



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ANA KAROLINE FERREIRA LEITE

**SUCO DE LARANJA POTENCIALMENTE PREBIÓTICO, SÍNTESE EM ESCALA
AMPLIADA E EFEITOS NA MICROBIOTA E NA EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS A INFLAMAÇÃO**

FORTALEZA

2024

ANA KAROLINE FERREIRA LEITE

SUCO DE LARANJA POTENCIALMENTE PREBIÓTICO, SÍNTESE EM ESCALA
AMPLIADA E EFEITOS NA MICROBIOTA E NA EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS A INFLAMAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Sueli Rodrigues.
Coorientadora: Dr^a. Thatyane Vidal Fonteles

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L55s Leite, Ana Karoline Ferreira.

Suco de laranja potencialmente prebiótico, síntese em escala ampliada e efeitos na microbiota e na expressão de genes relacionados a inflamação / Ana Karoline Ferreira Leite. – 2024.
106 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2024.

Orientação: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.

Coorientação: Profa. Dra. Thatyane Vidal Fonteles.

1. oligossacarídeos. 2. dextrana. 3. agitação. 4. microbiota. 5. inflamação intestinal. I. Título.

CDD 660

ANA KAROLINE FERREIRA LEITE

**SUCO DE LARANJA POTENCIALMENTE PREBIÓTICO, SÍNTESE EM ESCALA
AMPLIADA E EFEITOS NA MICROBIOTA E NA EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS A INFLAMAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Sueli Rodrigues (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Marciane Magnani
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Dr^a. Maria Cristiane Rabelo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr^a. Rhonyele Maciel da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Ana Célia e José Leite.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da sabedoria e por me guiar nesse caminho árduo.

Aos meus pais, Ana Célia e José Leite, pelo o apoio, amor, incentivo e por sempre acreditarem no meu potencial. Um agradecimento especial a minha mãe, pela luta diária, amor incondicional e paciência. Ao meu irmão, Nícolas, que sempre esteve ao meu lado nessa caminhada. Ao meu amor, André, obrigada por todo amor, companheirismo, paciência e por me encorajar sempre. Aos outros membros da família, que se fizeram presentes e ofereceram apoio.

Agradeço a professora Sueli, pela excelente orientação, incentivo e confiança. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado.

A Dra. Thatyane Fonteles, pela ajuda, sugestões e conselhos. Obrigada por desempenhar seu trabalho com tamanha excelência e ser um exemplo.

A professora Marciane Magnani, pela confiança e apoio na realização do doutorado sanduíche no Laboratório CarMeN (Lyon - França). Agradeço também aos pesquisadores doutores Hubert Vidal, Marie-Caroline Michalsky e Cécile Vors, pela excelente orientação durante o doutorado sanduíche no Laboratório CarMeN, assim como a toda a equipe e colegas do laboratório.

Agradeço fortemente a maravilhosa equipe LABIOTEC, especialmente a Elaine, Fátima, Brenda, Betina, Sannara, Cris e Rhony. Obrigada por todos os momentos compartilhados.

Aos meus amigos de intercâmbio, Raiza, Naju, Sarah, Thalyta, Pedro, Elisa, Tamara e Milena, sem vocês essa experiência jamais teria sido a mesma.

Aos demais amigos e colegas que contribuíram nessa etapa da minha vida.

Agradeço a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro por meio da concessão da bolsa de doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço também ao Programa de Internacionalização Print, fomentado pela CAPES. Assim como, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Frutos Tropicais (INCT-FT) pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço também a Universidade Federal do Ceará pela formação durante esses anos.

“O conhecimento é a base sólida sobre a qual
construímos nossos sonhos.” (Walt Disney).

ABSTRACT

The development of new prebiotic foods and their relationship with human health are topics that have been strongly explored. An option for producing prebiotic juices is the synthesis of these compounds directly in the juice. However, there is limited knowledge about scaling up this process and its potential beneficial effects at the intestinal level. Thus, using the enzyme dextranase, this work aimed to evaluate the effect of temperature and agitation on the synthesis of oligosaccharides and dextran in orange juice in increased volume, as well as the effect of the juice on the human intestinal microbiota composition, on epithelial barrier of Caco-2/TC7 intestinal cells and on expression of target genes. Aiming to achieve a better performance on the mixing system, especially the homogeneity of the medium and the carbohydrate diffusivity, the synthesis was conducted directly on the orange juice in magnetic and mechanical stirred reactors at 25 and 30 °C (MAG25, MEC25, MAG30 and MEC30) for 24 h. The juices produced were submitted to *in vitro* digestion, followed by fermentation by the colonic microbiota of two donors, one vegetarian (A) and the other omnivorous (B), under anaerobic conditions (37 °C/48 h). Finally, the effect of orange juice without (SL) and with oligosaccharides and dextran (SLP) was evaluated, before and after *in vitro* digestion (SLD and SLPD) on viability, transepithelial electrical resistance (TEER) and expression of genes related to inflammation (IL-8, TNF- α , NF- κ B-1 and COX-2), tight junctions (ZO-1) and sugar metabolism (GLUT-2, SGLT-1 and GLUT-5) in Caco-2/TC7 intestinal cells. The concentration of reducing sugars (AR) into the juice reduced at 25 °C, due to the use of RS in the production of oligosaccharides and dextran, and increased in syntheses conducted at 30 °C, an indication of hydrolysis. Furthermore, a higher concentration of oligosaccharides and dextran was identified in juices synthesized at 25 °C. In terms of agitation, magnetic agitation increased dextran synthesis, while the type of agitation did not interfere on the production of oligosaccharides at 25 °C/6 h. Despite the excellent results for MAG25, MEC25 was selected for next steps because mechanical stirred reactors are more suitable for large-scale production. The donors presented different profiles of oligosaccharide consumption and acid production, with rapid and complete consumption of oligosaccharides by donor B, in addition to high propionate accumulation. Oligosaccharides and dextran present in the digested juice were consumed by the human fecal microbiota of both donors, with consequent production of high concentrations of lactate and acetate, followed by butyrate, propionate and isobutyrate. The microbiota of donor A showed a high relative abundance of *Lactobacillus ruminis* (44.96%), while *Bifidobacterium adolescentis* was the main bacteria in the microbiome of donor B (41.73%) after 24 h. The abundance of beneficial microorganisms such as *Bacteroides xylanisolvens* was also favored by functional orange juice (6.08 and 8.52%), but a reduction in some species of *Clostridia* sp was observed. In Caco-2/TC7 cells, SLP increased cell viability and TEER values compared to SL. After digestion, SLPD reduced damage and structural losses in the cell layer compared to SLD. SLPD, at 1.25 % concentration, reduced the expression of inflammation-related genes and did not affect the expression of the ZO-1 gene. However, 2.5% SLPD increased the ZO-1 mRNA levels. No changes were observed on the expression of sugar transport-related genes. In this sense, orange juice containing oligosaccharides and dextran improved the composition and metabolic activity of the human colonic microbiota and may contribute to reducing intestinal inflammation and improving barrier function, being an alternative to the functional food market.

Keywords: oligosaccharides, dextran, agitation, microbiota, intestinal inflammation.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO GERAL	12
OBJETIVOS	14
1 CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 Prebióticos	15
1.1.1 <i>Síntese enzimática de oligossacarídeos e dextrana</i>	17
1.1.1.1 <i>Aumento de escala</i>	19
1.2 Digestão <i>in vitro</i>	21
1.3 Efeitos na microbiota intestinal	22
1.4 Modelo <i>in vitro</i> com células Caco-2/TC7	26
1.5 Suco de laranja	30
2 CAPÍTULO 2: EFEITO DA TEMPERATURA E AGITAÇÃO NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE OLIGOSSACARÍDEOS E DEXTRANA EM SUCO DE LARANJA	32
2.1 Introdução	32
2.2 Material e métodos	35
2.2.1 <i>Suco de laranja</i>	35
2.2.2 <i>Produção da enzima dextrana-sacarase</i>	35
2.2.3 <i>Atividade enzimática</i>	36
2.2.4 <i>Síntese de carboidratos prebióticos no suco de laranja em reator batelada agitado magneticamente</i>	36
2.2.5 <i>Síntese de carboidratos prebióticos no suco de laranja em reator agitado mecanicamente</i>	38
2.2.6 <i>Determinação de carboidratos</i>	38
2.2.6.1 <i>Açúcares simples e oligossacarídeos</i>	38
2.2.6.2 <i>Grau de polimerização dos oligossacarídeos</i>	39
2.2.7 <i>Análise estatística</i>	40
2.3 Resultados e discussão	40
2.3.1 <i>Consumo de sacarose durante a síntese</i>	40
2.3.2 <i>Evolução dos açúcares redutores durante a síntese</i>	41
2.3.3 <i>Produção de oligossacarídeos</i>	43

2.3.4 <i>Produção de dextrana</i>	45
2.4 <i>Conclusão</i>	50
3 CAPÍTULO 3: IMPACTO DE SUCO DE LARANJA CONTENDO INGREDIENTES POTENCIALMENTE PREBIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA E SEUS METABÓLITOS	
3.1 <i>Introdução</i>	52
3.2 <i>Material e métodos</i>	54
3.2.1 <i>Preparo do suco de laranja</i>	54
3.2.2 <i>Síntese de oligossacarídeos e dextrana no suco de laranja</i>	54
3.2.3 <i>Inóculo fecal</i>	55
3.2.4 <i>Digestão in vitro</i>	55
3.2.5 <i>Fermentação in vitro do suco digerido pela microbiota fecal humana</i>	56
3.2.6 <i>Análise da microbiota fecal</i>	56
3.2.7 <i>Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos</i>	57
3.2.7.1 <i>Oligossacarídeos e dextrana</i>	57
3.2.7.2 <i>Açúcares simples</i>	58
3.2.7.3 <i>Produtos da fermentação colônica</i>	58
3.2.8. <i>Análise estatística multivariada</i>	58
3.3 <i>Resultados e discussão</i>	59
3.3.1 <i>Resistência de carboidratos prebióticos e fermentação in vitro</i>	59
3.3.2 <i>Produção de ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)</i>	62
3.3.3 <i>Análise da microbiota intestinal</i>	64
3.4 <i>Conclusão</i>	71
4 CAPÍTULO 4: EFEITOS BENÉFICOS DE SUCO DE LARANJA POTENCIALMENTE PREBIÓTICOS NA BARREIRA EPITELIAL E NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO USANDO CÉLULAS INTESTINAIS HUMANAS CACO-2/TC7	
4.1 <i>Introdução</i>	73
4.2 <i>Material e métodos</i>	74
4.2.1 <i>Preparo do suco de laranja</i>	74
4.2.2 <i>Digestão in vitro</i>	75
4.2.3 <i>Análise de carboidratos</i>	76
4.2.3.1 <i>Oligossacarídeos e dextrana</i>	76
4.2.3.2 <i>Açúcares simples</i>	76

<i>4.2.4 Preparo da amostra</i>	77
<i>4.2.5 Cultura de células</i>	77
<i>4.2.6 Microscopia</i>	78
<i>4.2.7 Viabilidade celular</i>	78
<i>4.2.8 Resistência elétrica transepitelial (TEER)</i>	79
<i>4.2.9 Extração de RNA e PCR quantitativo (qPCR)</i>	79
<i>4.2.10 Análise estatística</i>	80
4.3 Resultados e discussão	80
<i>4.3.1 Açúcares simples, oligossacarídeos e dextrana em sucos de laranja</i>	80
<i>4.3.2 Microscopia</i>	81
<i>4.3.3 Teste de viabilidade XTT</i>	83
<i>4.3.4 Resistência elétrica transepitelial (TEER)</i>	85
<i>4.3.5 Expressão gênica</i>	86
4.4 Conclusão	92
CONCLUSÕES GERAIS	94
REFERÊNCIAS	95

INTRODUÇÃO GERAL

O mercado de alimentos funcionais tem evoluído fortemente nos últimos anos, principalmente devido à necessidade de estar sempre alinhado aos desejos dos consumidores. Para diversificar o setor alimentício, estratégias acerca de novas técnicas para elaboração de produtos vêm sendo desenvolvidas, das quais podem ser mencionadas a produção de alimentos com propriedades prebióticas (BEVILACQUA *et al.*, 2024). O conceito de prebióticos sofreu algumas modificações desde 1995, pois sua definição era restrita a carboidratos e funções intestinais. No entanto, devido ao reconhecimento da expansão de seus efeitos em outras partes do corpo e de outras categorias além dos alimentos, os prebióticos são atualmente classificados como substratos usados seletivamente por microrganismos hospedeiros conferindo benefícios à saúde (GIBSON *et al.*, 2017).

Os sucos de frutas funcionais têm se apresentado com uma boa opção para impulsionar o setor alimentício, especialmente por serem uma alternativa aos produtos de base láctea. Tendo em vista a boa aceitabilidade dos sucos, principalmente os cítricos, e sua composição rica em açúcares, ácidos orgânicos e compostos bioativos, essas bebidas têm sido reconhecidas como excelentes veículos de substratos prebióticos (SILVA *et al.*, 2020).

Os oligossacarídeos compõem o principal grupo de prebióticos adicionados ou sintetizados em sucos, sendo a via enzimática uma das mais exploradas por apresentar um maior rendimento, possibilitar a execução de um processo mais controlado e ser mais segura (AWASTHI *et al.*, 2022). Diante dessas vantagens, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido sucos de frutas potencialmente prebióticos pela ação direta da enzima dextran-sacarase (E.C.2.4.1.5), a qual sintetiza oligossacarídeos e dextrana a partir dos açúcares presentes no suco (DO NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022; LEITE *et al.*, 2021). Contudo, essas metodologias foram executadas em escala laboratorial.

Diante disso, a produção e comercialização de sucos prebióticos é uma forte tendência para alavancar as indústrias do ramo alimentício, aliados aos fatores benéficos à saúde dos consumidores. Assim, estudar o aumento de escala na produção de sucos prebióticos torna-se importante a nível industrial e social. Para tanto, conduzir um processo com aumento de volume demanda ajuste de alguns parâmetros, como agitação e tempo de processos, a depender do tipo de processo e produto desejado, além de outros parâmetros que não são critérios para ampliação de escala, tais como temperatura e pH. No caso específico da síntese enzimática de oligossacarídeos e dextrana, a temperatura e agitação são cruciais para o controle e desempenho ideal da reação, visto que, esses parâmetros estão relacionados a

estabilidade, atividade e seletividade da enzima, bem como a homogeneidade do meio reacional e melhoria da difusividade dos carboidratos (POTTRATZ; MÜLLER; HAMEL, 2022; RABELO; FONTES; RODRIGUES, 2011).

A escolha adequada das condições de processo favorece um maior rendimento e está diretamente ligada a qualidade do produto e suas propriedades funcionais. O principal critério para um produto ser considerado prebiótico é sua capacidade de ser fermentado pela microbiota colônica, favorecendo o crescimento seletivo de microrganismos benéficos e os efeitos que conferem à saúde (DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019). A partir disso, surge a importância de avaliar a interação desses ingredientes com a microbiota intestinal (AMORIM *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2020), preferivelmente submetidos previamente a digestão simulada (DA SILVA *et al.*, 2023; REGES *et al.*, 2023), além da busca de respostas positivas na saúde do hospedeiro que podem ser avaliadas por métodos *in vitro* com cultura de células. Apesar dos modelos com células Caco-2, que mimetizam o epitélio intestinal, já serem consolidados para o estudo de absorção de fármacos, compostos bioativos e alguns alimentos (LIAN *et al.*, 2023; PANSE; GERK, 2022; ROSELLI *et al.*, 2022), a literatura ainda não dispõe de estudos sobre o efeito de sucos prebióticos contendo gluco-oligosacarídeos e dextrana na barreira epitelial intestinal usando modelos *in vitro* com células Caco-2.

Dito isto, o presente trabalho aborda a produção de suco de laranja potencialmente prebiótico pela ação da enzima dextrana-sacarase e será apresentado na forma de capítulos, como descrito a seguir:

Capítulo 1: Nesta seção será apresentada uma revisão bibliográfica sobre os principais temas discutidos no decorrer do trabalho.

Capítulo 2: Este tópico discorre sobre o efeito dos parâmetros agitação e temperatura durante a síntese enzimática de oligossacarídeos e dextrana em suco de laranja, referente ao artigo científico “*Effect of temperature and agitation on the enzymatic synthesis of oligosaccharides and dextran in orange juice*”, publicado em 2023 na revista *Food Chemistry Advances* (DOI: 10.1016/j.focha.2023.100525).

Capítulo 3: Este capítulo refere-se ao artigo científico “*Impact of orange juice containing potentially prebiotic ingredients on human gut microbiota composition and its metabolites*”, publicado pela autora da tese na revista *Food Chemistry*, em 2022 (DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134706).

Capítulo 4: Esta última seção terá como abordagem o impacto do suco de laranja potencialmente prebiótico na barreira epitelial e na expressão de genes relacionados a

inflamação, junções estreitas e transporte de açúcares, usando um modelo com células intestinais humanas do tipo Caco-2/TC7.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito da temperatura e agitação durante a síntese enzimática de oligossacarídeos e dextrana no suco de laranja, pela ação da enzima dextrana-sacarase, bem como, o impacto do suco de laranja potencialmente prebiótico na composição da microbiota intestinal humana, na barreira epitelial de células intestinais Caco-2/TC7 e expressão de genes relacionados a inflamação, junções estreitas e transporte de açúcares.

Objetivos específicos

- Sintetizar oligossacarídeos e dextrana no suco de laranja;
- Estudar o efeito da agitação e temperatura durante a síntese no suco;
- Avaliar a digestibilidade dos carboidratos durante a simulação da digestão gastrointestinal;
- Avaliar o efeito do suco contendo oligossacarídeos e dextrana na composição da microbiota intestinal humana;
- Avaliar e quantificar os metabólitos ácidos proveniente do metabolismo da microbiota intestinal.
- Investigar o efeito do suco contendo oligossacarídeos e dextrana na viabilidade celular e na resistência da barreira epitelial de células intestinais Caco-2/TC7;
- Avaliar e quantificar a expressão de genes relacionados a inflamação, transporte de açúcares e junções estreitas usando modelo com células Caco-2/TC7.

CAPÍTULO 1

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Prebióticos

Os alimentos são fontes importantes de nutrientes e compostos bioativos, que devem atender as demandas do corpo, promover saúde e bem-estar, além de prevenir doenças relacionadas à nutrição (CILLA *et al.*, 2018). O mercado de alimentos funcionais tem se concentrado mais intensamente nos segmentos de prebióticos, probióticos e simbióticos, visando exercer efeitos benéficos à saúde do consumidor com foco na composição da microbiota intestinal (GRAND VIEW RESEARCH, 2022; SIDDIQUI *et al.*, 2023).

Esse enfoque na microbiota, impulsionou o conhecimento sobre microrganismos, que raramente eram conhecidos por seu papel positivo na saúde humana, mas sim como causadores de doenças. Diante das vantagens associadas aos alimentos funcionais, a procura e aceitação de probióticos e prebióticos vem crescendo exponencialmente, tendo sido previsto um crescimento de 14,9% do mercado de prebióticos de 2022 a 2030, o qual foi avaliado em US\$ 6,05 bilhões em 2021 (CUNNINGHAM *et al.*, 2021; GRAND VIEW RESEARCH, 2022).

O conceito de prebiótico vem sofrendo modificações ao longo do tempo, como consequência dos avanços nas pesquisas. Anteriormente, reconhecido como ingrediente alimentar que afeta benéficamente o hospedeiro, estimulando o crescimento e/ou atividade de um ou um número limitado de bactérias intestinais. Contudo, é definido atualmente como substrato que é usado seletivamente por micro-organismos hospedeiros conferindo benefícios à saúde (GIBSON *et al.*, 2017). Dentre os efeitos positivos oferecidos aos consumidores, destacam-se: promover a homeostase gastroenterológica, modulação da microbiota intestinal, prevenção ou cura de doenças associadas ao desequilíbrio da microbiota (disbiose), melhoram a motilidade intestinal, estimulam a resposta imune e, quando fermentados, induzem a produção de mucina pelos colonócitos e citocinas imunomoduladoras (KHUITUAN *et al.*, 2019; PANSAL *et al.*, 2020; YADAV *et al.*, 2022).

A importância biológica dos prebióticos deve-se a sua capacidade de serem fermentados e aos benefícios que conferem ao hospedeiro. Esse fato está vinculado aos metabólitos provenientes da fermentação colônica que resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), como acetato, butirato e propionato (BERGER *et al.*, 2021). Esses

metabólitos ácidos atuam em diferentes funções no organismo, protegendo a células epiteliais do intestino, regulando o pH do lúmen e tornando-o inadequado ao crescimento de patógenos. Além disso, atuam no metabolismo lipídico e glicêmico e apresentam atividade anti-inflamatória, dentre outras vantagens (CHENGXIAO *et al.*, 2021).

Os oligossacarídeos formam o principal grupo dos prebióticos e são formados por cadeias compostas entre 3 e 10 monômeros de carboidratos (SAINI *et al.*, 2022). Fruto-oligossacarídeos e galacto-oligossacarídeos são os principais oligossacarídeos comercialmente disponíveis. Porém, os pesquisadores tem se empenhado em produzir outros potenciais ingredientes funcionais a partir de diferentes substratos. Assim, mano-oligossacarídeos, xylo-oligossacarídeos, arabino-oligossacarídeos e glico-oligossacarídeos vem sendo reconhecidos por suas propriedades benéficas como prebióticos (AWASTHI *et al.*, 2022).

Para que esses oligossacarídeos sejam classificados como prebióticos devem atender alguns critérios: ser resistente às condições adversas do trato gastrointestinal (TGI), como acidez e ação de enzimas digestivas, estimular seletivamente o crescimento de micro-organismos probióticos, ser fermentado pela microbiota intestinal, conferir efeitos benéficos à saúde humana e ser quimicamente estável ao processamento de alimentos, incluindo o uso de tecnologias emergentes (BALTHAZAR *et al.*, 2022; GIBSON *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020).

Prebióticos podem ser encontrados diretamente na natureza em alimentos como aspargos, beterraba, alho, cebola (DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019). Além disso, algumas cascas de frutas, como banana, abacaxi e melância, e resíduos de sementes apresentam potencial como prebióticos ou possuem prebióticos em pequenas concentrações (AKTER *et al.*, 2022; BAMIGBADE *et al.*, 2022). Assim, diferentes vias são utilizadas para sua obtenção, das quais podemos mencionar a extração por hidrólise ácida (WIATER *et al.*, 2020), os processos microbiológicos, bem como os processos enzimáticos (SHARMA *et al.*, 2021).

Contudo, os métodos químicos, usados no processo de extração, apresentam algumas desvantagens associadas aos produtos secundários provenientes do processo, que podem ser nocivos aos consumidores. Em contrapartida, as técnicas enzimáticas são mais seguras para a formulação de alimentos funcionais (AWASTHI *et al.*, 2022).

1.1.1 Síntese enzimática de oligossacarídeos e dextrana

Nos últimos anos, tem sido observada uma forte tendência para a aplicação de enzimas na produção de ingredientes com potenciais propriedades prebióticas. Existe na literatura relatos de autores sobre a produção de oligossacarídeos pela ação das enzimas β -galactosidase (SABATER *et al.*, 2019), dextrana-sacarase (TINGIRIKARI; GOMES; RODRIGUES, 2017) e combinação de dextrana-sacarase e dextranase imobilizadas (SHARMA *et al.*, 2021).

A dextrana-sacarase é uma glicosiltransferase obtida pelo processo fermentativo da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* B-512F em meio de cultura tendo sacarose como fonte de carbono. A dextrana-sacarase atua hidrolisando a molécula de sacarose em glicose e frutose, em seguida as frações de glicose são unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,6 na cadeia principal, dando origem a molécula de dextrana (HASHEM *et al.*, 2018). É importante ressaltar que, o produto final dessa reação depende da composição do meio reacional. Quando além da sacarose, carboidratos aceptores (glicose, maltose e frutose) são adicionados ao meio, a enzima pode catalisar a síntese de oligossacarídeos prebióticos, bem como de dextrana. Essa reação é conhecida como reação do aceptor, assim na presença desses aceptores algumas unidades de glicose, provenientes da quebra da sacarose, são desviadas da cadeia de dextrana e se ligam ao aceptor, produzindo os oligossacarídeos prebióticos (ALMEIDA *et al.*, 2015).

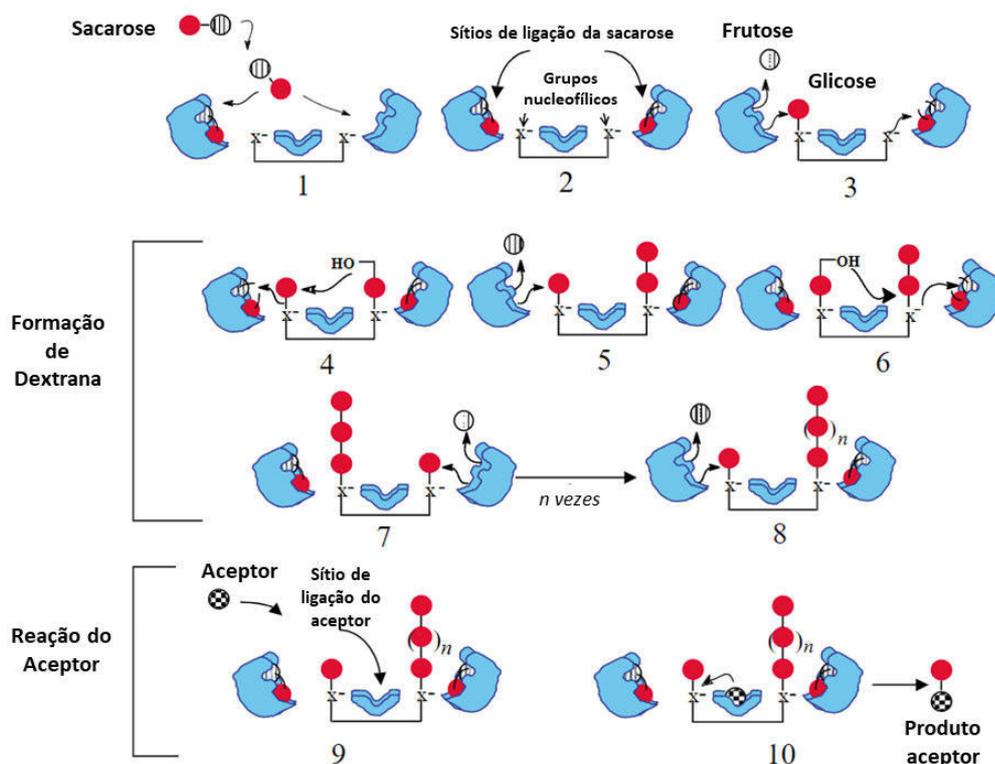
Existem na literatura alguns mecanismos para a síntese de oligossacarídeos e dextrana pela enzima dextrana-sacarase. Segundo PLOU *et al.* (2002), a enzima apresenta diferentes sítios ativos, sendo dois para a ligação da sacarose e um sítio de ligação para o aceptor, como mostrado na Figura 1. A transferência das unidades de glicose para produção de dextrana ocorre após a formação de dois complexos glicosil-enzima ligados covalentemente. A reação do aceptor é conduzida pelo ataque nucleofílico do grupo hidroxila presente na terminação não-redutora do aceptor ao carbono C-1 de um dos dois resíduos glicosil presentes nos complexos enzimáticos glicosil-enzima (ROBYT; KIMBLE; WALSETH, 1974).

À medida que as unidades de glicose vão sendo incorporadas aos aceptores, o grau de polimerização (GP) dos oligossacarídeos aumenta e quanto mais elevado o GP, maior a resistência da molécula às condições do TGI. O GP do oligossacarídeo juntamente com sua massa molar são características cruciais ao estudar as propriedades funcionais dessas moléculas, visto que a estrutura química está vinculada diretamente ao efeito causado ao

organismo, principalmente no que se refere à modulação da microbiota intestinal (HUANG *et al.*, 2020).

Esses carboidratos complexos sintetizados pela dextrana-sacarase são formados principalmente por ligações glicosídicas α -1,6, que são características da função prebiótica, ou seja, são resistentes à acidez estomacal e à ação de enzimas salivares e digestivas, além de serem metabolizados por micro-organismos probióticos (BARUAH; DEKA; GOYAL, 2017; FONTES *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2020).

Figura 1 - Mecanismo da síntese de oligossacarídeos prebióticos e dextrana pela enzima dextrana-sacarase



Fonte: PLOU *et al.* (2002)

Na literatura, vários autores relataram o efeito prebiótico dos oligossacarídeos, porém poucos estudos demonstraram as propriedades prebióticas da dextrana (KOTHARI; DAS; PATEL, 2014; KOTHARI; TINGIRIKARI; GOYAL, 2015). A dextrana é uma molécula biológica natural, biocompatível e biodegradável que apresenta diversas aplicações industriais, como gelificante, espessante, melhorador de textura e sabor (CHEN; HUANG; HUANG, 2020; WANG *et al.*, 2020b). Contudo, as pesquisas relacionadas ao seu potencial

prebiótico ainda são escassas.

Alguns autores avaliaram o potencial efeito prebiótico da dextrana de alta massa molar e observaram uma maior abundância relativa de *Bacteroides* e *Prevotella* e consequente produção de propionato. Com isso, a dextrana foi apontada como um ingrediente promissor que pode aportar benefícios à saúde (AMARETTI *et al.*, 2020). Nesse mesmo contexto, trabalhos mais recentes do nosso grupo de pesquisa foram desenvolvidos com o intuito de avaliar o potencial efeito da dextrana e oligossacarídeos sintetizados diretamente nos sucos de caju (LEITE *et al.*, 2021) e acerola (DO NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022) e confirmaram o efeito positivo desses carboidratos no crescimento de bactérias benéficas.

Por fim, a crescente busca por alimentos funcionais, principalmente os prebióticos, somados ao sucesso das pesquisas em desenvolver metodologias que possibilitem a produção destes em nível laboratorial, tem instigado as indústrias a se adequarem aos novos hábitos dos consumidores e diversificarem o mercado. Dessa forma, estudos que permitam a produção dos alimentos funcionais em grande escala devem ser realizados.

1.1.1.1 Aumento de escala

Os prebióticos apresentam um amplo espectro de aplicação, que varia entre a alimentação não só de humanos, como também de animais e atinge as indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Diante da demanda global por essa categoria de produto, torna-se necessário aprofundar os estudos voltados para a produção desses compostos funcionais em escala industrial (SAINI *et al.*, 2022). Aliado a isso, em comparação aos outros métodos de produção de prebióticos, a via enzimática é reconhecida por permitir um processo controlado, de fácil purificação, alta especificidade e adaptável ao *scale-up* (BUJNA *et al.*, 2022).

Embora a literatura disponha de inúmeros trabalhos acerca do desenvolvimento de alimentos potencialmente prebióticos, as reações são fundamentalmente conduzidas em pequenos volumes. BARUAH; DEKA; GOYAL (2017) produziram oligossacarídeos prebióticos em suco de abacaxi e manga pela ação da enzima dextrana-sacarase em 2 mL de meio reacional. BUJNA *et al.* (2022) sintetizaram oligossacarídeos por meio de uma preparação enzimática bruta em volume de 1 mL. Além disso, trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa também foram conduzidos em reatores de tamanho pequeno contendo 10 mL de suco de caju clarificado (DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014) e no caso da

produção de suco de acerola potencialmente prebiótico, as reações enzimáticas foram realizadas em Erlenmeyer contendo 25 mL de suco (ARAÚJO *et al.*, 2015).

Em contrapartida, a produção de mono-oligossacarídeos foi realizada em reator tanque agitado com aumento de escala, onde as condições de processo foram otimizadas de acordo com as variáveis concentração de enzima, temperatura e concentração de substrato (YILMAZER *et al.*, 2021). Considerando esses aspectos e almejando uma futura aplicação em nível industrial, um teste de aumento de escala na produção de suco de caju prebiótico, demonstrou a necessidade de controle do parâmetro agitação (LEITE *et al.*, 2021). Nesse estudo, a agitação permitiu uma maior produção de oligossacarídeos no suco de caju e esse aumento foi associado à redução dos problemas difusionais ao trabalhar com volumes maiores resultado da melhoria dos fenômenos de transferência de massa (POTTRATZ; MÜLLER; HAMEL, 2022).

Além da agitação, outras variáveis são imprescindíveis para o controle de processos biotecnológicos e principalmente quando há interesse em alavancar a produção para escala industrial. Destacam-se a concentração de substratos e moléculasceptoras, as condições de pH e temperatura, presença e velocidade de agitação, presença de oxigênio e tempo de processamento (DE LAMOTTE *et al.*, 2017). No que se refere à ação da enzima dextrana-sacarase, o fator temperatura apresenta um papel importante na atividade e estabilidade da enzima (RABELO; FONTES; RODRIGUES, 2011). Por outro lado, a agitação permite a homogeneização adequada do meio, favorecendo o contato dos substratos aos sítios ativos da enzima e produzindo oligossacarídeos e dextrana pelo mecanismo anteriormente elucidado.

Sendo a agitação uma variável crucial nos processos biotecnológicos, faz-se necessário avaliar o tipo de agitador e a velocidade que podem apresentar melhor desempenho e impulsionar a produção. Nesse contexto, foram avaliados dois tipos de agitação no presente trabalho, a agitação magnética e mecânica, tendo em vista que em maiores volumes, faz-se necessário o uso de agitadores mecânicos. Ademais, sabe-se que, os reatores tanque agitado são os mais utilizados em processos químicos e biológicos, devido a sua ampla gama de aplicação e boa performance (DE LAMOTTE *et al.*, 2017).

Diante do exposto, pode-se observar a relevância da otimização de processos que visa um maior rendimento do produto de interesse, e a possível produção em uma maior escala visando etapas futuras. Esse maior rendimento, aliado a manutenção das propriedades funcionais do produto final são os principais objetivos dessa pesquisa. Dessa forma, uma melhor abordagem em relação ao potencial efeito prebiótico do suco na composição da

microbiota intestinal, após digestão simulada, será abordada nos próximos tópicos.

1.2 Digestão *in vitro*

A simulação da digestão é um assunto que tem recebido atenção nos últimos anos e que vem sendo abordado em alguns trabalhos, principalmente pesquisas que envolvem alimentos funcionais e seus efeitos benéficos à saúde. Os ensaios de digestão *in vitro* são essenciais para uma avaliação mais concreta e realista dos fenômenos que ocorrem do trato gastrointestinal, possibilitando uma melhor compreensão de como a digestão simulada pode afetar o efeito prebiótico dos alimentos que são susceptíveis a modificações (GÓMEZ-GARCÍA *et al.*, 2022).

Dessa forma, foram desenvolvidas metodologias que permitissem estudar o comportamento dos alimentos e seus compostos ao longo do TGI. Embora existam algumas limitações ao simular os eventos fisiológicos e físico-químicos que ocorrem no trato gastrointestinal humano em comparação aos modelos *in vivo*, o material resultante dos ensaios de digestão *in vitro* apresentam as características semelhantes com o alimento digerido que atinge o cólon humano (MENEZES *et al.*, 2021).

Os modelos de digestão *in vitro* são a melhor alternativa para se obter esses resultados, pois permitem a simulação de condições gastrointestinais, que fornecem informações sobre alterações estruturais, digestibilidade e liberação de compostos presentes na matriz alimentícia, sem ir contra questões éticas, ocasionar constrangimentos técnicos, com menor custo e tempo quando comparados aos modelos *in vivo* (HUR *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2020; MÉNARD *et al.*, 2014; MINEKUS *et al.*, 2014).

A digestão simulada permite a avaliação das características dos alimentos durante as etapas da digestão - oral, gástrica e entérica, o que permite a obtenção de informações sobre a integridade, digestibilidade, biodisponibilidade e concentração da fração bioacessível de compostos. Esses métodos podem ser realizados sob condições estáticas, mas atualmente modelos dinâmicos têm sido desenvolvidos. Essas simulações levam em consideração a presença e concentração de enzimas digestivas, pH, temperatura, tempo de digestão, concentrações de sal, movimentos peristálticos e de mistura, entre outros fatores (BRODKORB *et al.*, 2019). Devido a importância de mimetizar o ambiente gastrointestinal, alguns modelos são desenhados com 3 a 5 compartimentos, possibilitando a replicação de vários órgãos humanos, como boca, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso (DIXIT *et al.*, 2023).

Nessa perspectiva, ensaios de digestão *in vitro* foram realizados como uma metodologia para confirmar a resistência de fruto-oligossacarídeos adicionados a alimentos, sugerindo um possível efeito na saúde intestinal (PEI *et al.*, 2023). Além disso, em outro estudo, a digestibilidade de oligossacarídeos obtidos enzimaticamente foi investigada antes de avaliar o potencial efeito prebiótico. Como resultado, verificou-se uma alta resistência dos ingredientes quando submetidos à acidez do suco gástrico e às condições dos fluidos intestinais (KUMAR; RAJULAPATI; GOYAL, 2020).

Com os avanços nos ensaios de digestão *in vitro*, experimentos com sucos de frutas funcionais foram ganhando espaço. Nesse contexto, alguns sucos potencialmente prebióticos, dos quais podemos mencionar os sucos de abacaxi, melão, laranja, acerola, caju e sapota-do-solimões, foram avaliados quanto a resistência às condições gastrointestinais, demonstrando que os oligossacarídeos presentes no suco foram resistentes à acidez estomacal e à ação de enzimas digestivas, o que revela seu potencial de atingir o cólon intacto, onde podem ser fermentados pela microbiota intestinal, promovendo efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (FONTES *et al.*, 2015). Recentemente, esses estudos têm sido conduzidos em sistemas semi-dinâmico, que consistem de reatores sequenciais com capacidade de 300 mL, os quais possibilitam a simulação das diferentes fases de digestão do trato gastrointestinal, seguido da fermentação com a microbiota fecal (DO NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022; LEITE *et al.*, 2021 e DA SILVA; CAMPELO; RODRIGUES, 2022).

Contudo, realizar ensaios de digestão *in vitro* antes da avaliação do efeito prebiótico é imprescindível para o presente estudo, pois nos permite obter informações importantes sobre a integridade dos oligossacarídeos e dextrana, bem como a concentração desses carboidratos que ficam disponíveis para serem usados como substrato pela microbiota colônica.

1.3 Efeitos na microbiota intestinal

A microbiota intestinal humana trata-se de um complexo ecossistema microbiano que, nos últimos anos, vem sendo fortemente investigada devido ao seu importante papel na saúde do hospedeiro. Esse ecossistema é composto por mais de 2000 espécies de bactérias, além dos eucariotos e arqueias (BALLAN *et al.*, 2020). Existem relatos na literatura que apontam cerca de 3000 mil espécies de bactérias, porém apenas 1000 tipos foram caracterizados por cultura de células, enquanto as remanescentes foram identificadas por técnicas de sequenciamento (HIIPPALA *et al.*, 2018).

Em termos de diversidade microbiana, a composição da microbiota dos indivíduos apresenta uma grande variabilidade associada a diferentes fatores, destacando-se a idade, estilo de vida, dieta, medicamentos, genética, entre outros (FAN; PEDERSEN, 2021). O tipo de dieta classifica os indivíduos principalmente como onívoros e vegetarianos, dos quais os onívoros consomem uma variedade de alimentos de origem animal e vegetal, incluindo carnes, produtos cárneos, peixe, laticínios, frutas, legumes, dentre outros alimentos, enquanto os vegetarianos consomem uma dieta que exclui carnes e produtos cárneos de qualquer animal, aves, frutos do mar e peixes, mas pode incluir ovos e laticínios a depender do tipo de vegetarianismo (TREFFLICH *et al.*, 2020).

Apesar das particularidades de cada organismo, aproximadamente 30% da população bacteriana são comuns aos hospedeiros. Assim, o microbioma humano é composto majoritariamente por *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, seguidos dos filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (HIIPPALA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2023a).

A promoção e manutenção de uma microbiota balanceada refletem no estado de saúde do hospedeiro e graças a isso esforços têm sido voltados para a descoberta de métodos que levem a modulação da comunidade microbiana intestinal. Uma microbiota saudável e equilibrada apresenta uma abundância de microrganismos benéficos, com destaque para os gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e gêneros associados, que compreendem espécies consideradas probióticas. Em contrapartida, o número de microrganismos patogênicos deve ser mínimo. É importante salientar que outros gêneros de microrganismos têm se mostrado promissores devido aos efeitos que conferem ao organismo e assim vem sendo comercializados como probióticos como *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Saccharomyces* (SARAO; ARORA, 2017). Com o avanço das pesquisas, principalmente referentes aos probióticos e prebióticos, outros gêneros de microrganismos tem recebido interesse como bactérias com propriedades benéficas e possíveis alvos para prebióticos, dentre eles podemos citar *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Roseburia*, *Ruminococcus* e *Eubacterium* (WANG *et al.*, 2020a).

O desequilíbrio da microbiota, também conhecido como disbiose, pode ser ocasionado pela ingestão de antibióticos que podem reduzir a diversidade microbiana e o número de microrganismos benéficos (HUMPHREYS, 2020). Condições como essas podem promover desordens no corpo humano, o que leva a casos de inflamação e disfunção da barreira intestinal (HIIPPALA *et al.*, 2018). Nesse sentido, o enfoque em compreender a interação entre compostos e a microbiota intestinal tem se tornado crescente.

A capacidade da microbiota ser suplementada e modulada despertou os estudos principalmente para prebióticos, devido às suas propriedades de selecionar e melhorar a colonização de bactérias probióticas. Autores relataram a capacidade de cepas de *Bifidobacterium* metabolizar carboidratos, como oligossacarídeos, e favorecer a colonização intestinal desse gênero, bem como de outros microrganismos intestinais. Esse mecanismo ocorre por meio de interações metabólicas cooperativas, onde o metabolismo das bifidobactérias produz substâncias e um ambiente favorável a multiplicação de bactérias produtoras de butirato, por exemplo (LUO *et al.*, 2021).

Bifidobacterium adolescentis, uma espécie de suma importância, é capaz de metabolizar fruto-oligossacarídeos de baixo grau de polimerização, oligossacarídeos de grau de polimerização entre 3 e 6, inulina e xilose. De modo geral, as bifidobactérias apresentam um papel importante na regulação da microbiota intestinal, no metabolismo glicolipídico, prevenindo doenças como obesidade, diabetes, aterosclerose e alivia os sintomas de colite ulcerativa e doença de Crohn (WANG *et al.*, 2022).

Algumas bactérias comensais apresentam efeitos anti-inflamatórios e contribuem para a homeostase intestinal por meio de substâncias secretadas durante o metabolismo. Além disso, espécies classificadas como probióticos de próxima geração, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* e *Eubacterium hallii* promovem efeitos anti-inflamatórios devido a interação com fibras dietéticas. Esse fenômeno resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta, que atuam como fonte de energia para os enterócitos (HIIPPALA *et al.*, 2018).

As interações entre carboidratos prebióticos e probióticos podem apresentar efeitos sinérgicos ou antagônicos nas funções intestinais, visto que a variação genética de cada espécie confere diferentes habilidades para metabolizar os substratos. Aliado a isso, nem todas as fibras dietéticas resistentes ao trato digestivo são usadas como fonte de energia pelos probióticos devido às propriedades estruturais da molécula, como grau de polimerização, grau de substituição, ordem molecular e modificações químicas de grupos funcionais (WANG *et al.*, 2022).

Os fenômenos discutidos até o momento justificam o efeito prebiótico de alguns alimentos. Nos oligossacarídeos e dextrana essas propriedades devem-se principalmente composição das moléculas em termos de ligações glicosídicas, composição de carboidratos simples e comprimento da cadeia. As ligações glicosídicas α -1,6 presentes nesses carboidratos complexos não são clivadas por enzimas digestivas, porém são responsáveis pelo efeito

prebiótico devido a capacidade de serem quebradas por enzimas produzidas por micro-organismos intestinais benéficos (WANG *et al.*, 2020a).

A promoção do ambiente intestinal equilibrado e saudável associados ao consumo de prebióticos também pode ser explicado devido a presença de proteínas enzimáticas na membrana ou parede celular dessas bactérias. Essas proteínas exercem um papel importante na adesão desses micro-organismos ao trato intestinal e são responsáveis pelo catabolismo de açúcares e pela degradação de vários carboidratos complexos (XU *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2017). Os principais gêneros de bactérias benéficas contêm genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos complexos, por exemplo algumas glicosil hidrolases como oligo-1,6-glicosidase e α -glicosidases. Aliado a isso, no genoma de lactobacilos também foi evidenciada a presença de genes que codificam produtos relacionados à resistência ácida e biliar, o que permite o metabolismo dos carboidratos prebióticos. Diante do exposto, observa-se a importância de estudar o genoma microbiano, visto que o conteúdo gênico pode refletir na adaptação do micro-organismo ao TGI humano (POKUSAEVA; FITZGERALD; VAN SINDEREN, 2011; WANG *et al.*, 2020a).

Novas formulações de alimentos adicionadas de componentes prebióticos vem sendo recentemente estudadas com o intuito de avaliar as modificações causadas por esses ingredientes na microbiota intestinal. PEI *et al.*, (2023) estudaram o efeito da adição de fruto-oligossacarídeos em arroz cozido na microbiota intestinal e observaram um aumento no número de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, com redução de *Bacteroides* e *Klebsiella*.

Além disso, WANG *et al.* (2023) avaliaram o impacto de suco de beterraba na modulação da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, bem como a associação entre os metabólitos e as mudanças da microbiota recorrentes da fermentação do suco de beterraba no intestino. Assim, foi constatado um aumento na abundância de *Bifidobacterium*, *Coprococcus* e *Akkermansia muciniphila*, com redução de *Ruminococcus* e *Bacteroides fragilis*, o que comprova a capacidade modulatória dessa bebida rica em bioativos na microbiota de indivíduos e sugere a presença de componentes de função prebiótica no suco de beterraba.

Dito isto, torna-se importante estudar o efeito do suco produzido nesse trabalho na composição da microbiota intestinal, para assim confirmar as indicações de suas propriedades prebióticas. Nesse mesmo âmbito, modelos baseados na cultura de células também são considerados relevantes para a obtenção de respostas sobre o efeito de prebióticos na saúde.

1.4 Modelo *in vitro* com células Caco-2/TC7

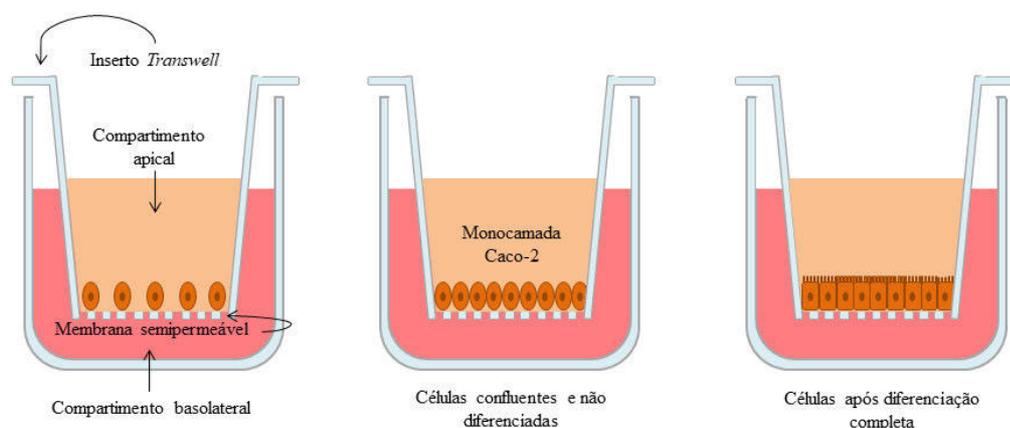
Simular os processos biológicos que se sucedem no organismo humano é um grande desafio que tem sido deslindado com êxito graças as avançadas técnicas de cultura de células. Em virtude da extrema importância das funções fisiológicas, o trato intestinal tem sido alvo de pesquisa no ramo na ciência de alimentos e nutrição, especialmente pelo uso de modelos celulares que avaliam a interação entre alimento e intestino (DING *et al.*, 2021).

No intestino delgado humano, o epitélio é caracterizado pela presença de criptas e vilosidades que se estendem da mucosa ao lúmen intestinal e desempenha um papel crucial nos mecanismos de absorção de nutrientes (LEA, 2015a). Em meio aos diferentes tipos de células que compõem a camada epitelial, das quais podemos mencionar os enterócitos, células caliciformes, células de Paneth e células enteroendócrinas, os enterócitos recebem notoriedade devido a sua função absorptiva (PETERSON; ARTIS, 2014).

Dito isto, a linhagem celular Caco-2, originalmente isolada de adenocarcinoma de cólon humano em 1977 por FOGH; FOGH; ORFEO, (1977) é amplamente reconhecida por sua aplicabilidade em sistemas de transporte e absorção de fármacos e nutrientes. As células Caco-2 são capazes de sofrer diferenciação espontânea e começam a polarizar, formando uma monocamada celular, com junções fortes e estreitas, bordas em escova apicais e microvilosidades, que expressa diversas características morfológicas e funcionais dos enterócitos do intestino delgado (KUS; IBRAGIMOW; PIOTROWSKA-KEMPISTY, 2023; LEA, 2015b). Geralmente, as células Caco-2 são cultivadas em placas com insertos *Transwell*, que consiste em dois compartimentos, apical e basolateral. O compartimento apical representa o lúmen intestinal, onde as substâncias entram em contato com o epitélio, e o compartimento basolateral contém a substâncias que foram absorvidas ou transportadas através da camada epitelial intestinal. Nesses modelos, as células são cultivadas do lado apical até atingir a confluência, seguido do processo espontâneo de diferenciação, totalizando um período de 21 dias de cultivo até a completa diferenciação, conforme ilustrado na Figura 2 (LEA, 2015a, 2015b).

Além das principais aplicações direcionada aos mecanismos de absorção e transporte de nutrientes, os modelos com Caco-2 também são usados para investigar o impacto de moléculas funcionais na barreira intestinal (ZHENG *et al.*, 2022), no sistema imune (ŠULIGOJ *et al.*, 2020) e na adesão de microrganismos ao epitélio intestinal (KONG *et al.*, 2020).

Figura 2 - Processo de diferenciação de células Caco-2 cultivadas em placas com insertos de culturas de células *Transwell*.



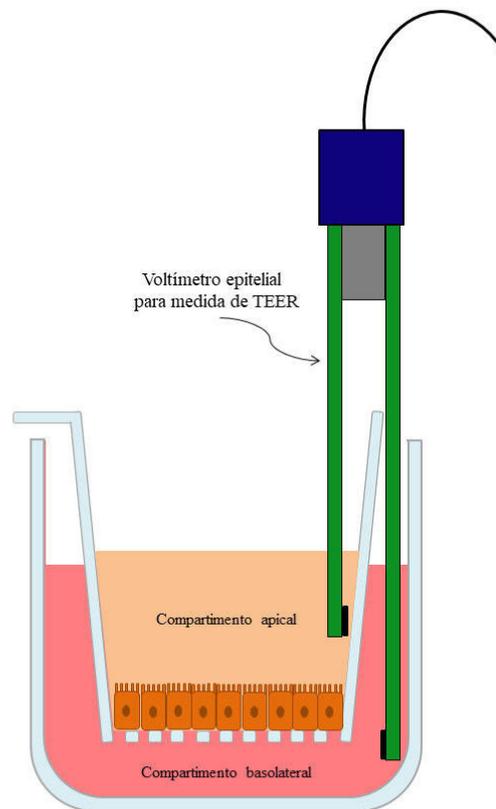
Fonte: Elaborado pela autora com adaptações de Lea (2015a).

A monocamada celular de Caco-2 apresenta características estruturais que permite a avaliação das principais vias de absorção: a difusão passiva transcelular e paracelular, transporte ativo mediado por transportadores e transporte facilitado (PANSE; GERK, 2022). A via paracelular é mediada por proteínas de junções estreitas, reconhecidas pela capacidade de formar uma barreira responsável pela difusão intercelular. Nesse complexo juncional, destacam-se as claudinas, ocludinas, zonula ocludentes-1 (ZO-1) e moléculas de adesão juncional (LOPEZ-ESCALERA; WELLEJUS, 2022; SHIRAI *et al.*, 2022). Desse modo, na atual pesquisa, destacamos ZO-1, uma proteína estrutural crítica que desempenha um papel crucial na manutenção da integridade da barreira intestinal e regulação da função de barreira (LIAN *et al.*, 2023).

A estrutura e integridade da barreira epitelial estão intrinsecamente ligados a saúde e homeostase intestinal. Nesse contexto, danos estruturais à monocamada celular exercem um impacto adverso na permeabilidade, o que favorece a passagem de microrganismos e moléculas indesejáveis. Isso, por sua vez, desencadeia uma resposta imune desregulada, resultando em inflamação (LAURINDO *et al.*, 2023). A avaliação da integridade e da permeabilidade das monocamadas epiteliais é frequentemente realizada por meio da medição da resistência elétrica transepitelial (TEER), a qual reflete a condutância iônica da via paracelular em modelos de cultura celular de monocamadas epiteliais (SRINIVASAN *et*

al., 2015). As medições de TEER são realizadas com o auxílio de um voltímetro composto por dois eletrodos, onde o eletrodo mais curto deve ser colocado no compartimento apical (região superior) e o outro eletrodo no compartimento basolateral (região inferior), conforme ilustrado na Figura 3 (LEA, 2015a).

Figura 3 - Representação da medida de resistência elétrica transepitelial (TEER) por um voltímetro composto por dois eletrodos.



Fonte: Elaborado pela autora com adaptações de Lea (2015b).

Diante do exposto, é importante salientar que, a medida de TEER somada a análise de expressão de proteínas e genes relacionados às junções estreitas, como ZO-1, proporcionam respostas sobre a integridade e resistência da barreira.

Com base nesses conhecimentos, estudos acerca do uso de modelos *in vitro* com Caco-2 vem sendo conduzidos a fim de avaliar o potencial benéfico de carboidratos complexos no epitélio intestinal. SHIRAI *et al.* (2022) buscaram analisar a permeabilidade intestinal de oligossacarídeos obtidos a partir de ágar em células Caco-2 e identificaram a

capacidade dos oligossacarídeos atravessarem a monocamada celular pela via paracelular e atingirem a corrente sanguínea. Além disso, uma pesquisa sobre a adição de oligossacarídeos pécnicos a fórmulas infantis também usou células Caco-2 como modelo de permeabilidade para investigar a absorção de produtos de glicação avançada (ZHU *et al.*, 2022).

Nessa mesma perspectiva, modelos com células epiteliais Caco-2 também foram utilizados para demonstrar que fruto-oligossacarídeos modificam a expressão de genes relacionados as junções apertadas, mostrando a habilidade dessas moléculas melhorarem expressão de genes que fortalecem as junções estreitas (HARASAWA; ISHIYAMA; MOCHIZUKI, 2023).

Além dos modelos com células parentais Caco-2, o uso do clone Caco-2/TC7, isolado das células Caco-2 em passagem tardia, vem sendo utilizado para simular as propriedades do intestino delgado. Os modelos apresentam algumas semelhanças morfológicas, incluindo a presença de borda em escova, microvilosidades e junções estreitas. Adicionalmente, o clone TC7 destaca-se frente as células parentais pelo: maior desenvolvimento da borda em escova e das junções intercelulares, formação de uma monocamada mais homogênea, maior atividade metabólica e maior expressão de transportadores (GRÈS *et al.*, 1998).

Desse modo, a literatura dispõe de trabalhos que discorrem sobre a absorção e permeabilidade intestinal de compostos usando os clones Caco-2/TC7, além de estudar a expressão de genes relacionados a TJ e inflamação, e a secreção de citocinas inflamatórias, como Interleucina-8 (IL-8) (MILARD *et al.*, 2019; VINCENT *et al.*, 2020). Perante o exposto e por estar alinhado com um dos objetivos dessa tese, enfatizamos a pesquisa idealizada por ROSELLI *et al.* (2022), a qual investigou o impacto de galacto-oligossacarídeos (GOS) em células Caco-2/TC7 com foco na atividade anti-inflamatória dos oligossacarídeos. As descobertas revelaram que GOS não afetam a permeabilidade da monocamada celular, reduzem a secreção de citocinas pro-inflamatória (IL-8, IL-6 e TNF- α) e inibem as proteínas envolvidas na via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B).

Sendo assim, a hipótese é que o modelo celular Caco-2 seja ideal para avaliar o efeito de suco de laranja contendo oligossacarídeos e dextrana na integridade da barreira intestinal, bem como na expressão de genes associados a inflamação (IL-8, TNF- α , NF- κ B e COX-2), junções estreitas (ZO-1) e transporte de açúcares (GLUT-2, SLGT-1 e GLUT-5).

Para finalizar a abordagem dos principais assuntos dessa pesquisa, uma breve descrição da matriz alimentícia usada será apresentada a seguir.

1.5 Suco de laranja

O bem-estar e a saúde são os principais anseios dos atuais consumidores. Uma escolha adequada para alcançar um estilo de vida saudável é uma dieta rica em frutas e vegetais. Esses alimentos além de nutrir, têm sido utilizados para fins terapêuticos e na prevenção de doenças como: câncer, diabetes, obesidade, ataques cardíacos, entre outras (AGUILERA; MARTIN-CABREJAS; GONZÁLEZ DE MEJIA, 2016; HEATH *et al.*, 2022). Paralelo a isso, um baixo consumo de frutas e vegetais vem sendo considerado um alto fator de risco para câncer gástrico (FERRO *et al.*, 2020).

As frutas cítricas são conhecidas e consumidas mundialmente tanto na forma natural como processada. As frutas cítricas apresentam como diferencial o perfil de sabor doce e moderadamente azedo, com destaque para a laranja (YUASA *et al.*, 2021). Aliado a isso, a demanda por sucos de frutas tem apresentado um considerável crescimento, pois a população busca alimentos práticos e naturais, com qualidade nutricional e sensorial (RODRÍGUEZ *et al.*, 2017).

O suco de laranja é uma das bebidas mais consumidas no mundo e sua alta aceitabilidade é justificada pelo seu alto valor nutricional e composição rica em açúcares (glicose, frutose e sacarose), ácidos orgânicos (cítrico e málico), minerais, aminoácidos, polifenóis, carotenoides e um alto conteúdo de vitamina C (ALMEIDA *et al.*, 2015, 2017; ANVARIAN; SMITH; OVERTON, 2018). Outrossim, o consumo de suco de laranja atua reduzindo os fatores de síndrome metabólica, distúrbios neurológicos, alguns tipos de câncer e apresenta efeito antioxidante (CASTELLO *et al.*, 2020; YUASA *et al.*, 2021).

Os sucos de frutas cítricas têm se destacado no mercado de alimentos devido a sua habilidade de atuar como carreadores de componentes como probióticos e prebióticos. Além de diversificar o mercado de alimentos funcionais, esses produtos alcançam um público mais restrito que busca por alimentos alternativos aos de base láctea. À vista disso, o aumento do desenvolvimento de novos produtos à base de frutos, bem como do seu consumo, implica diretamente na saúde e bem estar da sociedade (MONTEIRO; DE OLIVEIRA; PASQUALI, 2022).

Trabalhos acerca da elaboração de sucos de frutas com propriedades funcionais já foram reportados na literatura (FONTELES; RODRIGUES, 2018; TINGIRIKARI; GOMES; RODRIGUES, 2017). Alguns autores relataram que o suco de laranja se mostra como um veículo adequado para a ingestão de micro-organismos probióticos, pois apresenta nutrientes benéficos como vitaminas, fibras e antioxidante, podendo conferir efeitos benéficos à saúde

do consumidor (FERREIRA *et al.*, 2019). Ademais, o suco de laranja também é considerado um sistema modelo ideal para a adição direta de componentes prebióticos como xilooligosacarídeos (SILVA *et al.*, 2020).

Outra opção viável de diversificação do mercado é a elaboração de sucos prebióticos por meio da síntese enzimática conduzida pela enzima dextrana-sacarase. Nosso grupo de pesquisa produziu com sucesso sucos funcionais de diferentes frutas, dentre elas caju (DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014), acerola (DO NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022), melão, abacaxi e laranja (ALMEIDA *et al.*, 2015; FONTES *et al.*, 2015).

Diante das vantagens acima citadas, a matriz alimentícia escolhida nesse estudo foi o suco de laranja, principalmente por ser considerado um interessante carreador de prebiótico.

CAPÍTULO 2

2 EFEITO DA TEMPERATURA E AGITAÇÃO NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE OLIGOSSACARÍDEOS E DEXTRANA EM SUCO DE LARANJA

Resumo

A produção de sucos de frutas prebióticos tem sido amplamente investigada, principalmente pela via enzimática. Porém, não existem estudos envolvendo reatores agitados e considerando outros parâmetros importantes. Assim, este trabalho avaliou o efeito da temperatura e da agitação na síntese de oligossacarídeos e dextrana em suco de laranja utilizando dextranase. As sínteses em suco de laranja foram realizadas em reatores batelada agitados magneticamente e mecanicamente a 25 (MAG25, MEC25) e 30 °C (MAG30, MEC30) por 24 h. Uma baixa concentração final de sacarose foi observada em 6 h para sínteses com agitação magnética e menores temperaturas. A concentração de açúcar redutor diminuiu a 25 °C e aumentou à 30 °C ao longo do processo. Os resultados mostraram uma maior produção de oligossacarídeos e dextrana a 25 °C. A agitação magnética (MAG) favoreceu a síntese de dextrana em relação à agitação mecânica (MEC), sob a mesma temperatura. MAG25 e MEC25 levaram a produção de oligossacarídeos em concentrações com 6 h de reação. Diante do exposto, embora MAG25 e MEC25 tenham sido as melhores condições para sintetizar oligossacarídeos e dextrana em suco de laranja, MEC25 é mais adequado e viável para produção em larga escala.

Palavras-chave: Dextrana; oligossacarídeos; reator batelada; agitação; reatores de vidro encamizados

2.1 Introdução

Carboidratos prebióticos são substratos metabolizados seletivamente por microrganismos do hospedeiro, conferindo benefícios à saúde (CHAVAN *et al.*, 2023; GIBSON *et al.*, 2017). Dos quais podemos citar como exemplo, os oligossacarídeos e dextrana sintetizados pela enzima dextranase produzida por *Leuconoctoc mesenteroides*, que são considerados carboidratos potencialmente prebióticos (LEITE *et al.*, 2023; KOTHARI & GOYAL, 2013; LEITE *et al.*, 2021). Oligossacarídeos são carboidratos

com cadeia curta, usualmente formadas com 3 a 10 unidades de monossacarídeo, onde cada porção de açúcar corresponde a um grau de polimerização (GP). Contudo, polímeros de carboidratos com GP entre 2 e 20 também podem ser classificados como oligossacarídeos (BARRETEAU *et al.*, 2006; ZENG *et al.*, 2023). Os oligossacarídeos prebióticos tanto podem ser encontrados naturalmente nos alimentos, como podem ser obtidos seguindo diferentes vias, das quais podemos mencionar os processos microbianos, auto-hidrólise, catálise ácida e básica, hidrólise enzimática e síntese enzimática (CANO *et al.*, 2020; CHAVAN *et al.*, 2023). Não obstante, as rotas químicas e de auto-hidrólise apresentam limitações no controle do GP das moléculas, além dos elevados custos na recuperação do produto. Como alternativa, o processo enzimático tem sido relatado como ecologicamente correto, uma vez que dispensa o uso de produtos químicos e pode ser conduzido em temperaturas moderadas (PRECUP *et al.*, 2022).

A síntese enzimática possibilita a execução de um bioprocessamento mais controlado, acompanhado de um maior rendimento na síntese de polímeros de carboidratos (Wang *et al.*, 2023b; Zeng *et al.*, 2023). Dito isso, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido alguns sucos potencialmente prebióticos usando a enzima dextrana-sacarase (E.C.2.4.1.5) de *Leuconostoc mesenteroides* B512 F (DA SILVA *et al.*, 2014; FONTES *et al.*, 2015; LEITE *et al.*, 2021). Como principal produto, a dextrana-sacarase sintetiza dextrana a partir da sacarose, porém, em meios reacionais contendo outros açúcares, como glicose e frutose, que atuam como aceptores, a síntese é desviada para a rota de produção de oligossacarídeos. Desse modo, o produto final dessa reação trata-se de uma mistura de glico-oligossacarídeos e dextrana, que são moléculas resistentes ao trato gastrointestinal superior e consumidos seletivamente por microrganismos probióticos (LEITE *et al.*, 2021). Assim, tendo em vista a composição dos sucos de frutas que são ricos em açúcares, como glicose, frutose e sacarose, essas matrizes alimentícias são ideais para a produção e ingestão de prebióticos. Além disso, a síntese de carboidratos prebióticos no suco traz uma vantagem adicional, pois não necessita de processamento posterior após a síntese do biopolímero. Entretanto, poucos trabalhos exploraram a dextrana como carboidrato potencialmente prebiótico (DO NASCIMENTO *et al.*, 2022; LEITE *et al.*, 2021).

Nos estudos anteriores, as condições de síntese foram estabelecidas e otimizadas para reatores bateladas com capacidade de pequeno volume (100 mL) sem considerar parâmetros como a agitação. Contudo, o volume de reação pode afetar o rendimento e a concentração de cada componente do produto final (POTTRATZ *et al.*, 2022). Considerando isso, estudos preliminares não publicados demonstraram que a concentração de

oligossacarídeos diminui quando a síntese é conduzida com maiores volumes (1 a 2L) em sistemas estáticos (sem agitação). Isso ocorre pois apesar do pH e da temperatura serem os principais parâmetros que afetam as reações enzimáticas, o aumento de volume em sistemas estáticos pode se tornar inviável devido à resistência do meio à transferência de massa e às limitações de difusão conferidas pela alta viscosidade da dextrana sintetizada (LEITE, 2020).

No atual contexto, onde a produção industrial de alimentos prebióticos é de interesse tanto para o mercado de alimentos funcionais e como para a sociedade, torna-se essencial intensificar as pesquisas relacionadas aos parâmetros de processos visando obter um alto rendimento de prebióticos. Nessa busca por melhores condições industriais, algumas estratégias propostas incluem a imobilização de enzimas em reatores de membrana (POTTRATZ *et al.*, 2022) e imobilização covalente de enzimas (DA SILVA *et al.*, 2019). Contudo, a imobilização de dextrana-sacarase apresenta limitações de transferência devido a presença e tamanho da cadeia de dextrana, além das limitações dos biocatalisadores em relação ao número de ciclos (batelada).

Os reatores de tanque agitado, operados em batelada, são utilizados industrialmente em processamento químico e biológico devido ao seu desempenho e ampla gama de condições operacionais disponíveis. (DE LAMOTTE *et al.*, 2017). Aliado a isso, algumas variáveis são cruciais para o controle do processo e altos rendimentos, como concentração adequada de substrato e aceptores, presença e velocidade de agitação, valores de pH, tempo e temperatura. A temperatura, por exemplo, pode alterar o caminho da reação, melhorando a produção de um produto final específico, além de seu efeito estar associado à estabilidade e atividade da dextrana-sacarase no meio reacional (RABELO *et al.*, 2011). As baixas temperaturas proporcionam um aumento na especificidade e rendimento pela dextrana-sacarase devido ao aumento da razão de síntese/hidrólise nessas condições mais brandas (DAUM & BUCHHOLZ, 2002). Paralelamente, a velocidade e tipo de agitação desempenham um papel essencial na complexa síntese de carboidratos, principalmente para solucionar as limitações difusionais e melhorar a transferência de massa no processo (POTTRATZ *et al.*, 2022).

Atualmente, os sucos prebióticos sintetizados pela dextrana-sacarase descritos na literatura, incluindo o suco de laranja, foram produzidos em volumes reduzidos sem considerar fatores críticos que poderiam melhorar a eficiência do processo (ALMEIDA *et al.*, 2015; FONTES *et al.*, 2015; TINGIRIKARI *et al.*, 2017). O suco de laranja apresenta-se como uma matriz adequada para a produção e veiculação de carboidratos prebiótico, sendo

reconhecida como uma das fontes mais importantes de compostos bioativos e açúcares (ANVARIAN *et al.*, 2018).

Diante do exposto, a transferência de massa não afeta significativamente as reações de síntese com enzimas livres em volumes menores. Contudo, em volumes maiores, a transferência de massa torna-se um fator crítico. Portanto, a agitação poderia aumentar a eficiência da reação do acceptor da dextrana-sacarase em volumes maiores, melhorando a transferência de massa e mitigando as limitações de difusão. Nessa perspectiva, este trabalho teve como objetivo compreender o efeito da temperatura e de dois diferentes tipos de agitação, magnética e mecânica, na síntese de dextrana e oligossacarídeos em suco de laranja.

2.2 Material e Métodos

2.2.1. Suco de laranja

O suco foi preparado a partir do suco de laranja (*Citrus sinensis* L.) concentrado (Lanjal®), obtido do mercado local. O suco concentrado foi diluído em água potável (1:8 v/v), como descrito pelo fornecedor.

2.2.2. Produção da enzima dextrana-sacarase

A enzima dextrana-sacarase (E.C.2.4.1.5) foi produzida pelo processo fermentativo da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F em reator batelada alimentada. Para a produção da enzima, fez-se o uso de um meio composto por sacarose (50 g/L - grau alimentício), extrato de levedura (20 g/L - Himedia); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,20 g/L), $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ (0,01 g/L), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01 g/L), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,02 g/L), NaCl (0,01 g/L) e K_2HPO_4 (20 g/L - anidro). A fermentação foi realizada em reator batelada de 4 L, com controle de temperatura a 30 °C, pH a 6,5 (\pm 0,1), agitação mecânica de 150 rpm e aeração de 0,5 L/min. Para o controle de pH e dos níveis de sacarose no meio de cultura, o reator foi alimentado com NaOH (120 g/L) e sacarose (300 g/L). Após 6 h, a vazão de alimentação foi interrompida e o pH do meio reduziu até 5,2 quando o processo foi finalizado. As células foram removidas por centrifugação a 11600 g a 4° C durante 10 min, usando uma centrífuga Sigma 6 K-15. A enzima foi recuperada por precipitação com polietilenoglicol (PEG 1500, 50% v/v) e posteriormente diluída em 200 mL de tampão acetato de sódio (20 mM) contendo 0,05 g/L de

CaCl₂ e pH ajustado para 5,2. A enzima produzida apresentou atividade de 90 UI/mL (DA SILVA *et al.*, 2014; FONTES *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2019, 2020).

2.2.3. Atividade enzimática

A medida de atividade da dextrana-sacarase está relacionada à quantidade de frutose liberada da molécula de sacarose quando a porção glicose é polimerizada na cadeia de dextrana. Desse modo, a frutose foi quantificada pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959). Uma solução de sacarose a 10% (p/v), diluída em tampão acetato de sódio 20 mM contendo 0,05 g/L de CaCl₂ a pH 5,2, foi utilizada como substrato na reação (Heincke *et al.*, 1999). O ensaio de atividade enzimática foi realizado a 30 °C/10 min. Os resultados foram expressos como unidade internacional (UI/mL), e corresponde à quantidade de enzima que libera 1 μmol de frutose a partir de sacarose por minuto (Tanriseven & Doğan, 2002).

2.2.4 Síntese de carboidratos prebióticos no suco de laranja em reator batelada agitado magneticamente

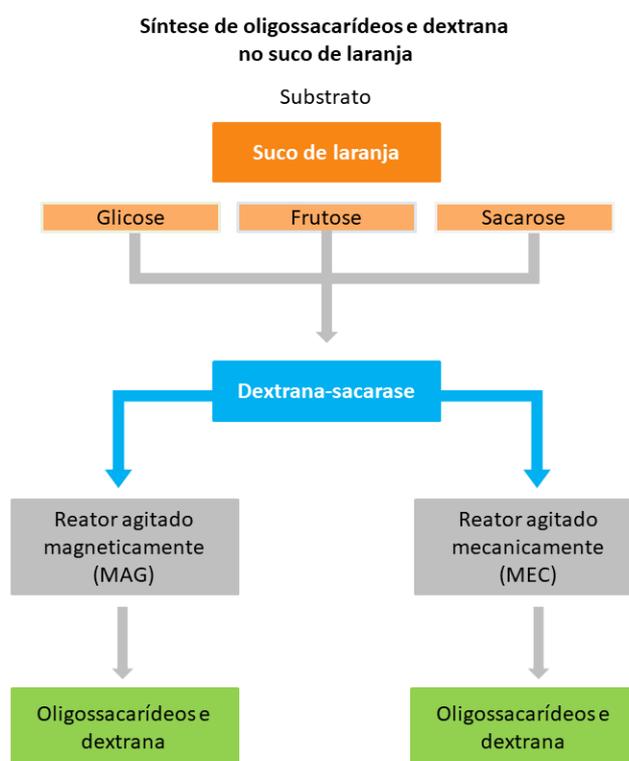
A Figura 1 apresenta um esquema da síntese de oligossacarídeos e dextrana utilizando suco de laranja como substrato, onde as reações são conduzidas em dois diferentes reatores agitados: agitado magneticamente e mecanicamente (reator batelada agitado).

O suco de laranja foi utilizado como meio para sintetizar 225 mL de suco de laranja prebiótico em um reator batelada encamisado de 300 mL com agitação magnética em duas temperaturas diferentes (25 °C e 30 °C). A agitação de 250 rpm foi realizada com auxílio de uma barra magnética (0,5 cm de diâmetro e 4 cm de comprimento) e um sistema automatizado de agitação magnética. O tempo total de síntese foi de 24 h, e as amostras foram coletadas a cada hora até completar 6 h, e depois coletadas novamente em 24 h. Esta estratégia de amostragem foi aplicada tendo em vista resultados obtidos em estudos preliminares, onde o consumo total da sacarose ocorreu em 6 h. No entanto, a otimização da síntese foi realizada com uma síntese enzimática final de 24 h. Dito isto, como a enzima dextrana-sacarase possui múltiplas vias, e a hidrólise pode ocorrer após a polimerização do monossacarídeo, o tempo de reação foi estendido até 24 h.

Como mencionado, o suco de laranja foi utilizado como substrato. Então, a concentração inicial de açúcar foi ajustada para 75 g/L de sacarose e 75 g/L de açúcar redutor

(mistura equimolar de glicose e frutose), em seguida, o pH do suco foi ajustado para 5,2 com NaOH, conforme previamente otimizado por (Fontes *et al.*, 2015). A síntese foi realizada com 1 UI/mL de dextrana-sacarase durante 24 h, e interrompida pela adição de ácido cítrico até atingir o pH 4,2.

Figura 1 - Fluxograma da síntese de dextrana e oligossacarídeos utilizando suco de laranja como substrato. MAG significa reator agitado magneticamente e MEC significa agitado mecanicamente.



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

As amostras de sucos foram analisadas para quantificação da dextrana pelo método dos carboidratos totais (FOX & ROBYT, 1991), açúcares simples por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), oligossacarídeos por balanço de massa e concentração relativa dos GPs por Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência (HPTLC), seguindo as metodologias descritas a seguir.

As sínteses foram codificadas como:

- MAG25: Síntese conduzida com agitação magnética (250 rpm) a 25 °C
- MAG30: Síntese conduzida com agitação magnética (250 rpm) a 30 °C.

2.2.5 Síntese de carboidratos prebióticos no suco de laranja em reator agitado mecanicamente

A síntese foi realizada em 700 mL de suco de laranja em um reator batelada encamisado agitado mecanicamente de 1 L. A agitação mecânica foi performada utilizando dois impulsores Scaba com 4 cm de diâmetro e 1 cm de largura. O processo seguiu a metodologia descrita no tópico 2.2.4, com sínteses a 25 e 30 °C.

As sínteses foram codificadas como:

- MEC25: Síntese conduzida com agitação mecânica (250 rpm) a 25 °C;
- MEC30: Síntese conduzida com agitação mecânica (250 rpm) a 30 °C.

2.2.6 Determinação de carboidratos

As amostras de suco foram caracterizadas antes e após a síntese enzimática. Inicialmente, a amostra de suco de laranja foi diluída (1:10) em água ultrapura (Milli-Q System, Millipore®) e filtrada através de membrana de acetato de celulose (Millipore® com 0,45 µm).

Após a síntese, a dextrana dos sucos potencialmente prebióticos foi precipitada com 3 volumes de etanol 96% (v/v), adicionando 3 mL de etanol a 1 mL de amostra de suco. (RABELO *et al.*, 2006). Em seguida, o sobrenadante foi diluído (1:2) em água ultrapura, filtrado e utilizado para quantificar os açúcares simples e os oligossacarídeos. A dextrana precipitada foi ressuspensa e diluída (1:200) em água destilada, para quantificação pelo método fenol-ácido sulfúrico (FOX & ROBYT, 1991).

2.2.6.1 Açúcares simples e oligossacarídeos

Os açúcares (glicose, frutose e sacarose) foram quantificados por HPLC em um sistema Agilent Infinity 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA-EUA), equipado com bomba quaternária, amostrador automático, forno de coluna e detector de índice de refração. (IR). A separação foi conseguida usando uma coluna BIORAD HPX-87C (300 x 7,8 mm) a 80 °C. Água ultrapura a 0,5 mL.min⁻¹ foi utilizada como eluente e a temperatura do detector foi de 35°C. A concentração de oligossacarídeos foi obtida por balanço de massa, como demonstrado por (FONTES *et al.*, 2015; RABELO *et al.*, 2009). Sacarose e açúcares

redutores (glicose + frutose) foram expressos em concentração relativa de acordo com a Eq.(1).

$$\text{Concentração relativa (\%)} = \frac{C_i}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

C_i significa a concentração no tempo i ($i = 1$ a 24 h)

C_0 significa a concentração no início da síntese i ($i = 0$)

2.2.6.2 Grau de polimerização dos oligossacarídeos

O grau de polimerização dos oligossacarídeos (GPs) foi determinado pelo sistema Camag HPTLC (Camag Muttenz- Switzerland), usando placas de sílica gel 60 (Art. 1.05553.0001, Merck, 20 x 20 cm). Para condução das análises, amostras de 5 μ L foram aplicados na placa com auxílio de um amostrador automático HPTLC (ATS 4, Camag, Muttenz-Suíça), com comprimento de banda de 6,0 mm e 10,0 mm de distância da borda inferior. Após a aplicação, a placa foi revelada em câmara reveladora de vidro HPTLC pré-condicionada, à temperatura ambiente, com mistura de solventes composta por acetonitrila/acetato de etila/1-propanol/água (85:20:50:90, v/v), em duas ascensões.

Os oligossacarídeos foram quantificados utilizando um densitômetro HPTLC (TLC Scanner 4, Camag Muttenz-Suíça) e o software Planar winCATS Chromatography Manager. As leituras foram medidas no comprimento de onda de 490 nm (Tingirikari *et al.*, 2017). Os resultados foram expressos em concentração relativa (%) seguindo a Eq. (2).

$$\text{Relative concentration(\%)} = \frac{A_{GPj}}{A_T} \times 100 \quad (2)$$

onde,

A_{GPj} significa a area cromatográfica de um GP ($j = 3$ a 12)

A_T significa a soma das áreas cromatográficas de todos os GP's $\sum_3^{12} A_{GPj}$

GP – Grau de polimerização

2.2.7. Análise estatística

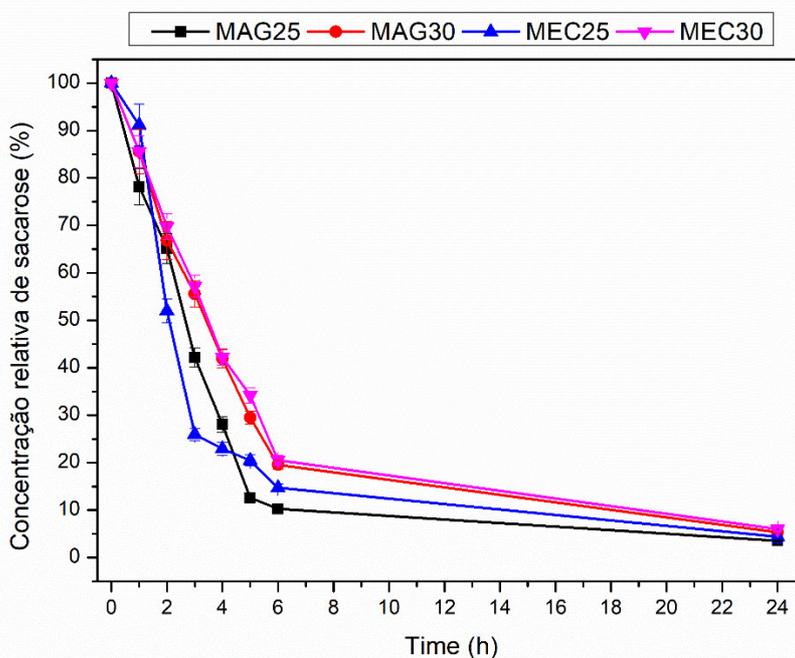
Os resultados cinéticos foram obtidos em duplicata e as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 6$).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Consumo de sacarose durante a síntese

Como principal substrato para a enzima dextrana-sacarase, a sacarose foi consumida ao longo da síntese de oligossacarídeos no suco de laranja. A Figura 2 ilustra a concentração relativa de sacarose durante 24 h de reação enzimática sob as quatro condições distintas.

Figura 2 - Evolução temporal da concentração de sacarose (%) durante as sínteses enzimáticas pela dextrana-sacarase, realizadas com agitação magnética a 25 °C (MAG25) e 30 °C (MAG30) e agitação mecânica a 25 °C (MEC25) e 30 °C (MEC30).



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

O perfil de concentração de sacarose foi semelhante para MAG30 e MEC30. Aproximadamente 80% da sacarose (60 g/L) foi hidrolisada até 6 h de síntese a 30 °C. As taxas de consumo de sacarose até 6 h de síntese foram de 10 g/L.h a 30 °C para ambos os processamentos (MEG e MAG). Por outro lado, o consumo de sacarose foi ligeiramente mais rápido quando a síntese foi realizada a 25 °C com taxas de 10,6 g/L.h (MEC25) e 11,25 g/L.h (MAG25). Após 6 h de síntese, a taxa de consumo diminuiu drasticamente para menos de 0,5 g/L.h para todas as sínteses, e em 24 h de processamento, a concentração residual de sacarose foi de apenas 3,75 g/L, ou seja, 95% de sacarose foi consumida. Desse modo, a enzima dextrana-sacarase hidrolisa a sacarose, liberando frutose e glicose, e então polimeriza as porções glicosil formando as cadeias de dextrana e oligossacarídeos.

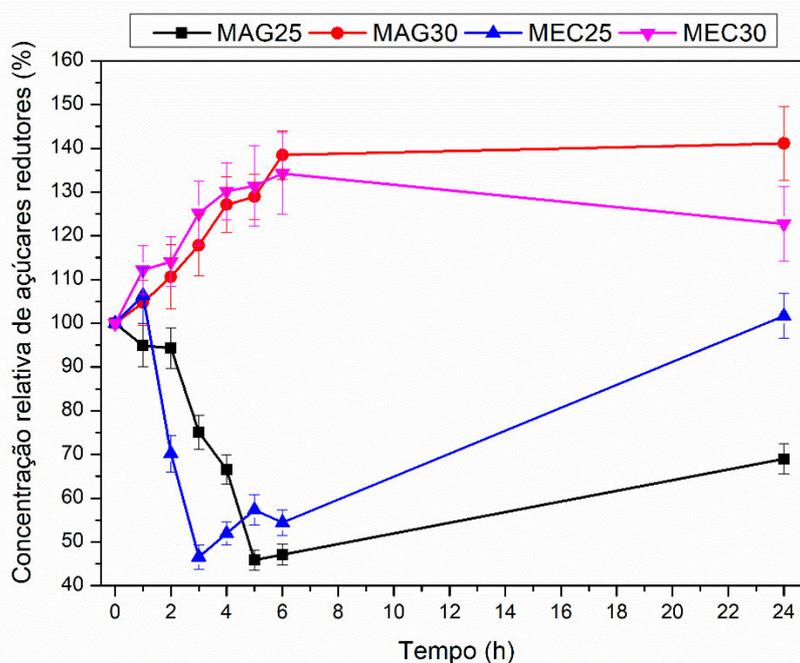
2.3.2 Evolução dos açúcares redutores durante a síntese

Durante a síntese, os açúcares redutores (frutose e glicose) provenientes da molécula de sacarose, devido à ação hidrolítica da dextrana-sacarase, podem ser polimerizados em oligossacarídeos ou permanecer como açúcar simples no meio de reação. A Figura 3 mostra a evolução dos açúcares redutores (frutose + glicose) ao longo da síntese enzimática.

A temperatura afetou fortemente a concentração de açúcares redutores (AR), favorecendo o acúmulo de açúcares AR a 30 °C. Por outro lado, o perfil de concentração de AR apresentou um comportamento diferente a 25 °C, com uma redução nas primeiras 6 h de síntese, seguido de um aumento na concentração de AR. Na Figura 3, também foi evidenciado o efeito da agitação nas diferentes temperaturas avaliadas. Nas sínteses conduzidas com agitação mecânica a 30 °C, a concentração de AR aumentou até 5 h, com valores ligeiramente superiores aos obtidos com agitação magnética. Porém, após 6 h, a concentração de AR diminuiu ligeiramente para MEC30, enquanto para o MAG30 o valor permaneceu constante. Diante do apresentado, infere-se que o aumento da concentração de AR pode estar associado à hidrólise da sacarose durante a síntese.

A diminuição da concentração relativa de AR se deve à produção de oligossacarídeos e dextrana durante a síntese enzimática, em que as cadeias de carboidratos são formadas por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas (α -1,6), resultando em uma redução na concentração de AR. Contrariamente, o aumento de AR nas sínteses realizadas a 30 °C independe do tipo de agitação, indicando que a taxa de hidrólise da sacarose foi superior à taxa de polimerização.

Figura 3 - Evolução temporal da concentração de açúcares redutores (AR) (%) durante as sínteses enzimáticas pela dextrana-sacarase realizadas com agitação magnética a 25 °C (MAG25) e 30 °C (MAG30) e agitação mecânica a 25 °C (MEC25) e 30 °C (MEC30).



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Somado a isso, os ensaios realizados a 25 °C com agitação mecânica mostraram aumento da concentração de AR em 1 h. Posteriormente, essa concentração reduziu acentuadamente até 3 h de síntese, seguida de um aumento na concentração de AR, atingindo aproximadamente o valor inicial após 24 h de síntese. MAG25 promoveu uma redução constante da concentração de AR até 5 h, seguida de um aumento às 24 h, porém notadamente inferior ao MEC25. O aumento da concentração de açúcares redutores, principalmente no final do processo, indica a hidrólise e cisalhamento dos carboidratos complexos devido à agitação, o que pode ocasionar danos mecânicos aos carboidratos prebióticos (GIAVASIS *et al.*, 2006).

Nota-se que, o perfil de consumo de sacarose não foi proporcional à concentração de AR durante o processo, isso ocorre porque parte das porções de glicose é incorporada às cadeias de dextrana e oligossacarídeos. Além disso, os resultados revelam que as sínteses realizadas a 25 °C apresentaram maior taxa de hidrólise de sacarose e menor concentração de AR livre do que as sínteses a 30 °C, sugerindo que 25 °C é a temperatura que pode favorecer maior produção de carboidratos prebióticos pela dextrana-sacarase. A síntese a 25 °C apresentou consumo de AR com taxas de 13,25 g/L.h (MEC25) e 8,25 g/L.h (MAG25). Por

outro lado, a síntese realizada a 30 °C apresentou taxas de liberação de AR de 6 g/L.h (MAG30) e 3,75 g/L.h (MEC30). Dito isso, o acúmulo de AR significa que os oligossacarídeos não foram sintetizados. Sabe-se que, a atividade ótima da dextrana-sacarase ocorre a 30 °C, mas sua estabilidade é maior em temperaturas mais baixas, como 25°C. Assim, o acúmulo de açúcar redutor na síntese a 30 °C sugere que a reação do acceptor não foi favorecida nesta temperatura. Por fim, esses resultados corroboram com dados obtidos anteriormente, onde autores relataram que a reação do acceptor é favorecida em temperaturas mais baixas (HEINCKE *et al.*, 1999; RABELO *et al.*, 2011).

2.3.3 Produção de oligossacarídeos

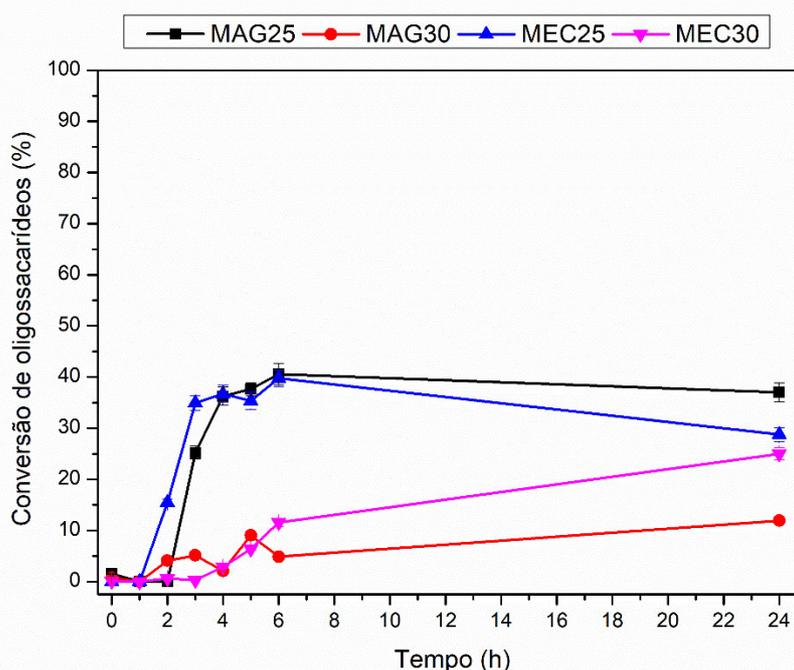
A Figura 4 demonstra a conversão de oligossacarídeos ao longo de 24 h de síntese enzimática em suco de laranja. Pode-se observar que, as maiores conversões foram obtidas para MAG25 e MEC25. Para MAG25, a conversão teve início apenas com 3 h de reação, enquanto a agitação mecânica a 25 °C possibilitou à síntese de oligossacarídeos já a partir da segunda hora de experimento.

A partir das Figuras 3 e 4, é possível observar uma relação entre AR e a produção de oligossacarídeos, visto que, à medida que a concentração de AR reduz, aumenta-se a produção de oligossacarídeos, sendo a relação inversa também verdadeira. Num meio composto por aceptores além da sacarose, as porções glicosil da sacarose são transferidas para a extremidade dos aceptores, alongando o comprimento da cadeia acceptora em vez da cadeia de dextrana. Nessa perspectiva, a molécula acceptora formada pode atuar também como um acceptor, promovendo a formação de séries homólogas de oligossacarídeos (HEINCKE *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2006). Esses oligossacarídeos, também conhecidos como produtos aceptores, são formados por ligações glicosídicas consecutivas α -1,6 e apresentam grau de polimerização (DP) entre 3 e 12 (DA SILVA *et al.*, 2014; RABELO *et al.*, 2009). A formação dessas ligações se processa devido ao ataque nucleofílico do grupo C_6-OH da molécula de glicose ao grupo C_1 da molécula acceptora.

Na Figura 4, pode-se visualizar a maior conversão de oligossacarídeos obtida nas condições MAG25 e MEC25 em 6 h de síntese, com uma conversão de 40% para ambos os processamentos. Transcorrido esse tempo de reação, os valores diminuíram para 37% para MAG25 e 29% para MEC25. Nessas circunstâncias, este resultado indica a irrelevância de manter as sínteses conduzidas a 25 °C por 24 h, demonstrando que apenas 6 h são suficientes.

O suco com carboidratos prebiótico, obtido por síntese enzimática a 25 °C, apresentou alta viscosidade, principalmente com 6 h de experimento. Esse fenômeno pode ser atribuído à alta concentração de carboidratos, considerando açúcares simples, oligossacarídeos e dextrana. Essa maior viscosidade pode ter aumentado a resistência à difusão e afetado a transferência de massa, e conseqüentemente a mobilidade das moléculas (FERNANDES & RODRIGUES, 2007), reduzindo a produção de oligossacarídeos e modificando a via bioquímica da dextrana-sacarase. Por outro lado, a alta transferência de massa pode promover um aumento da viscosidade devido a maior produção de oligossacarídeos e dextrana no meio (DIXIT *et al.*, 2015).

Figura 4 - Evolução temporal da conversão de oligossacarídeos (%) durante as sínteses enzimáticas pela dextrana-sacarase realizadas com agitação magnética a 25 °C (MAG25) e 30 °C (MAG30) e agitação mecânica a 25 °C (MEC25) e 30 °C (MEC30).



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

A reologia do suco contendo dextrana e oligossacarídeos pode prejudicar o desempenho do reator, modificar a rota da reação, afetando assim o rendimento e a produtividade do processo, devido à falta de homogeneidade do meio. Diante disso, o emprego da agitação pode melhorar o coeficiente de transferência de massa, embora este processo também apresente desvantagens associadas à taxa de cisalhamento, que é

dependente da velocidade (DIXIT *et al.*, 2015). Adicionalmente, o extenso tempo de reação pode ter afetado a estrutura da enzima, promovendo alterações nos sítios ativos.

A Figura 4 também ilustra a evolução da conversão dos oligossacarídeos nas sínteses conduzidas a 30 °C ao longo de 24 h. A agitação magnética (MAG30) demonstrou promover a síntese de oligossacarídeos nos tempos de 2 e 3 h, alcançando aproximadamente 5% de conversão. Em 5 h de processo, a conversão dos oligossacarídeos aumentou para 9,04%, atingindo 11,92% ao final da síntese (24 h). Para MEC30, o início da produção de oligossacarídeos ocorreu apenas com 4 h, com aumento gradual até 24 h, com 25% de conversão de oligossacarídeos ao final da reação enzimática. Estes resultados são opostos aos obtidos a 25 °C, apresentando uma ligeira diminuição na síntese de oligossacarídeos após 6 h, apesar de terem apresentado os maiores valores de conversão de oligossacarídeos.

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que o efeito da agitação na síntese de oligossacarídeos depende da temperatura de processamento. Nos ensaios realizados a 25 °C, os resultados conseguidos pela agitação magnética demonstraram melhores resultados que a agitação mecânica somente após 6 h de síntese. Em contrapartida, na temperatura de 30 °C, a agitação mecânica se mostrou mais eficiente. Diante do exposto, constata-se que, a síntese enzimática a 25 °C favoreceu a maior conversão de oligossacarídeos (Figura 4), ao passo que uma menor concentração de AR foram quantificados no suco de laranja (Figura 3). De modo geral, até 6 h de síntese, a formação de oligossacarídeos em sistemas agitados magnético e mecanicamente foi semelhante em ambas as temperaturas de síntese, com maiores conversões a 25 °C.

A hidrólise desses oligossacarídeos pode explicar a redução nos valores de conversão de oligossacarídeos em paralelo ao aumento no acúmulo de AR, mesmo após a sacarose ser quase totalmente consumida (após 6 h de processamento). O cisalhamento da molécula pode ocorrer devido ao processo de agitação, principalmente com a agitação mecânica que levou à redução da conversão de oligossacarídeos e aumento da concentração de AR em alguns pontos. Sugere-se que, a presença de impelidores somados a maior taxa de cisalhamento proporcionada pela agitação mecânica podem ter provocado alterações na conformação da enzima, levando a quebra dos oligossacarídeos durante o processo em comparação com a agitação magnética.

Contudo, a agitação mecânica é fundamental para transferência de massa em processos industriais, principalmente enzimáticos. O impelidor do tipo Scaba utilizado neste estudo é semelhante à turbina Rushton, a mais comumente aplicada em processamento biotecnológico. Esses impelidores são caracterizados pelo adequado tempo de mistura e taxas

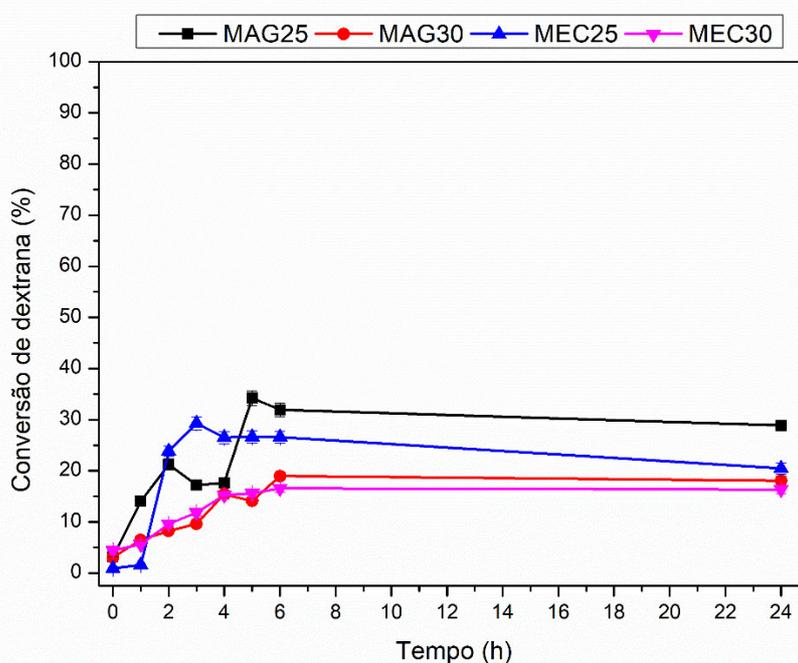
de transferência de calor. A turbina Scaba promove os fluxos radial, axial e tangencial. O fluxo axial leva a ocorrência do “efeito caverna” formando regiões de mistura eficiente próximas ao agitador com áreas estagnadas e mortas em outros lugares. No entanto, o fluxo tangencial pode melhorar a eficiência da mistura, aumentando a região homogênea no reator (AMEUR & VIAL, 2020; DREVETON *et al.*, 1994).

2.3.4 Produção de dextrana

A Figura 5 apresenta a produção de dextrana durante a síntese catalisada pela enzima dextrana-sacarase no suco de laranja. Em conformidade ao descrito anteriormente para oligossacarídeos, a maior conversão de dextrana também ocorreu a 25 °C, principalmente para MAG25, com conversão máxima em 5 h de reação, atingindo 37,36%. Nas condições MEC25, o início da produção de dextrana se deu às 2h, com conversão máxima de 34,86% no tempo de 3 h. Experimentos conduzidos a 30 °C demonstraram uma menor conversão de dextrana em comparação ao processo conduzido a 25 °C. Entretanto, os perfis de conversão foram semelhantes para MAG30 e MEC30. Além disso, é pertinente observar que nenhum aumento de conversão de dextrana foi evidenciado após 6 h.

Assimilando os resultados obtidos para dextrana (Figura 5), oligossacarídeos (Figura 4) e perfil do substrato (Figuras 2 e 3) ao longo da síntese enzimática, justifica-se que, 6 h de processo é suficiente para produzir um suco de laranja potencialmente prebiótico pela reação do acceptor da enzima dextrana-sacarase, nas condições realizadas no presente estudo. Após 6 h de processamento, tanto a sacarose estava quase completamente esgotada no meio, quanto o curso da reação mudou, sem mudanças no rendimento de carboidratos potencialmente prebióticos, o que torna o processo dispendioso devido ao longo tempo de processamento sem qualquer benefício adicional. Os baixos valores de conversão de dextrana em alguns tempos do processo sugerem uma possível inibição competitiva entre as altas concentrações de AR e sacarose. Do mesmo modo, a alta concentração de aceptores no final do processo pode diminuir a conversão de dextrana pelo mecanismo de inserção devido ao impedimento estérico pela ocupação do sítio pelo acceptor (Heincke *et al.*, 1999). Como descrito para os oligossacarídeos, essa redução pode ser provocada pela hidrólise e quebra de moléculas durante o processo de agitação.

Figura 5 - Evolução temporal da conversão de dextrana (%) durante a síntese enzimática pela dextrana-sacarase realizadas com agitação magnética a 25 °C (MAG25) e 30 °C (MAG30) e agitação mecânica a 25 °C (MEC25) e 30 °C (MEC30).

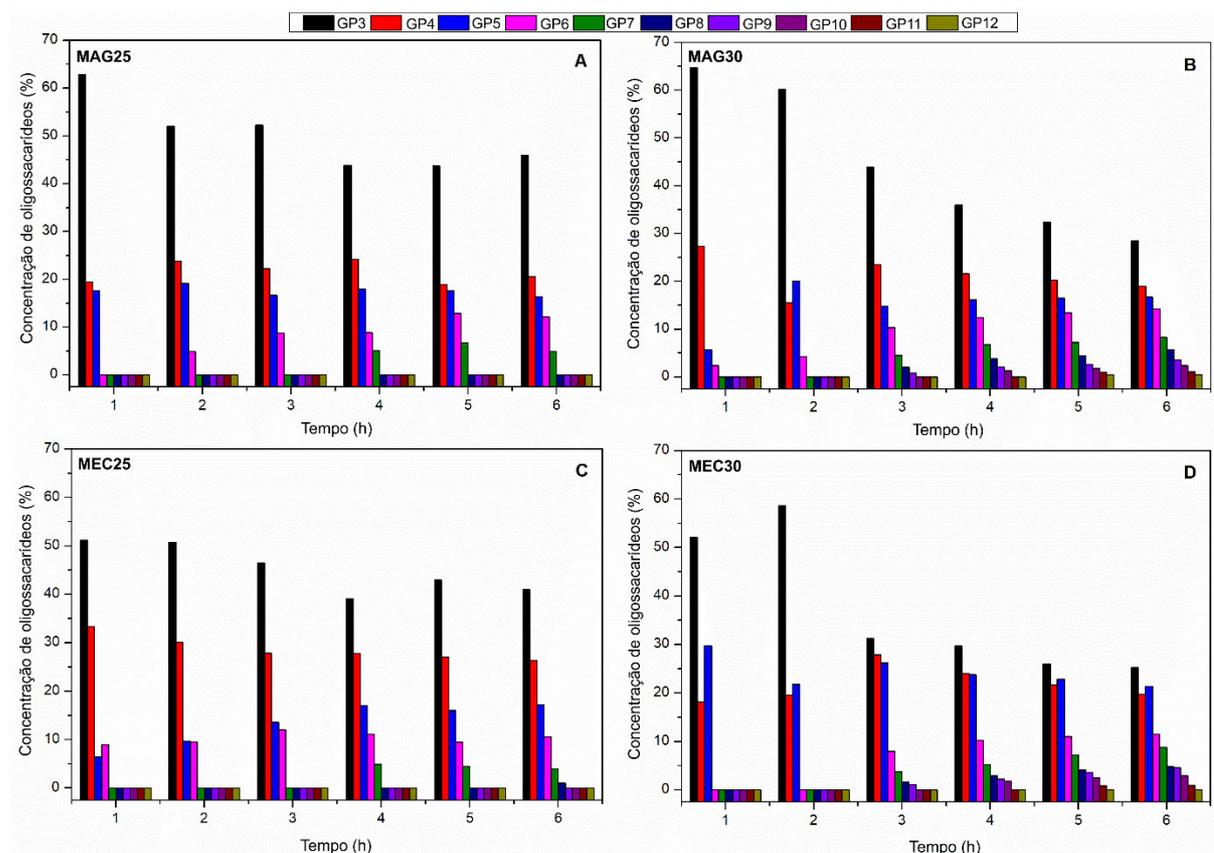


Fonte: Elaborado pela autora (2024)

A Figura 6 apresenta a distribuição dos GP dos oligossacarídeos sintetizados durante as primeiras 6 h do experimento, para as quatro condições avaliadas. A porcentagem de cada GP não foi calculada até 24 h, pois a partir de 6 h a concentração de oligossacarídeos não apresentou mudanças significativas. Sendo assim, prolongar o tempo de reação inviabilizaria economicamente o processo. Referindo-se a temperatura, a síntese conduzida a 25 °C favoreceu a maior produção de oligossacarídeos, porém, com GP até 7 e 8. Ao passo que, uma grande variedade de GP foi encontrada a 30 °C com oligossacarídeos de GP até 12. As Figuras 6A e C mostram que o suco produzido sob agitação magnética apresentou mais oligossacarídeos com GP3 do que MEC25 e menor percentual de GP4. Observa-se também que, no tempo de 4 h, a concentração relativa de GP3 diminuiu e são produzidos oligossacarídeos com GP7 (Figura 6A). Neste caso, infere-se que, as unidades de glicose livres no meio podem se ligar aos oligossacarídeos com menor GP, que atuam como moléculas aceptoras, dando origem aos carboidratos com maior GP. Assim, houve aumento nas concentrações dos GP6 e 7 às 5 h, enquanto a concentração relativa de GP4 reduziu. No final do processo (6 h), o suco apresentou um ligeiro aumento na porcentagem de

oligossacarídeos com GP3 e 4, que pode estar associado à hidrólise das moléculas de maior GP ou à produção de novos carboidratos prebióticos com cadeias mais curtas.

Figura 6 – Concentração de diferentes graus de polimerização (%) dos oligossacarídeos obtidos durante 6 h de síntese enzimática pela dextrana-sacarase em reatores agitados magneticamente (A) a 25 °C e (B) a 30 °C, e reatores agitados mecanicamente (C) a 25 °C e (D) a 30 °C.



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Comportamento similar foi observado para MEC25 até 4 h, onde a concentração relativa do GP3 reduziu de 51,20 para 39,19%, e a concentração de GP7 aumentou. A distribuição dos GPs no suco se manteve estável entre 4 e 5 h, com ligeiro aumento para GP3. Apenas no final do processo foi identificada a produção de oligossacarídeos com GP8 (1,00%).

Considerando as sínteses realizadas a 30°C, os resultados mostram uma maior redução na concentração relativa do GP3 durante todo o tempo de síntese, o que pode ter favorecido o aumento da diversidade de GP (Figuras 6B e 6D). Ao longo do processo, oligossacarídeos com GP até 12 unidades de glicose foram sintetizados, enquanto a

concentração de oligossacarídeos com baixo GP apresentou uma redução. O aumento na concentração relativa de oligossacarídeos com maior GP e a diminuição daqueles com menor GP indicam o alongamento da cadeia devido à reação do acceptor promovida pela dextran-sacarase. Comparando MAG30 e MEC30, o primeiro apresentou alta concentração de GP3, enquanto a agitação mecânica promoveu valores maiores no GP4 e GP5. De modo geral, a composição dos sucos de laranja apresentou maior concentração relativa em oligossacarídeos com GP3 e GP4, onde GP3 foi mais suscetível à hidrólise a 30°C e agitação mecânica, e a produção de GP4 foi favorecida pela agitação mecânica.

Na reação do acceptor, a redução da concentração de GP3 não é justificada apenas em razão das reações de hidrólise, visto que os oligossacarídeos com GP3 também podem atuar como aceptores na produção de oligossacarídeos com maior GP. Portanto, o alongamento da cadeia dos oligossacarídeos promovido pela reação do acceptor da dextran-sacarase produz séries homólogas de oligossacarídeos. Para isso, a concentração de oligossacarídeos com baixo GP deve ser suficiente para produzir o próximo grau de polimerização, pois o aumento de oligossacarídeos com maior GP utiliza aqueles com menor GP. Assim, o alongamento da cadeia será proporcional à concentração de oligossacarídeos com GP3 e sacarose (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Três estudos anteriores foram encontrados sobre a síntese de oligossacarídeos pela ação da enzima dextran-sacarase utilizando suco de laranja como substrato, dois desses realizados pelo nosso grupo de pesquisa, porém não publicados. A reação do acceptor foi otimizada em pequena escala (tubos de ensaio) nas mesmas condições utilizadas no presente estudo. A síntese resultou na conversão de 92% dos sacarídeos totais em oligossacarídeos. Este resultado é superior aos valores obtidos no presente estudo. Porém, a síntese em tubos de ensaio não apresenta as limitações de transferência de massa e taxas de cisalhamento encontradas em reatores agitados. No segundo estudo, a enzima dextran-sacarase obtida do processo fermentativo da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F foi submetida a imobilização e co-imobilização com dextranase de *Chaetomium erraticum*. Com isso, foram produzidos glico-oligossacarídeos com alto grau de polimerização usando 2,4 UI/mg de dextran-sacarase imobilizada ou co-imobilizadas usando suco de laranja. No processo descontínuo, a dextran-sacarase co-imobilizada converteu 27% dos sacarídeos totais e produziu uma quantidade significativamente maior de glico-oligossacarídeos do que a dextran-sacarase imobilizada, que converteu 25% dos sacarídeos totais. Os resultados obtidos são superiores aos valores obtidos no presente estudo, porém a síntese foi realizada em tubos de ensaio, que não apresentam as limitações de transferência de massa e taxas de

cisalhamento encontradas em reatores agitados. Por último, dextrana-sacarase obtida a partir de uma cepa mutante (*Leuconostoc mesenteroides* 512FMCM) foi aplicada na síntese glico-oligossacarídeos em suco de laranja contendo 9,3, 22,9 e 48,1 g/L de glicose, frutose e sacarose, respectivamente. A síntese foi conduzida a 16 °C utilizando 3 U/ml de enzima e obteve uma conversão de 35% dos sacarídeos totais em oligossacarídeos, com um consumo de sacarose de 97% (NGUYEN *et al.*, 2015).

A temperatura, a concentração inicial de açúcares e o tempo são fatores cruciais que afetam o curso da reação do acceptor da dextrana-sacarase. Dentre esses parâmetros, a temperatura influencia fortemente o grau de polimerização (GP) e a estabilidade enzimática durante a síntese dos oligossacarídeos (KAUR & PANESAR, 2020). O objetivo principal da agitação em um reator é conseguir a homogeneização, reduzindo os gradientes de temperatura e concentração. A agitação magnética tende a criar regiões estagnadas próximas à parede e à superfície do líquido, devido à formação de um vórtice na região inferior. Este fluxo restrito à região próxima ao agitador pode limitar a produção de oligossacarídeos, favorecendo a síntese de dextrana. Por outro lado, a agitação mecânica forma uma zona de movimento intenso ao redor do impelidor, eliminando as regiões estagnadas próximas à parede através da criação de duas áreas de circulação. O impelidor específico utilizado em nosso estudo (impelidor Scaba) gera fluxos tangenciais, axiais e radiais, contribuindo para um melhor desempenho do sistema de mistura.

A presença de diferentes impelidores e distâncias entre os mesmos afetam a mistura e a transferência de massa no processo industrial (DIXIT *et al.*, 2015; DREVETON *et al.*, 1994). Em escala ampliada, a agitação mecânica promove maior cisalhamento das moléculas do que a síntese com agitação magnética. Entretanto, a agitação magnética é mais viável para reatores de pequeno volume normalmente usados em síntese laboratorial. A agitação apresentou efeito secundário na síntese de oligossacarídeos e dextrana no presente estudo. Este resultado foi inesperado devido principalmente devido à mudança de viscosidade do meio de cultura causada pela síntese de dextrana. Além disso, os resultados mostram que a síntese pode ser otimizada em um pequeno reator agitado magneticamente para posterior ampliação de volume em reatores de tanques agitados.

2.4 Conclusão

Este estudo oportunizou a produção de suco de laranja potencialmente prebiótico em reatores, usando dois tipos de agitação (magnética e mecânica). Os parâmetros de agitação

e temperatura foram essenciais para a compreensão e elucidação do mecanismo de ação da dextrana-sacarase em reações com volumes maiores do que os usualmente utilizados em escala laboratorial. A temperatura ótima de estabilidade da dextrana-sacarase (25 °C) levou à maior produção de dextrana e oligossacarídeos. A agitação magnética promoveu maior produção de dextrana principalmente nas reações conduzidas a 25 °C, e a síntese de oligossacarídeos foi similar nas condições MAG25 e MEC25 em 6 h de processo. No que concerne a distribuição dos GP dos oligossacarídeos, as sínteses realizadas a 30 °C resultou em oligossacarídeos com GP até 12. As sínteses a 25 °C resultou em maior concentração de GP3 e GP4, bem como alguns oligossacarídeos com GP até 8. Apesar das concentrações similares de oligossacarídeos obtidas por MEC25 e MAG25, MEC25 foi a melhor condição para sintetizar carboidratos prebióticos no suco de laranja devido a formação inferior de dextrana. Essas descobertas são atraentes para uma futura aplicação industrial usando reatores descontínuos de tanque agitado com agitação mecânica e impelidores Scaba. A síntese desses oligossacarídeos pode ser de interesse industrial, pois, além da formação dos oligossacarídeos, os açúcares de baixo peso molecular presentes nos sucos de frutas são consumidos para formar os carboidratos prebióticos, resultando em um suco funcional com alto teor de carboidratos não digeríveis e menor teor de açúcares simples (glicose e frutose).

CAPÍTULO 3

3 IMPACTO DE SUCO DE LARANJA CONTENDO INGREDIENTES POTENCIALMENTE PREBIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA E SEUS METABÓLITOS

Resumo

Suco de laranja contendo oligossacarídeos e dextrana foi avaliado, após digestão *in vitro*, em um sistema fermentativo usando a microbiota fecal de dois doadores (A e B) em anaerobiose (37 °C/48 h). A microbiota foi analisada por sequenciamento 16S rRNA e os metabólitos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Oligossacarídeos e dextrana foram resistentes à digestão e consumidos durante a fermentação colônica. Lactato e acetato foram os principais metabólitos, seguidos de butirato, propionato e isobutirato. Foram observados um alto acúmulo de propionato e um rápido consumo de oligossacarídeos para o doador B. A abundância relativa de *Lactobacillus ruminis* (44,96%) apresentou um aumento na microbiota do doador A. *Bifidobacterium adolescentis* (41,73%) se destacou na microbiota do doador B após a fermentação. Além disso, o suco de laranja funcional promoveu o crescimento de probióticos emergentes, como *Bacteroides xyloisolvans*, e reduziu algumas cepas, como *Clostridia* sp. Assim, o suco de laranja potencialmente prebiótico melhora a composição da microbiota intestinal e se enquadra como um produto promissor para o mercado de alimentos funcionais.

Palavras-chave: microbiota fecal, oligossacarídeos, dextrana, probióticos, ácidos graxos de cadeia curta

3.1 Introdução

Os alimentos funcionais têm sido amplamente estudados e propostos como soluções para modular o ambiente intestinal, e consequentemente prevenir diferentes doenças. A microbiota intestinal é composta por todos os táxons da comunidade microbiana intestinal, como bactérias, arqueas e eucariotos, e compreendem mais de 2000 espécies de bactérias (BALLAN *et al.*, 2020). Estudos envolvendo a microbiota humana vem sendo desenvolvidos há muito tempo. No entanto, a interação da microbiota com a saúde do hospedeiro e sua

capacidade de ser modulada por meio da suplementação alimentar só começou a ser investigada mais recentemente (FAN; PEDERSEN, 2021; HOU *et al.*, 2020).

O desequilíbrio da microbiota intestinal, também conhecido como disbiose, pode desencadear inflamações associadas com disfunção da barreira e doenças como diabetes e obesidade. Além disso, a disbiose pode afetar o sistema nervoso entérico e central (BALLAN *et al.*, 2020). Considerando o exposto, prebióticos são substratos usados seletivamente por microrganismos do hospedeiro, conferindo benefícios à saúde (GIBSON *et al.*, 2017). Desse modo, os prebióticos podem ser uma ótima estratégia para solucionar essas questões, atingindo a homeostase intestinal e promovendo a saúde do hospedeiro.

A microbiota humana é específica para cada indivíduo e varia de acordo com a dieta, estilo de vida, idade, medicações e genética do hospedeiro (FAN; PEDERSEN, 2021). Nesse sentido, prebióticos são compostos que afetam a composição da população bacteriana, em termos de riqueza e diversidade, favorecendo o crescimento de microrganismos benéficos (probióticos), principalmente pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, e inibindo o crescimento de bactéria nocivas (ENAM; MANSELL, 2019).

O apelo funcional e efeitos fisiológicos dos prebióticos deve-se especialmente às características estruturais, incluindo a natureza das ligações glicosídicas, composição de monossacarídeos, grau de polimerização (GP), ramificações, fermentabilidade, solubilidade e viscosidade (LAM; CHEUNG, 2019). Aliado a isso, os desejáveis efeitos na saúde estão relacionados ao mecanismo de ação dos microrganismos benéficos, que produzem ácidos graxos de cadeia curta durante o processo fermentativo, melhorando a resposta imune do hospedeiro.

Nesse contexto, sistemas *in vitro* são viáveis e adequados para avaliar o efeito prebiótico de compostos. Pesquisadores pontuaram a importância de submeter previamente os ingredientes prebióticos às condições gastrointestinais humanas, com o intuito de observar a integridade dos ingredientes, usando um modelo semi-dinâmico de digestão *in vitro* (DO NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022). Por outro lado, a simulação da fermentação colônica investiga a modificações promovidas na composição da microbiota. Diante disso, a literatura dispõe de relatos sobre o positivo efeito de ingredientes prebióticos e alimentos funcionais na composição da microbiota intestinal, bem como na produção de ácidos graxos de cadeia curta, usando inóculo fecal humano (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Embora existam estudos sobre a interação entre ingredientes funcionais e microbiota intestinal, trabalhos sobre o efeito prebiótico de sucos de frutas na composição da microbiota humana ainda são escassos na literatura (DA SILVA *et al.*, 2023; REGES *et al.*,

2023). Assim, o objetivo dessa etapa do trabalho foi investigar o efeito do suco de laranja contendo oligossacarídeos e dextrana, após digestão simulada, na composição da microbiota intestinal humana em um modelo fermentativo *in vitro* usando inóculo fecal humano. Além disso, o estudo também avaliou o consumo de carboidratos e a produção de ácidos metabólicos.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Preparo do suco de laranja

O suco foi preparado a partir do suco de laranja concentrado (Lanjal®) adquirido no mercado local de Fortaleza, Ceará, Brasil. O suco de laranja concentrado foi diluído (1:8) em água potável seguido as recomendações do fabricante.

3.2.2 Síntese de oligossacarídeos e dextrana no suco de laranja

Os oligossacarídeos e dextrana foram sintetizados diretamente no suco de laranja pelo mecanismo de reação do aceptor da enzima dextrana-sacarase. A enzima dextrana-sacarase (E.C.2.4.1.5) foi produzida por meio do processo fermentativo da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* B512 F (FONTES *et al.*, 2015).

A síntese de oligossacarídeos e dextrana foi conduzida em um reator em batelada agitado mecanicamente contendo 700 mL de suco de laranja à 25 °C durante 6 h e velocidade de agitação de 250 rpm. Primeiramente, as concentrações de açúcares do suco foram ajustadas para 75 g/L de sacarose e 75 g/L de açúcares redutores (glicose e frutose, em proporções equimolares), condições ideais para obter a maior concentração de oligossacarídeos prebióticos com maior grau de polimerização (FONTES *et al.*, 2015). O pH do suco foi ajustado para 5,2 com NaOH (pH ótimo para a síntese enzimática), e então 1 UI/mL de dextrana-sacarase foi utilizada para a síntese. Transcorrido 6 h de processo, o pH do suco foi reduzido para 4,2 com ácido cítrico, com o objetivo de inativar a enzima.

O suco de laranja potencialmente prebiótico foi diluído em suco de laranja para atingir o limite diário de ingestão de prebióticos estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual indica a ingestão de 1,5 a 30 g/dia, considerando uma porção de 250 mL de suco.

3.2.3 Inóculo fecal

As amostras fecais foram coletadas de dois diferentes doadores humanos saudáveis com idade de 32 (A) e 28 (B) anos. Os voluntários não tomaram antibióticos, prebióticos ou suplementos probióticos recentemente. Além disso, não eram fumantes, não apresentavam doenças metabólicas ou gastrointestinais e tinham dietas diferentes. O doador A era vegetariano e o doador B era onívoro. Ambos assinaram um termo de consentimento voluntário para coleta da amostra fecal.

As amostras fecais foram diluídas (1:10) em tampão fosfato salino 0,1 M pH 7,0 e armazenadas em frascos estéreis a 4 °C até o momento do uso, respeitando o limite máximo de 5 h. As condições anaeróbicas foram conseguidas pela injeção de N₂ estéril (100%) no tampão e no espaço livre do frasco (*headspace*). O procedimento experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Universidade Federal do Ceará, CEP/UFC, CAAE 51874021.0.0000.5054, 25/10/2021).

3.2.4 Digestão *in vitro*

O sistema de digestão semi-dinâmico é composto por três biorreatores sequenciais, com capacidade de volume de 300 mL, conectados a um controlador BIO-TEC-PRO (LEITE *et al.*, 2021). O sistema opera a 37 °C e 250 rpm de agitação. Cada reator foi alimentado com a solução gástrica ou entérica, e o pH foi ajustado automaticamente de acordo com cada fase da digestão. A simulação da fase gástrica foi conduzida em pH $2,3 \pm 0,2$ por 2 h. Nessa fase, foi utilizada uma solução composta por NaCl 47,2 mmol/L, KCl 6,9 mmol/L, KH₂PO₄ 0,9 mmol/L, MgCl₂(H₂O)₆ 0,1 mmol/L, NaHCO₃ 25 mmol/L e CaCl₂ 0,3 g/L, além da adição de 600 U/mL (2,4 g/L) de pepsina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). O primeiro reator, correspondente a fase I, foi adicionado de 100 mL de solução gástrica e, posteriormente, alimentado com 150 mL suco de laranja potencialmente prebiótico em 10 min. O tempo de residência em cada fase foi 1 h. Além disso, as transferências de fase também duraram 1 h e foram realizadas com o auxílio de bombas peristálticas automáticas com controlador de fluxo de massa.

Um volume de 210 mL da fase I foi transferido para o segundo reator, referente a fase II ou fase duodenal, contendo 60 mL de solução entérica. A composição da solução entérica foi NaCl 38,4 mmol/L, KCl 6,8 mmol/L, KH₂PO₄ 0,64 mmol/L, MgCl₂(H₂O)₆ 0,33 mmol/L, NaHCO₃ 85 mmol/L, CaCl₂ 0,37 g/L, com adição de 0,9 g/L de pancreatina e 6 g/L

de bile (Sigma Aldrich). O pH do meio foi ajustado para $5,0 \pm 0,2$, e o tempo de processo seguiu o mesmo procedimento descrito para a fase I. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 2 e 4 h da digestão para quantificação de açúcares simples, oligossacarídeos e dextrana, como descrito na seção 3.2.7.1.

No último reator, 260 mL do suco digerido proveniente da fase II foi misturado com 50 mL de solução entérica. O pH foi ajustado para $7,0 \pm 0,2$, e a simulação dos processos fermentativos que ocorrem no cólon foram conduzidos como descrito a seguir.

3.2.5 Fermentação in vitro do suco digerido pela microbiota fecal humana

A simulação da fermentação colônica foi realizada em condições anaeróbicas pela injeção de N_2 estéril (100%) através do aspensor do reator. No último reator do sistema semi-dinâmico, o volume final da mistura (suco digerido e solução entérica) foi ajustado para 275 mL contendo 10% de inóculo fecal. O pH foi programado para ser mantido em 7.0 durante todo o processo fermentativo que teve duração de 48 h. As amostras foram coletadas em 0, 24 e 48 h de fermentação e submetidas imediatamente a centrifugação nas condições de 10000 g a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação de carboidratos e ácidos orgânicos (Seção 3.2.7). Enquanto isso, o precipitado (microbiota fecal) foi recuperado e congelado, para posterior sequenciamento 16S rRNA.

3.2.6 Análise da microbiota fecal

A extração do DNA foi realizada a partir de 250 mg da amostra fecal específica de cada doador, com auxílio do Kit DNeasy® PowerSoil® Pro (Qiagen, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Nesse procedimento, a região V4 do RNA ribossomal 16S foi amplificada com primers específicos (515F-Y e 806R), como orientado no protocolo descrito por PEREIRA *et al.* (2022). O sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA (300-ciclos, 2 x 150 bp) foi obtido usando o reagente MiSeq kit v2 na plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., USA). A análise da microbiota fecal foi realizada nas amostras coletadas no início (0 h) e final (48 h) da fermentação colônica.

A classificação taxonômica foi realizada com auxílio da base de dados DADA2 e Greengenes. O parâmetro α -Diversidade foi estimado usando o software EstimateS (Versão 9.1.0) para obter o índice de riqueza Chao1 (CHAO; BUNGE, 2002) e o índice de diversidade Shannon (SHANNON, 1948).

3.2.7 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos

3.2.7.1 Oligossacarídeos e dextrana

Inicialmente, as amostras foram adicionadas de 3 volumes de etanol 96% (v/v) para precipitação da dextrana. O sobrenadante foi usado para a quantificação oligossacarídeos, açúcares simples e ácidos orgânicos. Para isso, as amostras foram diluídas em água ultrapura (Milli-Q System, Millipore®) e filtradas usando uma membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,45 µm (Millipore®). Para quantificação da dextrana, o precipitado (*pellet* de dextrana) foi ressuspensão em água destilada e quantificado seguindo o método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Os oligossacarídeos foram caracterizados por cromatografia de camada delgada (TLC), para tanto, um volume de 5 µL de cada amostra foi aplicado na placa de sílica 60 (Art. 1.05553.0001, Merck, 20 x 20 cm) com um aplicador automático TLC Sampler (ATS 4, CAMAG). O alargamento das bandas foi de 6.0 mm, com 10.0 mm de distância da borda inferior da placa.

O densitômetro TLC scanner 4 (CAMAG), juntamente com o software Planar winCATS Chromatography Manager foram utilizados para quantificar os oligossacarídeos. As leituras foram realizadas em 490 nm (TINGIRIKARI; GOMES; RODRIGUES, 2017). Os oligossacarídeos sintetizados apresentaram entre 3 e 10 graus de polimerização (GP). Os resultados foram expressos como concentração relativa (%) e calculados a partir da Eq.(3) para amostras durante a digestão simulada e Eq.(4) durante a fermentação com a microbiota fecal.

$$\text{Concentração relativa (\%)} = \frac{A_{GPI}}{A_T} \times 100 \quad (3)$$

Onde,

A_{GPI} significa área cromatográfica de um GP específico (i = 3 a 10)

A_T significa a soma das áreas cromatográficas de todos os GP $\sum_3^{10} A_{GPI}$

$$\text{Concentração relativa (\%)} = \frac{A_{GPI}}{A_{GPI(\text{digerido})}} \times \text{concentração relativa}_{GPI(\text{digerido})} \quad (4)$$

Onde,

A_{GPI} significa área cromatográfica de um GP (i = 3 a 10)

$A_{GPi(digerido)}$ significa área cromatográfica de um GP específico ($i = 3$ a 10) do suco digerido (fase entérica)

Concentração relativa $_{GPi(digerido)}$ significa concentração relativa (%) de um GP ($i = 3$ a 10) do suco digerido (fase entérica)

3.2.7.2 Açúcares simples

Glicose, frutose e sacarose foram quantificadas por HPLC em um sistema Infinity 1260 (Agilent®). A separação dos açúcares foi realizada usando uma coluna BIORAD HPX-87C (300 × 7.8 mm) a 80 °C. Água ultrapura foi usada como fase móvel a um fluxo de 0,5 mL/min e os açúcares foram detectados por um detector de Índice de Refração (IR) a uma temperatura de 35 °C.

3.2.7.3 Produtos da fermentação colônica

Ácidos orgânicos, ácidos graxos de cadeia curta e isobutirato foram analisados por HPLC equipado com um detector UV-DAD no comprimento de onda de 210 nm. Uma coluna Aminex BIORAD HPX-87H (300 × 7.8 mm) foi usada a 65 °C para separar os analitos. O ácido sulfúrico 5 mM foi utilizado como fase móvel, com fluxo de 0.6 mL/min. Os metabólitos quantificados foram: ascorbato, citrato, acetato, lactato, propionato, butirato e isobutirato.

3.2.8. Análise estatística multivariada

Uma matriz numérica foi construída utilizando 4 amostras de suco de laranja digerido incubadas com inóculo fecal de dois doadores (A e B), coletadas imediatamente após a inoculação (0 h) e após 48 h de fermentação colônica. A matriz era composta pelas principais espécies identificadas no sequenciamento 16S rRNA: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bacteroides dorei*, *Lactobacillus ruminis*, *Roseburia faecis*, *Prevotella copri*, *Clostridium nexile*, *Blautia luti*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Akkermansia muciniphila* e *Clostridium ramosum*. A matriz também apresentava os compostos quantificados por HPLC: sacarose, glicose, frutose, oligossacarídeos, dextrana, citrato, ascorbato, lactato, acetato, propionato, butirato e isobutirato.

A matriz numérica foi importada pelo software PLS-Toolbox™ (version 8.6.2,

Eigenvector Research Incorporated, Manson, WA USA) para análise quimiométrica não supervisionada por PCA. Para avaliação quimiométrica, os dados foram escalonados automaticamente (centrados na média com subsequente escalonamento de variância), e o algoritmo Decomposição em Valor Singular (SVD) foi aplicado para decompor a matriz original em escores e cargas (*loadings*) a um nível de confiança de 95% (FONTELES *et al.*, 2021).

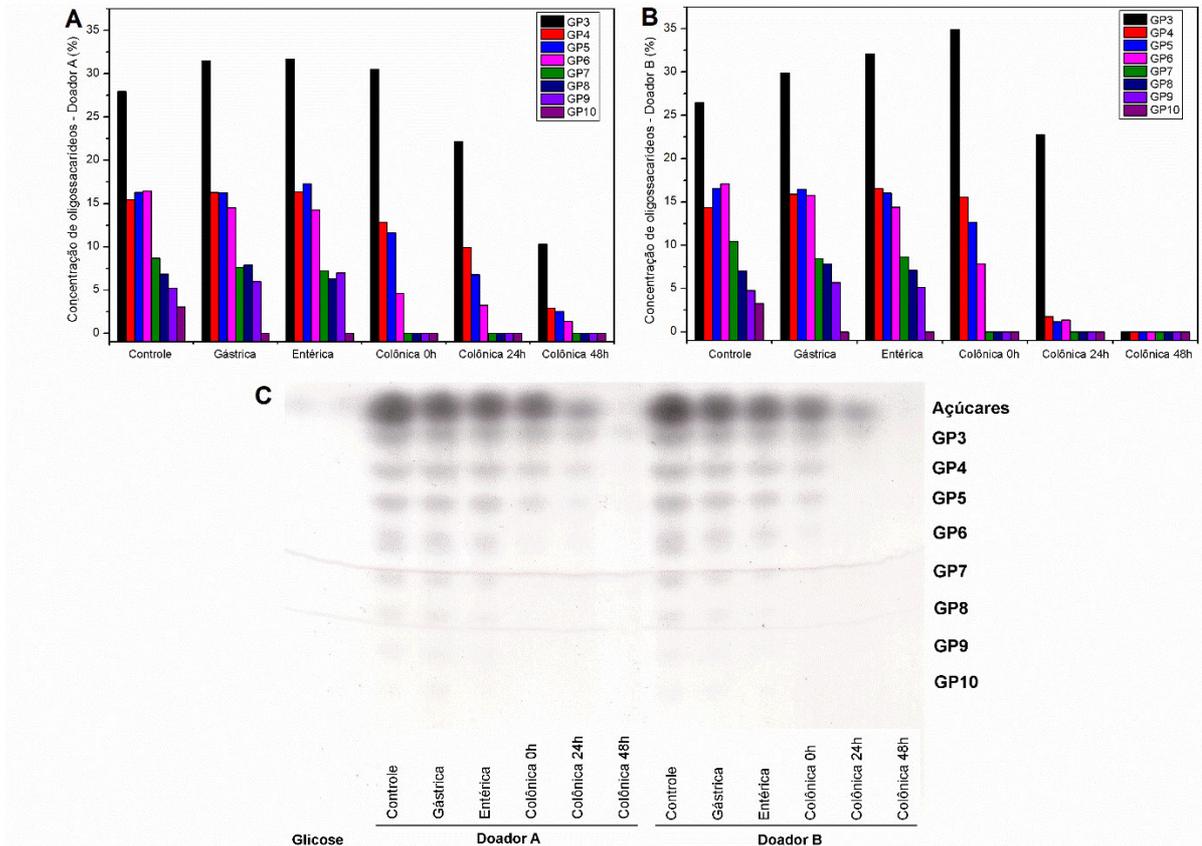
3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Resistência de carboidratos prebióticos e fermentação *in vitro*

A concentração de oligossacarídeos e dextrana foi monitorada juntamente com a digestão simulada. A resistência destes carboidratos às condições gastrointestinais superiores é crucial para o processo fermentativo da microbiota intestinal. A Figura 1 (A e B) mostra a concentração relativa de cada GP dos oligossacarídeos durante a digestão e fermentação *in vitro*. O resultado foi expresso para ambos os doadores, A e B. A amostra “controle” refere-se ao suco não digerido e as amostras “gástrica” e “entérica” representam as fases da digestão em 2 e 4 h (fase duodenal) de processo, respectivamente. Espera-se que os oligossacarídeos prebióticos sejam consumidos pela microbiota fecal durante as 48 horas de fermentação colônica. Na Figura 1C podemos observar a placa de TLC, na qual a intensidade de cada banda é diretamente proporcional a concentração dos oligossacarídeos.

Os oligossacarídeos sintetizados apresentaram até 10 graus de polimerização, sendo assim, podem ser promotores de efeitos prebióticos (FONTES *et al.*, 2015). Complementarmente, observa-se que os oligossacarídeos foram resistentes às condições ácidas e à atividade enzimática do sistema de digestão *in vitro*. Com base na ilustração dos dados, a concentração relativa (%) de cada GP sofreu algumas alterações entre as fases da digestão, contudo, essas modificações não afetaram a concentração total de oligossacarídeos, que no início do processo foi $25,85 \pm 0,70$ g/L, e após digestão se manteve em $24,95 \pm 0,60$ g/L. Ao passo que houve uma leve redução na concentração relativa dos GP6, GP7 e GP10, a concentração de DP3 e DP4 aumentou, evidenciando assim a hidrólise de oligossacarídeos de cadeias mais longas em moléculas de menor GP. É importante mencionar que, a redução de intensidade observada nas bandas da Figura 1C, durante a digestão simulada, está associada à diluição de cada fase devido à adição das soluções gástricas e entéricas e não a degradação dos oligossacarídeos.

Figura 1 - (A) Concentração relativa de cada grau de polimerização (GP) dos oligossacarídeos do suco de laranja potencialmente prebiótico durante a digestão *in vitro* e fermentação pela microbiota intestinal do doador A e (B) doador B. (C) Placa de cromatografia de camada delgada.



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

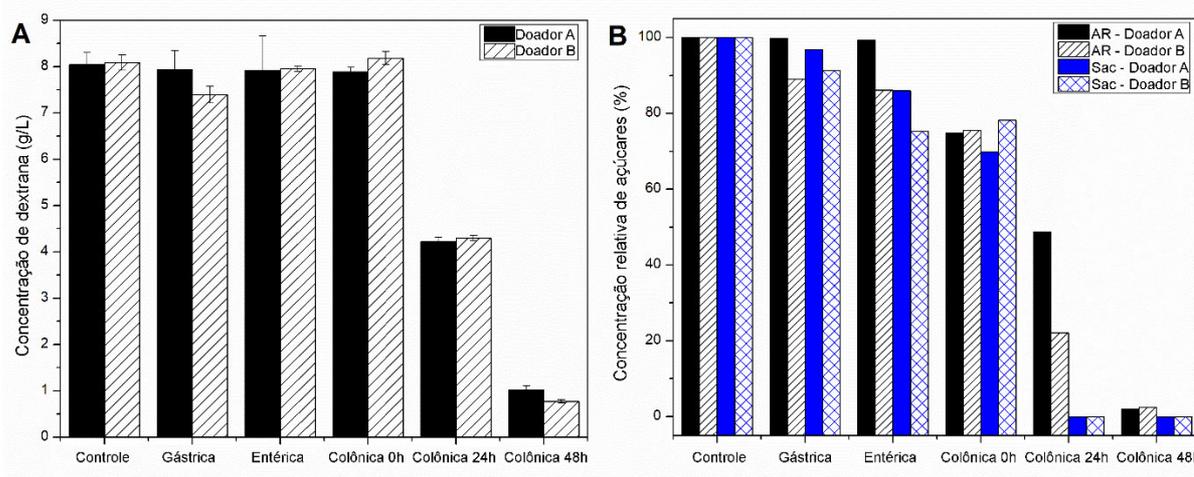
Durante a fermentação colônica, a microbiota de ambos doadores foi capaz de consumir os oligossacarídeos, porém com perfil de consumo diferente. O consumo de oligossacarídeos foi rápido e total para o doador B, enquanto a microbiota do doador A não consumiu completamente os oligossacarídeos. Atribui-se esse comportamento à diferente composição da microbiota, que será apresentada posteriormente. *Bifidobacterium*, por exemplo, consomem principalmente oligossacarídeos de cadeia curta (GP3), por outro lado, é relatado que *Bacteroides* não apresentam preferência em relação ao GP dos substratos. (OSE *et al.*, 2018).

A presença de oligossacarídeos com diferentes GP na composição dos sucos é desejável para o organismo hospedeiro, devido à função biológica específica de cada molécula, conferindo assim diferentes benefícios à saúde humana. (ZHANG *et al.*, 2019). Aliado a isso, uma mistura de prebióticos com comprimento de cadeia variado facilita a

manutenção da integridade dos ingredientes durante a passagem pelo trato gastrointestinal em direção ao cólon. Essas características possibilitam o crescimento microbiano seletivo e a modulação intestinal, além de estar relacionado com uma redução das reações de proteólise e produção de metabólitos indesejáveis (CUNNINGHAM *et al.*, 2021).

Além dos oligossacarídeos, a dextrana também se mostrou resistente às condições gastrointestinais, atingindo a concentração de $7,94 \pm 0,47$ g/L no final da digestão simulada (Figura 2A). Esses resultados foram consistentes com descobertas anteriores que demonstraram a resistência de glico-oligossacarídeos e dextrana à digestão *in vitro* (LEITE *et al.*, 2021).

Figura 2 - (A) Concentração de dextrana e (B) concentração relativa de açúcares redutores (AR) e sacarose (Sac) ao longo da digestão simulada e fermentação colônica pela microbiota dos doadores (A e B).



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

A resistência dos carboidratos prebióticos estudados pode ser atribuída às ligações glicosídicas α -1,6, que são produzidas pela enzima dextrana-sacarase durante a reação enzimática, bem como ao grau de polimerização das moléculas (KOTHARI; TINGIRIKARI; GOYAL, 2015). O consumo de oligossacarídeos e a produção de ácidos graxos de cadeia curta serão discutidos adiante.

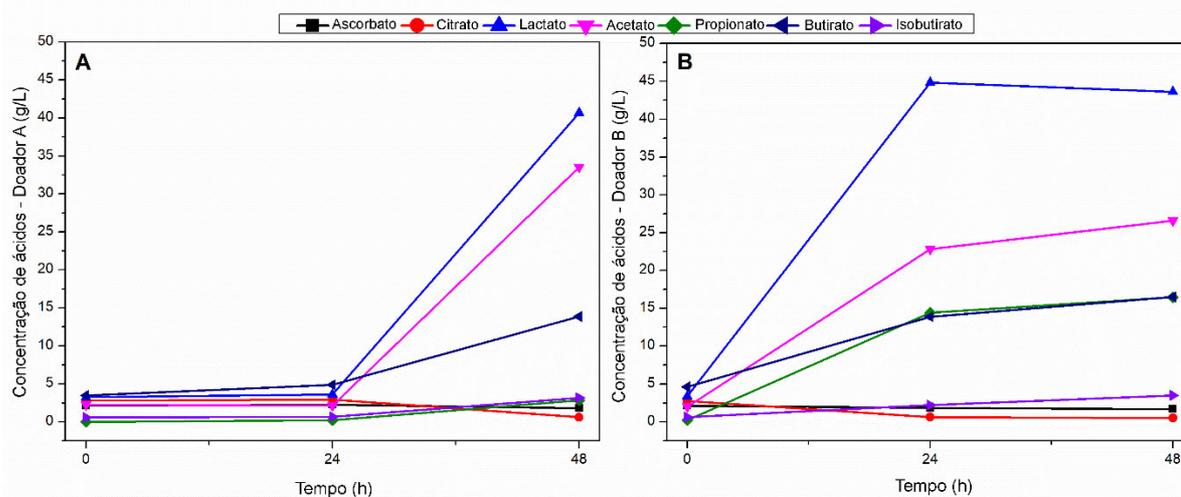
Após a síntese, além dos carboidratos prebióticos, os sucos também apresentam açúcares simples residuais, como sacarose e açúcares simples (glicose e frutose). A Figura 2B detalha a concentração relativa desses açúcares ao longo da digestão *in vitro* e o consumo dos mesmos durante a fermentação colônica até 48 h de processo. Durante a digestão, a sacarose

foi parcialmente hidrolisada e concentração de açúcares redutores se manteve acima de 80%. A microbiota fecal consumiu o conteúdo total de sacarose em 24 h de processo, enquanto isso, os açúcares redutores foram quase totalmente consumidos em 48 h de fermentação.

3.3.2 Produção de ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

As implicações da ingestão de prebióticos na saúde do hospedeiro são relacionadas especialmente à produção de AGCC. A Figura 3 ilustra os principais metabólitos provenientes da fermentação do suco potencialmente prebiótico digerido, pela microbiota fecal de dois doadores.

Figura 3 - Concentração de ácidos orgânicos, ácidos graxos de cadeia curta e ácidos graxos de cadeia ramificada durante a fermentação do suco de laranja potencialmente prebiótico digerido pela microbiota intestinal de 2 doadores (A e B).



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Lactato foi o principal metabólito obtido a partir do consumo dos carboidratos pela microbiota intestinal, seguido do acetato. A produção de lactato e acetato pode ser explicada, em partes, pela bioconversão de citrato por microrganismos intestinais, como por exemplo, as bactérias ácido-láticas.

Em conformidade, a concentração de citrato apresentou uma redução durante a fermentação e comportamento similar foi observado para o ascorbato. Como esperado, o perfil de metabólitos produzidos pela microbiota de cada doador teve suas particularidades. Para o doador A, a alta produção de ácido se deu apenas em 48 h, enquanto o doador B

produziu uma alta concentração de AGCC já em 24 h. No entanto, os resultados estão coerentes com os dados do consumo de oligossacarídeos mostrados na Figura 1, onde os oligossacarídeos foram consumidos rapidamente pela microbiota do doador B em 24 h, resultando na elevada produção de metabólitos ácidos no mesmo tempo de processo.

Para ambos doadores, acetato foi o AGCC com maior acúmulo durante a fermentação. Contudo, algumas diferenças foram evidenciadas no perfil dos AGCC dos voluntários, com ênfase na produção de propionato. Um aumento acentuado na concentração de propionato foi observado em 24 h (14,44 g/L), atingindo 16,47 g/L no final do experimento com a microbiota do doador B. Por outro lado, apenas 2,85 g/L de propionato foram produzidos pela microbiota fecal do doador A em 48 h. Nessa perspectiva, o perfil de AGCC é dependente de cada indivíduo, principalmente devido às particularidades da população microbiana intestinal de cada doador. Embasado nesses resultados, sugere-se que a microbiota do voluntário B apresenta microrganismos produtores de propionato, onde estão inseridos microrganismos dos gêneros *Bacteroides* e *Bifidobacterium*. Além do consumo de prebióticos, a produção de propionato por ser correlacionada com o uso de frutose como substrato (WANG *et al.*, 2017, 2019). Somado a isso, algumas cepas probióticas de *Lactobacillus* são capazes de metabolizar glico-oligossacarídeos, resultando em uma alta produção de ácido acético, seguido de ácido propiônico (SHI *et al.*, 2018). Outros autores também reportaram a produção de acetato e propionato a partir do uso de xilo-oligossacarídeos como substrato (AMORIM *et al.*, 2020). Nesse contexto, pode-se destacar que o propionato influencia fortemente na modulação da síntese de colesterol no fígado, redução dos níveis de triglicerídeos, melhoramento de esteatose hepática, e apresenta um papel importante no ganho de peso (GHOSH *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2017).

Acetato e Lactato são metabólitos produzidos principalmente por *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* durante a fermentação de prebióticos e são reconhecidos por promoverem efeitos benéficos à mucosa intestinal (SU *et al.*, 2019). Ademais, esses metabólitos podem ser usados como fonte de energia e estimular o crescimento de outros microrganismos, como por exemplo, microrganismos produtores de butirato. Esse processo é conhecido como *cross-feeding*, onde uma bactéria é indiretamente estimulada por metabólitos produzidos por outro grupo de bactérias (WANG *et al.*, 2020a).

Em relação ao butirato, a maior produção foi obtida pelo doador B, com 16,48 g/L em 48 h. Entretanto, a microbiota do doador A produziu 13,85 g/L no final da fermentação, valor similar ao atingido pela microbiota do doador B em 24 h. O butirato é essencial para a saúde do hospedeiro, dentre seus benefícios merece ênfase o melhoramento da barreira de

função, absorção mineral e regulação do sistema imune. Adicionalmente, o butirato fornece energia para as células do cólon e podem prevenir o câncer de cólon devido a sua habilidade de causar apoptose nas células cancerígenas, diferenciando-as das células epiteliais normais (WANG *et al.*, 2019). Dos microrganismos produtores de butirato, podemos mencionar o filo *Firmicutes* que engloba *Roseburia* spp., *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Clostridium leptum*, *Coprococcus catus*, *Ruminococcus* e *Oscillospira* (OSE *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020a).

Além da concentração de AGCC e lactato, a Figura 3 mostra a formação de isobutirato, um ácido graxo de cadeia ramificada. Em comparação aos AGCC, o acúmulo de isobutirato foi inferior durante a fermentação colônica, atingindo valores de apenas 3,17 e 3,49 g/L em 48 h. Resultado interessante, visto que os ácidos graxos de cadeia ramificada são metabólitos provenientes da clivagem de proteínas por bactérias colônicas (WANG *et al.*, 2019). O isobutirato juntamente com os compostos indesejáveis da fermentação de proteínas podem causar um aumento do pH do lúmen. Desse modo, uma baixa concentração desse ácido torna-se essencial para um ambiente intestinal saudável (FAN; PEDERSEN, 2021; GÓMEZ *et al.*, 2014).

3.3.3 Análise da microbiota intestinal

O índice Shannon mede a uniformidade dos táxons de cada amostra (SHANNON, 1948), enquanto o índice Chao1 estima a riqueza total das espécies (CHAO; BUNGE, 2002). Em outras palavras, os índices Chao1 e Shannon avaliam a riqueza e diversidade da microbiota intestinal, respectivamente. A amostra fecal do doador A apresentou índice Chao1 de 853,89 e índice Shannon de 3,55. Enquanto isso, a microbiota fecal inicial do doador B teve um índice Chao1 de 722,22 e índice Shannon de 3,59. Ao final da fermentação, nenhuma diferença significativa foi observada para as amostras do doador B, que mantiveram os índices Chao 1 de 768.01 e Shannon igual a 2.47. Não obstante, a riqueza da microbiota do doador A reduziu drasticamente, alcançando valores de Chao1 de 308,70 e índice Shannon igual a 2,18. Os resultados evidenciam que carboidratos complexos, como oligossacarídeos e dextrana, presentes no suco de laranja promovem mudanças na diversidade e composição da microbiota, como discutido posteriormente.

O inóculo fecal humano de ambos doadores apresentou uma microbiota intestinal diversa e saudável, mesmo que em diferentes proporções, tendo em vista que a composição é exclusiva de cada indivíduo. O filo *Firmicutes* foi dominante no inóculo fecal dos voluntaries,

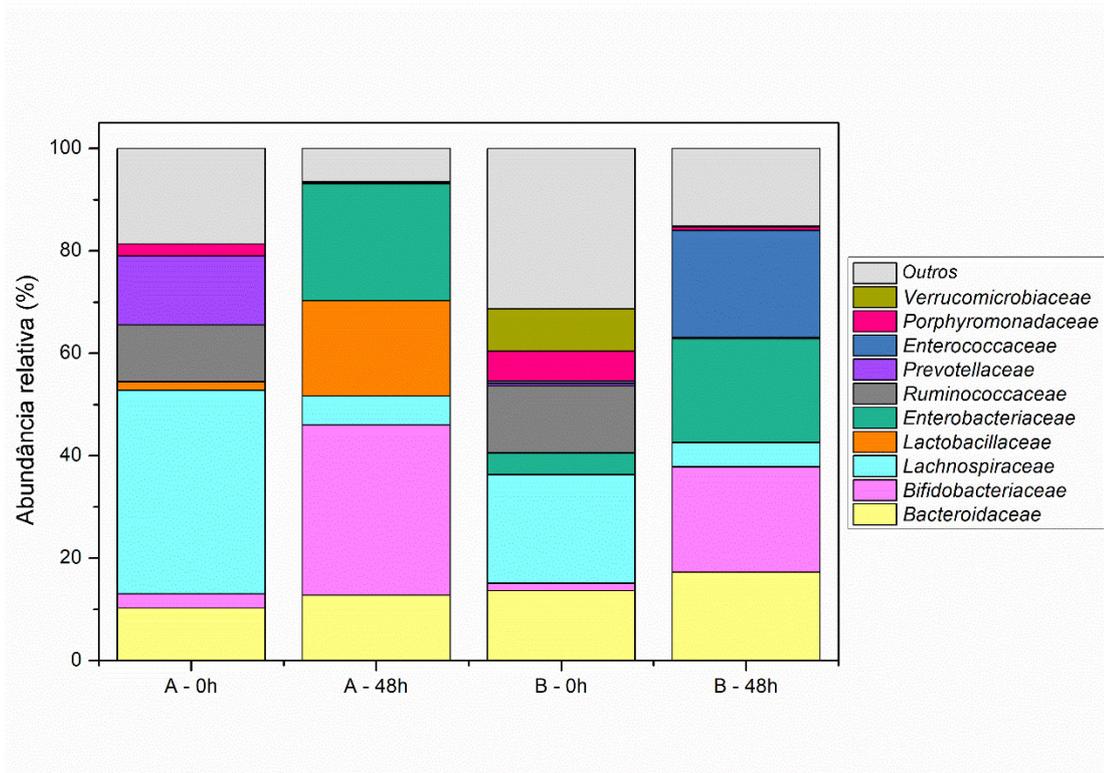
com mudanças marcantes após a fermentação do suco de laranja digerido. Os dados foram obtidos para todos os níveis taxonômicos. No que concerne aos filos, a composição da população microbiana era formada por *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, e *Actinobacteria*. Como discutido anteriormente, durante a fermentação colônica houve o consumo de oligossacarídeos e dextrana, alinhado a isso, foi identificado um aumento na abundância relativa de *Actinobacteria* e uma redução de *Firmicutes*. Lembrando que, *Firmicutes* compreende as classes *Clostridia* e *Bacilli*, e no filo *Actinobacteria* está incluída a ordem *Bifidobacteriales*.

O suco digerido contendo oligossacarídeos e dextrana causou mudanças benéficas na composição da microbiota fecal. Isso foi demonstrado por meio da redução da abundância relativa da classe *Clostridia* de 55,80 para 8,27% em paralelo ao aumento da classe *Bacilli* de 1,74 para 18,87% na microbiota do doador A. Do mesmo modo, na microbiota do doador B, a abundância relativa de *Clostridia* reduziu de 42,30 para 12,34%, e a abundância relativa de *Bacilli* aumentou de 0,96 para 21,06%. Além do exposto, a classe *Bacteroidia* reduziu após 48 h de fermentação com ambas as amostras fecais, enquanto *Actinobacteria* foi a classe dominante com 34,98% para o doador A e 21,66% para o doador B. A população bacteriana sofreu mudanças significantes no nível taxonômico ordem, onde *Clostridiales* e *Bacteroidales* apresentaram reduzidos valores de abundância relativa para ambos doadores após fermentação, e o suco de laranja com potencial prebiótico e digerido enriqueceu a composição da microbiota intestinal em termos de *Bifidobacteriales*, *Enterobacteriales* e *Lactobacillales*.

Na Figura 4, o efeito benéfico do suco de laranja, após digestão, é evidenciado pelo aumento da abundância relativa da família *Bifidobacteriaceae* e *Lactobacillaceae*. Essas famílias englobam espécies e gêneros importantes classificados como probióticos e reconhecidos por metabolizarem carboidratos prebióticos, como os oligossacarídeos e dextrana presentes no suco estudado.

A abundância de *Bifidobacteriaceae* se destaca na microbiota de ambos os doadores após 48 h de fermentação, onde se observa uma abundância relativa de 33,20% para o doador A e de 20,57% para o doador B. Em contrapartida, somente a microbiota do doador A foi enriquecida em termos de *Lactobacillaceae*, atingindo 18,61% ao final da incubação. Em resumo, esses resultados confirmam que inóculo fecal de cada voluntário apresenta suas peculiaridades e que a composição da microbiota fecal varia mesmo quando incubados na presença dos mesmos substratos.

Figura 4 - Abundância relativa (%) da microbiota intestinal de dois doadores (A e B) à nível taxonômico família, antes e após fermentação do suco de laranja potencialmente prebiótico digerido. As famílias com abundância relativa acima de 5% em pelo menos uma das amostras foram apresentadas na figura, as outras famílias foram agrupadas e classificadas como “Outros”.



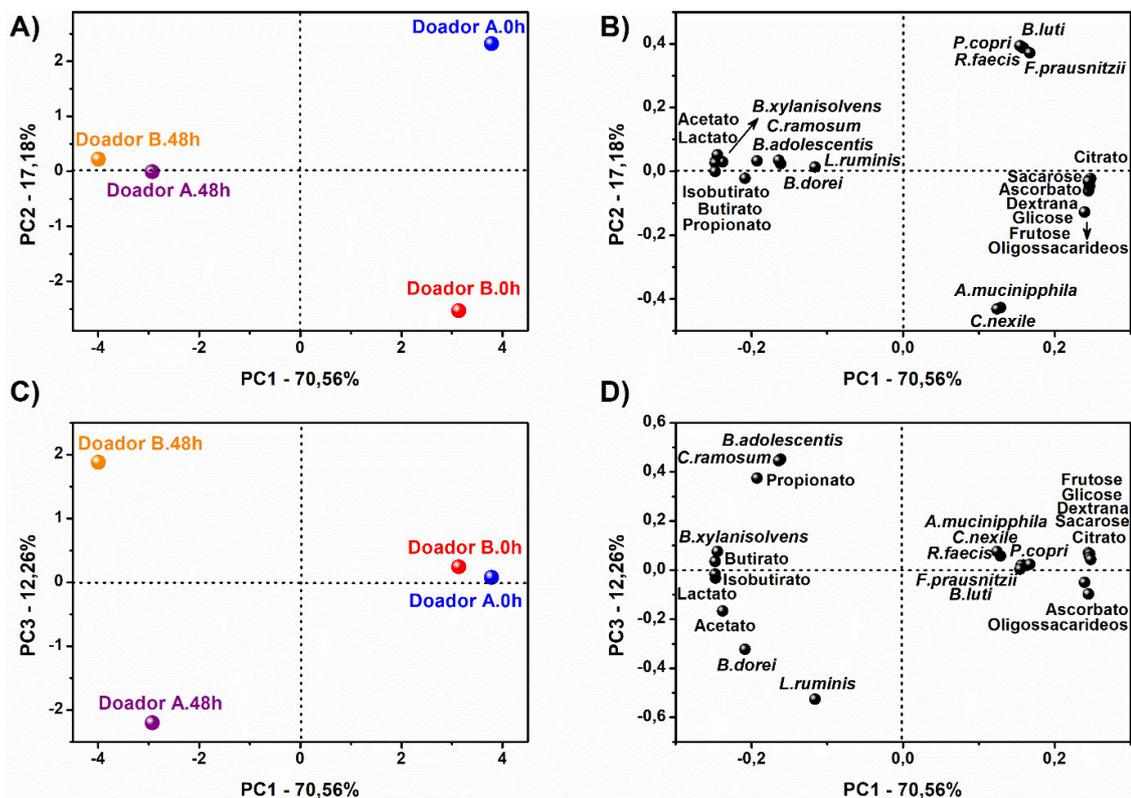
Fonte: Elaborado pela autora (2024)

O inóculo fecal de ambos os doadores apresentou abundância similar para a família *Bacteroidaceae*, que aumentou levemente após a fermentação. A família dominante na microbiota inicial dos voluntários foi *Lachnospiraceae*, com uma abundância de 39,80 e 21,12% para os doadores A e B, respectivamente. Todavia, a incubação com suco de laranja contendo oligossacarídeos e dextrana proporcionou uma redução acentuada na abundância de *Lachnospiraceae*, alcançando 5,65 (doador A) e 4,76% (doador B) após 48 h. Comportamento similar foi constatado para *Ruminococcaceae*, onde a abundância relativa foi próxima a zero após 48 h de fermentação colônica. Em relação a família *Enterobacteriaceae*, um aumento da abundância foi observado após a fermentação do suco pela microbiota fecal de ambos indivíduos. Contrariamente, a família *Prevotellaceae*, que nitidamente foi mais abundante no inóculo do doador A em comparação ao doador B, mostrou uma redução quase completa após fermentação com o suco potencialmente prebiótico. Para complementar, *Enterococcaceae*

tornou-se mais evidente somente após fermentação pela microbiota do doador B, finalizando com uma abundância de 20,91%.

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi usada para explicar a variabilidade da composição do suco de laranja com base na influência das amostras fecais. A Figura 5 ilustra os resultados do PCA, onde os eixos PC1, PC2 e PC3 retiveram 100% da variância total. A Figura 5 revelou que a principal discriminação da dinâmica da microbiota é baseada na influência do tempo de fermentação (0 e 48 h), independente do doador (A ou B). O eixo PC2 (Figura 5A) mostra a microbiota de cada doador antes da fermentação (0 h) e a composição da microbiota após o consumo do substrato prebiótico, onde as amostras de ambos os doadores foram agrupadas em torno do escore 0 após 48 h. Essas diferenças na composição do inóculo fecal humano é vinculada à diversos fatores, com enfoque no tipo de dieta, um dos principais determinantes da composição da microbiota intestinal (TREFFLICH *et al.*, 2020).

Figure 5 - Escores (a) e respectivos *loadings* (b) de PC1 × PC2. Escores (c) e respectivos *loadings* (d) de PC1 × PC3. Sistemas de coordenadas da avaliação do suco de laranja digerido antes (0 h) e após a fermentação (48 h) pela microbiota intestinal de dois doadores (A e B).



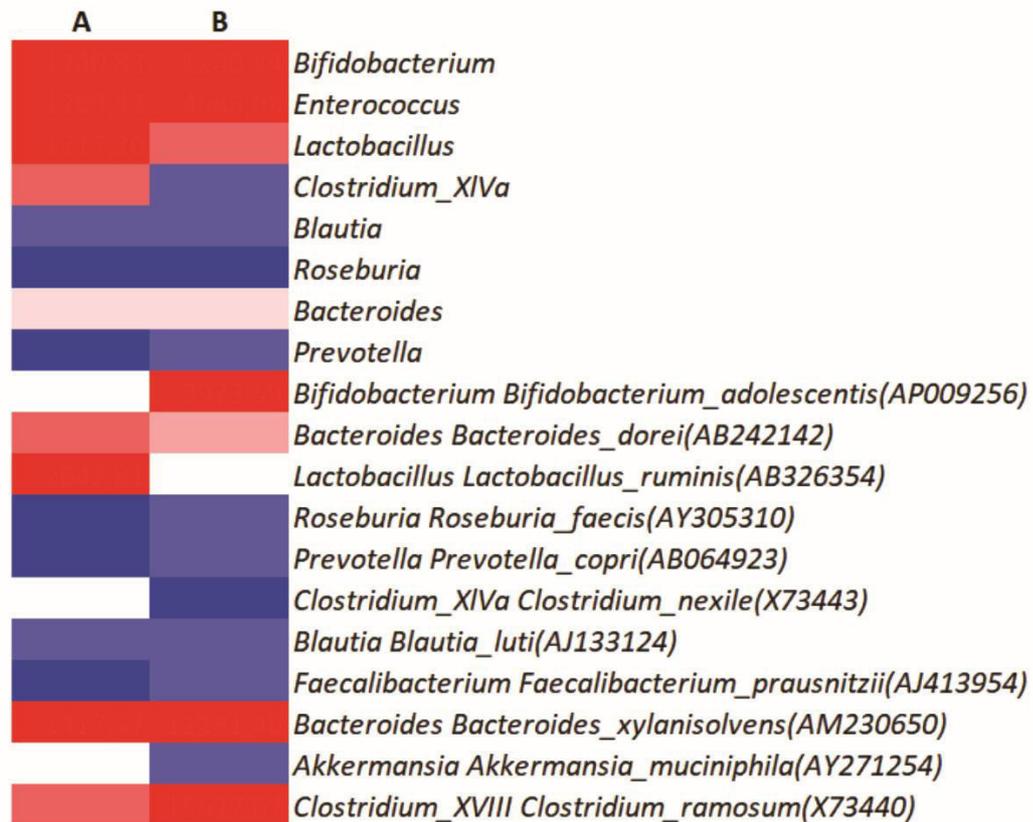
Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Observa-se que, altas concentrações de acetato, lactato, propionato, butirato e isobutirato estavam diretamente correlacionadas com a abundância de *B. adolescentis*, *B. dorei*, *L. ruminis*, *B. xylanisolvens* e *C. ramosum* nos sucos após 48 h de fermentação. Dentre os ácidos, sabe-se que, lactato e acetado são produzidos a partir do metabolismo de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Além disso, esses metabólitos são produzidos durante a fermentação de prebióticos e, como explicado previamente, podem ser usados como fonte de energia para outros microrganismos (WANG *et al.*, 2020a). No que diz respeito a concentração de butirato, *Bacteroides* também são conhecidos como microrganismo produtores de butirato (AMORIM *et al.*, 2020), o que reflete diretamente na correlação observada de *B. dorei* e *B. xylanisolvens* com a concentração de butirato na Figura 5B.

Diante do exposto, o crescimento significativo de *B. adolescentis* é um aspecto importante relacionado ao estado saudável do hospedeiro, visto que algumas cepas podem conferir um efeito positivo no alívio da obstipação e produzir ácido gama-aminobutírico, o qual apresenta um potencial impacto em distúrbios mentais como ansiedade e depressão (DURANTI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2017). Por outro lado, *L. ruminis* é reconhecido devido ao seu destaque na microbiota intestinal em meio as bactérias ácido-láticas (HOU *et al.*, 2020). Além disso, durante seu metabolismo, podem usar carboidratos como açúcares simples e oligossacarídeos graças à presença de enzimas glicosil hidrolases presentes em seu genoma (O'DONNELL *et al.*, 2015).

Por outro lado, baixas concentrações de sacarose, glucose, frutose, citrato, ascorbato, dextrana e oligossacarídeos foram correlacionados com baixas quantidades *R. faecis*, *P. copri*, *C. nexile*, *B. luti*, *F. prausnitzii* e *A. muciniphila* após 48 h de fermentação colônica. Os resultados sugerem que o consumo de açúcares simples e carboidratos potencialmente prebióticos não promoveram o crescimento dessas espécies. Algumas espécies, como *R. faecis*, *C. nexile* e *B. luti*, pertencem a classe *Clostridia* e podem causar efeitos prejudiciais ao organismo (GÓMEZ *et al.*, 2014). *F. prausnitzii* e *A. muciniphila* são microrganismos potencialmente probióticos devido as propriedades benéficas associadas ao tratamento de algumas doenças (SANDERS *et al.*, 2019). Entretanto, o suco de laranja contendo oligossacarídeos e dextrana reduziu a abundância dessas espécies, quando identificadas no inóculo fecal dos doadores. Estes resultados corroboram com um estudo anterior onde o metabolismo dos oligossacarídeos não favoreceu o crescimento de *A. muciniphila*. No entanto, a maioria dos estudos indica o efeito oposto (OSE *et al.*, 2018).

Figura 6 - *Heatmap* representando as variações dos principais gêneros e espécies após a fermentação de 48 h do suco de laranja digerido pela microbiota fecal de dois doadores (A e B): cor vermelha mais intensa representa maiores variações positivas (aumento na abundância relativa entre 0 e 48 h); azul mais intenso as maiores variações negativas (redução na abundância relativa entre 0 e 48 h); e a ausência de variação em branco.



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Além disso, os eixos PC1 e PC3 na Figura 5 revelaram a discriminação da microbiota com base nos dois doadores. Antes da fermentação fecal (0 h), PC1 destacou as elevadas quantidades de *R. faecis*, *P. copri*, *B. luti*, e *F. prausnitzii* no suco digerido inoculado com a amostra fecal do doador A, e altas concentrações de *C. nexile* e *A. muciniphila* somados à quantidades ligeiramente mais elevadas de sacarose, glicose, frutose, citrato, ascorbato, dextrana e oligossacarídeos na amostra do doador B. A variabilidade dos microrganismos e dos compostos do suco digerido refletiu na variabilidade da composição da microbiota e dos metabólitos após 48 h de fermentação, que foram posicionadas no eixo PC3: maiores concentrações de *B. dorei* e *L. ruminis* com altas quantidades de acetato e lactato na amostra

fecal do doador A; a altas concentrações de *B. adolescentis* e *C. ramosum* com elevadas quantidades de propionato, detectados na amostra fecal do doador B.

Sabe-se que *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, e *Streptococcus* produzem acetato pela rota Wood-Ljungdahl e acetyl-CoA pathways, o que confirma a correlação entre *B. dorei*, *L. ruminis*, e acetato (FENG; AO; PENG, 2018). Por outro lado, embora *Bifidobacterium* esteja positivamente correlacionado ao propionato, a produção desse AGCC pode ter sido favorecida via *cross-feeding* e não pela via metabólica direta. Portanto, os metabólitos provenientes do metabolismo de microrganismo do gênero *Bifidobacterium*, incluindo acetato e lactato, podem ser usados como compostos intermediário para o crescimento de microrganismos produtores de propionato (LI *et al.*, 2019).

Os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* compreendem vários microrganismos reconhecidos como probióticos. Dito isso, um aumento significativo na abundância desses dois gêneros é indicativo de uma microbiota saudável. Baseado nisso, as descobertas desse estudo confirmam o efeito benéfico do suco de laranja contendo oligossacarídeos e dextrana na composição microbiana de amostras fecais humanas, evidenciando os benefícios potenciais do consumo regular de sucos. *Bifidobacterium* apresentou elevada abundância para ambos os doadores, a medida que *Lactobacillus* dominou a microbiota do doador A e mostrou um ligeiro aumento na microbiota do doador B.

Bifidobacterium adolescentis é considerada um membro essencial na microbiota intestinal de adultos, sendo no presente trabalho, a espécie de *Bifidobacterium* com maior abundância na amostra fecal do doador B. Ainda nesse sentido, *B. adolescentis* apresentou a maior abundância relativa (41,73%) após 48 h de fermentação do suco com carboidratos potencialmente prebióticos. No entanto, essa espécie não foi identificada na microbiota do doador A no final do processo fermentativo. Em contrapartida, a população bacteriana da amostra do doador A foi enriquecida no que diz respeito a espécie *Lactobacillus ruminis*, seguindo comportamento semelhante à abundância de *B. adolescentis* para o doador B. Embora *B. adolescentis* não tenha sido detectada na microbiota do doador A, outro membro de *Bifidobacterium* foi encontrado (30.11%), porém não foi possível classificar, à nível de espécie com a base de dados DADA 2. Sendo assim, outra base de dados, *Greengenes*, foi utilizada e identificou a espécie *Bifidobacterium galicum*.

Na mesma perspectiva, foi observado um aumento do gênero *Bacteroides* em ambas as amostras dos doadores. Esse fato pode ser justificado pela maior abundância relativa de *Bacteroides xylanisolvens* e *Bacteroides dorei*, espécies pertencentes ao gênero

Bacteroides. Aliado a isso, *B. xylanisolvens* vem sendo estudado e considerado um probiótico emergente (TAN; ZHAI; CHEN, 2019). *B. dorei* é uma das espécies de *Bacteroides* mais abundantes na microbiota intestinal humana, e contribui fortemente na atenuação da aterosclerose, enquanto *B. xylanisolvens* atua aliviando a esteatose hepática não alcoólica (QIAO *et al.*, 2020). Além disso, a Figura 5D mostra que *B. xylanisolvens* e butirato estão agrupados no escore 0, indicando uma correlação entre eles e sugerindo que *Bacteroides* são produtores de butirato. Desta forma, o enriquecimento da microbiota em termos destas espécies pode ser interessante para a saúde humana. O *heatmap* apresentado na Figura 6 permite a visualização das alterações na composição da microbiota para cada doador após 48 h de fermentação colônica. Além de fornecer informações que esclarecem os agrupamentos das microbiotas fecais com base na sua composição antes e depois da fermentação do suco de laranja. Conforme discutido anteriormente, os gêneros com importância probiótica, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, aumentaram após o cultivo *in vitro* da microbiota fecal para ambos os doadores, enquanto outros gêneros diminuíram.

3.4 Conclusão

Conclui-se que, o suco de laranja contendo oligossacarídeos e dextrana promove mudanças positivas no ambiente intestinal, sendo assim considerado um alimento prebiótico em potencial. O suco digerido melhorou a composição e diversidade da microbiota intestinal em termos de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, assim como de outros microrganismos candidatos à probiótico e promotores de benefícios à saúde, como *Bacteroides xylanisolvens* e *B. dorei*. Além disso, oligossacarídeos e dextrana foram quase totalmente consumidos pela microbiota de ambos os doadores, levando a alta produção de lactato e AGCCs. A produção de ácidos metabólicos foi mais rápida para o doador B, com ênfase no acúmulo de propionato. Por fim, essas descobertas sugerem que o suco de laranja potencialmente prebiótico tem um papel metabólico essencial e pode influenciar na saúde do hospedeiro.

CAPÍTULO 4

4 EFEITOS BENÉFICOS DE SUCO DE LARANJA POTENCIALMENTE PREBIÓTICOS NA BARREIRA EPITELIAL E NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO USANDO CÉLULAS INTESTINAIS HUMANAS CACO-2/TC7

Resumo

A produção de sucos de frutas com potencial prebiótico, especialmente pela síntese enzimática de carboidratos não digeríveis, é uma estratégia promissora para potencializar seus benefícios à saúde. Este estudo investigou o impacto de suco de laranja sem (SL) e com oligossacarídeos e dextrana (SLP), antes e após digestão *in vitro* (SLD e SLPD, respectivamente) na viabilidade celular, resistência elétrica transepitelial (TEER) e expressão de genes relacionadas à inflamação (IL-8, TNF- α , NF- κ B e COX-2), do gene relacionado às junções estreitas (ZO-1) e dos genes transportadores de glicose (GLUT-2, SGLT-1 e GLUT-5), utilizando células intestinais humanas do tipo Caco-2/TC7. Essas células são amplamente utilizadas como modelos de barreira epitelial intestinal para avaliar o efeito de moléculas biológicas. Antes de testar os efeitos nas células intestinais, a resistência dos oligossacarídeos e dextrana às condições do trato gastrointestinal foi confirmada utilizando o protocolo de digestão *Infogest*. Em seguida, as células intestinais foram incubadas com suco de laranja (SL) e suco de laranja prebiótico (SLP) diluídos em meio de cultura nas concentrações de 5 e 10% (v/v), e com sucos digeridos (SLD e SLPD) nas concentrações de 1,25 e 2,5%. A viabilidade celular foi avaliada por microscopia e pelo uso do kit de proliferação celular II (XTT). Os níveis de RNAm dos genes alvo foram quantificados por RT-qPCR. O SLP melhorou a viabilidade celular mesmo em altas concentrações, e o SLPD aliviou as perdas estruturais e o desprendimento celular em comparação ao SLD. Células incubadas com suco contendo carboidratos prebióticos (SLP) apresentaram maiores valores de TEER do que células tratadas somente com suco de laranja (SL). Além disso, o SLPD, principalmente na concentração de 1,25%, reduziu a expressão de todos os genes testados relacionados à inflamação. SLPD a 1,25% não afetou o nível de RNAm de ZO-1, enquanto SLPD a 2,5% aumentou a expressão do gene ZO-1. A SLPD não afetou significativamente a expressão de genes relacionados ao transporte de açúcar, mostrando apenas uma ligeira redução no nível de RNAm de GLUT-2. Estas descobertas mostraram que o suco de laranja digerido e

potencialmente prebiótico induz mudanças positivas na expressão de genes relacionados à barreira intestinal e à inflamação, em células Caco-2/TC7.

Palavras-chave: Oligossacarídeos; Dextrana; Inflamação; Integridade da barreira; Expressão gênica.

4.1 Introdução

O trato gastrointestinal (TGI) desempenha um papel crucial na saúde humana envolvendo a digestão de alimentos, biotransformação, absorção de nutrientes e modulação imunológica (DIXIT *et al.*, 2023). O ecossistema intestinal possui uma barreira seletiva construída por células epiteliais intestinais que separam o conteúdo luminal da circulação (YANG *et al.*, 2022). O ambiente é dotado de características importantes para manter a permeabilidade das células epiteliais e da homeostase do hospedeiro (CHEN *et al.*, 2021).

O fluxo estrito e regulado entre o lúmen intestinal e os tecidos subjacentes é conseguido graças às junções intercelulares que conectam a barreira intestinal (TIAN *et al.*, 2022). A manutenção da estrutura física e as propriedades da permeabilidade da barreira intestinal estão associadas em parte à expressão de proteínas de junções estreitas, especialmente da zônula de oclusão (ZO-1), uma proteína estrutural crítica para manutenção da integridade da barreira intestinal (CHEN *et al.*, 2021; LIAN *et al.*, 2023).

A inflamação intestinal e o estresse oxidativo podem comprometer a função da barreira seletiva (TIAN *et al.*, 2022). A desruptura da barreira epitelial intestinal promove maior permeabilidade e translocação de componentes dos microrganismos, desencadeando a ativação de uma resposta imune desregulada e, conseqüentemente, levando à inflamação (LAURINDO *et al.*, 2023). Fatores ambientais, incluindo o estilo de dieta, podem comprometer a integridade da barreira intestinal, reduzir a viabilidade celular e desencadear a inflamação (ERSHAD *et al.*, 2021). Logo, uma dieta saudável pode desempenhar um papel importante na modulação das funções intestinais e conseqüentemente da inflamação (IGLESIAS *et al.*, 2020).

Os prebióticos são substratos utilizados seletivamente por microrganismos do hospedeiro que conferem benefícios à saúde (GIBSON *et al.*, 2017). Sua ingestão reduz a constipação, evita a colite e melhora a microbiota intestinal (BAMIGBADE *et al.*, 2022). Além da melhoria do TGI, os prebióticos podem beneficiar o cardiometabolismo e a saúde

mental, prevenir câncer e melhorar o sistema imunológico, entre outros (BAMIGBADE *et al.*, 2022; YADAV *et al.*, 2022).

Galacto-oligossacarídeos (GOS), fruto-oligossacarídeos (FOS), oligossacarídeos do leite humano (HMOs), oligossacarídeos pécticos e oligossacarídeos de quitosana são os prebióticos mais explorados. Sua importância biológica está principalmente relacionada ao reforço e integridade da barreira intestinal e função das junções estreitas (WANG *et al.*, 2020c; ZHU *et al.*, 2022; LIAN *et al.*, 2023).

Estudos acerca do efeito de compostos prebióticos na saúde humana, isolados ou incorporados em matrizes alimentares de base láctea vem sendo realizados (WANG *et al.*, 2020c; TIAN *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2022). Porém, a falta de pesquisas sobre alimentos prebióticos de base vegetal e seu impacto na saúde tem incentivado o desenvolvimento de sucos de frutas contendo oligossacarídeos e dextrana, pela ação da enzima dextrana-sacarase (E.C.2.4.1.5) (LEITE *et al.*, 2021; DO NASCIMENTO *et al.*, 2022).

Modelos *in vitro* têm sido propostos para avaliar as funcionalidades dos prebióticos. A simulação da digestão de alimentos vem sendo usada para avaliar o impacto da estrutura e a composição dos alimentos digeridos na saúde humana (BRODKORB *et al.*, 2019). Por outro lado, os modelos de células Caco-2 são comumente usados para simular a barreira epitelial intestinal e avaliar o papel biológico de medicamentos, suplementos e alimentos, por exemplo, interação, captação e transporte celular (LEA, 2015). Além disso, as células Caco-2 expressam diversos marcadores enzimáticos, de sistemas de transporte de células epiteliais primárias, bem como citocinas e genes inflamatórios envolvidos em processos biológicos, respostas inflamatórias e metabolismo de açúcares (LEA, 2015; MILARD *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2022).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos biológicos de suco de laranja não digerido e digerido contendo oligossacarídeos e dextrana na viabilidade celular, resistência transepitelial e expressão de genes relacionados à inflamação, metabolismo de açúcares e função da barreira intestinal na linha celular Caco-2/TC7.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Preparo do suco de laranja

O suco de laranja foi obtido a partir da diluição do suco de laranja concentrado (LANJAL®) adquirido no mercado local (Fortaleza, CE, Brasil). Para produzir o suco de

laranja potencialmente prebiótico, os oligossacarídeos e a dextrana foram sintetizados diretamente no suco pelo mecanismo de reação do acceptor catalisada pela enzima dextran-sacarase (E.C.2.4.1.5). A enzima foi produzida pelo processo fermentativo da bactéria *Leuconostoc mesenderoides* B512 F (FONTES *et al.*, 2015; LEITE *et al.*, 2022).

Antes da síntese, a concentração de açúcares foi ajustada para 75 g/L de sacarose e 75 g/L de açúcares redutores (glicose e frutose em proporções equimolares) para obter uma alta produção de oligossacarídeos, e o pH foi ajustado para 5,2. A síntese foi realizada no volume reacional de 2000 mL com 1 UI/mL de dextran-sacarase em um reator batelada agitado mecanicamente a 25 °C, 250 rpm de agitação por 6 h. Por fim, para inativar a enzima, o pH foi reduzido para 4,2 (LEITE *et al.*, 2022).

O suco de laranja contendo oligossacarídeos e dextrana foi diluído em suco de laranja para atingir a concentração entre 1,5 a 30 g/dia, o limite diário de ingestão de prebióticos proposto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), considerando uma porção de 250 mL de suco.

4.2.2 Digestão *in vitro*

A simulação da digestão gastrointestinal seguiu o protocolo *Infogest*, que envolve três fases digestivas: oral, gástrica e intestinal (BRODKORB *et al.*, 2019). A digestão *in vitro* foi realizada em um reator batelada agitado a 37 °C e 90 rpm de agitação, com volume final de 1000 mL.

Antes da realização dos experimentos, as soluções estoques para cada fase foram preparadas de modo a simular fluido salivar (SFS), fluido gástrico (SFG) e fluido intestinal (SFI). Mesmo em alimentos líquidos como suco, é indicado a simulação da fase oral para garantir uma diluição consistente. Assim, na fase oral, o suco foi diluído em SFS 1:1 (p/v), sem adição de amilase salivar e incubado por 2 min. A fase gástrica foi caracterizada pela mistura (1:1) do bolo oral com SFG e 2000 U/mL de pepsina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). A incubação foi realizada a pH 3,0 por 2 h sob agitação.

Por fim, na fase intestinal o quimo gástrico foi diluído em SFI 1:1 (v/v), 200 mg/mL de bile e 133,3 mg/mL de pancreatina (Sigma Aldrich). O pH da mistura foi ajustado para 7,0 e o processo foi realizado a 37 °C por mais 2 h sob agitação de 90 rpm. Os experimentos foram realizados com 125 mL de suco e, ao final de cada fase, obteve-se 250, 500 e 1000 mL, respectivamente.

Amostras foram coletadas em 0, 2 e 4 h de digestão para quantificar oligossacarídeos, dextrana e açúcares simples, conforme descrito na seção 4.2.3.

Os sucos não digerido e digerido foram codificados conforme descrito a seguir:

SL - Suco de laranja, sem oligossacarídeos/dextrana e não digerido;

SLP - Suco de laranja potencialmente prebiótico, com oligossacarídeos/dextrana e não digerido;

SLD - Suco de laranja, sem oligossacarídeos/dextrana após digestão *in vitro*;

SLPD - Suco de laranja potencialmente prebiótico, com oligossacarídeos/dextrana após digestão *in vitro*.

4.2.3 Análise de carboidratos

4.2.3.1 Oligossacarídeos e dextrana

Para quantificar oligossacarídeos e dextrana, foi realizada uma etapa inicial adicionando 3 volumes de etanol 96% (v/v) aos sucos não digeridos e digeridos. Assim, a dextrana foi precipitada e o sobrenadante foi recuperado para quantificação de oligossacarídeos e açúcares simples. Posteriormente, o sobrenadante foi diluído em água ultrapura (Sistema Milli-Q, Millipore®) e filtrado com o auxílio de membrana de acetato de celulose com 0,45 µm (Millipore®).

Por sua vez, o pellet de dextrana (precipitado) foi ressuspenso em água destilada e quantificado seguindo a metodologia fenol-sulfúrico descrita por Dubois *et al.* (1956). A concentração de oligossacarídeos foi calculada por balanço de massa conforme descrito por Rabelo *et al.* (2006).

4.2.3.2 Açúcares simples

Sacarose, glicose e frutose foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em sistema Infinity 1260 (Agilent®). Uma coluna BIORAD HPX-87C (300×7,8 mm) foi usada para separar as substâncias a 80 °C. Água ultrapura foi utilizada como fase móvel a 0,5 mL/min. Os açúcares simples foram detectados por detector de índice de refração (IR) a 35 °C (LEITE *et al.*, 2022).

4.2.4 Preparo da amostra

Os sucos foram avaliados em diferentes concentrações, variando de 1,25 a 15%. As concentrações foram selecionadas a partir de estudos já publicados na literatura sobre o efeito dos sucos cítricos nas células (XU *et al.*, 2003; ISLAM *et al.*, 2016).

Primeiramente, os sucos não digeridos foram diluídos a 15% em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), com GlutaMAX e 4,5 g/L de glicose, sem piruvato (Gibco 61965-026), adicionado de 1% (v/v) de antibióticos (10.000 UI/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina) e 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais (100X), sem adição soro fetal bovino. Os sucos diluídos foram submetidos à centrifugação a 3000 rpm/15 min/16 °C. O sobrenadante foi recuperado e foram realizadas diluições seriadas para obter concentrações de suco de 10, 8, 7, 5, 2,5 e 1,25%.

Com o objetivo de inativar os sais biliares e as enzimas digestivas, foi realizado um pré-tratamento com ácido clorídrico (HCl) nos sucos digeridos. O pH dos sucos foi reduzido até 2,0 - 2,5. Em seguida, o procedimento realizado foi o mesmo descrito para o suco não digerido, com uma etapa adicional de filtração do sobrenadante (0,20 µm). O meio DMEM contém HEPES 25 mM que mantém o pH neutro mesmo após o pré-tratamento ácido, ideal para cultura de células.

4.2.5 Cultura de células

Células Caco-2/TC7 foram cultivadas a 37 °C e atmosfera contendo 10% de CO₂ em meio DMEM, com GlutaMAX e 4,5 g/L de glicose, sem piruvato (Gibco 61965-026). O meio foi suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF), 1% (v/v) de antibióticos (10.000 UI/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina) e 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais (100X). O meio foi trocado a cada dois ou três dias. Uma vez por semana, as células foram tripsinizadas com tripsina-EDTA 0,25% (1X) e semeadas a uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células em frascos de cultura celular T75.

Todas as culturas foram realizadas a 37 °C e atmosfera de 10% de CO₂ durante 48 h. Para microscopia, as células foram semeadas com 10^5 células por poço (1,9 cm²) em placas de 24 poços. Após 48 h, o meio foi removido e as células foram lavadas com meio completo, sem adição de soro. Em seguida, o meio foi retirado e foram adicionados 500 µL dos sucos diluídos. A preparação da amostra será explicada mais detalhadamente na Seção 4.2.5. As células Caco-2/TC7 foram incubadas com os sucos durante 24 h.

Para a viabilidade celular (Seção 4.2.7), as células foram semeadas a $1,6 \times 10^4$ células/poço ($0,32 \text{ cm}^2$) em placas de 96 poços. Conforme descrito para análise microscópica, as células foram lavadas com meio completo isento de soro e depois incubadas com $100 \mu\text{L}$ de sucos diluídos por 24 h.

Por fim, para avaliar a resistência elétrica transepitelial (TEER) e a expressão gênica, as células foram semeadas a uma densidade de $0,6 \times 10^5$ células por insertos de filtro *Transwell* (área de $1,1 \text{ cm}^2$ e tamanho de poro de $0,04 \mu\text{m}$) em placas de 12 poços. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado durante 21 dias para atingir a diferenciação completa. Na primeira semana, utilizou-se o meio completo em ambos os compartimentos, apical e basolateral. Em seguida, as células foram incubadas com meio DMEM completo no compartimento basolateral, e meio completo isento de soro no compartimento apical para diferenciação. Antes de adicionar os sucos de laranja, as células foram incubadas com meio completo isento de soro durante a noite.

No dia do procedimento, o compartimento basolateral foi preenchido com 1 mL de meio completo isento de soro, e $500 \mu\text{L}$ de sucos diluídos foram adicionados ao filtro *Transwell* (apical) durante 6 e 24 h de incubação.

4.2.6 Microscopia

Todas as imagens foram capturadas utilizando-se microscópio invertido Primovert (ZeissTM) com resolução de 100x. As imagens foram obtidas das células incubadas com sucos não digeridos a 1,25 - 10%, sucos digeridos a 1,25 - 5%, meio completo sem soro, como controle positivo, e 1% (v/v) de triton 100X, como controle negativo.

4.2.7 Viabilidade celular

A viabilidade das células Caco-2/TC7 foi medida utilizando o kit de proliferação celular II (XTT) de acordo com o protocolo do fabricante (Roche, Sigma Aldrich, Cat. N°. 11465015001). O teste baseia-se na conversão de sais de tetrazólio XTT em corante formazan (laranja) por enzimas mitocondriais presentes em células metabolicamente ativas.

Após incubação com $100 \mu\text{L}$ do suco por 24 h, $50 \mu\text{L}$ da mistura de marcação XTT, contendo reagente de marcação XTT e reagente de acoplamento de elétrons, foram adicionados a cada poço em banho de gelo (concentração final de XTT $0,3 \text{ mg/mL/poço}$). A absorbância foi medida nos comprimentos de onda de 490 nm e 690 nm (490 - 690 nm)

utilizando leitor de placas (espectrofotômetro Tecan spark) nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min.

Com base nos resultados de microscopia e viabilidade celular, escolheu-se a maior concentração de suco que não causou perda de adesão celular nem afetou a viabilidade celular. Além disso, decidiu-se avaliar uma concentração intermediária de suco que não suprimisse o efeito biológico do suco nas células Caco-2.

4.2.8 Resistência elétrica transepitelial (TEER)

A integridade da monocamada Caco-2/TC7 foi avaliada medindo a TEER com o auxílio de um voltímetro Millicell-ERS (Millipore) com eletrodo duplo. Os eletrodos foram colocados nos dois compartimentos de cada inserto *Transwell*. A medição da TEER foi feita imediatamente após a adição do suco no compartimento superior do inserto, após 6 h e 24 h de incubação. Este sistema ajuda a avaliar a integridade e a confluência da monocamada celular.

Para observar um efeito mais pronunciado dos compostos do suco, optou-se por testar a concentração mais alta, que não causasse danos celulares, assim como um valor intermediário. Para sucos não digeridos: 5 e 10% de suco, e para sucos digeridos: 1,25 e 2,5%.

4.2.9 Extração de RNA e PCR quantitativo (qPCR)

Após 6 h e 24 h de incubação com os sucos, as células foram recuperadas utilizando-se o reagente TRIzol para extração de RNA. A concentração de RNA foi medida com NanoDrop One (Thermo Scientific), e amostras de RNA com proporção A260/280 entre 1,7 e 2,1 foram consideradas de boa qualidade. Um micrograma de RNA foi utilizado para Transcrição Reversa (TR) utilizando o kit de reagentes PrimeScript RT (Takara Bio Inc.). A PCR em tempo real foi realizada com o reagente TB Green Premix Ex Taq (2X) (Tli RNaseH Plus) utilizando um Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemanha).

A expressão gênica foi avaliada com os primers apresentados na Tabela 1. A proteína de ligação TATA (TBP) foi usada como gene para normalizar a expressão gênica em cada amostra.

Tabela 1 - Primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR)

Genes	Forward (Senso)	Reverse (Antisenso)
IL-8	TTCTGCAGCTCTGTGTGAAG	ACAGAGCTCTCTTCCATCAG
TNF-α	AGCCCATGTTGTAGCAAACC	GAGGTACAGGCCCTCTGATG
NF-κB-1	GCACCTAGCTGCCAAAGAAG	CATGGCAGGCTATTGCTCATC
COX-2	CTGCGCCTTTTCAAGGATGG	TCCTGCCCCACAGCAAAC
ZO-1	TAAGCCTCCTGCACACATTG	GGATGGGTTTCATAGCGTTTC
GLUT-2	GAGTTGGCGCTGTAAACATGG	CAGGTCCAATTGCTGAATGC
SGLT-1	AGGAGCGTATTGACCTGGAT	CTCTAGCCCACAAAATAGGT
GLUT-5	GTCCATGTTTCCATTTGGAG	GTTGGAAGATACACCTGCAC
TBP	AGACCATTGCACTTCGTGCC	CCTGTGCACACCATTTTCCC

Fonte: elaborada pela autora (2024).

4.2.10 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em replicata e as análises foram feitas em triplicata. Os resultados foram apresentados em média \pm erro padrão da média ($n = 6$), e submetidos ao teste one-way ANOVA, seguida do teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) utilizando o *software Statistica 14*.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Açúcares simples, oligossacarídeos e dextrana em sucos de laranja

Os açúcares, oligossacarídeos e dextrana identificados nos sucos de laranja e sucos de laranja potencialmente prebióticos são apresentados na Tabela 2. Apenas sacarose, glicose e frutose foram identificadas e quantificadas no suco de laranja, que após digestão *in vitro*, apresentaram concentrações de 26,69; 23,50; 19,61 g/L, respectivamente.

Oligossacarídeos e dextrana também foram monitorados durante a simulação da digestão dos sucos sintetizados pela dextrana-sacarase. O SLP apresentava 29,59 g/L de oligossacarídeos e 14,57 g/L de dextrana, concentrações essas consideradas adequadas para promoverem efeitos benéficos, por não excederem os 30 g/L de prebióticos recomendados por dia. Além disso, os oligossacarídeos apresentaram 10 graus de polimerização (GP), quantidade necessária para proporcionar efeitos prebióticos (LEITE *et al.*, 2022).

Tabela 2 - Concentração (g/L) de açúcares simples, oligossacarídeos e dextrana (DXT) de suco de laranja (SL) e suco de laranja potencialmente prebiótico (SLP) antes e após digestão *in vitro* (SLD e SLPD), respectivamente

	Sacarose	Glicose	Frutose	Oligo	DXT
SL	30,74 ± 0,21 ^a	28,46 ± 0,25 ^b	24,03 ± 0,33 ^b	0,00	0,00
SLD	26,69 ± 0,30 ^b	23,50 ± 0,22 ^d	19,61 ± 0,49 ^c	0,00	0,00
SLP	24,82 ± 0,14 ^c	24,46 ± 0,28 ^c	34,55 ± 0,35 ^a	29,59 ± 0,75 ^a	14,57 ± 0,46 ^a
SLPD	22,46 ± 0,36 ^d	30,59 ± 0,03 ^a	24,94 ± 0,59 ^b	28,01 ± 0,65 ^a	12,96 ± 0,16 ^b

^aMédias na coluna com mesma letra sobrescrita não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

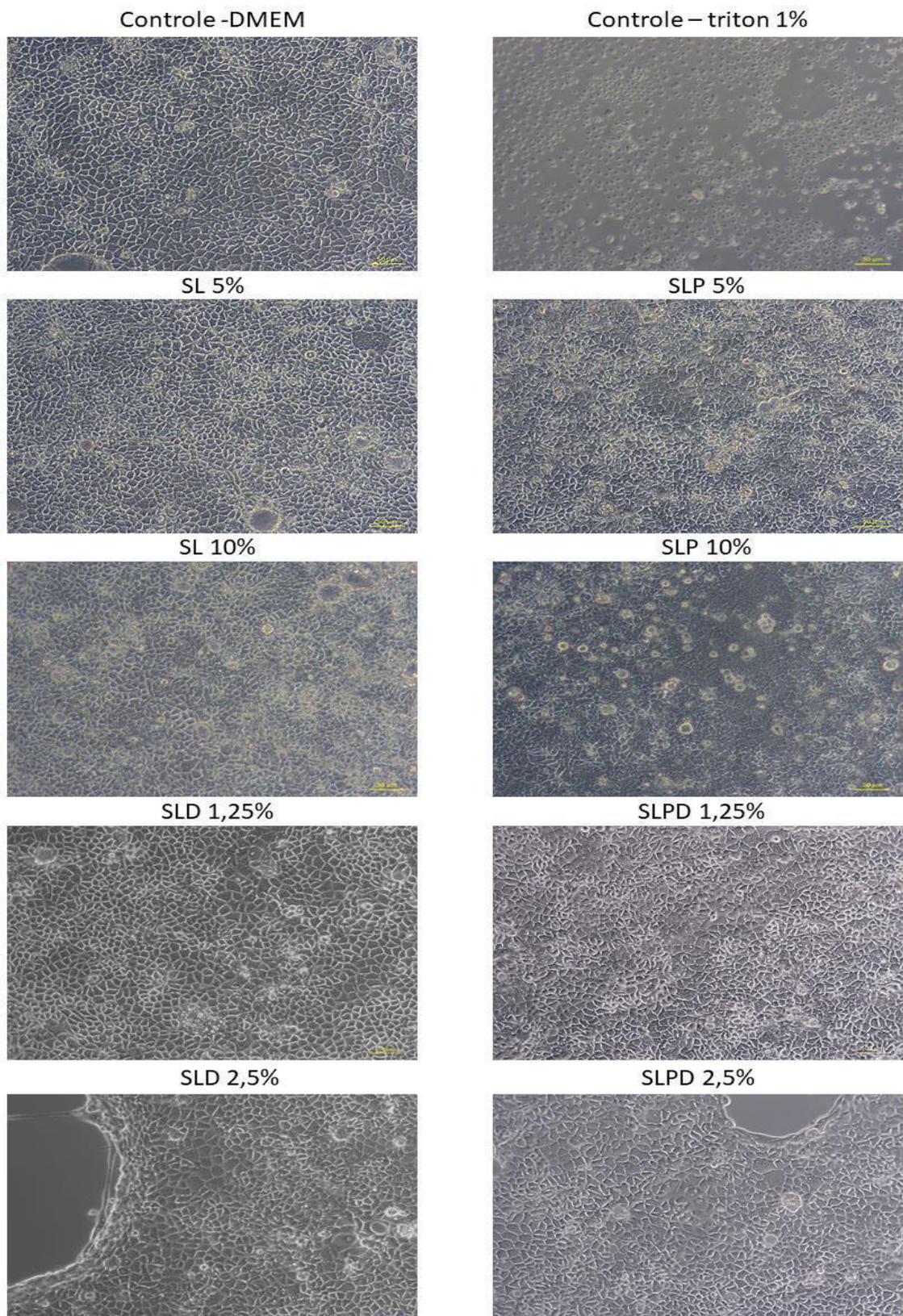
Fonte: elaborada pela autora (2024).

Conforme esperado, os oligossacarídeos apresentaram resistência às condições do TGI, como acidez, atividade enzimática e presença de sais biliares. Embora não tenham sido observadas alterações significativas nos oligossacarídeos durante a simulação da digestão, foi observada uma ligeira diminuição na concentração de dextrana. No SLPD, as concentrações foram mantidas em 28,01 e 12,96 g/L, respectivamente, devido principalmente à estrutura molecular formada por ligações glicosídicas α -1,6 produzidas pela dextrana-sacarase durante a síntese enzimática (DA SILVA *et al.*, 2014; KOTHARI *et al.*, 2014; KOTHARI *et al.*, 2014; KOTHARI *et al.*, 2015). No SLP e no SLPD, houve apenas uma ligeira redução na concentração de sacarose e frutose, com um rápido aumento na concentração de glicose, associado a uma ligeira hidrólise de oligossacarídeos e dextrana. Desse modo, a avaliação da composição após a digestão é importante, pois permite conhecer os compostos disponíveis para metabolismo no TGI do hospedeiro.

4.3.2 Microscopia

As análises de microscopia permitiram avaliar a morfologia e integridade das monocamadas de células Caco-2/TC7. A Figura 1 mostra o efeito dos sucos digeridos e não digeridos com e sem oligossacarídeos e dextrana na saúde das células Caco-2/TC7. Os sucos não digeridos (SL e SLP) não promoveram danos celulares em nenhuma condição avaliada. As células incubadas com SL 5% apresentaram morfologia e distribuição semelhantes às células controle, enquanto o SL 10% estimulou a multiplicação celular, levando a um arranjo celular mais compacto.

Figura 1 - Morfologia da linhagem celular Caco-2/TC7 incubadas com suco de laranja (SL) e suco de laranja potencialmente prebiótico (SLP) antes e depois da digestão (SLD e SLPD)



Fonte: elaborada pela autora (2024).

Sucos de laranja contendo dextrana e oligossacarídeos demonstram ter favorecido a proliferação celular. Os carboidratos potencialmente prebióticos presentes no suco foram utilizados como fonte de energia pelas células Caco-2/TC7. Além disso, SLP 5 e 10% não apresentaram potencial citotóxico conforme confirmado posteriormente (Seção 4.3.3). As células cultivadas com SLP 10% apresentaram regiões mais escuras que representam muitas células nesta área. Como as Caco-2/TC7 são células aderentes, quando estimuladas crescem e aglomeram-se em algumas regiões, onde é difícil visualizar a borda limite das células.

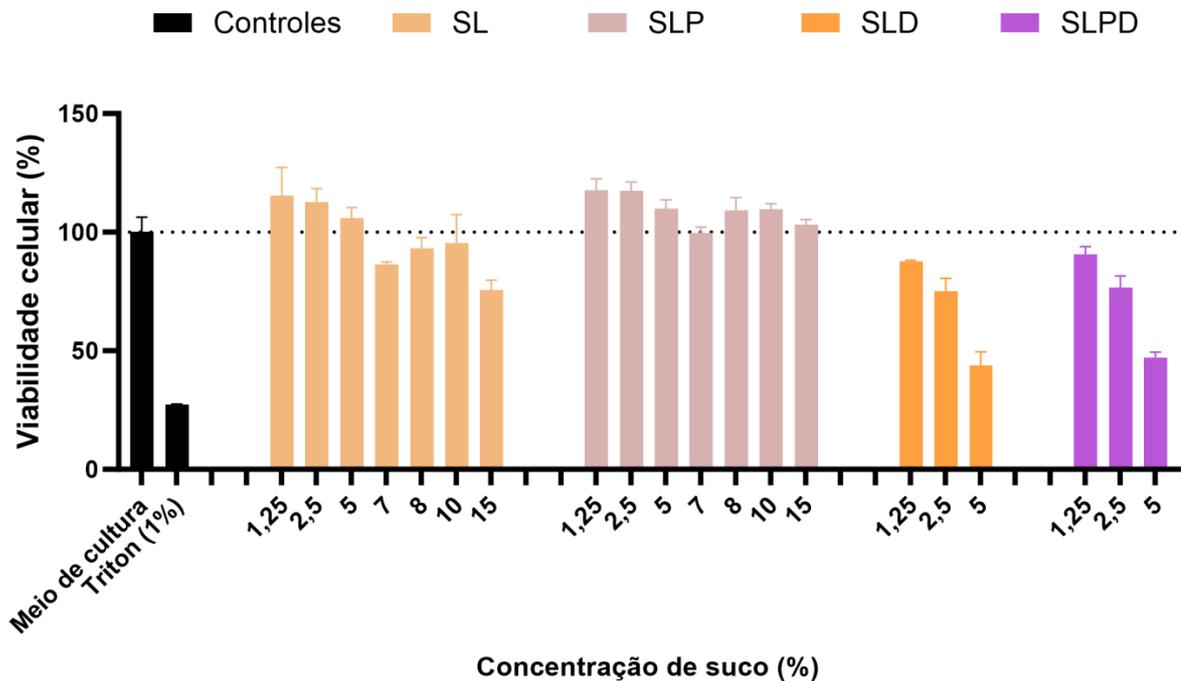
Figura 1 também representa a morfologia de células Caco-2/TC7 tratadas com SLD e SLPD 1,25 e 2,5%. Ambos os sucos na concentração de 1,25% preservaram a configuração celular semelhante ao controle DMEM, com células uniformemente distribuídas e firmemente aderentes. Pode-se observar a presença de espaços vazios nos tratamentos SLD 2,5% e SLPD 2,5%, indicando perda de adesão celular. Os danos às células epiteliais intestinais foram mais pronunciados nos experimentos realizados com SLD 2,5%. Nessas condições, houve notável ocorrência de descolamento celular, prejudicando a estrutura da barreira intestinal. Como a digestão *in vitro* não promoveu grandes alterações na concentração de açúcares, oligossacarídeos e dextrana, e os sucos não digeridos não causaram danos celulares mesmo na concentração de 10%, esse comportamento pode estar associado à presença de enzimas não inativadas e sais biliares provenientes do processo digestivo.

Por outro lado, o SLPD 2,5% apresentou efeito protetor contra as possíveis alterações causadas pelas enzimas digestivas, levando a menor formação de áreas vazias. Assim, estes resultados destacam o papel biológico dos oligossacarídeos e da dextrana na preservação da saúde intestinal.

4.3.3 Teste de viabilidade XTT

Inicialmente, foi realizado o teste XTT para determinar a concentração de suco adequada para atingir a alta viabilidade celular sem perda das propriedades funcionais dos sucos devido à diluição excessiva. A Figura 2 mostra o percentual de viabilidade de células Caco-2/TC7 tratadas com suco de laranja sem e com oligossacarídeos e dextrana, antes e após a simulação da digestão em diferentes concentrações em comparação ao controle, que corresponde a 100% (DMEM sem soro).

Figura 2 - Viabilidade celular pelo método colorimétrico XTT



Fonte: elaborada pela autora (2024).

Células Caco-2/TC7 incubadas com SL apresentaram menor viabilidade em relação ao SLP, principalmente em concentrações superiores a 7%. A incubação com SLP resultou em viabilidade celular de $103 \pm 2\%$, mesmo na concentração de suco de 15%. No entanto, as células expostas a 10 e 15% de suco de laranja atingiram viabilidade de 95 ± 9 e $76 \pm 3\%$, respectivamente. Devido à perda da viabilidade a 15% de suco de laranja, experimentos com células Caco2/TC7 diferenciadas foram realizados na concentração máxima de 10% de suco não digerido. Adicionalmente, o SL e o SLP a 5% também foram testados em células diferenciadas, mantendo a viabilidade celular em 106 ± 3 e $110 \pm 3\%$, respectivamente.

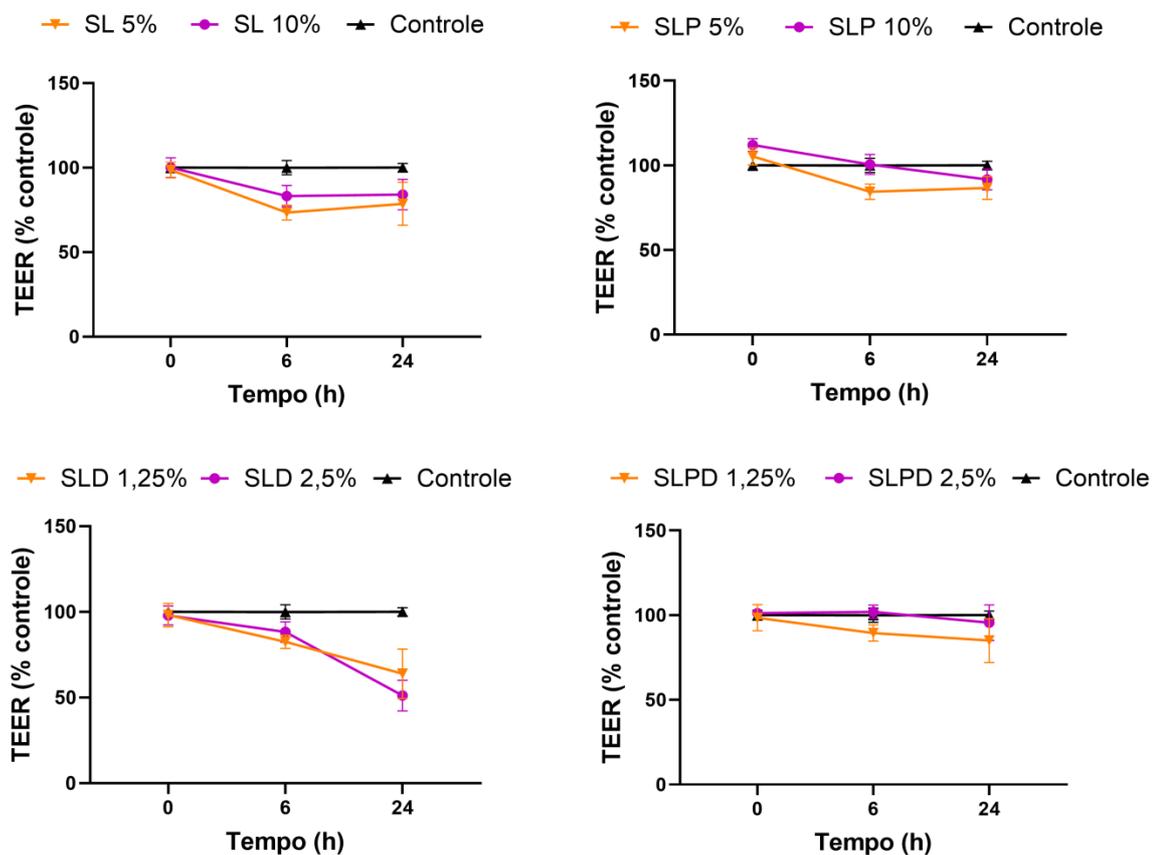
Corroborando com as imagens de microscopia, o suco digerido em altas concentrações causou danos celulares e, portanto, menor viabilidade celular. A inativação incompleta da mistura digestiva (enzimas, sais e bile) pode ter promovido citotoxicidade e perda de viabilidade mesmo na concentração de suco de 1,25%. A exposição de células Caco-2 a 5% de SLD e SLPD levou a uma diminuição de 56,11 e 52,75% da viabilidade, respectivamente. Já a viabilidade celular foi de 87,67% para SLD 1,25% e 90,69% para SLPD 1,25%. Embora os sucos digeridos a 2,5% tenham proporcionado uma redução de até 25% na viabilidade, os experimentos subsequentes foram conduzidos com SLD e SLPD até a concentração de 2,5%.

Assim, estes resultados reforçam a contribuição do suco de laranja potencialmente prebiótico na manutenção e melhoria da viabilidade celular, especialmente quando se compara SL e SLP.

4.3.4 Resistência elétrica transepitelial (TEER)

O efeito de diferentes sucos na integridade da monocamada de células Caco-2/TC7 diferenciada foi medido por TEER. A Figura 3 (A-B) mostra uma maior diminuição da TEER em células incubadas com 5% de sucos não digeridos (SL e SLP) do que com 10% dos respectivos sucos. A maior perda de integridade da monocamada ocorreu em 6 h de incubação, com leve recuperação para alguns tratamentos em 24 h.

Figura 3 - Resistência elétrica transepitelial de células epiteliais intestinais Caco2/TC7 incubadas com 5 e 10% de sucos não digeridos (SL e SLP) e 1,25 e 2,5% de sucos digeridos (SLD e SLPD) durante 6 e 24 h



Fonte: elaborada pela autora (2024).

Células Caco-2 expostas a 10% de suco de laranja apresentaram 84% de resistência em relação ao controle de 100%. Enquanto isso, 10% do SLP minimizou as perdas de TEER causadas pelo SL, mantendo a TEER de 92% após 24 h. O efeito potencial do suco de laranja contendo oligossacarídeos e dextrana (SLP e SLPD) pode ser notavelmente observado comparando os resultados obtidos por SL e SLD, conforme mostrado na Figura 3 (A-C).

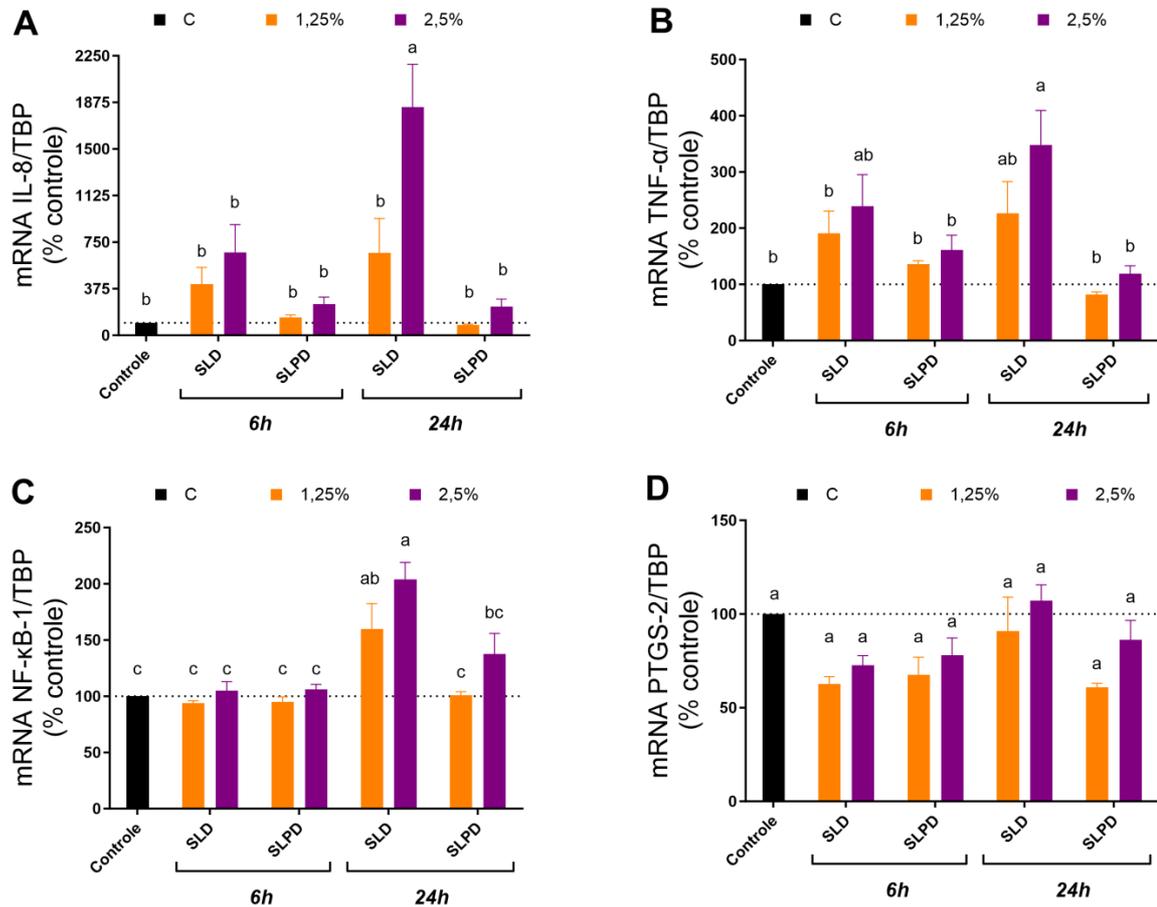
A exposição de células Caco-2 a sucos não digeridos (SLD 2,5%) resultou em uma diminuição de cerca de 50% da TEER em 24 h, indicando uma perda da integridade da barreira. Por outro lado, 2,5% de SLPD não afetou a resistência da monocamada celular.

Lian *et al.* (2023) mostraram que os oligossacarídeos não digeríveis podem reforçar a integridade epitelial intestinal, verificado por um aumento nos valores da TEER em um modelo de cocultura Caco-2/HT-29. Em conformidade, Pham *et al.* (2021) propuseram que FOS e xilo-oligossacarídeos (XOS), oligossacarídeos não digeríveis assim como os oligossacarídeos presentes no suco avaliado nesse estudo, poderiam ser utilizados como estratégias preventivas ou curativas contra inflamações locais e sistêmicas. Portanto, sugere-se que o reforço da integridade epitelial intestinal seja promovido por oligossacarídeos não digeríveis presentes nos sucos. Um estudo mais aprofundado sobre mecanismos de ação é necessário para esclarecer este ponto. Os efeitos observados podem ser mediados pela interação direta com receptores de células epiteliais, como os receptores *Toll-Like*, através da estimulação da sinalização de cálcio intracelular, inibição da proteína quinase ativada por mitógeno e induzida por patógenos (MAPK) e hipersensibilidade do fator nuclear pró-inflamatório kappa B (NF- κ B) (LIAN *et al.*, 2023).

4.3.5 Expressão gênica

O epitélio intestinal atua como uma barreira física contra os xenobióticos, desempenhando um papel importante no sistema imunológico em resposta a estímulos externos. Para determinar como as mudanças na barreira epitelial estavam relacionadas à exposição ao suco de laranja potencialmente prebiótico, foi avaliada a expressão de genes relacionados à inflamação, junções apertadas e outros. A Figura 4 mostra a expressão de genes relacionados à inflamação em células Caco-2/TC7 incubadas com SLD e SLPD durante 6 e 24 h.

Figura 4 - Expressão relativa dos genes IL-8, TNF- α , NF- κ B-1 e PTGS-2 normalizada para TBP em suco de laranja (SLD) e suco de laranja potencialmente prebiótico e após digestão *in vitro* (SLPD)



^aMédias no gráfico com a mesma letra sobrescrita não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: elaborada pela autora (2024).

A Interleucina-8 (IL-8) é uma citocina pró-inflamatória sintetizada por células intestinais como Caco-2/TC7. A expressão do gene IL-8 já foi detectada em 6 h, principalmente para SLD 2,5% (Figura 4A). De modo geral, os sucos na concentração de 2,5% induziram maior expressão de IL-8. Comparando SLD e SLPD, os compostos potencialmente prebióticos presentes nos sucos reduziram o nível de RNAm de IL-8, indicando um efeito protetor dos oligossacarídeos e da dextrana.

Um estudo empregando oligossacarídeos, particularmente oligossacarídeos do leite humano, revelou uma diminuição na concentração de IL-8 no soro e no íleo de camundongos alimentados com HMOs, indicando que os oligossacarídeos poderiam afetar a secreção dessa citocina pró-inflamatória (WANG *et al.*, 2020c).

Além disso, o gene IL-8 foi mais expresso ao longo do tempo para SLD 2,5%, com valores 6,7 e 18,4 vezes maiores que o controle em 6 e 24 h, respectivamente. Enquanto isso, a maior expressão gênica de IL-8 para SLPD a 1,25 e 2,5% foi obtida em 6 h de incubação, com valores 1,4 e 2,5 vezes maiores que o controle, respectivamente.

Os sucos não digeridos não induziram grande alteração no nível de transcritos de IL-8, apresentando valores inferiores ao controle em 24 h (Dados não apresentados). Assim, outros estímulos como a presença de enzimas digestivas não inativadas e bile podem ter promovido à inflamação e contribuído para a maior expressão gênica de IL-8 para sucos digeridos.

Em relação à resposta inflamatória, alguns oligossacarídeos não digeríveis, como os HMOs, são capazes de inibir a fosforilação de ERK1/2 e a fosforilação da MAP quinase P38 em células Caco-2Bbe, bem como melhorar a expressão da citocina IL-8 (WU *et al.*, 2022). As citocinas inflamatórias poderiam ativar a via ERK1/2, que quando inibida atua quebrando o ciclo de inflamação e permeabilização intestinal (IGLESIAS *et al.*, 2020). Assim, o menor nível de RNAm de IL-8 em Caco-2/TC7 incubado com SLPD poderia evitar a ativação da sinalização ERK1/2, indicando um potencial papel protetor de oligossacarídeos e dextrana contra a inflamação.

A expressão de IL-8 pode ser induzida pelo TNF- α , um mediador pró-inflamatório capaz de modificar a estrutura e a função do epitélio intestinal, promovendo alguma lesão celular epitelial, apoptose e doenças intestinais (O'HARA *et al.* al., 2009; QAZI *et al.*, 2011; IGLESIAS *et al.*, 2020; O'HARA *et al.*, 2020). A Figura 5 mostra comportamento similar na expressão de ambos os genes, sugerindo que o TNF- α estimulou a expressão de IL-8. Além disso, IL-8 e TNF- α foram os únicos genes marcadamente expressos em 6 h de incubação, mostrando que estes genes poderiam ter induzido a transcrição dos demais genes identificados.

A expressão de RNAm do TNF- α foi mais importante nas células Caco-2/TC7 incubadas com 2,5% de SLD, aumentando de 240% em 6 h para 440% com 24 h de incubação. Por outro lado, SLPD reduziu a expressão de TNF- α comparado ao SLD, com expressão relativa de 161% em 6 h e 119% em 24 h para o SLPD (concentração de suco de 2,5%). Além disso, os sucos na concentração de 1,25% apresentaram o mesmo perfil, porém com menores valores de expressão gênica. Um estudo utilizando células IPEC-J2 inflamadas com lipopolissacarídeos (LPS) mostrou que os galacto-oligossacarídeos tiveram um efeito supressor na secreção de IL-8 e TNF- α . Estes resultados evidenciaram o efeito positivo dos

carboidratos não digeríveis, que atenuam a resposta inflamatória e consequentemente melhoram a integridade e a função da barreira intestinal (TIAN *et al.*, 2022).

TNF- α promove a ativação das vias de sinalização ERK1/2 e do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que estão envolvidas na inflamação e regulação da estrutura e função da TJ. As vias NF- κ B e ERK1/2 induzem a transcrição da quinase de cadeia leve da miosina (MLCK), que fosforila a cadeia leve da miosina (MLC) causando a abertura da TJ (IGLESIAS *et al.*, 2020). Nesse sentido, os valores reduzidos da expressão gênica do TNF- α para SLPD evidenciam o efeito positivo dos oligossacarídeos não digeríveis e da dextrana no progresso da inflamação e na função da barreira demonstrados neste estudo pela expressão gênica de IL-8, NF- κ B e ZO-1.

O fator de transcrição NF- κ B desempenha um papel na modulação de muitos processos biológicos, como resposta imune e doenças inflamatórias (SONNIER *et al.*, 2010; ZHENG *et al.*, 2022). O gene NF- κ B foi notavelmente expresso apenas após 24 h, em concordância com a maior expressão de mRNA de TNF- α e IL-8. Sabe-se que o fator de transcrição NF- κ B pode estar envolvido na regulação da expressão de IL-8 (PARLESÁK *et al.*, 2004). Além disso, o NF- κ B pode ser ativado por diversos estímulos vitais, como citocinas pró-inflamatórias, produtos de lise celular e estresses fisiológicos (LAURINDO *et al.*, 2023), que foi mais pronunciado em células incubadas com SLD.

Além disso, a Figura 4C mostra que o SLPD regulou negativamente a expressão de NF- κ B em células Caco-2/TC7 em comparação com o SLD. Na concentração de suco de 1,25%, o nível de RNAm foi 160 e 100% para SLD e SLPD, respectivamente. Para sucos na concentração de 2,5%, a expressão de NF- κ B foi de 204% em células incubadas com SLD e 138% quando incubadas com SLPD. Neste sentido, estes resultados revelaram que os sucos contendo compostos potencialmente prebióticos podem inibir, pelo menos em parte, a via de sinalização NF- κ B.

A inibição da via de sinalização NF- κ B pode promover benefício à saúde do hospedeiro, pois algumas doenças inflamatórias têm sido associadas à superprodução de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 pelas vias NF- κ B (ZHENG *et al.*, 2022). Curiosamente, um estudo recente utilizando galacto-oligossacarídeos demonstrou que estas moléculas regulam a sinalização de NF- κ B, aliviando a inflamação intestinal e o estresse oxidativo através de sua interação direta com o epitélio intestinal (TIAN *et al.*, 2022). Além disso, outros carboidratos não digeríveis, como os oligossacarídeos pécticos de maçã, podem afetar a via NF- κ B, modulando atividades inflamatórias, como o nível dos genes TNF- α e IL-6 (TAN *et al.*, 2018).

O fator de transcrição NF- κ B é importante na indução da expressão de vários genes inflamatórios, incluindo COX-2. A expressão do COX-2, induzida pelo TNF- α , depende da ativação do NF- κ B, uma vez que o gene COX-2 apresenta dois sítios de ligação para o NF- κ B (FERRARI *et al.*, 2016). O gene COX-2 codifica enzimas reconhecidas como marcadores de inflamação, e essas enzimas são liberadas da lesão tecidual e produzem prostaglandina E2, um estimulador da inflamação. Desta forma, o gene COX-2 é regulado positivamente durante processos inflamatórios (DESAI *et al.*, 2018).

A resposta inflamatória e o sistema imunológico podem ser ativados pela presença de patógenos, LPS e outras moléculas prejudiciais que atravessam a barreira intestinal chegando à corrente sanguínea. Esse movimento de substâncias e microrganismos é regulado por proteínas da junção estreita, como a ZO-1, e sua expressão desregulada pode alterar as propriedades de permeabilidade e causar danos à função da barreira intestinal (ZHENG *et al.*, 2022).

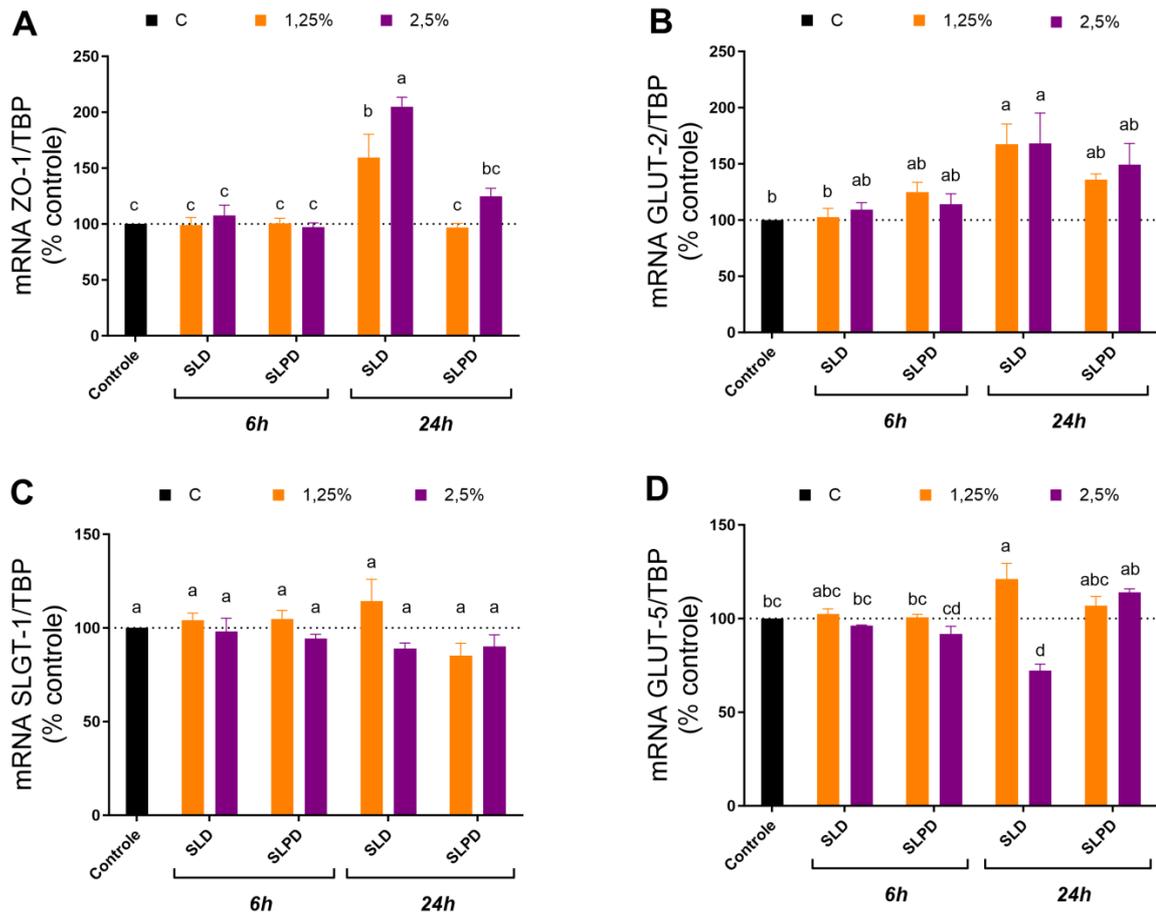
A expressão do gene ZO-1, que codifica a proteína da junção estreita intercelular ZO-1, foi representada na Figura 5A. Células Caco2/TC7 incubadas com sucos por 6 h não sofreram nenhuma modificação na expressão do gene ZO-1 em comparação ao controle. Após 24 h de tratamento, SLPD 2,5% favoreceu o aumento do nível de RNAm de ZO-1 até 125%. Este aumento é interessante para a estrutura celular, pois este gene codifica proteínas responsáveis pela melhoria da barreira e integridade intestinal. Ainda não está claro se sucos de laranja com oligossacarídeos e dextrana poderiam modular diretamente a expressão de RNAm de genes relacionados a TJ, porém outros estudos recentes também demonstraram que carboidratos não digeríveis não afetaram negativamente a expressão de RNAm de ZO-1, mantendo ou aumentando o nível de RNAm e também melhorando os valores da TEER (WU *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2022; HARASAWA *et al.*, 2023).

Surpreendentemente, a expressão de ZO-1 foi maior nos tratamentos com SLD em 24 h do que com SLPD, com aproximadamente 160 e 200% de expressão gênica para SLD 1,25 e SLD 2,5%, respectivamente. O aumento da expressão de ZO-1 pode estar associado à passagem intercelular de substâncias, controlada pelas proteínas das junções estreitas (aumento da permeabilidade), porém, a alta expressão gênica de ZO-1 para SLD pode indicar alterações no ambiente celular, uma vez que o SLD também induziu a superexpressão de outros genes descritos anteriormente.

Os genes exibidos subsequentemente na Figura 5 também codificam proteínas envolvidas no transporte e absorção de açúcares. A proteína codificada pelo gene GLUT-2

auxilia o transporte bidirecional facilitado de glicose, estando localizada na membrana basolateral e/ou borda em escova (membrana apical) (KOEPESELL, 2020).

Figura 5 - Expressão relativa dos genes ZO-1, GLUT-2, SLGT-1 e GLUT-5 normalizada para TBP em suco de laranja (SLD) e suco de laranja potencialmente prebiótico e após digestão *in vitro* (SLPD)



^aMédias no gráfico com a mesma letra sobrescrita não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: elaborada pela autora (2024).

De modo geral, as células Caco2/TC7 incubadas com a maioria dos sucos apresentaram um aumento na expressão do gene GLUT-2 (Figura 5B). Entretanto, em 6 h de experimento, o SLD não causou um aumento significativo na expressão do gene GLUT-2 em comparação ao controle, e o nível de transcrição foi maior para 1,25% de SLPD (125%). Uma expressão mais acentuada do gene GLUT-2 foi observada após 24 h, principalmente quando

as células foram tratadas com SLD, sabendo-se que esses sucos apresentavam apenas glicose e frutose como carboidratos em sua composição.

O gene SLGT-1 codifica o co-transportador de sódio-glicose SGLT-1, localizado na membrana de borda em escova dos enterócitos. Comparando todas as amostras de suco com a condição controle, não foram verificadas modificações significativas na transcrição do RNAm de SLGT-1 em células Caco-2/TC7.

Tanto o GLUT-2 quanto o SLGT-1 contribuem para o transporte e absorção de glicose. O SLGT-1 domina o mecanismo de absorção em baixas concentrações de glicose e curto tempo de incubação. No entanto, sob exposição prolongada em altas concentrações de glicose, o fluxo através do SGLT-1 atinge a saturação e a translocação apical do GLUT2 é favorecida, contribuindo para a absorção intracelular de glicose (AFSHAR *et al.*, 2019). O aumento na expressão relativa do gene GLUT-2 e nenhuma alteração na expressão do gene SLGT-1 em 24 h de incubação com sucos contendo altas concentrações de glicose podem estar relacionados à saturação do SGLT-1 e à translocação apical do GLUT-2, favorecendo o fluxo através da membrana apical e basolateral pelo GLUT-2.

Além disso, comparando SLD e SLPD em termos de expressão gênica de GLUT-2, o suco de laranja digerido contendo oligossacarídeos e dextrana promoveu ligeira redução nos níveis de transcrições relacionadas ao transporte de açúcar, o que poderia resultar em menor absorção intracelular e menor passagem de glicose para a corrente sanguínea.

O gene GLUT-5 codifica o transportador específico de frutose, GLUT-5, responsável por transportar a frutose para o enterócito no compartimento apical (SCHRECK; MELZIG, 2018). Um alto nível RNAm de GLUT-5 foi detectado em células Caco-2/TC7, com baixa diferença significativa entre células cultivadas com sucos por 6 h e aquelas cultivadas em meio isento de soro (controle). A expressão do gene GLUT-5 aumentou com uma exposição mais prolongada aos sucos de laranja (SLD e SLPD), com exceção do tratamento SLD 2,5% (72%). Logo, supôs-se que o suco de laranja sem carboidratos prebióticos e mais concentrado pode ter causado danos celulares e, conseqüentemente, comprometido o nível de transcritos relacionados à absorção de frutose, devido à ausência de moléculas com potenciais efeitos protetores em sua composição.

4.4 Conclusão

Por fim, concluiu-se que o suco de laranja contendo oligossacarídeos e dextrana melhorou a viabilidade das células Caco-2/TC7 e aliviou a perda da integridade da barreira

epitelial intestinal, medida por meio da TEER. Demonstrou-se também que o SLPD reduz a expressão de genes relacionados ao processo inflamatório, como IL-8, TNF- α , NF- κ B e COX-2. Em alta concentração e tempo de exposição, o SLPD aumentou o nível de RNAm de ZO-1, um gene relacionado às junções estreitas. De modo geral, a expressão dos genes GLUT-2, SGLT-1 e GLUT-5 não apresentou importantes variações. Estes resultados sugerem que a ingestão de suco de laranja contendo oligossacarídeos e dextrana pode contribuir para a diminuição da inflamação intestinal e melhorar a função de barreira, promovendo benefícios para a saúde.

CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo confirmou a importância dos parâmetros temperatura e agitação na síntese do suco de laranja funcional em reações com volume ampliado. A maior produção de oligossacarídeos e dextrana foi conseguida à 25 °C, com oligossacarídeos de grau de polimerização até 8. Enquanto isso, o efeito da agitação foi mais importante na síntese de dextrana.

Como a maioria dos processos industrial são conduzidos em reatores batelada agitados mecanicamente, MEC25 foi apontado como melhor resultado e suas propriedades prebióticas foram avaliadas. Os oligossacarídeos e dextrana sintetizados foram resistentes às condições do trato gastrointestinal e foram metabolizados pela microbiota colônica de ambos doadores. O suco de laranja potencialmente prebiótico proporcionou um ambiente e microbiota intestinal saudáveis, com aumento na abundância relativa dos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Bacteroides* e produção de metabólitos ácidos, específicos para cada doador. Somado a isso, melhorou a barreira epitelial intestinal, em termos de viabilidade, resistência e integridade celular, assim como induziu uma redução na expressão de genes relacionados à inflamação, em células intestinais humanas Caco-2/TC7.

Diante do exposto, conclui-se que, o suco de laranja funcional desenvolvido pode apresentar um papel importante da saúde dos consumidores. Conclui-se que, essas descobertas são interessantes para uma futura aplicação industrial e diversificação do mercado de alimentos funcionais.

REFERÊNCIAS

- AFSHAR, N. *et al.* Computational Modeling of Glucose Uptake in the Enterocyte. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. APR, 2019.
- AGUILERA, Y.; MARTIN-CABREJAS, M. A.; GONZÁLEZ DE MEJIA, E. Phenolic compounds in fruits and beverages consumed as part of the mediterranean diet: their role in prevention of chronic diseases. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 3, p. 405–423, 2016.
- AKTER, B. *et al.* Utilisation of watermelon, pineapple and banana fruit peels as prebiotics and their effect on growth of probiotic. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 11, p. 7359–7367, 1 nov. 2022.
- ALMEIDA, F. D. L. *et al.* Effects of atmospheric cold plasma and ozone on prebiotic orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 32, p. 127–135, 2015.
- ALMEIDA, F. D. L. *et al.* Fructooligosaccharides integrity after atmospheric cold plasma and high-pressure processing of a functional orange juice. **Food Research International**, v. 102, p. 282–290, 1 dez. 2017.
- AMARETTI, A. *et al.* Potential prebiotic effect of a long-chain dextran produced by *Weissella cibaria*: an in vitro evaluation. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 71, n. 5, p. 563–571, 3 jul. 2020.
- AMEUR, H.; VIAL, C. Modified Scaba 6SRGT Impellers for Process Intensification: Cavern Size and Energy Saving When Stirring Viscoplastic Fluids. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 148, 2020.
- AMORIM, C. *et al.* In vitro assessment of prebiotic properties of xylooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* 3610. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, n. October 2019, p. 115460, 2020b.
- AMORIM, C. *et al.* In vitro fermentation of raffinose to unravel its potential as prebiotic ingredient. **Lwt**, v. 126, n. March, p. 109322, 2020a.
- ANVARIAN, A. H. P.; SMITH, M. P.; OVERTON, T. W. Use of flow cytometry and total viable count to determine the effects of orange juice composition on the physiology of *Escherichia coli*. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 7, p. 1817–1825, 2018.
- ARAÚJO, A. D. A. *et al.* Production and spouted bed drying of acerola juice containing oligosaccharides. **Food and Bioprocess Processing**, v. 94, p. 565–571, 2015.
- AWASTHI, M. K. *et al.* Emerging trends of microbial technology for the production of oligosaccharides from biowaste and their potential application as prebiotic. **International Journal of Food Microbiology**, v. 368, 2 maio 2022.
- BALLAN, R. *et al.* **Interactions of probiotics and prebiotics with the gut microbiota**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. v. 171

BALTHAZAR, C. F. *et al.* The future of functional food: Emerging technologies application on prebiotics, probiotics and postbiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 21, n. 3, p. 2560–2586, 1 maio 2022.

BAMIGBADE, G. B. *et al.* **An Updated Review on Prebiotics: Insights on Potentials of Food Seeds Waste as Source of Potential Prebiotics.** **MoleculesMDPI**, , 1 set. 2022.

BARRETEAU, H.; DELATTRE, C.; MICHAUD, P. Production of Oligosaccharides as Promising New Food Additive Generation. **Food Technol Biotechnol**, v. 44, p. 323–333, 2006.

BARUAH, R.; DEKA, B.; GOYAL, A. Purification and characterization of dextransucrase from *Weissella cibaria* RBA12 and its application in in vitro synthesis of prebiotic oligosaccharides in mango and pineapple juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 449–456, 2017.

BERGER, K. *et al.* Xylooligosaccharides Increase Bifidobacteria and Lachnospiraceae in Mice on a High-Fat Diet, with a Concomitant Increase in Short-Chain Fatty Acids, Especially Butyric Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 12, p. 3617–3625, 31 mar. 2021.

BEVILACQUA, A. *et al.* An Update on Prebiotics and on Their Health Effects. **Foods**. v. 13, n.3, p. 446. 2024.

BRODKORB, A. *et al.* INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 1 abr. 2019.

BUJNA, E. *et al.* Synthesis of oligosaccharides with prebiotic potential by crude enzyme preparation from *Bifidobacterium*. **Food Chemistry**, v. 367, n. March 2021, p. 130696, 2022.

CANO, M.E. *et al.* Production of Oligosaccharides from Agrofood Wastes. **Fermentation**, v. 6, p. 1–27, 2020.

CASTELLO, F. *et al.* Absorption, metabolism, and excretion of orange juice (poly)phenols in humans: The effect of a controlled alcoholic fermentation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 695, 30 nov. 2020.

CHAO, A.; BUNGE, J. Estimating the Number of Species in a Stochastic Abundance Model. **Biometrics**, v. 58, n. 3, p. 531–539, 2002.

CHAVAN, A. R. *et a.* Recent trends in the biotechnology of functional non-digestible oligosaccharides with prebiotic potential. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, p. 1–46, 2023.

CHEN, F.; HUANG, G.; HUANG, H. Preparation and application of dextran and its derivatives as carriers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 827–834, 2020.

CHEN, L. *et al.* Synergistic Protective Effect of Konjac Mannan Oligosaccharides and *Bacillus subtilis* on Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in Caco-2 Cell Model and Mice Model of Lipopolysaccharide Stimulation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 17 set. 2021.

CHENGXIAO, Y. *et al.* Challenges of pectic polysaccharides as a prebiotic from the perspective of fermentation characteristics and anti-colitis activity. **Carbohydrate Polymers** Elsevier Ltd, , 15 out. 2021.

CILLA, A. *et al.* Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds – A review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, p. 3–15, 1 maio 2018.

CUNNINGHAM, M. *et al.* Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 667–685, 2021.

DA SILVA, I. M.; RABELO, M. C.; RODRIGUES, S. Cashew juice containing prebiotic oligosaccharides. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 2078–2084, 2014.

DA SILVA, R. M., GONÇALVES, L. R. B.; RODRIGUES, S. Different strategies to co-immobilize dextransucrase and dextranase onto agarose based supports: Operational stability study. **International Journal of Biological Macromolecules**, 156, p. 411–419, 2020.

DA SILVA, R. M. *et al.* Synbiotic Sapota-do-Solimões (*Quararibea cordata* Vischer) Juice Improves Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acid Production in an In Vitro Model. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2023.

DA SILVA, R.M.; Paiva Souza, P.M.; Fernandes, F.A.N.; Gonçalves, L.R.B.; Rodrigues, S. Co-Immobilization of Dextransucrase and Dextranase in Epoxy-Agarose- Tailoring Oligosaccharides Synthesis. **Process Biochemistry**, v. 78, p. 71–81, 2019.

DAUM, B.; BUCHHOLZ, K. High Yield and High Selectivity of Reactions in the Frozen State- The Acceptor Reaction of Dextransucrase. **Biocatal Biotransformation**, v. 20, p. 15–21, 2002.

DAVANI-DAVARI, D. *et al.* **Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications.** **Foods** MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute, , 1 mar. 2019.

DE LAMOTTE, A. *et al.* Investigating the effects of hydrodynamics and mixing on mass transfer through the free-surface in stirred tank bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 172, p. 125–142, 2017.

DESAI, S. J.; PRICKRIL, B.; RASOOLY, A. Mechanisms of Phytonutrient Modulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inflammation Related to Cancer. **Nutrition and Cancer** Routledge, , 3 abr. 2018.

DING, X. *et al.* Differentiated Caco-2 cell models in food-intestine interaction study: Current applications and future trends. **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 jan. 2021.

DIXIT, P. *et al.* Understanding the Effect of Interaction among Aeration, Agitation and Impeller Positions on Mass Transfer during Pullulan Fermentation by *Aureobasidium Pullulans*. **RSC Advances**, v. 5, p. 38984–38994, 2015.

DIXIT, Y. *et al.* In Vitro Human Gastrointestinal Tract Simulation Systems: A Panoramic Review. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2023.

DO NASCIMENTO, C. S.; SANTOS, B. N.; RODRIGUES, S. High-intensity ultrasound processed acerola juice containing oligosaccharides and dextran promotes *Lacticaseibacillus casei* NRRL B-442 growth. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1–9, 2022.

DREVEYTON, É. *et al.* Effect of Mixing and Mass Transfer Conditions on Gellan Production by *Auromonas Elodea*. **J Ferment Bioeng**, v. 77, p. 642–649, 1994.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DURANTI, S. *et al.* *Bifidobacterium adolescentis* as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

ENAM, F.; MANSELL, T. J. Prebiotics: tools to manipulate the gut microbiome and metabolome. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 9–10, p. 1445–1459, 2019.

ERSHAD, M.; SHIGENAGA, M. K.; BANDY, B. Differential protection by anthocyanin-rich bilberry extract and resveratrol against lipid micelle-induced oxidative stress and monolayer permeability in Caco-2 intestinal epithelial cells. **Food and Function**, v. 12, n. 7, p. 2950–2961, 7 abr. 2021.

FAN, Y.; PEDERSEN, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 55–71, 2021.

FENG, W.; AO, H.; PENG, C. Gut microbiota, short-chain fatty acids, and herbal medicines. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. NOV, p. 1–12, 2018.

FERNANDES, F.A.N.; RODRIGUES, S. Evaluation of Enzymatic Reactors for Large-Scale Panose Production. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 142, p. 95–104, 2007.

FERRARI, D. *et al.* Cyanidin-3-O-glucoside inhibits NF- κ B signalling in intestinal epithelial cells exposed to TNF- α and exerts protective effects via Nrf2 pathway activation. **Toxicology Letters**, v. 264, p. 51–58, 15 dez. 2016.

FERREIRA, R. *et al.* Orange juice added with *L. casei*: is there an impact of the probiotic addition methodology on the quality parameters? **LWT - Food Science and Technology**, v. 106, n. February, p. 186–193, 2019.

FERRO, A. *et al.* Fruits and vegetables intake and gastric cancer risk: A pooled analysis within the Stomach cancer Pooling Project. **International Journal of Cancer**, v. 147, n. 11, p. 3090–3101, 1 dez. 2020.

FOGH, J.; FOGH, J. M.; ORFEO, T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 59, p. 221–225, 1977.

FONTELES, T. V. *et al.* Ultrasound and ozone processing of cashew apple juice: effects of single and combined processing on the juice quality and microbial stability. **Processes**, v. 9, n. 12, 2021.

FONTELES, T. V.; RODRIGUES, S. Prebiotic in fruit juice: processing challenges, advances, and perspectives. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 55–61, 2018.

FONTES, C. P. M. L.; SILVA, J. L. A.; RABELO, M. C. Development of low caloric prebiotic fruit juices by dextransucrase acceptor reaction. **Food Science and Technology**, v. 52, n. November, p. 7272–7280, 2015.

FOX, D.; ROBYT, J. F. Miniaturization of Three Carbohydrate Using a Microsample Plate Reader **Analyses**. 96, p. 93–96, 1991.

GHOSH, S. *et al.* Active phase prebiotic feeding alters gut microbiota, induces weight-independent alleviation of hepatic steatosis and serum cholesterol in high-fat diet-fed mice. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 448–458, 2021.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L.M.; MCNEIL, B. The Effect of Agitation and Aeration on the Synthesis and Molecular Weight of Gellan in Batch Cultures of *Sphingomonas Paucimobilis*. **Enzyme Microb Technol**, v. 38, p. 101–108, 2006.

GIBSON, G. R. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.

GÓMEZ, B. *et al.* Purification, characterization, and prebiotic properties of pectic oligosaccharides from orange peel wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 40, p. 9769–9782, 2014.

GÓMEZ-GARCÍA, R. *et al.* Impact of Simulated Human Gastrointestinal Digestion on the Bioactive Fraction of Upcycled Pineapple By-Products. **Foods**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2022.

GRAND VIEW RESEARCH. Prebiotics Market Size, Share & Trends Analysis **Report By Ingredients (FOS, Inulin, GOS, MOS), By Application (Food & Beverages, Dietary Supplements, Animal Feed), By Region, And Segment Forecasts, 2022 - 2030**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/dietary-fibers-market>>.

GRÈS, M.-C. *et al.* Correlation between oral drug absorption in human, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parenteral Caco-2 cell line. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 5, p. 726–733, 1998.

HARASAWA, A.; ISHIYAMA, S.; MOCHIZUKI, K. Fructo-oligosaccharide-mediated alteration in claudin expression in small intestinal absorptive Caco-2 cells is positively

associated with the induction of inflammatory genes and the glucan receptor gene CLEC7A. **Nutrition**, v. 115, 1 nov. 2023.

HASHEM, A. M. *et al.* Optimization of *Enterococcus faecalis* Esawy KR758759 dextranase and evaluation of some dextran bioactivities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 348–358, 1 jul. 2018.

HEATH, L. *et al.* Obesity, metabolic risk and adherence to healthy lifestyle behaviours: prospective cohort study in the UK Biobank. **BMC Medicine**, v. 20, n. 1, 1 dez. 2022.

HEINCKE, K. *et al.* Kinetics of the Dextranase Acceptor Reaction with Maltose - Experimental Results and Modeling. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 24, p. 523–534, 1999.

HIIPPALA, K. *et al.* The potential of gut commensals in reinforcing intestinal barrier function and alleviating inflammation. **Nutrients** MDPI AG, , 1 ago. 2018.

HOU, Q. *et al.* Probiotic-directed modulation of gut microbiota is basal microbiome dependent. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, 2020.

HUANG, S. X. *et al.* Enzymatic synthesis of non-digestible oligosaccharide catalyzed by dextranase and dextranase from maltose acceptor reaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 523, n. 3, p. 651–657, 2020.

HUMPHREYS, C. Intestinal Permeability. Em: PIZZORNO, J. E.; MURRAY, M. T. (Eds.). **Natural Medicine**. [s.l: s.n.]. p. 166–177.

HUR, S. J. *et al.* In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1–12, 2011.

GIBSON, G. R. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.

IGLESIAS, D. E. *et al.* Ellagic acid protects Caco-2 cell monolayers against inflammation-induced permeabilization. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 152, p. 776–786, 20 maio 2020.

ISLAM, M. S. *et al.* Effect of UV Irradiation on the Nutritional Quality and Cytotoxicity of Apple Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 41, p. 7812–7822, 19 out. 2016.

KAUR, R.; PANESAR, P.S. Enzyme Systems for High-Value Biomolecule. **Production; Biomass, Biofuels, Biochemicals**, p. 273–308, 2020.

KHUITUAN, P. *et al.* Prebiotic oligosaccharides from dragon fruits alter gut motility in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 114, 1 jun. 2019.

KOEPSSELL, H. Glucose transporters in the small intestine in health and disease. **European Journal of Physiology**, v. 472, p. 1207–1248, 2020.

KONG, C. *et al.* Human milk oligosaccharides mediate the crosstalk between intestinal epithelial Caco-2 cells and lactobacillus plantarum WCFS1 in an in vitro model with intestinal peristaltic shear force. **Journal of Nutrition**, v. 150, n. 8, p. 2077–2088, 1 ago. 2020.

KOTHARI, D.; DAS, D.; PATEL, S. Dextran and Food Application. Em: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J.-M. (Eds.). **Polysaccharides**. [s.l.] Springer, 2014. p. 1–16.

KOTHARI, D.; GOYAL, A. Structural characterization of enzymatically synthesized dextran and oligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 dextranase. **Biochemistry (Moscow)**, 78(10), p. 1164–1170, 2013.

KOTHARI, D.; TINGIRIKARI, J. M. R.; GOYAL, A. In vitro analysis of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 for functional food application. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 6, n. 2, p. 55–61, 2015.

KUMAR, K.; RAJULAPATI, V.; GOYAL, A. In vitro prebiotic potential, digestibility and biocompatibility properties of laminari-oligosaccharides produced from curdlan by β -1,3-endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. **3 Biotech**, v. 10, n. 6, 1 jun. 2020.

KUS, M.; IBRAGIMOW, I.; PIOTROWSKA-KEMPISTY, H. Caco-2 cell line standardization with pharmaceutical requirements and in vitro model suitability for permeability assays. **Pharmaceutics** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 nov. 2023.

LAM, K. L.; CHEUNG, P. C. K. Carbohydrate-Based Prebiotics in Targeted Modulation of Gut Microbiome. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 45, p. 12335–12340, 2019.

LAURINDO, L. F. *et al.* Phytochemicals and Regulation of NF- κ B in Inflammatory Bowel Diseases: An Overview of In Vitro and In Vivo Effects. **Metabolites** MDPI, , 1 jan. 2023.

LEA, T. Caco-2 cell line. Em: **The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models**. [s.l.] Springer International Publishing, 2015b. p. 103–111.

LEA, T. Epithelial cell models; general introduction. Em: **The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models**. [s.l.] Springer International Publishing, 2015a. p. 95–102.

LEE, S. *et al.* Structural analysis of gluco-oligosaccharides produced by *Leuconostoc lactis* and their prebiotic effect. **Molecules**, v. 24, n. 3998, p. 1–11, 2019.

LEITE, A. K. F. *et al.* Cashew apple juice containing gluco-oligosaccharides, dextran, and tagatose promotes probiotic microbial growth. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101080, 2021.

LEITE, A. K. F. Efeito prebiótico de suco de caju (*Anacardium occidentale*) contendo glico-oligosacarídeos, dextrana e tagatose. 2020. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

LEITE, A. K. F. *et al.* Impact of orange juice containing potentially prebiotic ingredients on human gut microbiota composition and its metabolites. **Food Chemistry**, 2022.

LI, C. *et al.* Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. **Trends in Food Science & Technology**, v. 96, p. 114–126, 1 fev. 2020.

LI, N. *et al.* High-yield synthesis of glucooligosaccharides (GIOS) as potential prebiotics from glucose: Via non-enzymatic glycosylation. **Green Chemistry**, v. 21, n. 10, p. 2686–2698, 2019.

LIAN, P. *et al.* Differential Effects of Oligosaccharides, Antioxidants, Amino Acids and PUFAs on Heat/Hypoxia-Induced Epithelial Injury in a Caco-2/HT-29 Co-Culture Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, 1 jan. 2023.

LOPEZ-ESCALERA, S.; WELLEJUS, A. Evaluation of Caco-2 and human intestinal epithelial cells as in vitro models of colonic and small intestinal integrity. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 31, 1 set. 2022.

LUO, Y. *et al.* The role of mucin and oligosaccharides via cross-feeding activities by Bifidobacterium: A review. **International Journal of Biological Macromolecules** Elsevier B.V., , 15 jan. 2021.

MÉNARD, O. *et al.* Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. **Food Chemistry**, v. 145, p. 1039–1045, 2014.

MILARD, M. *et al.* Acute effects of milk polar lipids on intestinal tight junction expression: towards an impact of sphingomyelin through the regulation of IL-8 secretion? **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 65, p. 128–138, 1 mar. 2019.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MONTEIRO, S. S.; DE OLIVEIRA, V. M.; PASQUALI, M. A. DE B. Probiotics in Citrus Fruits Products: Health Benefits and Future Trends for the Production of Functional Foods—A Bibliometric Review. **Foods** MDPI, , 1 maio 2022.

NGUYEN, T. T. H. *et al.* Synthesis of oligosaccharide-containing orange juice using glucansucrase. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 20(3), p. 447–452, 2015.

O'DONNELL, M. M. *et al.* Lactobacillus ruminis strains cluster according to their mammalian gut source. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, 2015.

O'HARA, A. M. *et al.* Tumor necrosis factor (TNF)- α -induced IL-8 expression in gastric epithelial cells: Role of reactive oxygen species and AP endonuclease-1/redox factor (Ref)-1. **Cytokine**, v. 46, n. 3, p. 359–369, jun. 2009.

OSE, R. *et al.* The ability of human intestinal anaerobes to metabolize different oligosaccharides: Novel means for microbiota modulation? **Anaerobe**, v. 51, p. 110–119, 1 jun. 2018.

PANSAI, N. *et al.* Gut microbiota modulation and immune boosting properties of prebiotic dragon fruit oligosaccharides. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 55–64, 1 jan. 2020.

PANSE, N.; GERK, P. M. The Caco-2 Model: Modifications and enhancements to improve efficiency and predictive performance. **International Journal of Pharmaceutics** Elsevier B.V., , 25 ago. 2022.

PARLESK, A. *et al.* Modulation of cytokine release by differentiated CACO-2 cells in a compartmentalized coculture model with mononuclear leucocytes and nonpathogenic bacteria. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 60, n. 5, p. 477–485, nov. 2004.

PEI, F. *et al.* Effect of cooked rice with added fructo-oligosaccharide on faecal microorganisms investigated by in vitro digestion and fermentation. **Food Science and Human Wellness**, v. 12, n. 2, p. 662–668, mar. 2023.

PEREIRA, A. P. DE A. *et al.* Land degradation affects the microbial communities in the Brazilian Caatinga biome. **Catena**, v. 211, n. October 2021, 2022.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, mar. 2014.

PHAM, V. T. *et al.* Antioxidant vitamins and prebiotic fos and xos differentially shift microbiota composition and function and improve intestinal epithelial barrier in vitro. **Nutrients**, v. 13, n. 4, 1 abr. 2021.

PLOU, F. J. *et al.* Glucosyltransferases acting on starch or sucrose for the synthesis of oligosaccharides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 80, n. 6, p. 743–752, 2002.

POKUSAEVA, K.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. **Genes and Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 285–306, 2011.

POTTRATZ, I.; MÜLLER, I.; HAMEL, C. Potential and scale-up of pore-through-flow membrane reactors for the production of prebiotic galacto- oligosaccharides with immobilized β -galactosidase. **Catalysts**, v. 12, n. 1, 2022.

PRECUP, G. *et al.* Chemical and Enzymatic Synthesis of Biobased Xylo-oligosaccharides and Fermentable Sugars from Wheat Straw for Food Applications. **Polymers**, v. 14, 2022.

QAZI, B. S.; TANG, K.; QAZI, A. Recent Advances in Underlying Pathologies Provide Insight into Interleukin-8 Expression-Mediated Inflammation and Angiogenesis. **International Journal of Inflammation**, v. 2011, p. 1–13, 2011.

QIAO, S. *et al.* Activation of a Specific Gut Bacteroides-Folate-Liver Axis Benefits for the Alleviation of Nonalcoholic Hepatic Steatosis. **Cell Reports**, v. 32, n. 6, 2020.

RABELO, M. C. *et al.* Enzymatic synthesis of prebiotic oligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, n. 1, p. 31–40, 2006.

RABELO, M.C.; FONTES, C.P.M.L.; RODRIGUES, S. Enzyme Synthesis of Oligosaccharides Using Cashew Apple Juice as Substrate. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5574–5580, 2009.

RABELO, M. C.; FONTES, C. M. L.; RODRIGUES, S. Stability Study of Crude Dextranucrase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-742. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 164–170, 2011.

REGES, B. M. *et al.* Impact of ultrasound processing of açai juice containing complex carbohydrates in human intestinal microbiota composition and metabolite production. **Food Bioscience**, v. 56, 1 dez. 2023.

ROBYT, J. F.; KIMBLE, B. K.; WALSETH, T. F. The mechanism of dextranucrase action. Direction of dextran biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 165, n. 2, p. 634–640, 1974.

RODRIGUES, S.; LONA, L.M.F.; FRANCO, T.T. Optimizing Panose Production by Modeling and Simulation Using Factorial Design and Surface Response Analysis. **Journal Food Engineering**, v. 75, p. 433–440, 2006.

RODRIGUES, V. C. DA C. *et al.* Modulation of the intestinal microbiota and the metabolites produced by the administration of ice cream and a dietary supplement containing the same probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 124, n. 1, p. 57–68, 2020.

RODRÍGUEZ, Ó. *et al.* Effect of indirect cold plasma treatment on cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 457–463, 2017.

ROSELLI, M. *et al.* Galactooligosaccharide Treatment Alleviates DSS-Induced Colonic Inflammation in Caco-2 Cell Model. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 14 abr. 2022.

SABATER, C. *et al.* Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides from lactose and lactulose by dairy propionibacteria. **Food Microbiology**, v. 77, n. March 2018, p. 93–105, 2019.

SAINI, R. *et al.* **Recent advancements in prebiotic oligomers synthesis via enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass.** Bioengineered Taylor and Francis Ltd., 2022.

SANDERS, M. E. *et al.* Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 10, p. 605–616, 2019.

SARAO, L. K.; ARORA, M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 344–371, 22 jan. 2017.

SCHRECK, K.; MELZIG, M. F. Intestinal saturated long-chain fatty acid, glucose and fructose transporters and their inhibition by natural plant extracts in caco-2 cells. **Molecules** MDPI AG, , 6 out. 2018.

SHANNON, C. E. A Mathematical Theory of Communication. **Bell System Technical Journal**, v. 27, n. 3, p. 379–423, 1948.

SHARMA, M. *et al.* Development of a Prebiotic Oligosaccharide Rich Functional Beverage from Sweet Sorghum Stalk Biomass. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 4, p. 2001–2012, 1 abr. 2021.

SHI, Y. *et al.* In vitro digestibility and prebiotic potential of curdlan (1 → 3)- β -d-glucan oligosaccharides in Lactobacillus species. **Carbohydrate Polymers**, v. 188, p. 17–26, 15 maio 2018.

SHIRAI, I. *et al.* Intestinal permeability of agaro-oligosaccharides: Transport across Caco-2 cell monolayers and pharmacokinetics in rats. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, n. 996607, 2022.

SIDDIQUI, S. A. *et al.* Consumer Studies Focus on Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics in Food Packaging: a Review. **Current Food Science and Technology Reports**, v. 1, n. 1, p. 13–29, 13 set. 2023.

SILVA, E. K. *et al.* Xylooligosaccharides chemical stability after high-intensity ultrasound processing of prebiotic orange juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 63, 1 maio 2020.

SONNIER, D. I. *et al.* TNF- α Induces Vectorial Secretion of IL-8 in Caco-2 Cells. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 14, n. 10, p. 1592–1599, 2010.

SRINIVASAN, B. *et al.* **TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems.** **Journal of Laboratory Automation** SAGE Publications Inc., 1 abr. 2015.

SU, H. *et al.* Lotus seed oligosaccharides at various dosages with prebiotic activity regulate gut microbiota and relieve constipation in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110838, 1 dez. 2019.

ŠULIGOJ, T. *et al.* Effects of human milk oligosaccharides on the adult gut microbiota and barrier function. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 1–21, 1 set. 2020.

TAN, H. *et al.* Pectin oligosaccharides ameliorate colon cancer by regulating oxidative stress- and inflammation-activated signaling pathways. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., 27 jun. 2018.

TAN, H.; ZHAI, Q.; CHEN, W. Investigations of Bacteroides spp. towards next-generation probiotics. **Food Research International**, v. 116, n. 1800, p. 637–644, 2019.

TANRISEVEN, A.; DOĞAN, Ş. Production of Isomalto-Oligosaccharides Using Dextranucrase Immobilized in Alginate Fibres. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1111–1115, 2002.

TIAN, S. *et al.* Galacto-oligosaccharides directly attenuate lipopolysaccharides-induced inflammatory response, oxidative stress and barrier impairment in intestinal epithelium. **Journal of Functional Foods**, v. 91, 1 abr. 2022.

TINGIRIKARI, J. M. R.; GOMES, W. F.; RODRIGUES, S. Efficient production of prebiotic gluco-oligosaccharides in orange juice using immobilized and co-immobilized dextransucrase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, p. 1265–1281, 2017.

TREFFLICH, I. *et al.* Is a vegan or a vegetarian diet associated with the microbiota composition in the gut? Results of a new cross-sectional study and systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 17, p. 2990–3004, 2020.

VINCENT, M. *et al.* Human milk pasteurisation reduces pre-lipolysis but not digestive lipolysis and moderately decreases intestinal lipid uptake in a combination of preterm infant in vitro models. **Food Chemistry**, v. 329, 1 nov. 2020.

WANG, C. *et al.* Human Milk Oligosaccharides Activate Epidermal Growth Factor Receptor and Protect Against Hypoxia-Induced Injuries in the Mouse Intestinal Epithelium and Caco2 Cells. **Journal of Nutrition**, v. 150, n. 4, p. 756–762, 1 abr. 2020c.

WANG, H. *et al.* Interaction between dietary fiber and bifidobacteria in promoting intestinal health. **Food Chemistry**, v. 393, 1 nov. 2022.

WANG, L. *et al.* Bifidobacterium adolescentis exerts strain-specific effects on constipation induced by loperamide in BALB/c mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, 2017.

WANG, M. *et al.* In vitro colonic fermentation of dietary fibers: Fermentation rate, short-chain fatty acid production and changes in microbiota. **Trends in Food Science and Technology**, 2019.

WANG, K., *et al.* Galactooligosaccharides: Synthesis, metabolism, bioactivities and food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–17, 2023b.

WANG, S. *et al.* Rational use of prebiotics for gut microbiota alterations: Specific bacterial phylotypes and related mechanisms. **Journal of Functional Foods**, v. 66, n. September 2019, 2020a.

WANG, Y. *et al.* Effect of two-week red beetroot juice consumption on modulation of gut microbiota in healthy human volunteers – A pilot study. **Food Chemistry**, v. 406, p. 134989, abr. 2023a.

WANG, Y. *et al.* The effect of in situ produced dextran on flavour and texture perception of wholegrain sorghum bread. **Food Hydrocolloids**, v. 106, p. 105913, 1 set. 2020b.

WIATER, A. *et al.* Prebiotic potential of oligosaccharides obtained by acid hydrolysis of α -(1→3)-glucan from *laetiporus sulphureus*: A pilot study. **Molecules**, v. 25, n. 23, 1 dez. 2020.

WU, R. Y. *et al.* Variations in the Composition of Human Milk Oligosaccharides Correlates with Effects on Both the Intestinal Epithelial Barrier and Host Inflammation: A Pilot Study. **Nutrients**, v. 14, n. 5, 1 mar. 2022.

WU, Y. *et al.* Short administration of combined prebiotics improved microbial colonization, gut barrier, and growth performance of neonatal piglets. **ACS Omega**, v. 5, n. 32, p. 20506–20516, 18 ago. 2020.

XU, J.; LIN GO, M.; LIM, L.-Y. Modulation of Digoxin Transport across Caco-2 Cell Monolayers by Citrus Fruit Juices: Lime, Lemon, Grapefruit, and Pummelo. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 2, 2003.

XU, Y. *et al.* Probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* L1 and its growth performance-promotion in chicken by improving the intestinal microflora. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. JUL, 2019.

YADAV, M. K. *et al.* Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, p. 505–521, 2022.

YANG, Y. *et al.* Alpha-Lipoic Acid Promotes Intestinal Epithelial Injury Repair by Regulating MAPK Signaling Pathways. **Mediators of Inflammation**, 2022.

YILMAZER, C. *et al.* Optimization of mannoooligosaccharides production from different hydrocolloids via response surface methodology using a recombinant *Aspergillus sojae* β -mannanase produced in the microparticle-enhanced large-scale stirred tank bioreactor. **Journal of Food Processing and Preservation**. Anais...John Wiley and Sons Inc, 1 ago. 2021.

YUASA, M. *et al.* Chemical composition and sensory properties of fermented citrus juice using probiotic lactic acid bacteria. **Food Bioscience**, v. 39, 1 fev. 2021.

ZENG, M.; VAN PIJKEREN, J.; PAN, X. Glucoooligosaccharides as potential prebiotics: Synthesis, purification, structural characterization, and evaluation of prebiotic effect. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 22(4), p. 2611–2651, 2023.

ZHANG, L. *et al.* Starch flocculation by the sweet potato sour liquid is mediated by the adhesion of lactic acid bacteria to starch. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–11, 2017.

ZHANG, Y.-H. *et al.* Antioxidant capacity and prebiotic effects of *Gracilaria neoagaro* oligosaccharides prepared by agarase hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 177–186, 15 set. 2019.

ZHENG, J. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* CY12 Enhances Intestinal Barrier Function by Regulating Tight Junction Protein Expression, Oxidative Stress, and Inflammation Response in Lipopolysaccharide-Induced Caco-2 Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, 1 out. 2022.

ZHU, R. *et al.* Effect of pectin oligosaccharides supplementation on infant formulas: The storage stability, formation and intestinal absorption of advanced glycation end products. **Food Chemistry**, v. 373, 30 mar. 2022.