



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

ANA KAROLINE FERREIRA LEITE

**EFEITO PREBIÓTICO DE SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale*) CONTENDO
GLICO-OLIGOSSACARÍDEOS, DEXTRANA E TAGATOSE**

**FORTALEZA
2020**

ANA KAROLINE FERREIRA LEITE

EFEITO PREBIÓTICO DE SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale*) CONTENDO
GLICO-OLIGOSSACARÍDEOS, DEXTRANA E TAGATOSE

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

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

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L55e Leite, Ana Karoline Ferreira.
EFEITO PREBIÓTICO DE SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale*) CONTENDO GLICO-
OLIGOSSACARÍDEOS, DEXTRANA E TAGATOSE / Ana Karoline Ferreira Leite. – 2020.
74 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.

Coorientação: Profa. Dra. Thatyane Vidal Fontes.

1. Digestão in vitro. 2. Bioacessibilidade. 3. Vitamina C. 4. Probióticos. 5. Tagatose. I. Título.
CDD 660

ANA KAROLINE FERREIRA LEITE

EFEITO PREBIÓTICO DE SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale*) CONTENDO
GLICO-OLIGOSSACARÍDEOS, DEXTRANA E TAGATOSE

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 27/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Sueli Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Maria Cristiane Rabelo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus queridos pais.

A vós devo tudo o que sou.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da sabedoria, pela paciência e coragem que me foram concebidos.

Aos meus pais, Ana e José Leite, pelo apoio, educação, paciência quando tive que ficar distante e amor imensurável. Ao meu irmão, que mesmo tão jovem sempre me incentivou da sua forma e aos outros membros da minha família que ofereceram apoio e confiaram em mim.

A Professora Sueli Rodrigues, pela excelente orientação, incentivo, confiança e conhecimento compartilhado durante a realização do mestrado.

A Dra. Thatyane Vidal, pelos conselhos, sugestões, orientação, ótimas palavras em momentos difíceis e amizade.

Sou imensamente grata a equipe do Labiotec, a Rhony, por toda ajuda principalmente nessa reta final, o Rony, Day, Cristiano, Alana, Andressa. Obrigada por todos os momentos de descontração, pelo apoio, conselhos e ajuda nos momentos mais complicados. Agradeço também aos professores Elenilson e Ítalo.

Nada teria dado tão certo sem a ajuda e amizade do melhor grupo: Elaine, Priscila, Fátima e Brenda, muito obrigada tanto pela vivência no laboratório, como pelo laço que temos aqui fora. Um agradecimento especial a Brenda, sem sua amizade tão rápida, companheirismo, presença, eficiência e amor pelo que faz, teria sido difícil concluir esse mestrado no tempo certo.

Aos amigos que fiz no início do mestrado e guardo no coração até hoje, mesmo na distância. Em especial, Eddie, Angélica e Dani, sem vocês teria sido bem difícil superar o primeiro semestre. Além disso, obrigada pela amizade e todos os momentos bons compartilhados, que tenham mais!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001. Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Instituto Nacional de Frutos Tropicais (INCT-FT) pelo apoio financeiro.

Agradeço também a Universidade Federal do Ceará pela formação durante esses anos.

E por fim, agradeço a mim mesmo, por ter conseguido chegar até aqui, por ter superado as barreiras que surgiram e não ter desanimado. Que venha o Doutorado!

“O saber a gente aprende com os mestres e
os livros. A sabedoria se aprende é com a
vida e com os humildes.”

(Cora Coralina)

RESUMO

A microbiota intestinal exerce um papel importante para a saúde do hospedeiro e a suplementação da dieta com prebióticos pode melhorar o equilíbrio dessa microbiota. Sucos de frutas podem ser considerados veículos ideais para o consumo dos prebióticos, pois são ricos em compostos bioativos e apresentam boa aceitabilidade pelos consumidores. No caso específico da produção de sucos prebióticos através da síntese de oligossacarídeos, faz-se necessário recompor a docura das bebidas uma vez que os açúcares são consumidos durante a síntese. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito prebiótico de sucos de caju prebióticos, adoçado ou não com tagatose. Os oligossacarídeos prebióticos foram sintetizados no suco, com e sem agitação pela ação da enzima dextrana-sacarase ($30\text{ }^{\circ}\text{C}/17\text{ h}$). Uma simulação de digestão *in vitro* foi conduzida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}/6\text{ h}$. Durante a passagem pelo trato gastrointestinal foram avaliadas a concentração de glico-oligossacarídeos, dextrana e tagatose, e a bioacessibilidade da vitamina C. Para avaliar o efeito prebiótico dos sucos funcionais, os micro-organismos probióticos *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis* foram utilizados. Os resultados mostraram que os oligossacarídeos, a tagatose e parte da dextrana produzida (70 - 90 %) foram resistentes às condições gastrointestinais e atingiram a parte final do sistema digestivo onde ocorre o consumo dos carboidratos prebióticos pelos microrganismos probióticos. Além disso, os sucos prebióticos melhoraram a bioacessibilidade da vitamina C, isso sugere um efeito protetor oferecido por esses ingredientes. Os ingredientes com propriedades prebióticas atuaram como substratos e estimularam o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos. No entanto, cada micro-organismo apresentou suas particularidades e consumiu preferencialmente alguns desses componentes. A tagatose se mostrou um bom substrato para a multiplicação de *B. infantis*. Por outro lado, o *L. casei* e *B. breve* merecem destaque por metabolizarem preferencialmente a dextrana e os oligossacarídeos, respectivamente. As concentrações de componentes com propriedades prebióticas dos sucos variaram entre 2,68 e 10,23 g/250 mL de suco. Por fim, os sucos de caju elaborados nesse trabalho atendem ao apelo funcional sugerido, tendo em vista que apresentaram efeito prebiótico ao estimularem o crescimento de micro-organismos benéficos.

Palavras-chave: Digestão *in vitro*, Bioacessibilidade, Vitamina C, Probióticos, Tagatose.

ABSTRACT

The intestinal microbiota plays an important role in the health of the host and dietary supplementation with prebiotics can improve their balance. Fruit juices can be considered ideal vehicles for the consumption of prebiotics, because they are rich in bioactive compounds and have good acceptability by consumers. In the specific case of the production of prebiotic juices through the synthesis of oligosaccharides, it is necessary to restore the sweetness of the drinks because the sugars are consumed during the synthesis. Thus, the objective of the present work was to evaluate the prebiotic effect of prebiotic cashew juices, sweetened or not with tagatose. The prebiotic oligosaccharides were synthesized in the juice, with or without agitation, by the enzyme dextranucrase (30°C / 17 h). An *in vitro* simulated digestion was carried out at 37°C / 6 h. During the passage through the gastrointestinal tract, the concentration of glyco-oligosaccharides, dextran and tagatose, and the bioaccessibility of vitamin C were evaluated. To evaluate the prebiotic effect of the functional juices, the following probiotic microorganisms were used: *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium infantis*. The results showed that oligosaccharides, tagatose and part of the dextran (70 - 90 %) were resistant to gastrointestinal conditions and reached the final part of the digestive system where the consumption of prebiotic carbohydrates by probiotic microorganisms occurs. In addition, juices containing these prebiotics have improved the bioaccessibility of vitamin C, which suggests a protective effect offered by these ingredients. The ingredients with prebiotic properties acted as substrates and stimulated the growth of bifidobacteria and lactobacilli. However, each microorganism presented its particularities and consumed some of these components preferentially. Tagatose proved to be a good substrate for the multiplication of *B. infantis*. Conversely, *L. casei* and *B. breve* deserve to be highlighted for preferentially metabolizing dextran and oligosaccharides, respectively. The concentrations of components with prebiotic properties of the juices varied between 2.68 and 10.23 g / 250 mL of juice. Finally, the cashew juices produced in this work meet the claimed of functional appeal, given that they had a prebiotic effect by stimulating the growth of beneficial microorganisms.

Keywords: *In vitro* digestion, Bioaccessibility, Vitamin C, Probiotics, Tagatose.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	Alimentos funcionais.....	14
2.2	Oligossacarídeos prebióticos.....	15
2.2.1	<i>Síntese enzimática de oligossacarídeos prebióticos e dextrana</i>	16
2.2.2	<i>Efeitos benéficos atribuídos ao uso de oligossacarídeos prebióticos</i>	17
2.3	Suco de caju.....	18
2.4	Adoçante tagatose	20
2.5	Digestão simulada in vitro e bioacessibilidade	22
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Preparo do suco de caju.....	28
4.2	Caracterização físico-química do suco de caju.....	28
4.3	Produção da enzima dextrana-sacarase.....	28
4.4	Síntese enzimática de oligossacarídeos prebióticos	28
4.5	Formulação do suco de caju prebiótico utilizando tagatose como adoçante	30
4.6	Quantificação de glico-oligossacarídeos	30
4.7	Sistema contínuo de digestão <i>in vitro</i>.....	31
4.8	Efeito dos prebióticos no crescimento de micro-organismos intestinais	32
4.8.1	<i>Ativação dos micro-organismos</i>	32
4.8.2	<i>Cultivo dos micro-organismos</i>	33
4.9	Métodos analíticos.....	33
4.9.1	<i>Determinação de açúcares</i>	33
4.9.2	<i>Determinação de ácidos orgânicos</i>	33
4.9.3	<i>Determinação da atividade enzimática</i>	34
4.9.4	<i>Determinação de dextrana</i>	35
4.9.5	<i>Avaliação do crescimento microbiano nos sucos após digestão <i>in vitro</i></i>	35
4.10	Análises estatísticas	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5.1	Caracterização do suco de caju	36

5.2 Síntese enzimática dos oligossacarídeos	36
5.2.1 <i>Scale-up</i>	37
5.3 Efeito da digestão <i>in vitro</i> nos ingredientes com propriedades prebióticas	39
5.3.1 <i>Glico-oligossacarídeos e dextrana</i>	39
5.3.2 <i>Tagatose</i>	42
5.4 Efeito da digestão <i>in vitro</i> na bioacessibilidade vitamina c.....	42
5.5 Avaliação do efeito prebiótico dos sucos de caju	44
5.5.1 <i>Crescimento de probióticos na ‘Formulação 1’</i>	45
5.5.2 <i>Crescimento de probióticos na ‘Formulação 2’</i>	49
5.5.3 <i>Crescimento de probióticos na ‘Formulação 3’</i>	54
5.5.4 <i>Crescimento de probióticos na ‘Formulação 4’</i>	58
5.5.5 <i>Crescimento de probióticos na ‘Formulação 5’</i>	61
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, além de serem vistos como fonte de nutrientes básicos, os alimentos passaram a ser reconhecidos como promovedores de bem estar físico e mental e podendo inclusive prevenir doenças relacionadas à nutrição. O crescimento do mercado de alimentos funcionais pode ser observado pela variedade de novos produtos encontrados nos seus diversos segmentos, isso pode ser justificado pelo comportamento dos consumidores, que estão mais atentos à qualidade de vida, aliados ao bem estar e saúde (KAUR; SINGH, 2017). Assim, as indústrias e pesquisadores visam atender os anseios dessa parcela da população, desenvolvendo alimentos saudáveis.

Na área de alimentos funcionais a microbiota intestinal tem recebido destaque, devido aos efeitos benéficos que promovem à saúde. Dessa forma, torna-se importante estimular o crescimento seletivo de bactérias probióticas reduzindo assim, o número de patógenos (ALQURASHI et al., 2017; LI et al., 2019). Uma das estratégias mais adotadas para o estabelecimento de uma microbiota saudável é a ingestão de prebióticos, visto que estudos evidenciam a fermentação desses ingredientes por micro-organismos probióticos no trato gastrointestinal, levam a produção de metabólitos desejáveis, tais como ácidos graxos de cadeia curta (FONTELES; RODRIGUES, 2018).

A fortificação de alimentos com ingredientes prebióticos é uma categoria que vem sendo desenvolvida para promover a funcionalidade de matrizes alimentícias. Os produtos lácteos geralmente são os produtos mais estudados para a elaboração de bebidas com propriedades probióticas (SANTOS et al., 2018), porém a fortificação de sucos de frutas com ingredientes funcionais, como prebióticos, é uma opção viável de diversificação do mercado (ARAÚJO et al., 2015), pois possuem uma boa aceitação sensorial e atendem o apelo nutricional dos consumidores (ANNUNZIATA; VECCHIO, 2011).

Prebióticos são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis com estruturas quimicamente estáveis ao trato gastrointestinal superior que modulam a microbiota intestinal e a saúde do hospedeiro (SINGH et al., 2017). Os sucos de frutas podem ser considerados veículos ideais para o consumo de prebióticos, devido a sua composição, visto que são ricos em compostos bioativos, nutrientes, vitaminas e açúcares. Existem dois métodos para elaborar sucos de frutas prebióticos: adicionando oligossacarídeo prebiótico à matriz alimentar ou sintetizando o carboidrato prebiótico diretamente no suco de fruta, por via enzimática.

A enzima dextrana-sacarase é uma glicosiltransferase produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* em meio de cultura contendo sacarose. Essa enzima catalisa a síntese de oligossacarídeos prebióticos em meios contendo sacarose e aceptores (glicose, maltose e frutose), produzindo também dextrana. Estes oligossacarídeos, por não serem hidrolisados pelo trato gastrointestinal, chegam até o colôn promovendo o crescimento seletivo de bactérias probióticas (RASTALL; GIBSON, 2015). Estudos mostraram que a dextrana-sacarase pode ser usada de modo satisfatório para a síntese enzimática de oligossacarídeos prebióticos em sucos de frutas (DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014; VERGARA et al., 2010).

Após a síntese de oligossacarídeos, faz-se necessário recompor a doçura das bebidas uma vez que os açúcares (naturais do suco e/ou adicionados) são consumidos durante a síntese. Na busca de uma alimentação saudável e que atenda aos anseios dos consumidores que buscam alimentos sem sacarose, a tagatose é considerada uma alternativa potencial, pois se assemelha à sacarose com relação ao dulçor, apresenta baixo valor calórico e pode se comportar como um ingrediente prebiótico, conferindo benefícios à saúde (JAYAMUTHUNAGAI et al., 2017a).

Existem diferentes critérios para avaliar o efeito prebiótico de um ingrediente alimentar, dentre eles estão: sua capacidade de não sofrer alterações pelas enzimas e condições do trato gastrointestinal e ser substrato para crescimento da microbiota intestinal, favorecendo a multiplicação de probióticos (SUBIN et al., 2017).

Diante do exposto, esse trabalho visou avaliar o efeito do suco de caju contendo glico-oligossacarídeos, dextrana e tagatose no crescimento de microrganismos probióticos, bem como avaliar a bioacessibilidade da vitamina C e seu comportamento durante a fermentação dos micro-organismos probióticos em estudo. Com o intuito de avaliar a resistência desses ingredientes e a bioacessibilidade de compostos bioativos durante a digestão, realizou-se um modelo de simulação *in vitro* do sistema digestivo humano, o qual permitiu analisar o produto digerido nas etapas gástrica e entérica. Além disso, fez-se necessário simular as condições do cólon, onde ocorrem os processos fermentativos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alimentos funcionais

Nas últimas décadas, tornou-se crescente o interesse por alimentos com efeitos benéficos à saúde. Isso se deve a preocupação das indústrias em atender os anseios dos consumidores, que estão mais conscientes e acreditam que os alimentos podem oferecer saúde e bem estar. Nesse contexto surgiram os alimentos funcionais que apresentam valores nutricionais e terapêuticos melhorados (MOUMITA et al., 2018). O conceito de alimentos funcionais surgiu na década de 80 no Japão, e pode ser definido como, alimentos que além das funções nutricionais básicas, têm um efeito potencialmente positivo sobre a saúde, bem como efeitos metabólicos e/ou fisiológicos, auxiliando na redução de riscos de doenças não transmissíveis (GRANATO; NUNES; BARBA, 2017).

Os alimentos funcionais fazem parte de um novo nicho de mercado que busca aumentar o reconhecimento e aceitação do consumidor. A indústria alimentícia se mostra interessada nesse segmento devido as atividades de pesquisa e desenvolvimento que evidenciam os benefícios que esses alimentos proporcionam ao nosso organismo (BALTHAZAR et al., 2017a). Estes produtos apresentam um impacto positivo ao corpo humano, pois atuam na biorregulação do apetite, modulam as funções imunológicas e podem atuar na prevenção de alergias, hipertensão arterial, diabetes, câncer, colesterol alto e anemia (DA SILVA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2016; MITSUOKA, 2014).

Uma das estratégias para a produção de alimentos funcionais é a adição de probióticos, prebióticos ou sua combinação (simbiótico), além da incorporação de compostos bioativos em um alimento convencional para melhorar os valores nutricionais, perfil sensorial, características físico-químicas e reológicas (FAZILAH et al., 2018). Devem-se levar em conta algumas variáveis, como: a interação do ingrediente funcional com a matriz alimentar, a estabilidade ao processamento e a sua biodisponibilidade (ALMEIDA et al., 2015; AMIGO-BENAVENT et al., 2013; FONTELES; RODRIGUES, 2018).

Atualmente, existe um grande interesse na modulação da microbiota intestinal humana, pois a mesma desempenha um papel fundamental na saúde do hospedeiro. Os alimentos probióticos atendem esse apelo funcional, contudo, uma alternativa bastante eficaz e que vêm se destacando nos últimos tempos, é o consumo de ingredientes

funcionais denominados prebióticos (FONTELES; RODRIGUES, 2018; TAKO et al., 2014). Esse conceito será melhor explanado no tópico posterior.

2.2 Oligossacarídeos prebióticos

Os prebióticos foram definidos pela primeira vez em 1995, como ingredientes alimentares não digeríveis, que conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro ao serem consumidos pelas bactérias benéficas do cólon, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado desses microrganismos (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Os oligossacarídeos prebióticos, uma classe de destaque dos prebióticos, são metabolizados seletivamente por cepas probióticas, como os gêneros bifidobactérias e lactobacilos, e não são metabolizados pelas outras bactérias da flora intestinal (RASTALL; GIBSON, 2015). Dessa forma, esses ingredientes alimentares se comportam como uma fonte específica para o crescimento de probióticos.

Um novo conceito de prebióticos foi proposto pelo painel de consenso da Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos, sendo definido como um substrato que é usado seletivamente por microrganismos hospedeiros, conferindo um benefício à saúde (GIBSON et al., 2017). De acordo com a Global Market Insights, Inc. (Delaware, EUA), o mercado mundial de prebióticos está aumentando, e espera-se que este ingrediente alimentar ultrapasse US \$ 8,5 bilhões até 2024 (FONTELES; RODRIGUES, 2018).

A maioria dos prebióticos são oligossacarídeos não digeríveis, que consistem de 3-10 monômeros de carboidratos. A inulina é uma exceção, composta por uma mistura de fruto-oligossacarídeos e polissacarídeos (SAAD et al., 2013). Dentre os oligossacarídeos funcionais, destacam-se os fruto-oligossacarídeos, glico-oligossacarídeos, isomalto-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeos e os oligossacarídeos de soja (PATEL; GOYAL, 2011). Os oligossacarídeos devem seguir alguns critérios para serem classificados como prebióticos, tais como: serem resistentes à ação de enzimas salivares e intestinais; estimular o crescimento de bactérias probióticas; ser fermentado pela microbiota intestinal; conferir efeitos benéficos à saúde do hospedeiro; e ser quimicamente estável ao processamento de alimentos (LAMSAL, 2012; WANG, 2009).

Os oligossacarídeos podem ser encontrados naturalmente em alimentos, como leite, mel, cana de açúcar, soja, alho e beterraba (MUSSATTO; MANCILHA, 2007) ou

produzidos por síntese enzimática ou química a partir de dissacarídeos ou outros substratos, bem como por hidrólise de polissacarídeos (MORENO et al., 2017). No caso dos oligossacarídeos sintetizados via enzimática, a enzima dextrana-sacarase vem sendo empregada pelo nosso grupo de pesquisa. DA SILVA; RABELO; RODRIGUES (2014) produziram oligossacarídeos prebióticos pela ação da enzima dextrana-sacarase em suco de caju clarificado.

2.2.1 Síntese enzimática de oligossacarídeos prebióticos e dextrana

A enzima dextrana-sacarase (E.C.2.4.1.5) é uma glicosiltransferase bacteriana extracelular que catalisa a síntese de dextrana e oligossacarídeos prebióticos, de acordo com a composição do meio. Essa enzima produzida pelo *Leuconostoc mesenteroides*, uma bactéria ácido láctica presente naturalmente em alimentos fermentados e reconhecida como GRAS (Generally Recognized As Safe) (AMAN; SIDDIQUI; QADER, 2012).

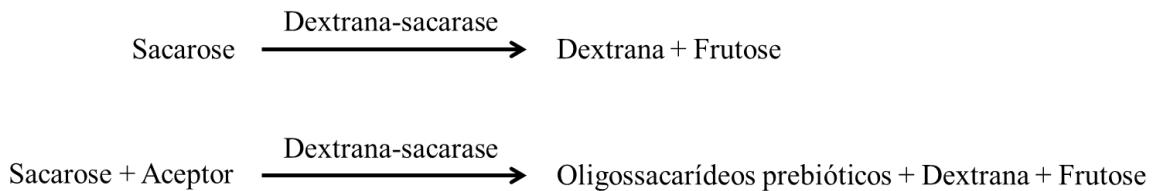
Em meios contendo apenas sacarose como substrato, a enzima catalisa a formação de dextrana, um polissacarídeo formado por monômeros de glicose ligados 95% por ligações glicosídicas lineares do tipo α -(1-6) na cadeia principal e ligações α -(1-2), α -(1-3) e α -(1-4) nas ramificações (BARUAH; DEKA; GOYAL, 2017; BOUNAIX et al., 2009; VANDAMME; SOETAERT, 1995). Autores relataram que esse exopolissacarídeo pode apresentar propriedades prebióticas e ser fermentados pela microbiota intestinal (KOTHARI; DAS; PATEL, 2014; OLANO-MARTIN et al., 2000).

Além da formação de dextrana, a enzima dextrana-sacarase sintetiza outros produtos. Dessa forma, quando um carboidrato acceptor (glicose, frutose e maltose) é adicionado ao meio reacional contendo sacarose, as unidades de glicose são desviadas da cadeia de dextrana, sendo incorporadas na molécula acceptora, formando os oligossacarídeos, essa reação é conhecida como reação do acceptor (Figura 1) (DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014; VERGARA et al., 2010). As unidades de glicose são incorporadas na cadeia de oligossacarídeos, levando ao aumento do grau de polimerização dos mesmos. Contudo, a proporção sacarose: acceptor apresenta efeito sobre o grau de polimerização dos oligossacarídeos, bem como sobre o rendimento destes e da dextrana (DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014).

A enzima dextrana-sacarase apresenta atividade ótima em torno de 30 °C e na faixa de pH de 5,0 a 5,5 (DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014; FONTES et al.,

2015; RABELO; FONTES; RODRIGUES, 2009). No entanto, a sua estabilidade a longo prazo é maior em temperaturas mais baixas (HEINCKE et al., 1999).

Figura 1. Reação do aceptor para a síntese de oligossacarídeos prebióticos



Fonte: VERGARA et al. (2010) com adaptações.

2.2.2 Efeitos benéficos atribuídos ao uso de oligossacarídeos prebióticos

O interesse por alimentos contendo prebióticos vem crescendo continuamente. Isso se deve aos efeitos benéficos que esses ingredientes conferem à saúde dos consumidores. A principal função dos prebióticos é a capacidade de modular a microbiota gastrointestinal (LIN et al., 2014; VANDEPUTTE et al., 2017). As bifidobactérias intestinais, bem como as bactérias do gênero *Lactobacillus*, são os principais microrganismos que metabolizam os prebióticos, logo, existem alguns estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstraram esses efeitos bifidogênicos dos oligossacarídeos (ENDO et al., 2016; PAINEAU et al., 2014; SCOTT et al., 2014).

Estudos reportam que esses carboidratos funcionais podem melhorar o funcionamento do sistema imunológico (VIEIRA; TEIXEIRA; MARTINS, 2013), diminuir o risco de câncer e de obesidade (JOHNSON et al., 2013), prevenir doenças cardíacas e diabetes (JOHANSSON et al., 2016). Além disso, esses ingredientes podem ter efeitos sobre alguns fatores regulatórios do corpo, por exemplo favorecer a absorção de minerais, como cálcio, magnésio e ferro (MAAWIA et al., 2016).

É importante ressaltar que, esses ingredientes funcionais, quando ingeridos em quantidades elevadas, podem apresentar efeitos colaterais, tais como: desconforto intestinal, flatulências e diarreia (BARUAH; DEKA; GOYAL, 2017). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o valor de referência dietética para fibras alimentares, inulina e fruto-oligossacarídeos (FOS) deve ser no mínimo 3 g/dia se o alimento for sólido ou 1,5 g/dia se o alimento for líquido, para que o mesmo apresente alegações com propriedades funcionais, de acordo com o item 3.3 da Resolução no 18/1999. É recomendada, ainda, uma ingestão máxima de 30 g/ dia (ANVISA, 2014). No entanto,

alguns autores indicam uma ingestão diária de 10 g/L para fruto-oligossacarídeos (BOUHNICK et al., 1999) e 7 g/L para galacto-oligossacarídeos (SILK et al., 2009).

Do ponto de vista tecnológico, a adição de oligossacarídeos prebióticos aos alimentos melhora o aspecto sensorial, como sabor e textura, e confere benefícios nutricionais quando usados como substituto de gorduras em formulações de alimentos (BALTHAZAR et al., 2017b). Outros estudos mostram que os prebióticos melhoram a sensação dos alimentos na boca (mastigabilidade) em uma ampla gama de aplicações alimentícias, como laticínios e produtos de panificação, bem como podem causar escurecimento de produtos, como pães (SALINAS et al., 2016).

Um novo segmento do mercado de alimentos prebióticos vem ganhando destaque, os sucos de frutas. Alguns estudiosos vêm avaliando a funcionalidade de suco de laranja adicionados de oligossacarídeos (COSTABILE et al., 2015; VEGA; ZUNIGA-HANSEN, 2015). Os sucos de frutas tem se apresentado como substratos ideais para a elaboração de bebidas prebióticas de baixo teor calórico, obtidas por processo enzimático, pela ação da enzima dextrana-sacarase, sendo eles: Suco de melão, laranja e abacaxi (FONTES et al., 2015), suco de acerola (ARAÚJO et al., 2015) suco de cranberry (GOMES et al., 2017) e suco de caju prebiótico (TINGIRIK; GOMES; RODRIGUES, 2017).

2.3 Suco de caju

O Brasil é um país tropical, conhecido pela sua grande variedade de frutas. Destaca-se por ser um importante exportador de frutas tropicais e subtropicais, principalmente para países da Europa e Estados Unidos. Esses alimentos são reconhecidos como produtos saudáveis, e frequentemente consumidos por uma parcela significativa da população. As frutas e vegetais não são vistos apenas como uma forma de nutrir, mas também são utilizados para fins terapêuticos e na prevenção de doenças crônicas como: câncer, diabetes, ataques cardíacos entre outras (AGUILERA; MARTIN-CABREJAS; GONZÁLEZ DE MEJIA, 2016).

O caju é o pseudofruto do cajueiro (*Anacardium Occidentale L.*), e pertence à família *Anacardiaceae*. Para cada tonelada de castanha de caju produzida, obtém-se aproximadamente de 10 a 15 toneladas de caju como subproduto (TALASILA; SHAIK, 2015). O pedúnculo do caju é rico em componentes funcionais como vitamina C, minerais, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, carboidratos e açúcares redutores como a frutose e a

glicose (QUEIROZ et al., 2011; RABELO; FONTES; RODRIGUES, 2009; SCHWEIGGERT et al., 2016). Essa parte do fruto é suculenta, apresenta sabor agradável e pode ser consumido *in natura* ou industrializado. O suco é o principal produto oriundo do pedúnculo, o qual pode ser obtido por meio de um processo mecânico, em uma prensa extratora (FONTELES et al., 2017; QUEIROZ et al., 2011).

A comercialização de sucos, bem como a aceitabilidade dos consumidores com relação a esses produtos, tem apresentado um considerável crescimento, pois a população anseia por alimentos práticos e naturais, com qualidade nutricional e sensorial (RODRÍGUEZ et al., 2017). O suco de caju é uma alternativa conveniente a esta demanda. Segundo regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de caju, o suco de caju integral é definido como a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale*, L.), através de processo tecnológico adequado. Além disso, o suco deve obedecer determinadas características como: cor variando do branco ao amarelado; sabor próprio, levemente ácido e adstringente; e aroma próprio (BRASIL, 2000).

Estudos evidenciam que os sucos de frutas representam um forte segmento no mercado de alimentos funcionais. A composição do suco de caju o torna um substrato ideal para fermentação com culturas probióticas, pois são produtos ricos em componentes funcionais, o que possibilita o desenvolvimento de bebidas funcionais à base de frutas, como o suco probiótico de caju (ALVES FILHO et al., 2017; PEREIRA et al., 2013, 2014).

Os sucos de frutas se apresentam como veículos promissores para a elaboração de outros alimentos com propriedades funcionais, como suco de caju prebiótico, obtido pela síntese de oligossacarídeos prebióticos no próprio suco, pela ação da enzima dextranase (DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014; FONTELES; RODRIGUES, 2018). No entanto, após a síntese de oligossacarídeos, a doçura final do produto pode ser afetada, pois os açúcares do suco são consumidos durante o processo. Diante do exposto, faz-se necessário recompor esse atributo sensorial e uma alternativa saudável é a busca por adoçantes que atendam essa demanda e não alterem a qualidade e aceitabilidade do produto.

2.4 Adoçante tagatose

A busca por uma alimentação saudável vem sendo um dos maiores objetivos dos consumidores, que estão cada vez mais preocupados com a saúde e com a qualidade dos produtos que adquirem. A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou uma nova diretriz em março de 2015, orientando a redução do consumo de açúcar para menos de 25 g / dia (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2015).

Nesse contexto, estudos foram realizados avaliando a substituição desses açúcares por adoçantes. Porém, alguns estudiosos relataram que o uso de adoçantes artificiais, como a sucralose, pode alterar a microbiota intestinal e causar inflamações (BIAN et al., 2017). Dessa forma, o estudo sobre adoçantes naturais com baixo teor calórico está continuamente ganhando espaço no mercado e nas pesquisas, devido as suas funcionalidades.

A tagatose é um adoçante tipo cetohexose, que vem sendo estudado como substituto da sacarose e de outros açúcares (JAYAMUTHUNAGAI et al., 2017a; KIM, 2004). A tagatose é um monossacarídeo com estrutura similar a frutose, a diferença entre essas moléculas deve-se a posição do grupo hidroxila no quarto carbono. Sua estrutura permite uma absorção mínima no trato gastrointestinal superior, sendo considerado um açúcar de baixo valor calórico, apresentando menos de 1,5 kcal /g (JAYAMUTHUNAGAI et al., 2017a; KIM, 2004). Apresenta-se na forma de pó branco cristalino e inodoro, como se trata de um açúcar redutor, participa da reação de Maillard, causando o escurecimento dos alimentos durante tratamentos térmicos (ROY et al., 2018). Essa característica se assemelha aos efeitos da sacarose quando adicionada em formulações submetidas ao aquecimento, por exemplo, na elaboração de pães. O que torna viável a substituição do açúcar tradicional pela tagatose, pois apresentam o mesmo comportamento quando submetidos à condições de calor.

Em 2001, esse adoçante natural recebeu o status de geralmente reconhecido como seguro (GRAS), pela *Food and Drug Administration* (FDA), devido a vários benefícios para a saúde e várias aplicações nas indústrias de alimentos (LEVIN, 2002). A tagatose é encontrada naturalmente em pequenas quantidades nos produtos lácteos e algumas frutas, apresenta aproximadamente 92% da docura da sacarose (LEVIN, 2002; MENDOZA; OLANO; VILLAMIEL, 2005; OH, 2007) e sabor mais similar ao açúcar que os outros adoçantes existentes. Contudo, contém apenas 30% do conteúdo energético da sacarose (FUJIMARU; PARK; LIM, 2012; MEN et al., 2014). A tagatose apresenta alta

solubilidade, o que a torna ideal como intensificador de sabor (SHOURIDEH et al., 2012), podendo ser usada também como texturizante e estabilizante. Esse adoçante natural é menos higroscópico que a frutose, e levemente mais viscoso que a frutose e sorbitol, porém possui menor viscosidade que a sacarose. Além disso, suas propriedades umectantes são semelhantes às do sorbitol (OH, 2007).

A tagatose é pouco absorvida no intestino delgado, cerca de 20 a 25%. Esse monossacarídeo não absorvido atinge o intestino grosso, onde é metabolizado pela microflora presente no cólon, acarretando em modificações nas proporções dos ácidos graxos de cadeia curta (TAYLOR; FASINA; BELL, 2008), incluindo propionato e butirato (BERTELSEN; JENSEN; BUEMANN, 1999; VENEMA; VERMUNT; BRINK, 2005). O butirato atua como um agente anti-inflamatório e na prevenção do câncer de cólon (CANANI et al., 2011). Dessa forma, a tagatose é considerada um ingrediente prebiótico, o que contribuiu para a realização de estudos para avaliar seus efeitos potenciais em formulações de alimentos (ROUHI et al., 2014).

Alguns estudos mostram que a tagatose apresenta efeitos prebióticos. Quando aplicada como substrato simbiótico, favorece o crescimento e as funções probióticas de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus*, e promove a redução do colesterol. Com isso, pode contribuir para a melhoria funcional dos alimentos (KOH et al., 2013). Ensaios confirmaram o uso desses monossacarídeos para tratar diabetes tipo 2, mostrando um importante potencial para a perda de peso e aumento do colesterol das lipoproteínas de alta densidade (GUERRERO-WYSS; DURÁN AGÜERO; ANGARITA DÁVILA, 2018).

Esse adoçante vem sendo aplicado como substituto ao açúcar tradicional e tem tido destaque por melhorar características nos produtos reformulados, tornando assim viável sua utilização. RUBIO-ARRAEZ et al. (2016) avaliaram as características de geléias cítricas e observaram uma melhoria na textura e nos atributos sensoriais dos alimentos elaborados com tagatose e em combinação com isomaltulose, além disso, a tagatose favoreceu inicialmente a capacidade antioxidante da geléia cítrica. Estudos evidenciam o impacto positivo da adição de tagatose na formulação de chocolates ao leite simbiótico, mostrando que esse prebiótico melhora a aceitabilidade dos produtos, e não interferem na viabilidade dos microrganismos probióticos incorporados no chocolate (RAD et al., 2018).

Adoçantes saudáveis vêm sendo aplicados na formulação de doces, como a marmelada de laranja, visando substituir o açúcar tradicional. Foi observado que a incorporação de tagatose e oligofrutose, na mesma proporção, melhorou a consistência e a elasticidade dos produtos, bem como obtiveram boa aceitabilidade e intenção de compra

pelos degustadores (RUBIO-ARRAEZ et al., 2015). Do mesmo modo, os resultados obtidos por RUBIO-ARRAEZ et al. (2017) mostram que doces de limão elaborados com tagatose apresentam maior pontuação nos atributos sensoriais, com ênfase na doçura. Diante do exposto, pode-se notar que esse açúcar raro apresenta várias aplicações na indústria alimentícia, pois suas propriedades dulçor e sabor mascaram sabores desagradáveis em produtos. Portanto, esse ingrediente potencial apresenta importantes aplicações na formulação de biscoitos, bolos, refrigerantes, produtos de confeitoraria, iogurtes, sorvetes, pães, muffins e chocolates (ROY et al., 2018).

Dessa forma, espera-se que a Tagatose mostre um efeito positivo nas propriedades funcionais do suco prebiótico de caju, devido às suas propriedades, como alta doçura, baixo teor calórico, baixo índice glicêmico, potencial prebiótico e propriedades físico-químicas desejáveis para a formulação de produtos alimentícios e sua capacidade de competir com os mercados de polialcool que substituem o açúcar (JAYAMUTHUNAGAI et al., 2017b).

2.5 Digestão simulada *in vitro* e bioacessibilidade

O atual pensamento e comportamento dos consumidores em relação à saúde levaram a um maior interesse dos pesquisadores em avançar os estudos dos mecanismos de digestão e absorção de nutrientes pelo organismo. Os ensaios *in vivo* são os que apresentam resultados mais precisos e relevantes para avaliar o funcionamento do sistema gastrointestinal, porém apresentam algumas dificuldades devido a questões éticas, constrangimentos técnicos, custo e tempo (HUR et al., 2011; MÉNARD et al., 2014). Diante disso, houve a necessidade de buscar maiores informações sobre novas metodologias que solucionassem esses problemas, uma alternativa foi o desenvolvimento dos modelos *in vitro*.

Os modelos de digestão *in vitro* permitem a simulação de condições gastrointestinais, que fornecem informações sobre alterações estruturais, digestibilidade e liberação de compostos presentes na matriz alimentícia. Além disso, tem como objetivo elucidar as etapas que envolvem a biodisponibilidade e bioacessibilidade de compostos, principalmente as fases oral, gástrica e entérica, e ocasionalmente os processos fermentativos que ocorrem no intestino grosso. Vale ressaltar que, esses métodos levam em consideração a presença e concentração de enzimas digestivas, pH, temperatura, tempo de

digestão e concentrações de sal, entre outros fatores (MINEKUS et al., 2014). Geralmente, esses modelos são aplicados em temperaturas de 37°C, temperatura do trato gastrointestinal; na fase gástrica o pH é ajustado entre 1 e 5 e são adicionadas as enzimas pepsina e lipase; na fase entérica o pH é ajustado primeiramente entre 4,5 e 5,5, em seguida o ajuste é realizado entre 6 e 7,5, nessa etapa são adicionadas a pancreatina e bile (BEDANI; ROSSI; SAAD, 2013; COSTA et al., 2017; GUERRA et al., 2012; PADILHA et al., 2016).

Para concluir que um alimento possui algum efeito benéfico à saúde é necessário avaliar o processo digestivo, analisando se as condições afetam os compostos de interesse e sua estabilidade, ou seja, se afetará sua bioacessibilidade e seus possíveis efeitos benéficos ao hospedeiro (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014). A bioacessibilidade refere-se à fração do nutriente ou composto bioativo ingerido que está disponível para uso em funções fisiológicas normais ou para ser armazenado e exercer seus efeitos potenciais ao corpo humano (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009). A bioacessibilidade desses componentes depende da matriz alimentícia, dos processamentos aplicados no alimento e dos parâmetros gastrointestinais (GUERRA et al., 2012). A quantidade de compostos liberados da matriz alimentícia que passam pelo sistema de digestivo e se encontram disponíveis para serem absorvidos ou metabolizados no cólon é chamado de fração bioacessível (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014).

Geralmente os termos “biodisponibilidade” e “bioacessibilidade” são usados indistintivamente, porém a biodisponibilidade pode ser definida como a soma da bioacessibilidade e da bioatividade. A bioacessibilidade é definida como a fração do componente bioativo liberado da matriz alimentícia, que não sofre modificações pelas reações bioquímicas do trato gastrointestinal e, torna-se disponível para a absorção intestinal (MANZINI et al., 2015). Nesse conceito, levam-se em consideração as transformações digestivas do alimento, tornando o um componente pronto para assimilação pelo corpo; a absorção e assimilação nas células do epitélio intestinal; e por fim, o metabolismo pré-sistêmico (intestinal e hepático). Por outro lado, a bioatividade oferece informações de como o composto bioativo é transportado e atinge o tecido-alvo, sua interação com as biomoléculas, o metabolismo ou biotransformação que pode sofrer. Essa interação com as biomoléculas dá origem a um metabólito, um sinal ou uma resposta fisiológica sistêmica, que confere benefícios para a saúde do hospedeiro. Uma aplicação para o termo “bioatividade” baseia-se no comportamento de polissacarídeos e oligossacarídeos, que são ingredientes não digeríveis, que possuem efeitos potenciais à

saúde, porém não são absorvidos. Com isso, a biodisponibilidade envolve processos de digestão, absorção, metabolismo, distribuição tecidual e bioatividade (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009).

Para a obtenção de resultados rápidos e menos dispendiosos sobre a digestibilidade dos alimentos, surgiram os modelos *in vitro* que simulam o sistema digestivo e determinam o comportamento e a biodisponibilidade dos nutrientes durante a digestão. Estudos estão sendo realizados buscando modelos que cada vez se assemelhem ao funcionamento real do corpo humano. Contudo, existem atualmente diferentes metodologias para a realização desses experimentos, o que dificulta no momento de comparar resultados dos estudos (MINEKUS et al., 2014). Os modelos *in vitro* podem ser classificados em estáticos e dinâmicos. Os modelos estáticos simulam as diferentes regiões do trato gastrointestinal: boca, estômago e intestino delgado, por meio da utilização de enzimas, tensoativos e reguladores de pH, além do controle de temperatura. Porém não reproduzem alguns processos físicos e fisiológicos, como os movimentos peristálticos, corte, mistura, hidratação e a existência da microbiota intestinal (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009; WICKHAM; FAULKS; MILLS, 2009).

Os modelos dinâmicos de digestão *in vitro* são os mais realistas e que conferem resultados mais fiáveis. Isso se deve ao fato de incluírem os processos físicos e mecânicos que permitem uma maior semelhança com as condições *in vivo* (GUERRA et al., 2012). Esses modelos possuem mecanismos que podem reproduzir os movimentos peristálticos, as forças de cisalhamento e de mistura que ocorrem nas etapas da digestão (KONG; SINGH, 2010; WANG et al., 2018). Assim, podem representar as mudanças na viscosidade do alimento digerido, reduzir o tamanho das partículas, avaliar a difusão e distribuição de nutrientes (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009). Por fim, todas essas vantagens pode tornar o custo desse modelo mais elevado.

Alguns autores optam por usarem modelos semi-dinâmicos, que possuem menos critérios que os modelos dinâmicos, porém são mais promissores que os estáticos. DE CARVALHO et al. (2009) realizaram estudos com um simples modelo *in vitro* semi-dinâmico, que simulou a sobrevivência de microrganismos probióticos do gênero *Lactobacillus* através do trato gastrointestinal, levando em considerações as condições ambientais do sistema digestivo humano, como pH, enzimas digestivas, resíduos alimentos e medicamentos terapêuticos. As simulações foram realizadas com a adição de sucos gástricos e intestinais, sob agitação rotativa.

Os modelos dinâmicos são aplicados em estudos sobre a resistência de microrganismos e sua capacidade de reduzir a biodisponibilidade de toxinas no organismo humano (RIVAS-JIMENEZ et al., 2016). Alguns autores destacam a importância dos modelos dinâmicos e consideram aspectos geralmente desconsiderados na simulação do sistema digestivo. JAIME-FONSECA et al. (2016) estudaram a digestão do amido, levando em consideração além dos parâmetros bioquímicos, as características de engenharia, como a motilidade intestinal. Além disso, considerou a taxa de fluxo enzimática e viscosidade do quimo na digestibilidade do amido e bioacessibilidade simulada da glicose.

As simulações *in vitro* também são executadas para avaliar o efeito prebiótico de produtos. Estudos foram conduzidos por meio de um modelo gastrointestinal contendo a digestão gástrica e duodenal. Verificou-se a resistência de cascas de amêndoas as condições do trato gastrointestinal e em seguida, foi realizada a fermentação no cólon com culturas bacterianas. Contudo, observou-se que a fibra alimentar das cascas de amêndoas alterou a composição das bactérias intestinais, apresentando efeitos potenciais prebióticos, bem como foram resistentes ao processo digestivo, pois não houve alteração significativa em sua composição. Além disso, foi avaliada a biodisponibilidade de compostos fenólicos após a digestão (MANDALARI et al., 2010). MANZINI et al. (2015) realizaram experimentos *in vitro* com o objetivo de avaliarem a digestão de pães elaborados com inulina e frutooligossacarídeos, e observaram que esses prebióticos reduziram a bioacessibilidade de micotoxinas produzidas durante a fermentação do pão. Portanto, a adição de ingredientes teve um efeito potencial à saúde humana, pois reduz a exposição do organismo a estas micotoxinas e isso pode ser observado pelas simulações do sistema digestivo.

Os modelos *in vitro* possibilitam estudos relacionados à sobrevivência de microrganismos no trato gastrointestinal e confirmam o efeito positivo da matriz alimentícia na proteção do probiótico, levando a menos alterações morfológicas (BEDANI; ROSSI; SAAD, 2013; COSTA et al., 2017). Além disso, alguns ingredientes prebióticos, como frutooligossacarídeos e inulina, podem promover um efeito protetor às bactérias probióticas, melhorando a sobrevivência e atividade durante o armazenamento, bem como durante a passagem pelo sistema digestivo (COSTA et al., 2017; HERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 2011; PADILHA et al., 2016).

Com o intuito de avaliar o efeito do adoçante natural (extraído de folhas de estévia) na formulação de bebidas exóticas de aveia, desenvolveu-se um modelo de digestão gastrointestinal *in vitro*, que possibilitasse avaliar a biodisponibilidade de compostos bioativos, bem como a bioacessibilidade dos glicosídeos de esteviol

(CARBONELL-CAPELLA et al., 2015). A simulação foi realizada com diferentes etapas: salivar, gástrica e duodenal, com o auxílio de uma membrana de diálise. A adição de stevia contribuiu para a biodisponibilidade de compostos fenólicos, antocianinas, capacidade antioxidante total e dos glicosídeos de esteviol na bebida funcional a base de frutas e aveia.

BUNIOWSKA et al. (2017) estudaram a biodisponibilidade de compostos bioativos e atividade antioxidante de sucos formulados com o adoçante stevia e processados por tecnologias não térmicas. Os experimentos foram realizados por meio de modelos *in vitro* de digestão e os resultados obtidos mostraram a eficiência das tecnologias elétricas pulsadas e ultrassom na liberação da compostos bioativos da matriz alimentícia e aumento da atividade antioxidante total após uma digestão gastrointestinal simulada *in vitro*. HODONICZKY; MORRIS; RAE (2012) avaliaram a resistência de oligossacarídeos por microrganismos orais e enzimas intestinais usando modelos *in vitro* de digestibilidade, com o objetivo de testar suas propriedades funcionais como um potencial substituto da sacarose. Alguns oligossacarídeos se mostraram resistentes às condições estabelecidas e considerados como adoçantes alternativos.

Na região inferior do sistema digestivo ocorrem processos fermentativos, os quais são provenientes do metabolismo de micro-organismo probióticos naturalmente encontrados no cólon. A microbiota intestinal é composta principalmente por micro-organismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, com destaque para *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium infantis* (ARBOLEYA et al., 2016; FERREIRA et al., 2019; TERPOU et al., 2019).

Além dos efeitos que a microbiota colônica e compostos bioacessíveis desempenham na saúde do hospedeiro, estudos apontam a existência de uma interação positiva entre a fração bioacessível desses compostos com os micro-organismos intestinais. Segundo OZDAL et al. (2016) compostos fenólicos podem ser biotransformado pela microbiota intestinal, assim como podem modular a composição da microbiota por meio da inibição de bactérias patogênicas e estimulação do crescimento de bactérias benéficas (probióticos).

Dessa forma, pode-se observar a relevância de se avaliar a bioacessibilidade de compostos e a integridade de ingredientes alimentares por meio de modelos de simulação *in vitro* do trato gastrointestinal, pois permitem a obtenção de resultados confiáveis sobre a quantidade de um composto bioativo ou ingrediente alimentar que estão disponíveis para gerar uma resposta fisiológica positiva ao organismo humano. Vale ressaltar a importância

dessas metodologias para o controle de qualidade de alimentos funcionais, uma vez que permitem a avaliação de bebidas prebióticas, probióticas e simbióticos, pois auxiliam nas análises de sobrevivência de microrganismos vivos, assim como na resistência de ingredientes ao sistema digestivo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito prebiótico dos sucos de caju contendo glico-oligossacarídeos e dextrana, sintetizados pela dextrana-sacarase, e adicionados ou não de tagatose, no crescimento dos micro-organismos probióticos, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis*, que compõem a microbiota intestinal.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar os oligossacarídeos prebióticos e dextrana no suco de caju em condições estáticas e com agitação magnética;
- Avaliar o efeito prebiótico do adoçante tagatose;
- Avaliar a digestibilidade dos oligossacarídeos, dextrana e tagatose nas etapas de digestão gastrointestinal simulada *in vitro*;
- Avaliar o efeito dos glico-oligossacarídeos, dextrana e tagatose presentes nos sucos, no crescimento dos micro-organismos probióticos: *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis*;
- Avaliar a bioacessibilidade da vitamina C e sua concentração ao longo do processo fermentativo dos probióticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo do suco de caju

Para a elaboração do suco de caju (*Anacardium occidentale L.*), foram utilizadas polpas não pasteurizadas da fruta adquiridas em mercado local, na cidade de Fortaleza (Brasil) (Ki Polpa®). As polpas foram armazenadas sob temperatura de congelamento (-20 °C) até o uso. O suco de caju foi obtido pela diluição das polpas em água potável (1:3), para cada 100 mL de polpa foram adicionados 200 mL de água, conforme descrito pelo fabricante.

4.2 Caracterização físico-química do suco de caju

Foram analisados dois tipos de sucos: não prebiótico “*in natura*” (Formulação 1) e prebiótico (contendo oligossacarídeos e dextrana sintetizados pela enzima dextrana-sacarase). Ambos foram caracterizados quanto ao teor de açúcares e vitamina C (ácido ascórbico) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia descrita por FONTELES et al. (2011), com adaptações. A metodologia das análises é descrita nos itens 4.9.1 e 4.9.2, respectivamente.

4.3 Produção da enzima dextrana-sacarase

A enzima dextrana-sacarase (E.C.2.4.1.5) foi produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* B512 F, por meio de processo fermentativo em batelada, segundo metodologia descrita por RODRIGUES (2003). A enzima obtida foi estocada a -20 °C. Para determinação da atividade enzimática tomou-se como referência a metodologia descrita no item 4.9.3.

4.4 Síntese enzimática de oligossacarídeos prebióticos

A síntese de oligossacarídeos prebióticos foi conduzida pela ação da enzima dextrana-sacarase, de acordo com a metodologia previamente estabelecida por DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, (2014).

A concentração dos açúcares do suco de caju integral foi ajustada pela adição dos açúcares redutores glicose e frutose, ou diluição do suco até atingir a concentração

estabelecida. Como o suco de caju não contém sacarose, esse carboidrato foi adicionado ao meio para promover a síntese de oligossacarídeos e atingir a concentração desejada de açúcares.

Primeiramente, meios reacionais com volume final de 10 mL foram elaborados, variando a concentração de sacarose (25 a 75 g/L), açúcar redutor (25 a 75 g/L, concentração equimolar de frutose e glicose) com e sem adição de cloreto de cálcio (0 a 0,05 g/L) – Tabela 1. O cálcio é fundamental para a estabilização da enzima. Sendo assim, a adição de Ca^{2+} pode melhorar a estabilidade da enzima e aumentar a atividade enzimática, uma vez que esse mineral pode variar no suco.

Para a realização da síntese, o pH foi ajustado para 5,2 com NaOH. A síntese foi realizada em tubo cônico tipo Falcon a 30 °C durante 17 h sem agitação, adicionando-se 1 UI/mL de enzima dextrana sacarase no suco (RABELO; FONTES; RODRIGUES, 2009). Após a síntese o pH foi ajustado para 4,2 com ácido cítrico para inativação da enzima e reestabelecimento do pH inicial do produto.

Tabela 1. Ensaios para a síntese enzimática de oligossacarídeos prebióticos e dextrana em suco de caju pela ação da enzima dextrana-sacarase

Ensaios	Sacarose (g/L)	Açúcar Redutor (g/L)	Cloreto de Cálcio (g/L)
1	25	25	0,00
2	25	25	0,05
3	50	50	0,00
4	50	50	0,05
5	75	75	0,00
6	75	75	0,05

O ponto com maior produção de oligossacarídeos prebióticos foi selecionado. Os experimentos foram prosseguidos em uma escala maior, a síntese foi conduzida em frasco reagente Schott® com um volume total de 1 L de suco. No entanto, foram estudadas duas condições do sistema, sendo um suco sintetizado sem agitação (Formulações 2) e outro sintetizado com agitação magnética constante (Formulações 3).

Decorrido o tempo de síntese (17 h), uma alíquota de 1 mL foi retirada e a dextrana foi precipitada pela adição de três volumes de etanol a 96% (v/v). O sobrenadante

etanólico recuperado, contendo os glico-oligossacarídeos, foi utilizado para análises posteriores. As respostas foram a produção de oligossacarídeos e dextrana e açucares consumidos.

4.5 Formulação do suco de caju prebiótico utilizando tagatose como adoçante

Foi realizada uma mistura de suco de caju contendo oligossacarídeos prebióticos (1/3), suco de caju não prebiótico “*in natura*” (2/3) e tagatose (1% m/v), para se avaliar o efeito da adição desse adoçante nas propriedades prebióticas do produto em estudo. As formulações foram realizadas seguindo os limites de ingestão diária de fibras alimentares e FOS, indicados pela ANVISA, e de tagatose. Se ingerida em grandes quantidades, a tagatose pode ter efeito laxativo, dessa forma a ingestão desse adoçante não deve exceder 30 g por dose por porção (GUERRERO-WYSS; DURÁN AGÜERO; ANGARITA DÁVILA, 2018).

Além disso, a concentração de tagatose foi baseada na quantidade de açúcar que foi consumido durante a síntese enzimática, visando recompor a docura do suco. As concentrações finais de açúcares redutores e tagatose foram determinadas por CLAE, segundo metodologia descrita no item 4.9.1.

4.6 Quantificação de glico-oligossacarídeos

Os açúcares redutores totais, açúcares totais, açúcares redutores totais consumidos, açúcares totais consumidos, oligossacarídeos prebióticos foram calculados por balanço de massa, de acordo com as Equações 2 a 6 a seguir:

$$AR_T \text{ (g/L)} = AR_S + AR_{AD} \quad (2)$$

$$AT \text{ (g/L)} = AR_T + Sac \quad (3)$$

$$AR_{CONS} \text{ (g/L)} = AR_T - AR_F \quad (4)$$

$$AT_{CONS} \text{ (g/L)} = Sac + AR_{CONS} \quad (5)$$

$$OLIGO \text{ (g/L)} = AT_{CONS} - DEXT \quad (6)$$

Onde,

AR_T Açúcares redutores totais

AR_S	Açúcares redutores do suco
AR_{AD}	Açúcares redutores adicionados ao suco
AT	Açúcares totais
Sac	Sacarose
AR_{CONS}	Açúcares redutores consumidos
AR_F	Açúcares redutores no final do ensaio
AT_{CONS}	Açúcares redutores totais consumidos no ensaio
OLIGO	Oligossacarídeos
DEXT	Dextrana

4.7 Sistema contínuo de digestão *in vitro*

O sistema de digestão simulada consistiu em 3 biorreatores de vidro sequenciais acoplados a um controlador (BIO-TEC-PRO) composto por bombas peristálticas que auxiliaram nas transferências de meio e soluções de ajuste de pH, placa agitadora (TE-2003-0,36-E1) e banho termostático (TEC-BIO-T) para controle de temperatura.

Foram simuladas três fases do trato gastrintestinal: gástrica, entérica I (duodenal) e entérica II (jejunal). As amostras foram mantidas nos biodigestores a temperatura de 37 °C sob agitação constante de 250 rpm, com transferências entre fases que simulam o movimento peristáltico *in vivo* do trato gastrintestinal (TGI).

Em cada biorreator foram adicionadas as soluções gástricas e entéricas, referente às diferentes fases. Estas foram preparadas de acordo com LO CURTO et al. (2011); MARTINEZ et al. (2011); MINEKUS et al. (2014) com adaptações. A solução gástrica foi formulada com cloreto de sódio (47,2 mmol/L), cloreto de potássio (6,9 mmol/L), fosfato de potássio monobásico (0,9 mmol/L), cloreto de magnésio hexahidratado (0,1 mmol/L), bicarbonato de sódio (25 mmol/L), cloreto de cálcio (0,3 g/L), pepsina 2,4 g/L - 600 U/mL - (Sigma Aldrich). As soluções duodenal e jejunal possuem a mesma composição, cloreto de sódio (38,4 mmol/L), cloreto de potássio (6,8 mmol/L), fosfato de potássio monobásico (0,64 mmol/L), cloreto de magnésio hexa-hidratado (0,33 mmol/L), bicarbonato de sódio (85 mmol/L), cloreto de cálcio (0,37 g/L), pancreatina 0,9 g/L (Sigma Aldrich) e bile 6 g/L (Sigma Aldrich).

O primeiro biodigestor é alimentado com 150 mL do suco durante 10 min. Cada reator foi preenchido com 100, 60 e 35 mL de solução gástrica, duodenal e jejunal, respectivamente. As fases da digestão tiveram duração de 2 h cada, sendo 60 min o tempo

de residência nos biorreatores e 60 min de transferência, realizada pelo funcionamento das bombas peristálticas. Após o tempo de residência da primeira etapa, a fase seguinte foi alimentada com 180 mL da fase I. Ao fim da fase II, a última fase recebeu 210 mL da fase anterior.

O valores de pH foram adequados para cada fase da digestão, os ajustes foram feitos automaticamente seguindo a programação previamente estabelecida no sistema com soluções de NaOH 1M e HCl 1M. Na fase gástrica, o pH foi ajustado para $2,3 \pm 0,2$. Na fase entérica I, para $5,0 \pm 0,2$ e na fase entérica II, os valores foram corrigidos para $7,0 \pm 0,2$. O ensaio completo teve duração de 6 h. Amostras foram coletadas das três fases (a cada 2h) da digestão *in vitro* para avaliar a bioacessibilidade da vitamina C por HPLC (detector UV), bem como a integridade dos glico-oligossacarídeos e dextrana. Ao final da digestão, o suco digerido foi recuperado e microrganismos probióticos foram cultivados nesse meio.

4.8 Efeito dos prebióticos no crescimento de micro-organismos intestinais

Para avaliar o efeito prebiótico dos oligossacarídeos, dextrana e tagatose presentes no suco de caju, a última fase da digestão de cada formulação foi recuperada. Foi inoculado uma concentração de células da ordem de 10^7 UFC/mL de cada micro-organismo. As cepas probióticas cultivadas foram: *Lactobacillus casei* B-442, *Bifidobacterium breve* B-41408 e *Bifidobacterium infantis* B-41661.

4.8.1 Ativação dos micro-organismos

Inicialmente, as cepas foram cultivadas em caldo MRS (Man Rogosa e Sharpe, Himedia[®]), exceto a cepa de *Bifidobacterium infantis*, cujo meio utilizado foi caldo *bifidobacterium*, específico para esse microrganismo. O *L. casei* foi ativado inoculando-se 1,5 mL da cultura estoque em 100 mL de caldo adicionado de 10 mL de tampão fosfato de potássio bibásico 200 mM pH 6,5. A ativação foi conduzida a 37 °C (aproximadamente 16 h), e em seguida fez-se o repique para atingir uma concentração de células da ordem de 10^9 UFC/mL (aproximadamente 4,5 h), equivalente a 0,600 de absorbância a 590 nm. A ativação e o repique das bifidobactérias foram realizados durante 24 h à 37 °C em anaerobiose.

4.8.2 *Cultivo dos micro-organismos*

Após ativação das linhagens, um volume adequado do caldo fermentado foi centrifugado (6000 g, 10 min, 20 °C). A biomassa precipitada foi ressuspensa em 40 mL do suco digerido, para atingir uma contagem inicial de 7,0 log UFC/mL no suco. Os sucos foram incubados a 37 °C estaticamente para o *L. casei* e em anaerobiose para as bifidobactérias. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 h. Foram realizadas análises de crescimento microbiano (item 4.9.5), bem como análises para a quantificação de açúcares, oligossacarídeos prebióticos, dextrana, ácido cítrico e lático a fim de avaliar o crescimento de cada espécie frente aos substratos disponíveis para o crescimento. As metodologias estão descritas no item 4.9.

4.9 Métodos analíticos

4.9.1 *Determinação de açúcares*

Os açúcares glicose, frutose e tagatose foram quantificados mediante um sistema integrado por um cromatógrafo modelo Infinity 1260 (Agilent®) e um detector de índice de refração (IR) Prostar 345. A separação dos constituintes foi conseguida através de uma coluna BIORAD HPX-87H (300×7,8 mm) à 60 °C. Uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 5mM foi utilizada como fase móvel, com um fluxo de 0,6 mL/min. A temperatura do detector foi de 35 °C.

As amostras de suco sem oligossacarídeos foram diluídas em água Milli-Q (Millipore) e filtradas com uma membrana de acetato de celulose (Millipore) com poros de 0,45 µm, a fim de remover partículas em suspensão que pudessem interferir na análise. Para as amostras de suco prebiótico, uma etapa foi realizada antes de proceder com a filtração do analito, a dextrana foi precipitada com etanol e a diluição foi feita a partir do sobrenadante etanólico. Uma curva de calibração foi elaborada com uma mistura de soluções puras dos açúcares de interesse: glicose, frutose e tagatose. As concentrações desses componentes encontravam-se na faixa de 0,5 a 10g/L, exceto a tagatose, onde foi usada uma faixa de 0,25 a 5 g/L.

4.9.2 *Determinação de ácidos orgânicos*

Para a determinação dos ácidos orgânicos, ascórbico e lático, tomou-se como

base o procedimento descrito no item anterior. Contudo, a temperatura da coluna foi de 50 °C e o detector utilizado foi UV 210 nm. Os valores de concentração dos ácidos nas curvas de calibração variaram de 10-200, 40-800 e 80-1600 mg/L para ácido ascórbico, cítrico e lático, respectivamente.

4.9.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade da enzima dextrana-sacarase foi determinada através da quantificação da frutose liberada em meio reacional contendo sacarose como substrato (HEINCKE et al., 1999). É expressa em unidade internacional de dextrana-sacarase (UI), que corresponde a quantidade de enzima que produz 1 µmol de frutose a partir da sacarose por minuto (TANRISEVEN; DOĞAN, 2002).

Para a determinação da atividade enzimática obtida, foram preparados 100 mL de uma solução de atividade contendo 18,2 mL de uma solução estoque de sacarose (600 g/L) em tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05 g/L de CaCl₂ e 4,5 mL de tampão de acetato de sódio 20 mM com 1,2 g/L de CaCl₂. O pH da solução foi ajustado para 5,2. Uma alíquota de 450 µL desta solução de atividade foi adicionada a dois tubos de ensaio e em seguida, foi acrescentado uma alíquota de 50 µL da enzima livre em cada tubo de ensaio identificados como tempo 0 e tempo 10. No tubo de tempo 0 foram adicionados 500 µL do reagente de DNS, ambos os tubos foram incubados a 30 °C durante 10 min. Transcorrido o tempo de reação, foram adicionados 500 µL do reagente de DNS no tubo de tempo 10. Os tubos foram aquecidos por 5 min a 100 °C, e resfriados em banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 9,0 mL de H₂O destilada em cada tubo, e a densidade ótica foi obtida em espectrofotômetro UV-visível (Global Trade Technology), no comprimento de onda de 540 nm. Nesse método, o branco foi feito substituindo o volume de enzima por água. Para calcular a atividade enzimática utilizou-se a Equação 1:

$$\text{Atividade (UI/mL)} = \frac{(ABS10 - ABS0) \times d \times 10^3}{\alpha \times 180 \times t} \quad (1)$$

Sendo:

α coeficiente angular da curva de calibração de DNS (mg/ABS.ml)

ABS10 valor médio das leituras de absorbância no tempo 10 minutos

ABS0 valor médio das leituras de absorbância no tempo zero

- d diluição da amostra
 t tempo de reação

4.9.4 Determinação de dextrana

A dextrana precipitada pela adição de etanol (como descrito anteriormente) foi ressuspensa em água destilada e determinada segundo o método fenol ácido sulfúrico para determinação de carboidratos totais (DUBOIS et al., 1956).

4.9.5 Avaliação do crescimento microbiano nos sucos após digestão *in vitro*

O crescimento foi monitorado pela medida de densidade ótica a 590 nm e 620 nm para o *L.casei* e bifidobactérias, respectivamente. As leituras foram conduzidas em espectrofotômetro UV-visível (Global Trade Technology). Para isso, diluiu-se uma alíquota do suco contendo o inóculo em água destilada (1:10) e utilizou-se água como branco. Os resultados foram expressos em absorbância relativa (ABS/ABS0). Foram feitas medidas do pH por meio de leitura direta, em potenciômetro Marconi®, modelo PA200, calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

4.10 Análises estatísticas

As análises foram realizadas em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância ao nível de confiança de 95 % utilizando o programa Statistica versão 10, quando necessário. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As formulações estudadas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Formulações elaboradas para o estudo.

Formulações	Descrição
1	Suco de caju não prebiótico (<i>in natura</i>)
2	Suco de caju prebiótico sintetizado sem agitação
3	Suco de caju prebiótico sintetizado com agitação
4	Suco elaborado pela diluição da Formulação 3 na Formulação 1 (1:3)

5.1 Caracterização do suco de caju

O suco de caju utilizado como matéria-prima para a produção dos sucos prebióticos continha 18,73 g/L de glicose, 18,43 g/L de frutose e 637,98 mg/L de ácido ascórbico (Formulação 1). As concentrações elevadas de glicose e frutose no suco de caju favorecem a formação de oligossacarídeos prebióticos por síntese enzimática, uma vez que são açúcares aceptores da reação (DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014).

5.2 Síntese enzimática dos oligossacarídeos

Foram realizados ensaios preliminares variando as condições de síntese enzimática. Os ensaios foram realizados com 10 mL de meio reacional, durante 17 h pela ação da enzima dextrana-sacarase. As condições experimentais dos ensaios e os valores de açúcares totais consumidos, oligossacarídeos e dextrana estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Condições experimentais e resultados de produção de glico-oligossacarídeos e dextrana no suco de caju *in natura* utilizando a enzima dextrana-sacarase.

Ensaios	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS			RESPOSTAS	
	SAC*	AR*	CaCl ₂ *	OLIGO*	DEXT*
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
1	25	25	0,00	17,65	4,32 ± 0,14 ^c
2	25	25	0,05	31,74	3,23 ± 0,22 ^c
3	50	50	0,00	44,74	8,23 ± 0,90 ^b
4	50	50	0,05	49,29	11,57 ± 0,60 ^a
5	75	75	0,00	91,43	10,24 ± 0,46 ^{ab}
6	75	75	0,05	94,49	8,80 ± 0,10 ^b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

*Significado das siglas: SAC-Sacarose; AR-Açúcares Redutores; CaCl₂-Cloreto de Cálcio; OLIGO-Oligossacarídeos prebióticos e DEXT-Dextrana.

Pode-se observar que, as formulações que propiciaram uma maior produção de oligossacarídeos prebióticos foram as com maiores valores de AR e SAC (75 g/L de cada).

Mesmo com maiores concentrações de açúcares, os pontos 5 e 6 não obtiveram valores de dextrana superiores às preparações contendo 50 g/L de AR e SAC. Resultados semelhantes foram obtidos por DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, (2014) que sintetizaram oligossacarídeos em suco de caju clarificado e atingiram maior produção desses ingredientes prebióticos com 75 g/L de sacarose em combinação com 75 g/L de açúcares redutores.

A adição de cálcio nos meios pode melhorar a atividade e estabilidade da enzima, permitindo uma maior síntese enzimática de oligossacarídeos. Nesse estudo foi possível observar esse efeito, pois todos os pontos acrescidos de cloreto de cálcio apresentaram maior produção de oligossacarídeos.

5.2.1 Scale-up

Após avaliar os resultados obtidos nos ensaios preliminares, realizados com volume de 10 mL, tomou-se a melhor condição (ponto 6) e a síntese foi conduzida numa escala maior, com um volume de 1L de meio reacional. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos a partir da síntese enzimática em 1 L de suco de caju não prebiótico (*in natura*), com ênfase na quantidade de oligossacarídeos prebióticos, dextrana e vitamina C.

Tabela 4. Caracterização dos sucos sintetizados com e sem agitação, quanto à concentração de glico-oligossacarídeos, dextrana e vitamina C.

Formulações	OLIGO (g/L)	DEXT (g/L)	VITAMINA C (mg/L)
2	20,91	20,00 ± 0,48 ^a	581,77 ± 11,63 ^a
3	23,50	8,99 ± 0,20 ^b	578,84 ± 17,36 ^a

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

As formulações apresentam condições diferentes, um suco foi produzido sem agitação (Formulação 2) e o outro suco com agitação magnética constante (Formulação 3). A escolha de executar ensaios estáticos ou com agitação visou reduzir os impactos dos efeitos difusoriais sobre a matriz alimentícia, evitando as limitações externas de transferência de massa (GONÇALVES; GIORDANO; GIORDANO, 1997). Ao aumentar o volume de reação, se torna mais difícil o acesso do substrato ao sitio da enzima devido ao

impedimento estérico causado pela cadeia de dextrana e isso pode ocasionar uma menor taxa de reação, ou direcionar a reação para a síntese de outro produto.

A Formulação 3 produziu 12,39 % mais oligossacarídeos em comparação a Formulação 2. Enquanto nessa houve uma produção de dextrana 55,05 % maior que na Formulação 3. Os resultados obtidos apontaram que a síntese estática propiciou uma maior produção de dextrana que oligossacarídeos prebióticos. A falta de agitação permitiu que as moléculas de glicose fossem mais fortemente atraídas para a cadeia de dextrana, produto principal da enzima dextrana-sacarase, em vez de serem desviadas e se ligarem aos aceptores encontrados no meio, dando origem aos oligossacarídeos.

O resultado obtido sugere que a agitação pode ter ocasionado mudanças conformacionais na estrutura tridimensional da enzima, facilitando o acesso do acceptor ao sitio ativo da dextrana-sacarase e favorecendo a produção de glico-oligossacarídeos. Além disso, com a agitação as unidades de glicose, provenientes da molécula de sacarose, se ligaram mais facilmente ao acceptor, desviando a cadeia de dextrana (GUTTERIDGE; THORNTON, 2004; RABELO; FONTES; RODRIGUES, 2011).

Além dessas formulações, duas outras foram feitas a fim de manter as quantidades de prebióticos recomendadas de ingestão diária. A Tabela 5 mostra a caracterização dessas bebidas. Essas preparações, uma sem tagatose (Formulação 4) e outra com a adição de 1 % (p/v) de tagatose (Formulação 5) foram avaliadas quanto o efeito prebiótico desse adoçante. Esse adoçante apresenta propriedades prebióticas e pode ser uma alternativa saudável ao uso de açúcares convencionais, como a sacarose (JAYAMUTHUNAGAI et al., 2017b).

Tabela 5. Caracterização dos sucos quanto a concentração de glico-oligossacarídeos, dextrana, tagatose e vitamina C.

Formulações*	OLIGO (g/L)	DEXT (g/L)	TAGATOSE (g/L)	VITAMINA C (mg/L)
4	7,83	2,87 ± 0,08 ^a	-	380,47 ^a
5	7,83	2,99 ± 0,17 ^a	10,40 ± 0,48	376,64 ^a

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p < 0,05)

* Sucos elaborados pela diluição da Formulação 3 em suco de caju não prebiótico (Formulação 1).

Atualmente, não existe uma legislação referente ao consumo específico de glico-oligossacarídeos e dextrans, para promover o efeito prebiótico. No entanto, tendo como base os valores sugeridos pela legislação para compostos com propriedades similares, como fibras alimentares e fruto-oligossacarídeos (FOS), sugere-se que os compostos desse estudo podem conferir efeitos benéficos nas mesmas concentrações e todas as formulações apresentam as concentrações indicadas pela legislação para fibras.

As formulações 2, 3, 4 e 5 elaboradas nesse estudo apresentaram concentrações de 10,22; 8,12; 2,68 e 5,30 g/250 mL de componentes conhecidos por suas propriedades prebióticas. Contudo, faz-se necessário confirmar se esses valores promovem o efeito prebiótico favorecendo o crescimento de micro-organismos probióticos.

5.3 Efeito da digestão *in vitro* nos ingredientes com propriedades prebióticas

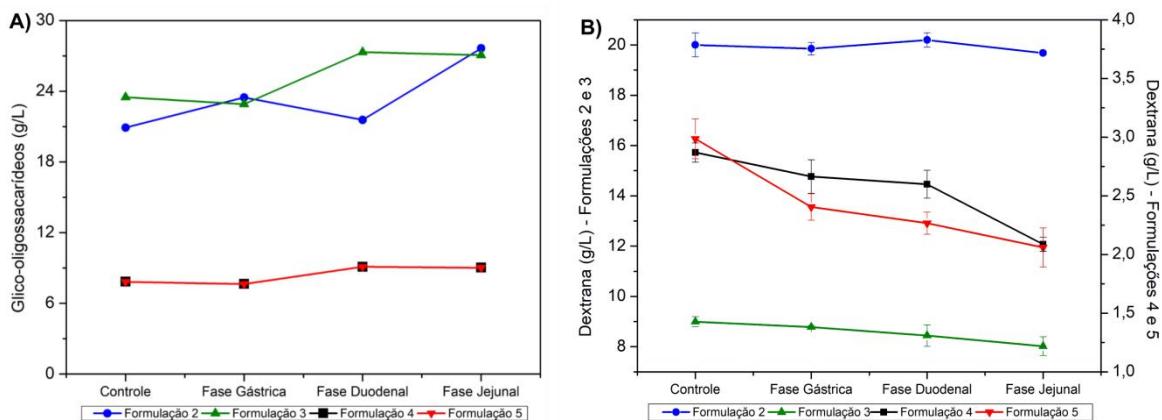
A simulação da digestão *in vitro* permite uma melhor abordagem sobre a concentração de compostos que alcançam a região inferior do trato digestivo, e ficam disponíveis para serem absorvidos ou participarem de reações metabólicas (AGUDELO et al., 2018).

No presente trabalho, foi estudada a integridade dos glico-oligossacarídeos e dextrans sintetizados nos sucos de caju, e da tagatose adicionada.

5.3.1 Glico-oligossacarídeos e dextrans

Os prebióticos são definidos como substratos usados seletivamente por micro-organismos do trato gastrointestinal (TDI) do hospedeiro, conferindo efeitos benéficos à sua saúde (GIBSON et al., 2017). Para tanto, precisam atravessar o TDI e atingirem o intestino grosso intactos. Amostras dos sucos prebióticos e as formulações com e sem tagatose passaram pelo sistema de digestão dinâmico e os resultados da concentração de oligossacarídeos e dextrans a cada fase estão expostos na Figura 2.

Figura 2. Comportamento dos glico-oligossacarídeos e dextrana do suco de caju prebiótico durante a simulação dinâmica da digestão *in vitro*



Pode-se observar que, durante as fases da digestão não houve hidrólise dos oligossacarídeos, ou seja, isso confirma que esses ingredientes funcionais produzidos no suco de caju, por via enzimática, são resistentes ao TGI. Os prebióticos são quimicamente estáveis a ampla faixa de temperatura e pH, além disso são resistentes às ações hidrolíticas das enzimas intestinais (SINGH et al., 2017).

É importante lembrar que, o controle refere-se a cada formulação antes de passar pela digestão simulada *in vitro*. Além disso, os valores de oligossacarídeos presentes nas formulações 4 e 5 estão sobrepostos pois estas foram preparadas a partir da diluição da formulação 3 e apresentam a mesma composição com relação a concentração de glico-oligossacarídeos.

Durante a síntese, parte da glicose liberada pela quebra da molécula de sacarose se liga, dando origem a dextrana (DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014; FONTES et al., 2015). No decorrer da digestão *in vitro*, a dextrana pode sofrer hidrólise ácida e dar origem aos glico-oligossacarídeos, aumentando a concentração desses prebióticos nas fases da digestão. Na Figura 2A, pode-se observar que as amostras apresentaram um aumento da concentração de glico-oligossacarídeos, nas fases entéricas (duodenal e/ou jejunal). Esse aumento pode estar associado a redução da concentração de dextrana, mostrada na Figura 2B.

A integridade dos oligossacarídeos pode ser justificada por suas ligações glicosídicas. Durante a digestão, o suco entra em contato com as soluções gástrica e entérica, onde se encontram enzimas como: pepsina, bile e pancreatina. Apesar da presença dessas enzimas digestivas, os oligossacarídeos prebióticos permanecem intactos, pois as

ligações glicosídicas características desses componentes não são clivadas pela ação dessas enzimas.

Alguns autores associam o efeito prebiótico de glico-oligossacarídeos, produzidos via glicosilação, às ligações glicosídicas dessas moléculas, destacando a presença de ligações α -1,6 e β -1,6 bem como α/β -1,1, α -1,2 e α -1,3 (LI et al., 2019). É importante ressaltar que os oligossacarídeos sintetizados no presente estudo apresentam ligações glicosídicas α -1,6. Isso se deve ao fato da enzima dextrana-sacarase sintetizar carboidratos complexos com ligações α -1,6 na cadeia principal e essas ligações são menos susceptíveis a ação de enzimas digestivas humanas (HUANG et al., 2020; KOTHARI; TINGIRIKARI; GOYAL, 2015).

Avaliando a Figura 2B, na formulação 2, a concentração de dextrana não sofreu alteração significativa durante a digestão. Por outro lado, o conteúdo de dextrana da Formulação 3 apresentou uma redução de 10,82 % com relação ao controle. Ao verificar a Figura 2, nota-se que, a medida que houve uma redução da concentração de dextrana na Formulação 3, a quantidade de oligossacarídeos da amostra aumentou, isso infere que parte dos oligossacarídeos pode ter sido obtido pela hidrolise ácida e/ou enzimática da dextrana (IQBAL et al., 2017; LEEMHUIS et al., 2013).

As formulações 4 e 5 apresentaram uma redução no conteúdo de dextrana de 27,25 % e 31,00 %, respectivamente, em relação ao suco não digerido. Pode-se notar que, a maior redução nos teores de dextrana ocorreu nas amostras com um menor conteúdo desse carboidrato. Esse resultado sugere que, a formulação sintetizada com agitação (Formulação 3) e as formulações 4 e 5 obtidas a partir desta, tenham em sua composição dextrana de menor peso molecular e menor tamanho, favorecendo o efeito da acidez e da ação de enzimas digestivas na hidrólise da molécula. Pode-se considerar que, quanto menor a cadeia de dextrana, mais acessível à degradação, devido a melhor difusividade da molécula (OLANO-MARTIN et al., 2000).

Assim, as formulações 2 e 3 atingiram a parte final do trato digestivo, para colonização bactérias intestinais em concentrações de dextrana superiores a 80 % do conteúdo inicial. Por outro lado, as formulações 4 e 5 mantiveram intactos aproximadamente 70% do seu conteúdo inicial.

Contudo, a formulação 2 apresentou maior resistência durante a passagem pelo sistema simulado do trato gastrointestinal, isso pode ser justificado pela presença predominante de ligações glicosídicas α -1,6, que não são clivadas pelas enzimas do lúmen,

e também pelo alto peso molecular que dificulta sua digestão por dissacaridas presentes no intestino delgado (KOTHARI; DAS; PATEL, 2014; OLANO-MARTIN et al., 2000).

5.3.2 Tagatose

Nesse estudo, foi avaliada a aplicação da tagatose, um adoçante com potencial efeito prebiótico. Os resultados obtidos mostraram que a concentração de tagatose não reduziu durante as fases da simulação da digestão gastrointestinal, atingindo a última fase da digestão simulada *in vitro* numa concentração de $10,59 \pm 0,52$ g/L. Lembrando que o valor inicial de tagatose na formulação foi de $10,40 \pm 0,48$ g/L. Logo, esse adoçante apresenta um dos critérios para ser considerado como prebiótico: não foi degradado mesmo em condições ácidas e exposição às enzimas digestivas encontradas em cada fase da digestão (GIBSON et al., 2017).

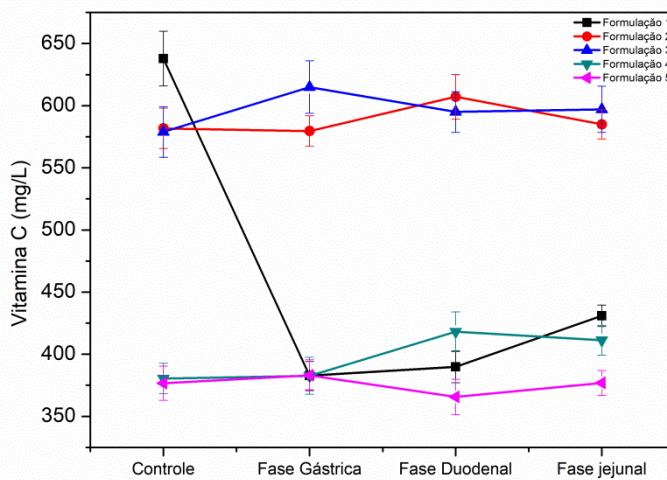
A estrutura da tagatose é responsável pela sua difícil absorção ao longo do trato gastrointestinal, isso acontece devido à diferença na configuração espacial da molécula na posição C-4. Com isso, a maior parte da tagatose ingerida alcança o intestino grosso e serve como substrato para microflora intestinal (ROY et al., 2018).

5.4 Efeito da digestão *in vitro* na bioacessibilidade vitamina c

A bioacessibilidade é um conceito de grande importância quando avaliamos compostos bioativos. Geralmente, mensura-se a concentração dos constituintes no alimento propriamente dito, porém, a fração disponível para absorção no colón é que reflete os efeitos benéficos à saúde. Contudo, a bioacessibilidade pode ser definida como a quantidade de nutriente ingerido que é liberado da matriz alimentícia e se encontra disponível para absorção no intestino após a digestão (GALANAKIS, 2017). A Figura 4 mostra o efeito da digestão na concentração de vitamina C, expressa em mg/L, das amostras de suco de caju não prebiótico, prebiótico e prebiótico adoçado com tagatose.

A vitamina C é um poderoso antioxidante (KALLIO et al., 2012). Durante a digestão, o teor de vitamina C das amostras apresentou comportamento diferente. O suco não prebiótico mostrou uma elevada redução no conteúdo de vitamina C, perdendo cerca de 30 % desse componente em comparação a amostra não digerida.

Figura 4. Concentração de vitamina C dos sucos de caju não prebiótico (*in natura*) e prebióticos durante a simulação dinâmica da digestão *in vitro*



A degradação da vitamina C pode ser atribuída principalmente à influência do oxigênio (ALVES FILHO et al., 2018). A oxidação desse composto no trato gastrointestinal pode ocorrer devido à sua ação como doador de elétrons, onde mantem os íons no estado reduzido, regenerando a forma ativa de outros constituintes da alimentação (FONTELES et al., 2016).

Os resultados indicam que, os sucos contendo oligossacarídeos prebióticos mantém o conteúdo de vitamina C preservado ao longo da digestão *in vitro*. Pode-se observar que durante a digestão também ocorre um aumento na concentração de Vitamina C. Alguns componentes dos sucos podem sofrer hidrólise ácida ou enzimática liberando o conteúdo intracelular para o meio, como por exemplo, as fibras do caju. Vários fatores podem influenciar a bioacessibilidade de compostos, dentre eles se destacam: a matriz alimentícia, a forma química do nutriente e a interação com outras moléculas presentes no alimento (GALANAKIS, 2017). Uma atenção especial deve ser dada as bebidas, pois são meios complexos que permitem interações entre compostos bioativos, nutrientes e / ou outros constituintes dos alimentos (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2015).

Esses ingredientes funcionais diminuem o efeito do processo digestivo na composição no suco. Isso pode ser atribuído ao efeito protetor contra a oxidação do composto bioativo em estudo. Segundo CORONA-HERNANDEZ et al. (2013), alguns prebióticos, tais como, inulina e oligossacarídeos são usados para microencapsulação como o objetivo de proteger certos compostos ou micro-organismos de condições adversas.

Diante disso, sugere-se que o efeito protetor ocorra devido à capacidade dos prebióticos revestir outras moléculas do suco.

Alguns estudiosos explicam o efeito de carboidratos complexos, como a fibra dietética, na digestão de moléculas antioxidantes. As fibras podem retardar as taxas de liberação de nutrientes ou antioxidantes no intestino delgado, diminuindo a absorção desses compostos ao longo da digestão. Esse efeito pode ser explicado pelo aprisionamento físico dessas moléculas em conjuntos estruturados, como o tecido do alimento. Esse fator pode ser aplicado ao efeito dos glico-oligossacarídeos na digestão da vitamina C presentes no suco de caju prebiótico. Porém, pode haver também a liberação de compostos, dependendo do tempo de exposição ao ambiente digestivo, o tamanho e estrutura das partículas durante a simulação da digestão *in vitro* (PALAFOX-CARLOS; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011).

Para tanto, os antioxidantes não absorvíveis atingem o intestino grosso e permanecem no lúmen do cólon, onde podem contribuir para a saúde do hospedeiro.

5.5 Avaliação do efeito prebiótico dos sucos de caju

Para um ingrediente alimentício ser classificado como prebiótico, necessariamente ele deve atender alguns atributos, como ser fermentado pela microbiota intestinal e estimular o crescimento de microrganismos probióticos. Após a digestão *in vitro*, os sucos digeridos foram incubados na presença de microrganismos probióticos, a 37 °C durante 96 h. Algumas espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são caracterizadas como potencialmente probióticas e são as mais comumente estudadas. Ambos os gêneros foram caracterizados como “geralmente reconhecidos como seguros” (GRAS) e compõem a microbiota do intestino humano (TERPOU et al., 2019).

Os resultados a seguir, mostram o comportamento das bactérias: *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis*, frente aos constituintes que alcançaram a parte inferior do intestino. Segundo ENDO et al. (2016), o potencial prebiótico de cada oligossacarídeo é diferente, portanto cada ingrediente prebiótico pode ser metabolizado de modo distinto pelos vários micro-organismos que compõem a microbiota intestinal.

5.5.1 Crescimento de probióticos na ‘Formulação 1’

A medida de crescimento dos micro-organismos nas amostras de suco de caju não prebiótico (Formulação 1) foi verificada pela densidade ótica e os resultados expressos em crescimento relativo (ABS/ABS0). A Figura 5 mostra os resultados do crescimento dos probióticos *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis*, relacionando com as medidas de pH, produção de ácido lático, concentração de vitamina C e consumo de açúcares simples no processo fermentativo.

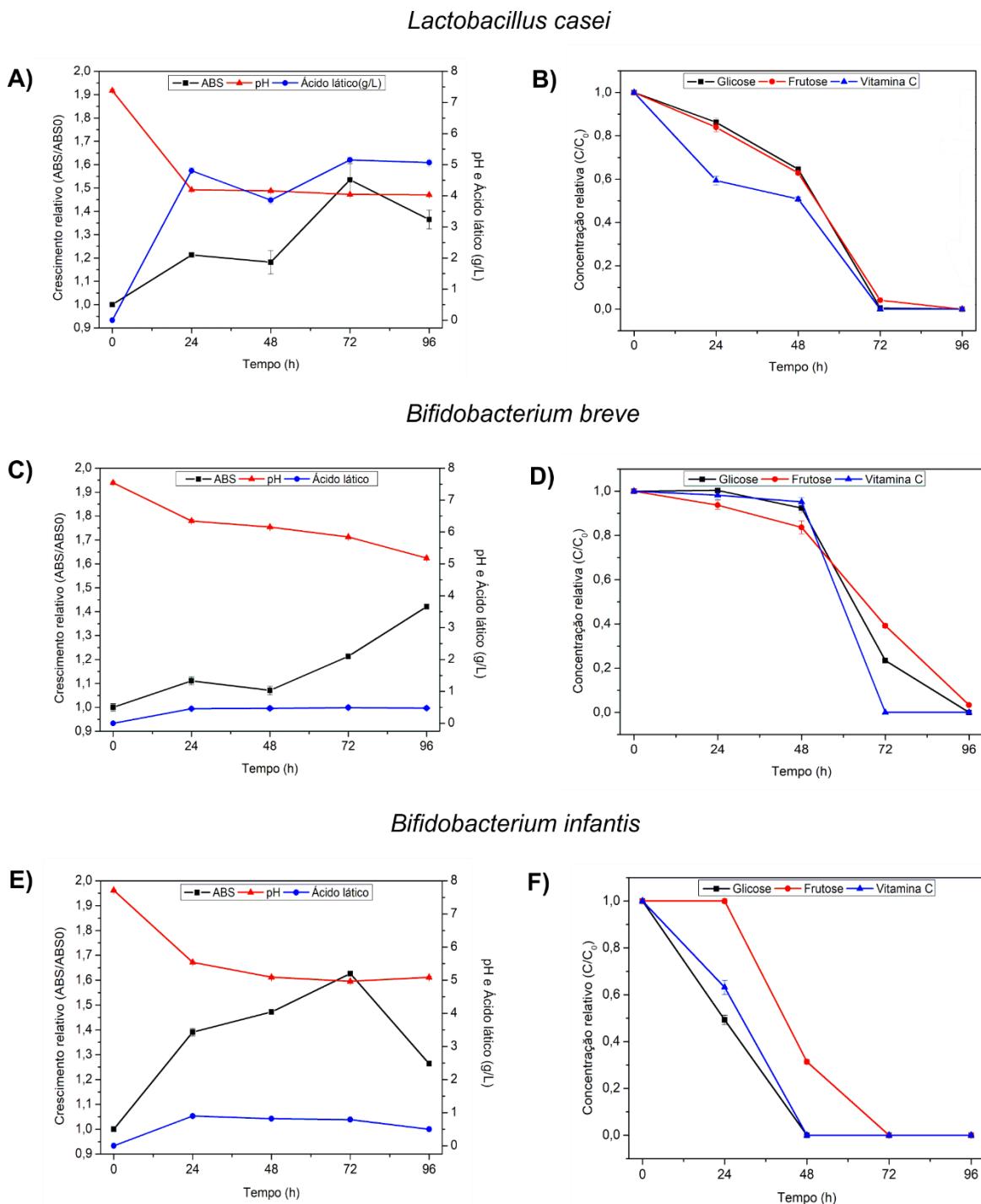
Observando os gráficos da primeira coluna da Figura 5 (A,C e D), é possível notar que o crescimento microbiano modifica as condições do meio pelo decaimento do pH, resultante da produção de ácido lático. A fase lag do *L. casei* apresenta uma curta duração se comparada a *B. breve*. No tempo de 24 h, o *L. casei* apresentou absorbância relativa de 1,21, que corresponde a 20 % do crescimento, enquanto a *B. breve* apresentou aproximadamente 10 % no mesmo tempo. O crescimento da população microbiana de *L. casei* atingiu maiores valores de absorbância relativa (1,54) com 72 h. Após determinado momento, a população entrou na fase de declínio. Isso pode ocorrer devido a escassez de nutrientes ou pelo pH ácido proveniente dos metabólitos secundários do processo fermentativo, como o ácido lático.

O pH é um dos fatores que pode influenciar o crescimento de micro-organismos. Diante disso, a faixa de crescimento adequada para esse gênero se compreende no pH neutro, sendo pH 6,5, o valor ótimo para manutenção da viabilidade e crescimento dos lactobacilos (TERPOU et al., 2019). O ácido lático é o principal produto do processo fermentativo de bactérias ácido-láticas (NOVIK; MEEROVSKAYA; SAVICH, 2017), por isso torna-se importante conhecer a concentração desse composto na parte inferior do sistema digestivo.

Na Figura 5A, é possível observar o decaimento do pH com 24 h de fermentação (pH inicial 7,38 e pH com 24h 4,19), aliado a isso houve uma produção de 4,80 g/L de ácido lático nesse tempo, atingindo uma concentração de 5,15 g/L com 72 h de processo.

Em concordância com os resultados do crescimento, na Figura 5B pode-se observar as concentrações relativas da glicose, frutose e vitamina C ao logo do processo fermentativo. A multiplicação celular pode estar relacionada ao consumo dos açúcares simples e a morte celular pode também ser justificada pela ausência desses nutrientes após algumas horas de incubação.

Figura 5. Crescimento relativo de *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis* em suco de caju não prebiótico (Formulação 1), medidas de pH, produção de ácido láctico (g/L) e concentração relativa (C/C_0) de glicose, frutose, vitamina C durante o processo fermentativo.



Os açúcares simples, glicose e frutose, apresentam comportamento semelhante durante o processo fermentativo do *L. casei*. O consumo desses açúcares está relacionado diretamente com a multiplicação celular, pois à medida que a concentração desses

nutrientes reduz durante a fermentação, ocorre o aumento do crescimento microbiano. Percebe-se que, em 24 h de incubação o *L. casei* utiliza a glicose e a frutose como substrato, consumindo aproximadamente 13 % do conteúdo inicial dessas moléculas. Com 72 h houve um consumo acentuado desses açúcares redutores, onde o conteúdo total de glicose foi consumido e a concentração relativa de frutose foi de 0,04, que corresponde ao consumo de 95,88 % desse carboidrato. Diante disso, com 96 h de fermentação não havia mais açúcares simples disponíveis para o consumo.

Neste estudo foi avaliada a interação da fração bioacessível da vitamina C com o *L. casei*, *B. breve* e *B. infantis*. A composição do ambiente intestinal e os micro-organismos nele presentes exercem funções relevantes na saúde do hospedeiro (CHEN et al., 2019; SABATER et al., 2019). Logo, compreender a interação dos probióticos com a fração bioacessível desse composto é de grande importância tanto para a comunidade científica, quanto para os consumidores.

A Figura 5B, mostra o perfil da vitamina C durante o processo fermentativo. É possível observar que a concentração desse composto foi reduzida durante o tempo de incubação com o *L. casei*. O conteúdo de vitamina C reduziu 40 % durante 24 h de fermentação, e no tempo de 72 h esse composto estava ausente no suco fermentado.

Essa redução pode ser ocasionada por reações de degradação térmica, devido ao tempo de exposição à temperatura de 37 °C. Outra possibilidade é o consumo da vitamina C pelo probiótico, dado que, esse composto bioativo pode ser usado como substrato e melhorar a viabilidade de *Lactobacillus* (OLIVARES et al., 2019). Alguns autores reforçam que, vitaminas são componentes que atuam promovendo o crescimento de micro-organismos probióticos (TERPOU et al., 2019).

Além do crescimento do *Lactobacillus casei*, foram avaliados duas bifidobactérias. Conforme ilustrado na Figura 5C, é possível observar que a *B. breve* apresenta um fase de adaptação maior ao meio, onde o crescimento relativo se intensificou com 72 h de incubação, com um aumento de 21 % da população microbiana inicial. Os valores máximos de crescimento foram alcançados com 96 h de fermentação, mostrando um aumento de 42 %.

Os resultados de crescimento relativo mostraram que a *B. breve* apresentou uma menor multiplicação celular no tempo de incubação estudado, quando comparado ao *L. casei*. Pode-se observar também que a produção de ácido lático pela bifidobactéria é menor durante a fermentação e os valores de pH reduzem, porém não atingem números baixos conseguidos pelo *L. casei*. Entretanto, as bifidobactérias são classificadas como

heterofermentativas e produzem além do ácido lático, outros produtos secundários, como o acetato. Para cada mol de glicose fermentada essas bactérias heterofermentativas produzem 1 mol de ácido lático e 1,5 mols de acetado. Por outro lado, o *L.casei*, um micro-organismo homofermentativo, produz 2 mols de ácido lático a partir de 1 mol de glicose pela via metabólica Embden-Meyerhof-Parnas (NOVIK; MEEROVSKAYA; SAVICH, 2017; POKUSAeva; FITZGERALD; VAN SINDEREN, 2011). Isso justifica os menores valores de concentração de ácido lático durante a incubação de *B. Breve* nos sucos de caju digeridos.

O crescimento dos probióticos reflete na produção de ácido lático e pH, bem como está relacionado com os substratos disponíveis no meio para serem consumidos durante o período de incubação. Na Figura 5D, é possível verificar que durante os tempos de 24 e 48 h, a *B. breve* consumiu pequenas quantidades de glicose (7,64 %) e frutose (16,33%), isso justifica o crescimento reduzido nesses tempos de fermentação. Como dito anteriormente a multiplicação celular desse micro-organismo ocorreu entre 72 e 96 h e isso pode ser explicado pelo aumento do consumo de açúcares simples nesse período, onde a concentração relativa em 72 h correspondia a 0,23 para a glicose e 0,39 para a frutose. No final do processo (96 h), a frutose residual foi 3 % e a glicose foi totalmente consumida.

O crescimento da *B. infantis* também foi avaliado, as medidas de absorbância relativa encontram-se na Figura 5E. Comparando os resultados obtidos no crescimento dessa bactéria com os micro-organismos anteriormente citados, é possível observar que a *B. infantis* apresentou um maior crescimento que a *B. breve* e a fase lag não foi extensa, semelhante ao comportamento do *L. casei*. Os maiores valores de densidade ótica foram obtidos com 72 h de incubação, onde o número de células aumentou 63 %. As medidas de pH indicaram uma redução de valor para 5,54 com 24 h de processo, confirmado que a multiplicação celular ocorria nesse momento. É possível observar uma maior produção de ácido lático no tempo de 24 h (0,9 g/L), após esse período a concentração de ácido lático apresenta uma redução. Esse fato pode ser justificado pela escassez de nutrientes no meio e possivelmente a *B. infantis* utilizou o ácido lático como substrato.

Na Figura 5F, pode-se verificar que houve redução nas quantidades de glicose e vitamina C nas primeiras 24 h de fermentação, com isso acredita-se que o crescimento bacteriano esteja relacionado ao uso desses componentes. No tempo de 48 h, os sucos fermentados não apresentavam glicose e vitamina C em sua composição, porém havia 4,8 g de frutose que foram totalmente consumidas com 72 h de incubação. Portanto, pode-se

assumir que a redução rápida das concentrações dessas moléculas, favoreceu o consumo de ácido lático pelo micro-organismo.

De maneira geral, observa-se que a *B. infantis* assimila melhor os açúcares simples glicose e frutose, ocasionando uma maior multiplicação celular que pode ser notada pelos valores de absorbância obtidos.

5.5.2 Crescimento de probióticos na ‘Formulação 2’

Além do cultivo de micro-organismos no suco de caju não prebiótico, foi avaliado também a fermentação de sucos prebióticos (Formulação 2) por *L. casei*, *B. breve* e *B. infantis*. Os resultados de crescimento celular, pH, açúcares simples, oligossacarídeos prebióticos, dextrana, vitamina C e produção de ácido lático estão dispostos na Figura 6.

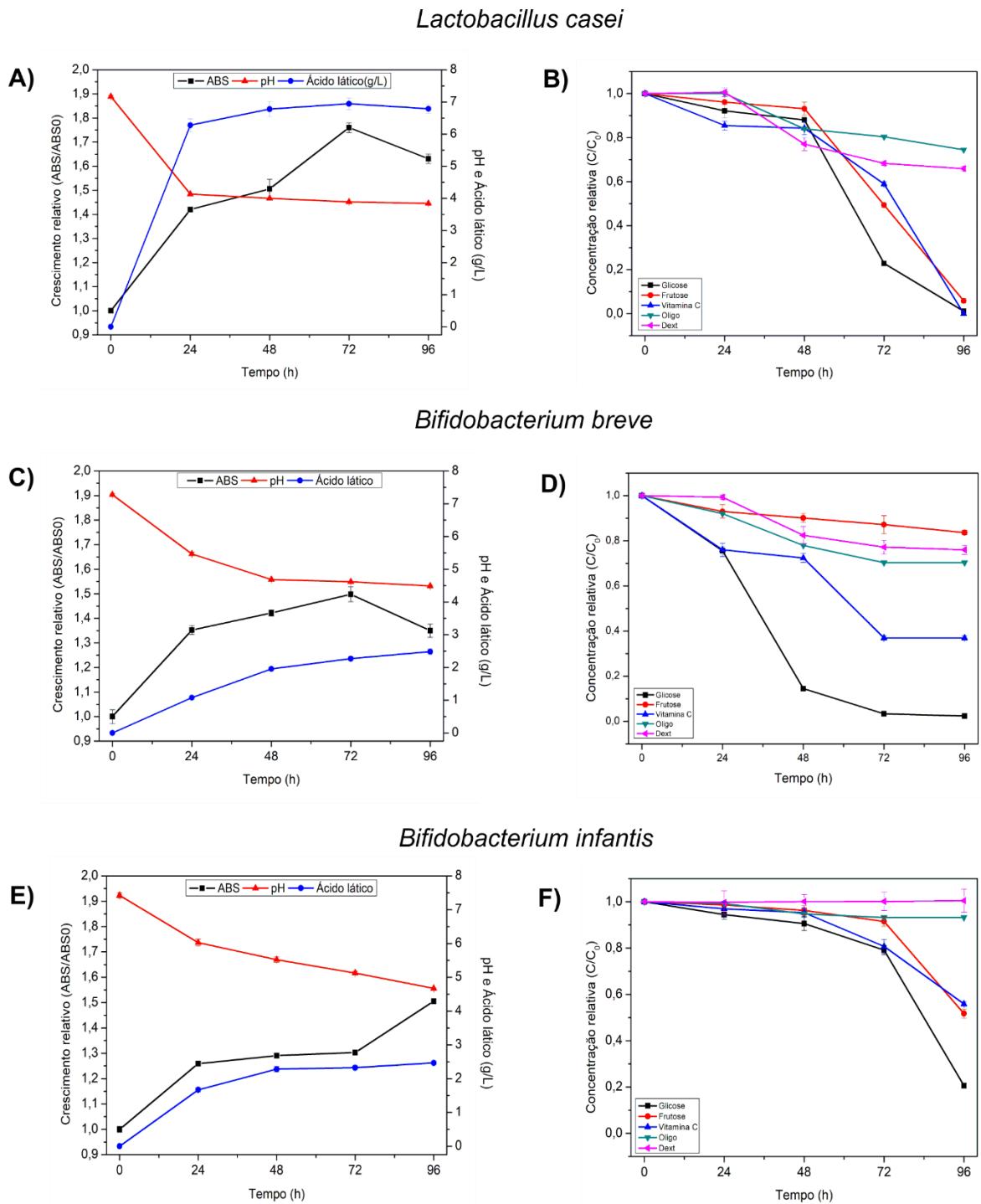
É possível observar um crescimento mais acentuado do *L. casei* e *B. breve* nos sucos que contêm oligossacarídeos prebióticos e dextrana, comparados com o Formulação 1. Esse resultado implica que, os ingredientes funcionais presentes nos sucos atendem a outro critério necessário para serem classificados como prebióticos: estimular o crescimento de micro-organismos probióticos.

Na Figura 6A, pode-se notar que o *L. casei* apresenta um alto crescimento com 24 h de fermentação, alcançando um aumento de 42 % do numero de células iniciais, isso corresponde ao dobro do valor obtido quando o meio a ser fermentado era a Formulação 1. O maior crescimento celular se deu no tempo de 72 h, onde o crescimento relativo foi de 1,76 (76 %).

Os resultados de pH e produção de ácido lático seguem a mesma discussão do item anterior, onde quanto maior o crescimento microbiano, maior a produção de ácido lático e menores os valores de pH do suco digerido. No inicio do processo o pH era 7,17, apresentando um decaimento para 3,84. Com relação à concentração de ácido lático, houve uma produção máxima de 5,15g/L. Vale salientar que, o crescimento microbiano reduziu com 96 h de fermentação, porém o suco digerido ainda apresentava 19,76 % de glico-oligossacarídeos e 13,74 % de dextrana. Dessa forma, pode-se concluir que a elevada acidez do meio tornou as condições adversas ao crescimento do *L.casei*.

Nas primeiras horas de fermentação, podemos observar na Figura 6B que o *L. casei* não consumiu os ingredientes prebióticos, o micro-organismo utilizou apenas os açúcares simples e houve uma redução no conteúdo de vitamina C.

Figura 6. Crescimento relativo de *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis* em suco de caju prebiótico sintetizado sem agitação (Formulação 2), medidas de pH, produção de ácido láctico (g/L) e concentração relativa (C/C_0) de glicose, frutose, glico-oligossacarídeos, dextrana e vitamina C durante o processo fermentativo.



Alguns autores relataram que, espécies do gênero *Lactobacillus* consomem preferencialmente os resíduos de frutose, em seguida começam a utilizar os prebióticos como substrato (ENDO et al., 2016). LI et al. (2019) também verificou o consumo parcial de glico-oligossacarídeos após 24 h de incubação, indicando que os microrganismos usaram esses ingredientes para seu crescimento. Os autores afirmam que inicialmente o crescimento não se deu pelo consumo de oligossacarídeos, visto que nos tempos iniciais não houve redução da concentração desses carboidratos. Diante disso, sugeriram que nas primeiras horas a glicose residual pode ter sido consumida.

Por outro lado, com 48 h de incubação o *L. casei* havia consumido 16 % do conteúdo inicial de glico-oligossacarídeos e 23 % da dextrana encontrada na formulação 2 após digestão. No tempo de 72 h, houve consumo de todos os ingredientes presentes no suco, com destaque para os açúcares simples, havia apenas 23 e 31% do conteúdo de glicose e frutose, respectivamente.

Observando a Figura 6B, é possível notar que o *L. casei* utilizou a dextrana como potencial substrato para seu crescimento, quando comparada ao consumo de oligossacarídeos prebióticos. Ao final do processo, foram consumidos 34,23 % do conteúdo inicial de dextrana, enquanto o *L. casei* utilizou 25,57 % do glico-oligossacarídeos presentes no suco digerido. Esse resultado confirma a capacidade da dextrana ser fermentada por bactérias intestinais humanas (OLANO-MARTIN et al., 2000). A glicose e frutose do meio foram quase totalmente consumidas pelo micro-organismo durante a fermentação.

Com relação a vitamina C, vale ressaltar que ao final do processo esse composto estava ausente na formulação, uma parte do conteúdo de vitamina C pode ter sido degradada, mas acredita-se que esse composto tenha alguma interação com o *L. casei*, utilizando esse ácido como fonte de energia para a reprodução microbiana. Vale ressaltar que, comparando as formulações 1 e 2, a formulação 1 apresentou maiores perdas de vitamina C nas primeiras horas do processo. Isso pode ser explicado pelo efeito protetor que os prebióticos conferem aos compostos presentes na matriz alimentícia (ALVES FILHO et al., 2018).

Na Figura 6C, pode-se verificar que a *B. breve* apresentou maior síntese celular em 72 h de incubação, quando aumentou 50 % o número total de células. Podemos notar que o *L. casei* mostrou um crescimento relativo maior que a *B. breve* nos sucos de caju digerido. Isso pode ser justificado com base nos resultados de concentração relativa dos constituintes ilustrados na Figura 6D. A frutose havia sido consumida 100 % pelo *L. casei*,

mas apenas 16,35 % da frutose foi metabolizada pela *B. breve*. Entretanto, a glicose começou a ser consumida com 24 h de fermentação, onde a concentração residual nesse momento era 76 % do conteúdo inicial. No tempo de 72 h a glicose estava ausente no meio.

Com relação a acidez do meio e a redução do pH, a acidez pode ser justificada pela produção de ácidos orgânicos durante o processo fermentativo, pois ao metabolizar ingredientes prebióticos, as bifidobactérias produzem ácidos graxos de cadeia curta, como: acetato, butirato e propionato (EHARA et al., 2016; MORENO et al., 2017). Dessa forma, a síntese desses produtos metabólicos levam a redução do pH. Os baixos valores de pH induzem a produção de mucina pelos colonócitos, de citocinas imunomoduladoras e promove amônia e excreção de amina (KRUMBECK et al., 2016). Sabendo-se que, as mucinas são glicoproteínas que atuam protegendo as mucosas e potenciais moléculas de adesão para microrganismos.

A *B. breve* apresentou a capacidade de consumir tanto oligossacarídeos prebióticos, quanto a dextrana, contudo, os resultados mostram que os glico-oligossacarídeos são metabolizados preferencialmente pela *B. breve*. Foi possível observar que as bactérias usaram a dextrana como fonte de carbono apenas com 48 h de incubação, consumindo 17,56 % do conteúdo inicial desse carboidrato, por outro lado, em 24 h de incubação havia consumido 8 % dos glico-oligossacarídeos.

A concentração de vitamina C reduziu no decorrer do processo fermentativo, entretanto 37 % do conteúdo total de vitamina C se encontravam no suco digerido e fermentado durante 96 h.

A multiplicação celular de *Bifidobacterium infantis* apresentou um comportamento diferente dos outros micro-organismos estudados, pois o suco de caju não prebiótico promoveu maior crescimento relativo (1,63). Diante dos resultados obtidos, é possível observar que essa espécie assimila melhor os açúcares simples disponíveis no suco, glicose e frutose, do que os demais ingredientes, glico-oligossacarídeos e dextrana.

No entanto, a formulação 2 também estimulou a multiplicação das células de *B. infantis*, com destaque para 96 h de fermentação. Nesse tempo a população bacteriana aumentou em 50 %. De maneira geral, quando comparados ao outros probióticos em estudo, a *B. infantis* apresentou crescimento menor frente a presença de ingredientes prebióticos sintetizados nos sucos, implicando que os oligossacarídeos prebióticos e a dextrana não são considerados os substratos ideais a serem metabolizados por essa espécie de bifidobactéria. Entretanto, são consumidos mesmo em pequena concentração.

Contudo, apesar dos oligossacarídeos não serem consumidos durante todo o processo fermentativo, esses ingredientes podem melhorar o ambiente intestinal e influenciar na manutenção da viabilidade dos microrganismos benéficos. Autores confirmam que, o uso de ingredientes prebióticos como protetores de probióticos tem recebido considerável interesse (TERPOU et al., 2019).

De maneira geral, é possível observar que a dextrana apresenta efeitos prebióticos (KOTHARI; DAS; PATEL, 2014), pois além de serem resistentes às condições adversas do TGI, modulam a microbiota intestinal. Isso se deve possivelmente a estrutura da dextrana, que é caracterizada por uma estrutura linear formada por resíduos de glicose ligados por α -1,6 com ramificações ligadas a α -1,2, α -1,3 ou α -1,4. Portanto, as ligações α -1,2 são representativas das propriedades prebióticas (BOUNAIX et al., 2009). Estudiosos também reportaram que a dextrana favoreceu o crescimento de espécies de bifidobactérias e lactobacilos em modelo de fermentação *in vitro*, confirmando seu efeito como potencial prebiótico (KOTHARI; DAS; PATEL, 2014).

Os resultados obtidos nesse estudo estão em conformidade com o descrito por (LI et al., 2019). Esses autores relataram que glico-oligossacarídeos produzidos por glicosilação apresentaram características prebióticas, pois estimularam o crescimento de microrganismos probióticos do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, dentre eles o *L. casei*. LEE et al. (2019) também relatou o crescimento de *L. casei* e bifidobactérias em meios contendo glico-oligossacarídeos produzidos por *Leuconostoc lactis* CCK940.

Os micro-organismo do gênero *Bifidobacterium* degradam açúcares (hexoses) através de uma via metabólica específica, chamada de “bifid shunt”, onde a enzima frutose-6-fosfocetolase exerce um papel importante e é considerada um marcador taxonômico desse gênero (POKUSAEVA; FITZGERALD; VAN SINDEREN, 2011). Diante disso, é interessante destacar que a *B. breve* e *B. infantis* podem metabolizar uma ampla gama de açúcares formados por α / β -glicose (MILANI et al., 2015), monômeros que compõem a estrutura dos oligossacarídeos e dextrana.

Diante do exposto, foi possível observar que a proliferação microbiana está ligada diretamente a composição do meio onde o micro-organismo foi inoculado e cada probiótico tem preferência por consumir determinado composto. Nesse estudo, o *L. casei* usou preferencialmente dextrana como fonte de energia, a *B. breve* apresentou maior afinidade e consumiu maiores porcentagens de oligossacarídeos prebióticos e a *B. infantis* consumiu pequenas quantidades desses prebióticos, dando preferência ao consumo de açúcares simples, como glicose e frutose.

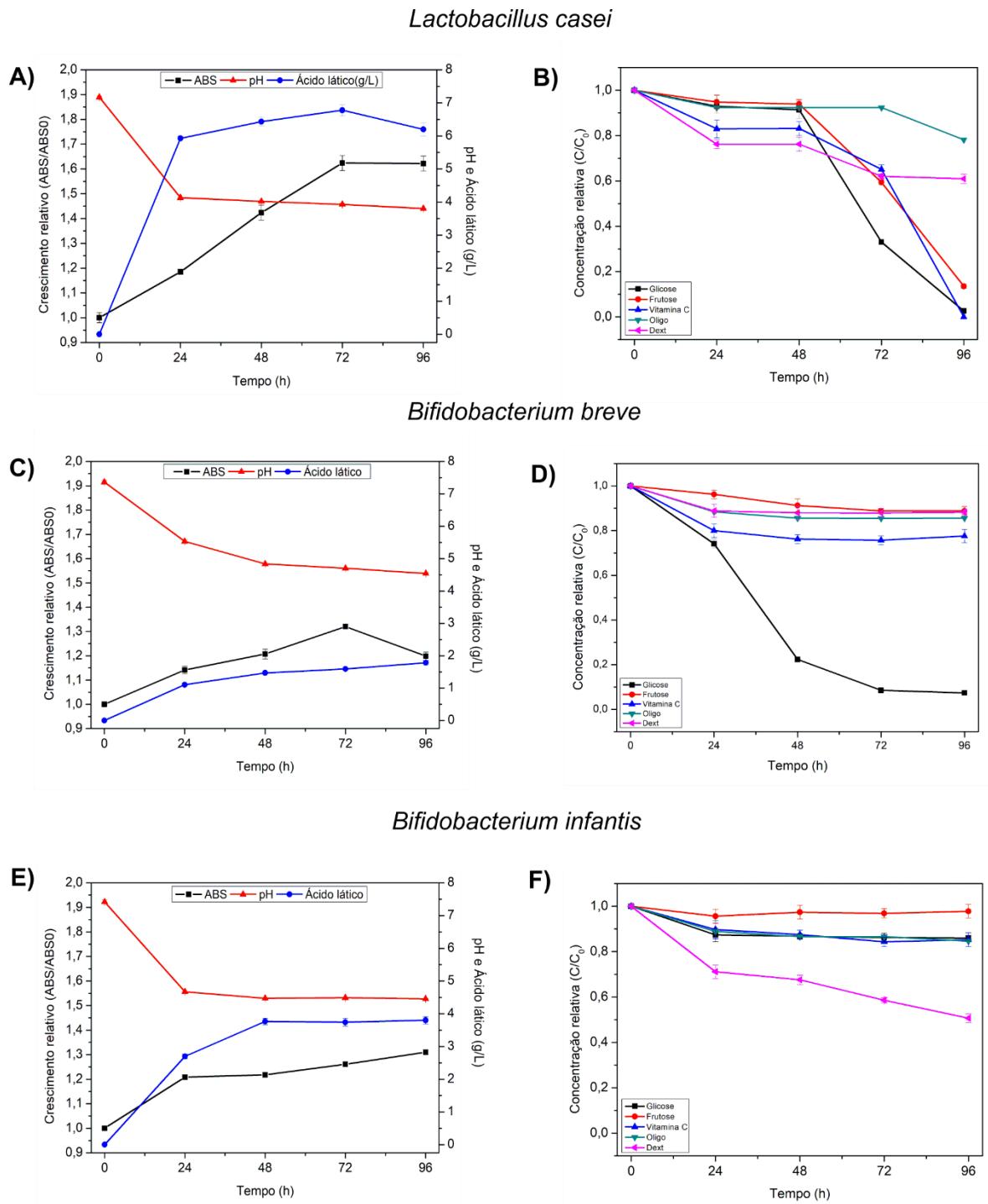
5.5.3 Crescimento de probióticos na ‘Formulação 3’

Os micro-organismos probióticos em estudo foram inoculados em outra amostra, a formulação 3, a fim de simular e conhecer os processos fermentativos que ocorrem no colón. A diferença principal entre a formulação 2 e 3 foi a quantidade de dextrana sintetizada e trata-se também de um suco prebiótico. Os resultados obtidos para o crescimento celular do *L. casei*, *B. breve* e *B. infantis* na Formulação 2, os valores de pH, produção de ácido láctico e concentração de glicose, frutose, glico-oligossacarídeos, dextrana e vitamina C estão disponíveis na Figura 7.

Ao avaliar o crescimento relativo do *L. casei*, pode-se observar que esse micro-organismo apresentou menor multiplicação celular na Formulação 3, em comparação a Formulação anteriormente discutida. Similar aos dados obtidos para o *L. casei*, o crescimento da *B. breve* foi mais acentuado para a Formulação 2. Na Figura 7A, podemos notar que houve um crescimento constante do *L. casei*, o mesmo atingiu o crescimento máximo com 72 h de fermentação e se encontrou na fase estacionaria com 96 h, quando em ambos os tempos apresentou crescimento celular referente a 62 %. Vale ressaltar que, os valores de pH reduzem intensamente logo após as primeiras 24 h de incubação e a produção de ácido láctico é mais intensa nesse momento, onde foram produzidos 6,78 g/L desse ácido.

Na Figura 7B, ao passo que o *L. casei* consome glicose e frutose, essa bactéria utiliza também os prebióticos como substrato. Nas primeiras 24 h houve consumo de todos os constituintes estudados do suco digerido, e a partir de 48 h de fermentação o consumo dos substratos e a redução do conteúdo de vitamina C foram mais intensos que nas primeiras horas do processo, exceto para os oligossacarídeos que tiveram sua concentração reduzida principalmente no tempo de 96 h, quando foram consumidos aproximadamente 22 % do conteúdo inicial. Os resultados inferem que o *L. casei* utiliza maiores quantidades de dextrana para seu metabolismo celular, visto que, no final do processo 39,07 % da dextrana foram consumidas.

Figura 7. Crescimento relativo de *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis* em suco de caju prebiótico sintetizado com agitação (Formulação 3), medidas de pH, produção de ácido láctico (g/L) e concentração relativa (C/C_0) de glicose, frutose, glico-oligossacarídeos, dextrana e vitamina C durante o processo fermentativo.



Os micro-organismos entéricos são capazes de produzir enzimas, como forma de defesa às condições adversas e o ambiente rico em bile. Essas enzimas hidrolisam os sais biliares em ácidos biliares. O metabolismo desses ácidos no intestino é realizado por algumas espécies, dentre elas as do gênero *Lactobacillus* e podem promover efeitos benéficos ao hospedeiro (GIBSON et al., 2017). Estudos conduzidos em camundongos demonstraram que a atividade da hidrolase do sal biliar pode reduzir o ganho de peso dos animais, atua sobre o metabolismo lipídico, ritmo cardíaco periférico, sistema imunológico e função de barreira intestinal (JOYCE; GAHAN, 2016).

Portanto, como os lactobacilos tem efeito no metabolismo dos ácidos biliares, isso confirma sua importância na manutenção do estado de saúde do hospedeiro e o possível efeito dos prebióticos no metabolismo humano. Haja vista que, os prebióticos favorecem o crescimento *L. casei* e consequentemente influenciam na composição do ambiente intestinal por meio da produção de metabólitos.

Analizando os resultados ilustrados na Figura 7C, nota-se que o maior crescimento da *B. breve* se deu em 72 h de fermentação, porém a proliferação bacteriana não foi muito elevada, atingindo um valor máximo de 1,32, que corresponde ao aumento de 32 % das células dessa bifidobactéria. Os resultados da Figura 7D, refletem nos valores obtidos na Figura 7C, o crescimento celular não atinge níveis elevados, porque o consumo de substratos disponíveis não são altos o suficiente. Diferente do *L. casei*, a *B. breve* não assimila o conteúdo total de frutose disponível (cerca de 10 %) no suco digerido e a concentração de vitamina C residual se mantém em 76 %. Com esse resultado de vitamina C residual, pode-se inferir que a redução desse composto na incubação dos outros micro-organismos pode ser explicada pelo consumo desse substrato como fonte de energia. Visto que, essas amostras inoculadas com *B. breve* foram submetidas às mesmas condições de temperatura e tempo e não tiveram o conteúdo de vitamina C totalmente degradado. Alguns autores afirmam que essa vitamina pode ser usada como substrato e melhorar a viabilidade de *Lactobacillus* (OLIVARES et al., 2019).

Figura 7D, podemos concluir que o conteúdo total de glicose foi consumido pela bactéria. A concentração de glico-oligossacarídeos e dextrans ao final do processo são altos, foram consumidos um total de 14,50 g/L de oligossacarídeos e 12,06 g/L de dextrans durante as primeiras horas do processo fermentativo.

O crescimento da *B. infantis* pode ser observado na Figura 7E, nas primeira 24 h as células se multiplicam e aumentam em 20 %. Ao longo da fermentação a bactéria continua a crescer, porém em níveis baixos, atingindo crescimento máximo de 31 % em 96

h de fermentação. Esse resultado reflete na produção de ácido lático, que se torna mais intensa nas primeiras horas de incubação, levando a produção de 3,80 g/L desse metabólito.

Os baixos valores de crescimento da *B. infantis* está relacionado ao baixo consumo dos substratos disponíveis. A Figura 7F mostra o consumo mais acentuado dos componentes presentes na formulação durante as primeiras 24 h de incubação, exceto para a frutose, que não teve seu conteúdo total reduzido ao longo da fermentação. O consumo de glicose e oligossacarídeos prebióticos apresentaram perfis similares, a *B. infantis* consumiu 14,01 e 15,36 % dos componentes, respectivamente. Houve também uma redução de 14,72 % do conteúdo total de vitamina C, ou seja, resultado semelhante ao encontrado nos sucos incubados com *B. breve*, onde a concentração de vitamina C não reduziu em níveis altos.

Observando as formulações contendo prebióticos, é possível observar que a *B. infantis* consumiu uma concentração maior de dextrana da formulação 3, se destacando também dentre os outros componentes encontrados na composição do suco. O micro-organismo consumiu cerca de 50 % do conteúdo inicial de dextrana disponível no suco digerido. Vale ressaltar, que mesmo em concentrações baixas a *B. infantis* consumiu mais oligossacarídeos da formulação 3 em comparação a formulação 2. Os glico-oligossacarídeos e dextrana presentes na Formulação 3 foram sintetizados sob agitação, esse procedimento pode ter conduzido a formação de prebióticos de cadeia curta, que facilitou a assimilação dos componentes pelo micro-organismo.

É importante salientar que, esse consumo de oligossacarídeos durante a fermentação pode se dar devido a presença de proteínas enzimáticas na membrana ou parede celular dessas bactérias acido-láticas. Essas proteínas desempenham 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). Contudo, algumas enzimas metabólicas que atuam na conversão de oligossacarídeos são intracelulares e podem limitar o metabolismo desses carboidratos pelo transporte (GÄNZLE; FOLLADOR, 2012).

O conteúdo gênico do genoma de bifidobactérias pode refletir sua adaptação ao trato gastrintestinal humano. Foi evidenciada a presença de genes que codificam uma variedade de enzimas modificadoras de carboidratos, como glicosilhidrolases, hexosiltransferases, isomerase e fosfotransferases. A sequência do genoma da *B. breve* codificou pelo menos uma cópia de um gene que caracterizam as seguintes enzimas: 4-alfa-glucanotransferase, fructoquinase, galactoquinase, glicose-6-fosfato isomerase, alfa-

glucosidase, beta-glucosidase, alfa-galactosidase, beta-galactosidase, com destaque para a oligo-1,6-glucosidase e as α -glucosidases são as enzimas ativas que possivelmente atuam nos glico-oligossacarídeos. Essas enzimas atuam no metabolismo de carboidratos e podem estar relacionadas com o consumo de oligossacarídeos durante a incubação dos sucos na presença de *B. breve* (POKUSAEVA; FITZGERALD; VAN SINDEREN, 2011).

5.5.4 Crescimento de probióticos na ‘Formulação 4’

A formulação 4 foi elaborada visando atender os critérios para ser classificada como uma bebida prebiótica, bem como para auxiliar na comparação de resultados obtidos com a formulação 5, acrescida de Tagatose. O suco prebiótico foi diluído em suco não prebiótico, com isso a concentração dos compostos com propriedades funcionais se encontram em quantidades reduzidas na formulação. A Figura 8 fornece informações sobre o crescimento dos probióticos em estudo, a produção de ácido lático, acompanhado das medidas de pH e das concentrações relativas dos compostos de interesse da formulação durante o processo fermentativo.

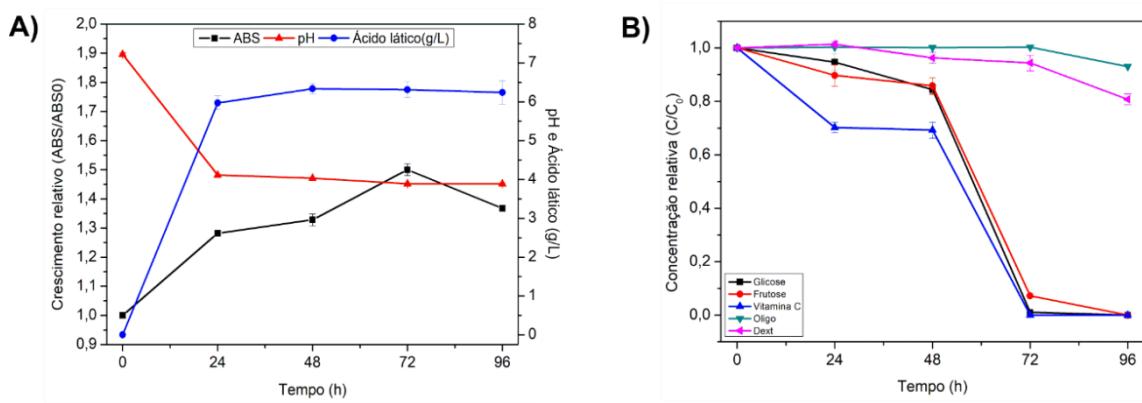
A densidade ótica no suco fermentado aumenta com 24 h de incubação, mostrando que a fase de adaptação do *L. casei* ao meio não foi muito extensa. No primeiro tempo analisado, as células microbianas aumentaram em 28 %, entre 24 e 48 h o crescimento foi menos acentuado, possivelmente devido a um consumo menor de nutrientes nesse tempo. O maior valor de crescimento relativo (1,50) se deu com 72 h de fermentação, o que corresponde a um aumento de 50 % da população bacteriana. No entanto, com 96 h cessou o crescimento celular. O pH do meio apresentava característica ácida, com medida valores de pH igual a 3,89. Essas condições adversas do meio são decorrentes da produção de metabólitos provenientes do crescimento, como o ácido lático, que ao final do processo encontrava-se no suco numa concentração de 6,24 g/L.

No inicio do processo fermentativo o *L. casei* consumiu preferencialmente os açúcares simples, glicose e frutose, conforme indicado na Figura 8B. A partir de 48 h esse micro-organismo reduziu o consumo de frutose e os resultados evidenciaram a preferência desse microrganismo por dextrana, pois a degradação desse carboidrato foi observada com 48h de reação (3,76 %), ou seja, antes do consumo de oligossacarídeos prebióticos que ocorreu com 96 h (6,99 %). O consumo final de dextrana da Formulação 4 foi cerca de 20% ao final do processo fermentativo. Os resultados de concentração relativa estão condizentes com o exposto na Figura 8A, dado que com 72 h de incubação houve maior crescimento

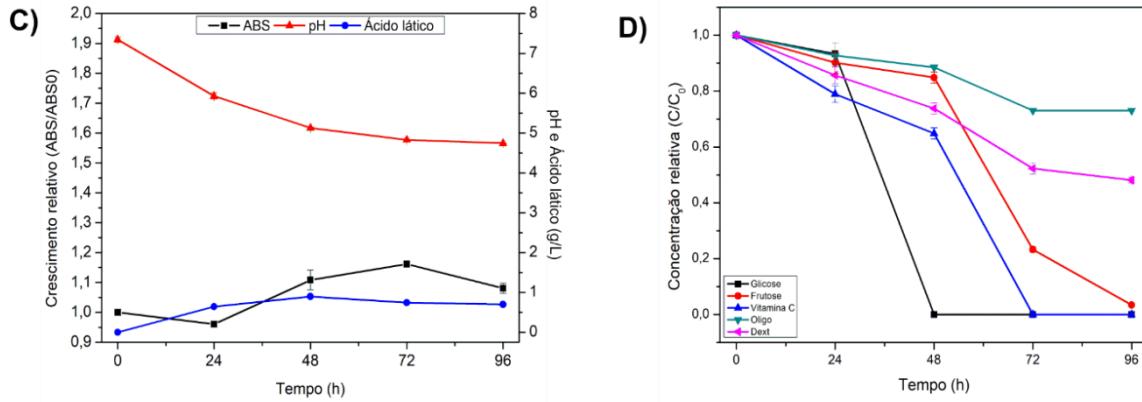
microbiano e aliado a isso observa-se que houve maior consumo dos substratos disponíveis no suco digerido.

Figura 8. Crescimento relativo de *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis* em suco de caju elaborado com 1/3 de suco prebiótico e 2/3 de suco não prebiótico (Formulação 4), medidas de pH, produção de ácido lático (g/L) e concentração relativa (C/C_0) de glicose, frutose, glico-oligossacarídeos, dextrana e vitamina C durante o processo fermentativo.

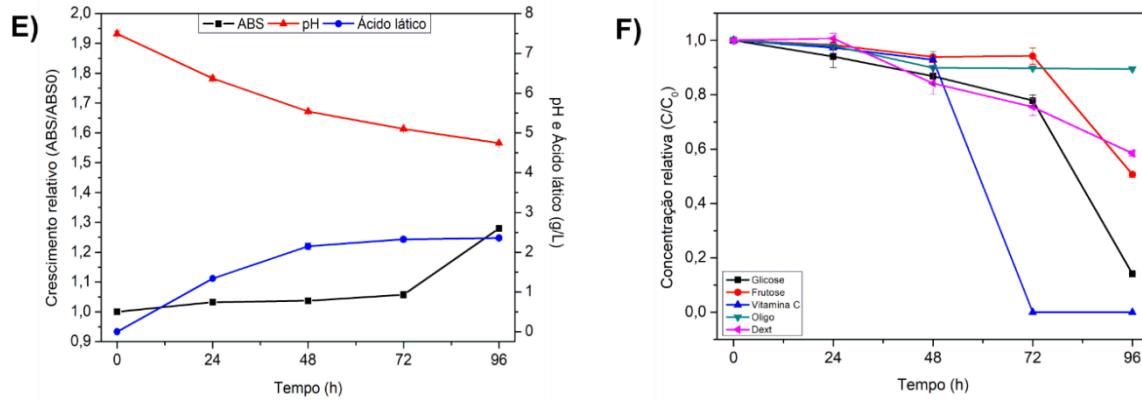
Lactobacillus casei



Bifidobacterium breve



Bifidobacterium infantis



Além disso, o conteúdo de vitamina C reduziu com 24 h de experimento, encontrando-se disponível 69 % do conteúdo inicial e com 72 h esse composto estava ausente na formulação. Alguns autores reforçam que, vitaminas são componentes que atuam promovendo o crescimento de micro-organismos probióticos (TERPOU et al., 2019). Assim, os resultados obtidos nesse estudo sugerem que, existe uma interação positiva entre a microbiota intestinal e a vitamina C bioacessível.

Para avaliar o efeito bifidogênico dos prebióticos presentes no suco, o crescimento da *B. breve* também foi avaliado, os resultados estão ilustrados na Figura 8C. O resultado de crescimento sugere que essa bactéria apresentou uma maior fase lag, onde não houve multiplicação celular, mas houve consumo de ingredientes disponíveis no meio, mesmo em baixas concentrações. Semelhante a maioria dos casos estudados, o crescimento microbiano se destacou com 72 h de fermentação, quando a *B. breve* cresceu 16 %.

De acordo com a Figura 8D, a glicose foi totalmente consumida em 48 h de processo. É possível observar que esse micro-organismo consome todos os ingredientes simultaneamente. Diferente das formulações anteriormente descritas, Na formulação 4, a *B. breve* a concentração relativa dos oligossacarídeos ao longo da fermentação foram maiores que a concentração de dextrana, ou seja, nesse meio a *B. breve* consumiu preferencialmente a dextrana. Esses carboidratos com função prebiótica foram utilizados como substrato até 72 h de fermentação, sendo consumidos 26,99 e 51,92 g/L de oligossacarídeos prebióticos e dextrana, respectivamente. A vitamina C foi totalmente degradada ou consumida em 72 h de incubação, nesse mesmo tempo houve maior consumo de todos os constituintes do suco. Essa redução também pode ser explicada pelo fato da formulação 4 ter sido preparada com 2/3 de suco não prebiótico, dessa forma a quantidade de dextrana e oligossacarídeos no suco era reduzida, podendo afetar o possível efeito protetor oferecido por esses ingredientes e permitindo o uso da vitamina C no metabolismo e atividade da *B. breve*.

Ao avaliar a Figura 8E, de forma geral, pode-se verificar que a *B. infantis* não obteve uma boa adaptação ao meio, pois seu crescimento ocorreu após 72 h de incubação e aumentou 28 % do número inicial de células. Os valores de pH reduziram lentamente ao longo do tempo, bem como a produção de ácido lático foi aumentando gradativamente, até atingir 2,35 g/L no final do processo.

Na Figura 8F, conseguimos verificar que o consumo dos substratos nas primeiras 24 h é reduzido, confirmando a ausência de crescimento microbiano nesse tempo de incubação. A glicose é consumida lentamente ao longo do processo e tem 85 % do seu conteúdo consumido com 96 h de fermentação, contudo a redução mais acentuada se deu a

partir de 72 h. A concentração de frutose reduziu pela metade no final do processo fermentativo. Com relação aos prebióticos, os glico-oligossacarídeos foram consumidos pela *B. infantis* no tempo 48h, onde foram metabolizados 10 % do conteúdo inicial desses ingredientes alimentares. Para a dextrana, os resultados mostraram um maior destaque, pois com 48 e 72 h apresentaram menor concentração relativa dentre os componentes estudados, mostrando um consumo de 15,84 e 24,53 %, respectivamente. Assim, no final do processo 41,56 % da dextrana foram utilizados como substrato pela *B. infantis*. Por outro lado, a concentração de vitamina C na formulação teve uma lenta redução no inicio do processo e com 72 h não havia mais a presença desse composto na formulação.

5.5.5 Crescimento de probióticos na ‘Formulação 5’

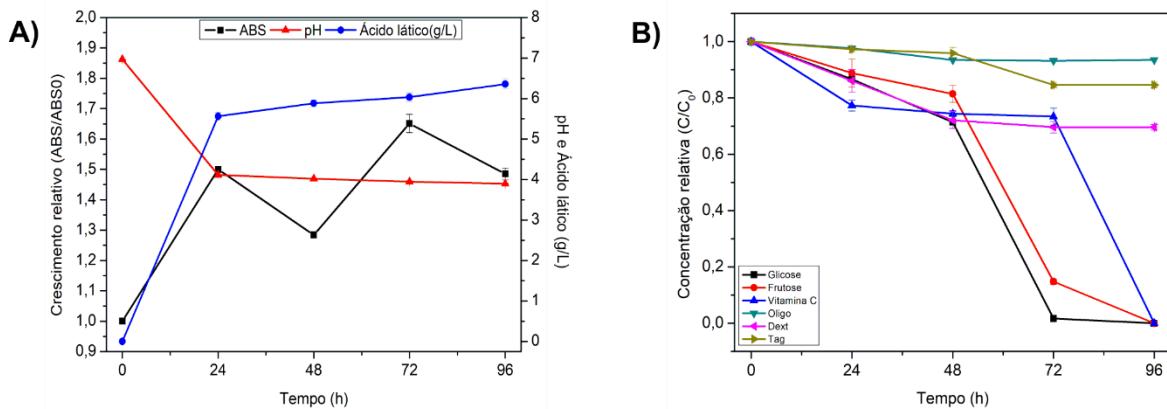
A tagatose é um adoçante, conhecido por suas propriedades prebióticas. A presença desse açúcar raro desempenha um papel importante na microbiota humana. Diante disso, a Tagatose se encontra presente nessa formulação e os resultados de crescimento dos micro-organismos probióticos, produção de ácido láctico, pH e concentração de substratos e da vitamina C estão expostos na Figura 9.

Analizando a Figura 9A, pode-se notar que a tagatose possibilitou um ambiente mais propício ao crescimento do *L. casei*, em comparação aos resultados obtidos com a formulação 4. Os maiores valores de crescimento relativo se deram com 72 h de fermentação (65 %), sendo que, em todos os tempos a formulação 5 favoreceu um crescimento igual ou maior que os sucos elaborados sem a tagatose. É importante salientar que, em 24 h de incubação o *L. casei* apresentou um crescimento acentuado, onde a multiplicação celular foi de 50 %.

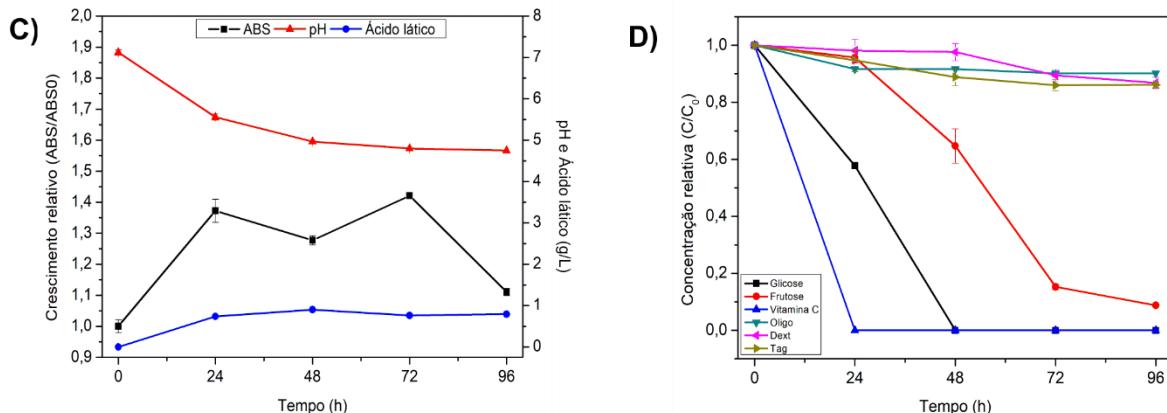
O perfil de crescimento desse micro-organismo na formulação 5 é característico da presença de vários substratos no meio, primeiramente o *L. casei* consumiu um tipo de composto, se multiplicou, em seguida apresentou um crescimento retardado e começou a utilizar outra fonte de energia para seu metabolismo, como por exemplo a Tagatose. Autores relatam que, no intestino grosso, a d-tagatose é catabolizada pelo *Lactobacillus casei*, por meio da via tagatose-6-fosfato, uma via do metabolismo da galactose (ROY et al., 2018).

Figura 9. Crescimento relativo de *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis* em suco de caju elaborado com 1/3 de suco prebiótico e 2/3 de suco não prebiótico (Formulação 4) e adicionado de tagatose (1 % p/v), medidas de pH, produção de ácido láctico (g/L) e concentração relativa (C/C_0) de glicose, frutose, glico-oligossacarídeos, dextrana e vitamina C durante o processo fermentativo.

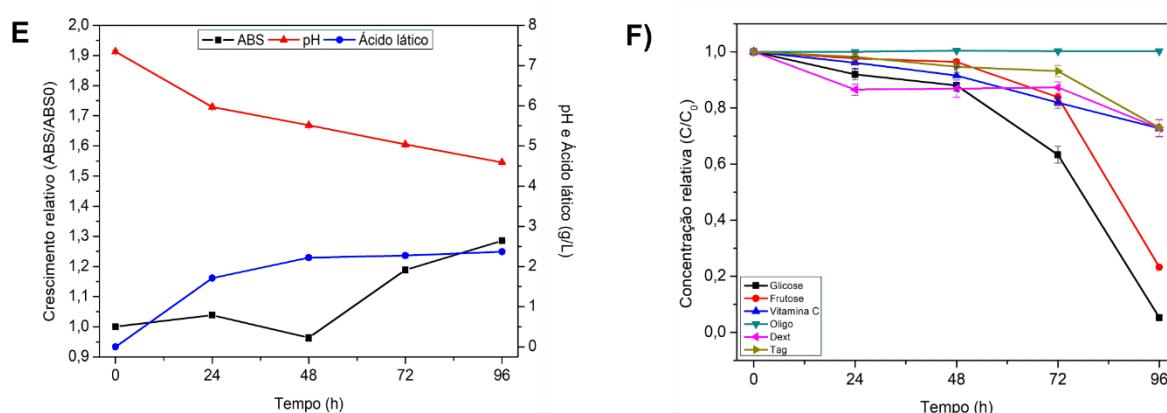
Lactobacillus casei



Bifidobacterium breve



Bifidobacterium infantis



Nas primeiras horas de fermentação, a glicose, frutose e dextrana apresentaram concentrações relativas similares, entre 86 e 89 %. Por outro lado, houve consumo mínimo de glico-oligossacarídeos e tagatose. O consumo relativo da dextrana foi similar ao da

glicose até 48 h de reação, após isso a glicose foi totalmente consumida, enquanto aproximadamente 30% do conteúdo de dextrana foi consumido. Em vista do exposto, é sugerido que essa bactéria apresenta maior afinidade pela dextrana, pois seu consumo recebeu destaque na maioria das amostras.

No tempo de 72h, houve um maior consumo de frutose e o *L. casei* metabolizou quantidades maiores de Tagatose (aproximadamente 15%). É importante enfatizar que, o crescimento da *L. casei* na formulação 5, pode ter sido influenciado pela adição desse adoçante no suco. Isso pode ser confirmado pelo menor consumo de oligossacarídeos prebióticos e dextrana, quando comparada à formulação 4. Além disso, nesse tempo de fermentação o crescimento microbiano foi favorecido pelo consumo da tagatose, tendo em vista que não houve hidrólise dos oligossacarídeos prebióticos nesse período e a quantidade de dextrana consumida entre 48 e 72 h foi mínima, aproximadamente 2,5 % da concentração inicial.

Com relação a vitamina C, esse composto teve seu conteúdo reduzido nas primeiras 24 h (concentração relativa 77%) e depois foi totalmente degradado após 72 h de incubação.

A avaliação do crescimento de *B. breve* na formulação 5 indicou que a adição de tagatose apresenta um efeito pronunciado na proliferação desse probiótico. Foram verificados maiores valores de crescimento em 72 h de processo, alcançando valores de 1,42, enquanto a formulação 4 apresentou valor de 1,16. O perfil de crescimento do *L. casei* e da *B. breve* se assemelha, devido ao crescimento acentuado em 24h, inibição da síntese celular e em 72 h ocorre novamente a proliferação dos micro-organismos. A produção de ácido láctico e os valores de pH seguem a mesma discussão dos itens anteriores.

Para entender o perfil de crescimento da *B. breve* deve-se observar a Figura 9D, onde estão dispostas as concentrações relativas dos ingredientes presentes no suco digerido. É possível observar que o conteúdo de vitamina C foi totalmente consumido ou degradado durante as primeiras 24 h de fermentação e a glicose com 48h. Por outro lado, a frutose começou a ser consideravelmente consumida a partir de 24 h. Com relação aos compostos com propriedades prebióticas, 8,33 % dos oligossacarídeos foram consumidos em 24h, depois somente com 72 h foram consumidos novamente (consumo total de 9,85 %). Entretanto, a dextrana foi metabolizada pela *B. breve* somente a partir de 72 h, quando foi consumido 10,53 % do conteúdo inicial, atingindo um consumo máximo no final do processo de 13,16%. Diante do exposto, é importante ressaltar a importância da Tagatose nas formulações, pois ao comparar as formulações 4 e 5, é notório o consumo de mais

ingredientes no suco sem adição da Tagatose. Dessa forma, a presença de outro carboidrato no meio, como a tagatose, favoreceu maior crescimento microbiano, mesmo com um consumo reduzido dos outros ingredientes pelos probióticos.

O consumo desse adoçante se deu até 72 h de incubação, concluindo o processo com 86 % do conteúdo inicial de tagatose. Esse resultado é consistente com os dados de crescimento relativo e consumo dos outros componentes presentes na amostra, evidenciando a capacidade da *B. breve* metabolizar a tagatose (aproximadamente 14 %), estimulando a multiplicação celular.

Avaliando a Figura 9E, podemos observar que o crescimento da *B. infantis* tem inicio em 72h de fermentação (19 %), continuando o crescimento no tempo de 96h (28 %), quando o consumo de tagatose foi intenso. Em contrapartida o crescimento da formulação 4 teve inicio após 72 h. As 2 formulações apresentavam a mesma composição, exceto pela adição de tagatose na última. Contudo, esse crescimento antecipado pode ter ocorrido devido ao consumo de tagatose pelo micro-organismo e favorecimento da multiplicação celular.

Com base nos resultados de concentração relativa dispostos na Figura 9F, podemos observar que a *B. infantis* não utilizou os oligossacarídeos como substrato para sua reprodução. O consumo de açúcares simples se deu principalmente com 72 e 96 h de fermentação. A dextrana foi consumida nas primeiras 24 h, aproximadamente 13% do conteúdo inicial, em seguida foi utilizada pelo micro-organismo apenas em 72 h de incubação, apresentando um consumo máximo de 27,26 %.

É possível observar que a *B. infantis* se destacou frente aos outros micro-organismos em relação à utilização da tagatose como substrato, esse açúcar foi consumido lentamente durante o processo e no final do processo apresentou uma redução de 27,05 % do conteúdo inicial, inferindo que este açúcar raro é um bom ingrediente prebiótico para essa bactéria.

LIANG et al. (2019) relataram que o consumo da tagatose permite restaurar a diversidade da microbiota intestinal e melhora a composição da microbiota. afirmam também que esse adoçante pode ser utilizado pela microflora intestinal para aumentar a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), reduzindo o pH intestinal e tornando o ambiente intestinal mais harmonioso.

A tagatose, como ingrediente prebióticos, promove a sobrevivência de probióticos do grupo *Lactobacillus casei* (RAD et al., 2018). Estudiosos afirmam o efeito benéficos oferecidos pela ingestão desse adoçante, além disso, descrevem a habilidade da

tagatose afetar positivamente a microbiota intestinal dos consumidores (GUERRERO-WYSS; DURÁN AGÜERO; ANGARITA DÁVILA, 2018). Assim, os resultados evidenciaram o potencial desse açúcar raro de ocasionar mudanças benéficas no crescimento dos probióticos em estudo.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo confirmou as propriedades prebióticas dos sucos contendo glico-oligossacarídeos, dextrana e tagatose. Esses ingredientes se mostraram resistentes às condições do TGI e atingiram a parte final do processo digestivo, onde cada micro-organismo em estudo apresentou um perfil de crescimento diferente, frente aos substratos com propriedades prebióticas estudados.

Foi demonstrado que todos os probióticos avaliados consumiram a tagatose, com destaque para a *Bifidobacterium infantis*. Tanto o *Lactobacillus casei* quanto a *Bifidobacterium breve*, consumiram concentrações satisfatórias de oligossacarídeos prebióticos e dextrana. No entanto, o *L. casei* mostrou uma preferência pela dextrana e a *B. breve* apresentou maior afinidade pelos glico-oligossacarídeos. É importante ressaltar que os dados obtidos nesse estudo, permitem concluir que a Formulação 2 estimulou maior crescimento dos probióticos, exceto para a *B. infantis*.

Os sucos prebióticos melhoraram a bioacessibilidade da vitamina C, devido ao efeito protetor observado dos ingredientes prebióticos sobre esse composto bioativo. É válido ressaltar a interação positiva da vitamina C com a microbiota intestinal, esse estudo sugere que essa vitamina pode se apresentar como substrato favorecendo o crescimento das bactérias probióticas estudadas.

Por fim, os sucos de caju prebióticos sintetizados nesse trabalho apresentaram-se como potenciais alimentos funcionais, visto que a variedade e as concentrações dos componentes prebióticos presentes nos sucos estimularam o crescimento dos micro-organismos intestinais avaliados.

REFERÊNCIAS

- AGUDELO, C. D. et al. Bioaccessibility during in Vitro Digestion and Antiproliferative Effect of Bioactive Compounds from Andean Berry (*Vaccinium meridionale* Swartz) Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 28, p. 7358–7366, 2018.
- 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.
- 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.
- ALQURASHI, R. M. et al. In vitro approaches to assess the effects of açai (*Euterpe oleracea*) digestion on polyphenol availability and the subsequent impact on the faecal microbiota. **Food Chemistry**, v. 234, p. 190–198, 2017.
- ALVES FILHO, E. G. et al. Chemometric evaluation of the volatile profile of probiotic melon and probiotic cashew juice. **Food Research International**, v. 99, p. 461–468, 2017.
- ALVES FILHO, E. G. et al. Evaluation of thermal and non-thermal processing effect on non-prebiotic and prebiotic acerola juices using ^1H q NMR and GC – MS coupled to chemometrics. **Food Chemistry**, v. 265, p. 23–31, 2018.
- AMAN, A.; SIDDIQUI, N. N.; QADER, S. A. U. Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 910–915, 2012.
- AMIGO-BENAVENT, M. et al. Stability and bioactivity of a Bowman-Birk inhibitor in orange juice during processing and storage. **Food and Function**, v. 4, p. 1051–1060, 2013.
- ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Functional foods development in the European market: A consumer perspective. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 3, p. 223–228, 2011.
- ANVISA. **Alegações de propriedade funcional aprovadas**. v. 3, p. 1–9, 2014.
- ARAÚJO, A. D. A. et al. Production and spouted bed drying of acerola juice containing oligosaccharides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 565–571, 2015.
- ARBOLEYA, S. et al. Gut bifidobacteria populations in human health and aging. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–9, 2016.
- BALTHAZAR, C. F. et al. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, p. 247–262, 2017a.
- BALTHAZAR, C. F. et al. Assessing the effects of different prebiotic dietary oligosaccharides in sheep milk ice cream. **Food Research International**, v. 91, p. 38–46,

2017b.

BARUAH, R.; DEKA, B.; GOYAL, A. Purification and characterization of dextranase 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.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Impact of inulin and okara on Lactobacillus acidophilus La-5 and Bifidobacterium animalis Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 382–389, 2013.

BERTELSEN, H.; JENSEN, B. B.; BUEMANN, B. D-Tagatose - A Novel Low-Calorie Bulk Sweetener with Prebiotic Properties. **Low-Calories Sweeteners: Present and Future**, v. 85, p. 98–109, 1999.

BIAN, X. et al. Gut microbiome response to sucralose and its potential role in inducing liver inflammation in mice. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–13, 2017.

BOUHNICK, Y. et al. Increases Fecal Bifidobacteria in Healthy Humans 1. **Pain**, n. February 1998, p. 113–116, 1999.

BOUNAIX, M. S. et al. Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 22, p. 10889–10897, 2009.

BRASIL. Instrução normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000. **Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de caju com alto teor de polpa**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2000.

BUNIOWSKA, M. et al. Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with Stevia rebaudiana. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1834–1842, 2017.

CANANI, R. B. et al. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 12, p. 1519–1528, 2011.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 155–171, 2014.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Effect of Stevia rebaudiana addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. **Food Chemistry**, v. 184, p. 122–130, 2015.

CHEN, M. X. et al. Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 118, p. S10–S22, 2019.

CORONA-HERNANDEZ, R. I. et al. Structural stability and viability of

microencapsulated probiotic bacteria: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 6, p. 614–628, 2013.

COSTA, M. G. M. et al. Synbiotic Amazonian palm berry (*açai*, *Euterpe oleracea* Mart.) ice cream improved *Lactobacillus rhamnosus* GG survival to simulated gastrointestinal stress. **Food and Function**, v. 8, n. 2, p. 731–740, 2017.

COSTABILE, A. et al. Effects of orange juice formulation on prebiotic functionality using an in vitro colonic model system. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2015.

DA SILVA, B. V.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 50, p. 144–158, 2016.

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.

DE CARVALHO, K. G. et al. Evaluation of the role of environmental factors in the human gastrointestinal tract on the behaviour of probiotic cultures of *Lactobacillus casei* Shirota and *Lactobacillus casei* LC01 by the use of a semi-dynamic in vitro model. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 439–445, 2009.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EHARA, T. et al. Combinational effects of prebiotic oligosaccharides on bifidobacterial growth and host gene expression in a simplified mixed culture model and neonatal mice. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 2, p. 270–278, 2016.

ENDO, A. et al. Variations in prebiotic oligosaccharide fermentation by intestinal lactic acid bacteria. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 2, p. 125–132, 2016.

FAZILAH, N. F. et al. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 387–399, 2018.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, n. 11, p. 751–760, 2009.

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.

FONTELES, T. V. et al. Optimization of the Fermentation of Cantaloupe Juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. **Food Bioprocess Technology**, 2011.

- FONTELES, T. V. et al. Ultrasound processing to enhance drying of cashew apple bagasse puree: Influence on antioxidant properties and in vitro bioaccessibility of bioactive compounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 237–249, 2016.
- FONTELES, T. V. et al. Sonication Effect on Bioactive Compounds of Cashew Apple Bagasse. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 10, p. 1854–1864, 2017.
- 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. et al. Development of low caloric prebiotic fruit juices by dextranase acceptor reaction. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 11, p. 7272–7280, 2015.
- FUJIMARU, T.; PARK, J. H.; LIM, J. Sensory Characteristics and Relative Sweetness of Tagatose and Other Sweeteners. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 9, 2012.
- GALANAKIS, C. M. **Nutraceutical and Functional Food Components: Effects of Innovative Processing Techniques**. London, United Kingdom: Elsevier Inc., 2017.
- GÄNZLE, M. G.; FOLLADOR, R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. SEP, p. 1–15, 2012.
- 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.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401–1412, 1995.
- GOMES, W. F. et al. Effect of ultrasound followed by high pressure processing on prebiotic cranberry juice. **Food Chemistry**, v. 218, p. 261–268, 2017.
- GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C. Effects of diffusion on the kinetics of maltose hydrolysis using glucoamylase immobilized on macroporous silica. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 4, p. 341–346, dez. 1997.
- GRANATO, D.; NUNES, D. S.; BARBA, F. J. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. **Trends in Food Science and Technology**, v. 62, p. 13–22, 2017.
- GUERRA, A. et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591–600, 2012.
- GUERRERO-WYSS, M.; DURÁN AGÜERO, S.; ANGARITA DÁVILA, L. D-Tagatose Is a Promising Sweetener to Control Glycaemia: A New Functional Food. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–7, 2018.

GUTTERIDGE, A.; THORNTON, J. Conformational change in substrate binding, catalysis and product release: An open and shut case? **FEBS Letters**, v. 567, n. 1, p. 67–73, 2004.

HEINCKE, K. et al. Kinetics of the dextranase acceptor reaction with maltose - Experimental results and modeling. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 523–534, 1999.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, O. et al. In vitro fermentation by human gut bacteria of proteolytically digested caseinomacropeptide nonenzymatically glycosylated with prebiotic carbohydrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 22, p. 11949–11955, 2011.

HODONICZKY, J.; MORRIS, C. A.; RAE, A. L. Oral and intestinal digestion of oligosaccharides as potential sweeteners: A systematic evaluation. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1951–1958, 2012.

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.

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

IQBAL, S. et al. Enzymatic and acidic degradation of high molecular weight dextran into low molecular weight and its characterizations using novel Diffusion-ordered NMR spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 744–750, 2017.

JAIME-FONSECA, M. R. et al. Digestion of starch in a dynamic small intestinal model. **European Journal of Nutrition**, v. 55, n. 8, p. 2377–2388, 2016.

JAYAMUTHUNAGAI, J. et al. D-Tagatose production by permeabilized and immobilized *Lactobacillus plantarum* using whey permeate. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 250–255, 2017a.

JAYAMUTHUNAGAI, J. et al. Biocatalytic production of D-tagatose: A potential rare sugar with versatile applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 16, p. 3430–3437, 2017b.

JOHANSSON, S. et al. Oligosaccharide Synthesis in Fruit Juice Concentrates Using a Glucansucrase from *Lactobacillus reuteri* 180. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 201–209, 2016.

JOHNSON, C. R. et al. Lentil (*Lens culinaris* L.): A prebiotic-rich whole food legume. **Food Research International**, v. 51, p. 107–113, 2013.

JOYCE, S. A.; GAHAN, C. G. M. Bile Acid Modifications at the Microbe-Host Interface: Potential for Nutraceutical and Pharmaceutical Interventions in Host Health. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, n. 1, p. 313–333, 2016.

- KALLIO, J. et al. Vitamin C inhibits staphylococcus aureus growth and enhances the inhibitory effect of quercetin on growth of escherichia coli in vitro. **Planta Medica**, v. 78, n. 17, p. 1824–1830, 2012.
- KAUR, N.; SINGH, D. P. Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. **Appetite**, v. 112, p. 167–187, 2017.
- KIM, P. Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: A review and future perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 3, p. 243–249, 2004.
- KOH, J. H. et al. Synbiotic impact of tagatose on viability of Lactobacillus rhamnosus strain GG mediated by the phosphotransferase system (PTS). **Food Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 7–13, 2013.
- KONG, F.; SINGH, R. P. A Human Gastric Simulator (HGS) to Study Food Digestion in Human Stomach. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, 2010.
- KOTHARI, D.; DAS, D.; PATEL, S. Dextran and Food Application. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J.-M. (Eds.). **Polysaccharides**. [s.l.] Springer, 2014. p. 1–16.
- 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.
- KRUMBECK, J. A. et al. Prebiotics and synbiotics: Dietary strategies for improving gut health. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 32, n. 2, p. 110–119, 2016.
- LAMSAL, B. P. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 10, p. 2020–2028, 2012.
- LEE, S. et al. Structural Analysis of Gluco-Oligosaccharides Produced by Leuconostoc lactis and Their Prebiotic Effect. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 21, p. 1–11, 2019.
- LEEMHUIS, H. et al. Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 250–272, 2013.
- LEVIN, G. V. Tagatose, the New GRAS Sweetener and Health Product. **Journal of Medicinal Food**, v. 5, n. 1, p. 23–36, 2002.
- LI, N. et al. High-yield synthesis of glucooligosaccharides (GLOS) as potential prebiotics from glucose: Via non-enzymatic glycosylation. **Green Chemistry**, v. 21, n. 10, p. 2686–2698, 2019.
- LIANG, Y. X. et al. The Constipation-Relieving Property of d-Tagatose by Modulating the Composition of Gut Microbiota. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 22, 2019.

LIN, C.-S. et al. Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease. **Biomedical Journal**, v. 37, n. 5, p. 259–268, 2014.

LO CURTO, A. et al. Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion. **Food Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1359–1366, 2011.

MAAWIA, K. et al. Production of impure prebiotic galacto-oligosaccharides and their effect on calcium, magnesium, iron and zinc absorption in Sprague-Dawley rats. **PharmaNutrition**, v. 4, p. 154–160, 2016.

MANDALARI, G. et al. In vitro evaluation of the prebiotic properties of almond skins (*Amygdalus communis L.*). **FEMS Microbiology Letters**, v. 304, n. 2, p. 116–122, 2010.

MANZINI, M. et al. Reduction of beauvericin and enniatins bioaccessibility by prebiotic compounds, evaluated in static and dynamic simulated gastrointestinal digestion. **Food Control**, v. 47, p. 203–211, 2015.

MARTINEZ, R. C. R. et al. International Journal of Food Microbiology In vitro evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides , milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp . *lactis* Bb-12. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 152–158, 2011.

MEN, Y. et al. Enzymatic conversion of d -galactose to d -tagatose : Cloning , overexpression and characterization of l -arabinose isomerase from *Pediococcus pentosaceus* PC-5. **Microbiological Research**, v. 169, n. 2–3, p. 171–178, 2014.

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

MENDOZA, M. R.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Chemical indicators of heat treatment in fortified and special milks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2995–2999, 2005.

MILANI, C. et al. Bifidobacteria exhibit social behavior through carbohydrate resource sharing in the gut. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–14, 2015.

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.

MITSUOKA, T. Development of Functional Foods. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 33, n. 3, p. 117–128, 2014.

MORENO, F. J. et al. Current state and latest advances in the concept, production and functionality of prebiotic oligosaccharides. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 50–55, 2017.

MOUMITA, S. et al. Effect of long-term storage on viability and acceptability of lyophilized and spray-dried synbiotic microcapsules in dry functional food formulations.

LWT - Food Science and Technology, v. 96, p. 127–132, 2018.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 587–597, 2007.

NOVIK, G.; MEEROVSKAYA, O.; SAVICH, V. Waste Degradation and Utilization by Lactic Acid Bacteria: Use of Lactic Acid Bacteria in Production of Food Additives, Bioenergy and Biogas. In: **Intechopen**. [s.l: s.n.]. v. 5p. 105–145.

OH, D.-K. Tagatose : properties , applications , and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 1–8, 2007.

OLANO-MARTIN, E. et al. In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. **British Journal of Nutrition**, v. 83, n. 3, p. 247–255, 2000.

OLIVARES, A. et al. Survival of microencapsulated Lactobacillus casei (prepared by vibration technology) in fruit juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2019.

OZDAL, T. et al. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 1–36, 2016.

PADILHA, M. et al. A prebiotic mixture improved: Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium animalis gastrointestinal in vitro resistance in petit-suisse. **Food and Function**, v. 7, n. 5, p. 2312–2319, 2016.

PAINEAU, D. et al. Effects of Short-Chain Fructooligosaccharides on Faecal Bifidobacteria and Specific Immune Response in Formula-Fed Term Infants: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 60, p. 167–175, 2014.

PALAFON-CARLOS, H.; AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 6–15, 2011.

PATEL, S.; GOYAL, A. Functional oligosaccharides: Production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1119–1128, 2011.

PEREIRA, A. L. F. et al. Storage Stability and Acceptance of Probiotic Beverage from Cashew Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 11, p. 3155–3165, 2013.

PEREIRA, A. L. F. et al. Spray-Drying of Probiotic Cashew Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 9, p. 2492–2499, 2014.

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

QUEIROZ, C. et al. Changes in bioactive compounds and antioxidant capacity of fresh-cut

- cashew apple. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1459–1462, 2011.
- RABELO, M. C.; FONTES, C. M. L.; RODRIGUES, S. Stability Study of Crude Dextranase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-742. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 164–170, 2011.
- RABELO, M. C.; FONTES, C. P. M. L.; RODRIGUES, S. Bioresource Technology Enzyme synthesis of oligosaccharides using cashew apple juice as substrate. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5574–5580, 2009.
- RAD, A. H. et al. Development of Synbiotic Milk Chocolate Enriched with *Lactobacillus*. **Applied Food Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 59–68, 2018.
- RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 42–46, 2015.
- RIVAS-JIMENEZ, L. et al. Evaluation of acrylamide-removing properties of two *Lactobacillus* strains under simulated gastrointestinal conditions using a dynamic system. **Microbiological Research**, v. 190, p. 19–26, 2016.
- RODRIGUES, S. **Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como acceptor**. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C , phenolic compounds , and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 33–43, 2015.
- 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.
- ROUHI, M. et al. Combined effects of replacement of sucrose with d-tagatose and addition of different probiotic strains on quality characteristics of chocolate milk. **Dairy Science and Technology**, v. 95, n. 2, p. 115–133, 2014.
- ROY, S. et al. Tagatose as a Potential Nutraceutical: Production, Properties, Biological Roles, and Applications. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 11, p. 2699–2709, 2018.
- RUBIO-ARRAEZ, S. et al. Influence of Healthy Sweeteners (Tagatose and Oligofructose) on the Physicochemical Characteristics of Orange Marmalade. **Journal of Texture Studies**, v. 46, n. 4, p. 272–280, 2015.
- RUBIO-ARRAEZ, S. et al. Physicochemical characteristics of citrus jelly with non cariogenic and functional sweeteners. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 10, p. 3642–3650, 2016.
- RUBIO-ARRAEZ, S. et al. Development of Lemon Marmalade Formulated with New Sweeteners (Isomaltulose and Tagatose): Effect on Antioxidant, Rheological and Optical

- Properties. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 2, 2017.
- SAAD, N. et al. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1–16, 2013.
- 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.
- SALINAS, M. V. et al. Wheat bread enriched with organic calcium salts and inulin. A bread quality study. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 491–500, 2016.
- SANTOS, R. O. et al. Prebiotic flours in dairy food processing: Technological and sensory implications. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, p. 1–10, 2018.
- SCHWEIGERT, R. M. et al. Carotenoids, carotenoid esters, and anthocyanins of yellow-, orange-, and red-peeled cashew apples (*Anacardium occidentale L.*). **Food Chemistry**, v. 200, p. 274–282, 2016.
- SCOTT, K. P. et al. Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, *in vitro*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 87, p. 30–40, 2014.
- SHOURIDEH, M. et al. Effects of D-Tagatose and Inulin as Sugar Substitutes on the Chemical , Rheological and Sensory Properties of Prebiotic Dark Chocolate. **International journal of bioscience, biochemistry and bioinformatics**, v. 39, n. 5, p. 249–254, 2012.
- SILK, D. B. A. et al. Clinical trial: The effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 5, p. 508–518, 2009.
- SINGH, S. P. et al. Prebiotic Oligosaccharides: Special Focus on Fructooligosaccharides, Its Biosynthesis and Bioactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 2, p. 613–635, 2017.
- SUBIN, S. R. et al. Structural features underlying prebiotic activity of conventional and potential prebiotic oligosaccharides in food and health. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1–19, 2017.
- TAKO, E. et al. The effect of wheat prebiotics on the gut bacterial population and iron sta....: “Start Your Research”. **Nutrition Journal**, v. 13, n. 1, p. 58, 2014.
- TALASILA, U.; SHAIK, K. B. Quality, spoilage and preservation of cashew apple juice: A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 54–62, 2015.
- TANRISEVEN, A.; DOĞAN, Ş. Production of isomalto-oligosaccharides using dextranase immobilized in alginate fibres. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1111–1115, 2002.
- TAYLOR, T. P.; FASINA, O.; BELL, L. N. Physical Properties and Consumer Liking of Cookies Prepared by Replacing Sucrose with Tagatose. **Journal of Food Science**, v. 73, n.

3, p. 145–151, 2008.

TERPOU, A. et al. Probiotics in Food Systems : Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. **Nutrients**, v. 11, p. 32, 2019.

TINGIRIK, 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, n. 4, p. 1265–1281, 2017.

VANDAMME, E. J.; SOETAERT, W. Biotechnical modification of carbohydrates. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2–3, p. 163–186, 1995.

VANDEPUTTE, D. et al. Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota. **Gut**, v. 66, n. 11, p. 1968–1974, 2017.

VEGA, R.; ZUNIGA-HANSEN, M. E. The effect of processing conditions on the stability of fructooligosaccharides in acidic food products. **Food Chemistry**, v. 173, p. 784–789, 2015.

VENEMA, K.; VERMUNT, S. H. F.; BRINK, E. J. D-Tagatose increases butyrate production by the colonic microbiota in healthy men and women. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 47–57, 2005.

VERGARA, C. M. DE A. C. et al. Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 141–145, 1 jan. 2010.

VIEIRA, A. T.; TEIXEIRA, M. M.; MARTINS, F. S. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 445, 2013.

WANG, X. et al. Gastric digestion of milk protein ingredients: Study using an in vitro dynamic model. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 8, p. 6842–6852, 2018.

WANG, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p. 8–12, 2009.

WICKHAM, M.; FAULKS, R.; MILLS, C. In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. 8, p. 952–958, 2009.

WORLD HEALTH ORGANISATION. **Sugars intake for adults and children**. p. 49, 2015.

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, 2019.

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, p. 1–11, 2017.