

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

ANDRESSA CAVALCANTE DO NASCIMENTO

**IMPACTOS DE DIFERENTES PARTES DA BETERRABA (*Beta vulgaris* L.) SOBRE
A MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS COM HIPERTENSÃO
ARTERIAL**

JOÃO PESSOA

2025

ANDRESSA CAVALCANTE DO NASCIMENTO

**IMPACTOS DE DIFERENTES PARTES DA BETERRABA (*Beta vulgaris* L.) SOBRE
A MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS COM HIPERTENSÃO
ARTERIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de mestra em Ciências da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque

JOÃO PESSOA

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N244i Nascimento, Andressa Cavalcante do.

Impactos de diferentes partes da beterraba (*Beta vulgaris* L.) sobre a microbiota intestinal de indivíduos com hipertensão arterial / Andressa Cavalcante do Nascimento. - João Pessoa, 2025.
131 f. : il.

Orientação: Evandro Leite de Souza.

Coorientação: Thatyane Mariano R. de Albuquerque.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS/PPGCN.

1. Alimentos funcionais. 2. Raíz tuberosa. 3. Beterraba. 4. Microbiota intestinal. 5. Hipertensão arterial. I. Souza, Evandro Leite de. II. Albuquerque, Thatyane Mariano Rodrigues de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 612.3(043)

**IMPACTOS DE DIFERENTES PARTES DA BETERRABA (*Beta vulgaris* L.) SOBRE
A MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS COM HIPERTENSÃO
ARTERIAL**

Dissertação aprovada em 26 de fevereiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **EVANDRO LEITE DE SOUZA**
Data: 27/03/2025 05:33:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza
Orientador (DN/CCS/UFPB)
Presidente da Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **THATYANE MARIANO RODRIGUES DE ALBUQUE**
Data: 24/03/2025 11:45:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque
Coorientadora (DN/CCS/UFPB)

Documento assinado digitalmente
 **MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA**
Data: 25/03/2025 21:50:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Maria Elieidy Gomes de Oliveira
Examinadora Interna (DN/CCS/UFPB)

Documento assinado digitalmente
 **KAROLINY BRITO SAMPAIO**
Data: 24/03/2025 19:31:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Téc. Dr^a Karoliny Brito Sampaio
Examinadora Externa (DTA/CTDR/UFPB)

João Pessoa

2025

DEDICATÓRIA

Dedico estas linhas...

*A todos que um dia sonharam com a
educação, mas tiveram que abrir mão por suas
obrigações e falta de direito a escolha.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser o meu refúgio e fortaleza, socorro bem presente, que me susteve em todos os momentos e que segue me guiando e abençoando a cada passo.

A minha amada mãe, **Maria José** e ao meu querido pai **Alexandre Magno**, por todos os esforços de uma vida para me oferecerem a melhor educação, que nem mesmo tiveram acesso, mas que por entendimento da importância, por mim e meu irmão, tudo fizeram e seguem presentes orientando, encorajando e apoiando a cada tomada de decisão.

Ao meu querido irmão Alexandre Magno, “**Maguinho**”, por toda parceria de uma vida, trazendo leveza aos meus dias, sendo o meu oposto com suas brincadeiras e risadas, sendo sempre a descontração do ambiente, mas que também é porto seguro.

Aos meus avôs (*in memoriam*) **Maria Barbosa, Joaquim Martiniano, Maria Oswaldina e Alexandre Manoel**, que apesar do pouco tempo em vida, carrego comigo hoje os valores que, a mim ensinados, foram um dia passados deles para os meus pais.

Aos meus amados tios, **Geraldo, Russa e Jandira**, que mesmo distantes e não tendo entendimento do processo, se fazem presentes, externando seus carinhos, me declarando sempre o quanto sou amada e o quanto rezam por mim, minha felicidade e meu sucesso.

A **Auriane Dutra, Valter Silva, Damiana Mamede, Irisnay Correia, Kelyane Cerqueira, Lais Santos e Alexia Samara**, amigos que tenho grande apreço e que sou grata a sorte por tê-los na jornada vida.

Ao **Adolfo Pinheiro**, a quem sou imensamente grata e feliz pela parceria construída com muito respeito, onde esteve comigo desde o nosso primeiro encontro, presente em todas as análises, não medindo esforços para atender as minhas necessidades e logísticas para continuidade dos meus estudos quando estive afastada, e que além do universo científico, tornou-se um amigo e assim seguimos a dividir vivências, histórias e a torcer pela felicidade e sucesso um do outro.

À **Dra. Helena Taina Diniz** que na graduação foi inspiração, amiga, conselheira e a principal encorajadora na tomada de decisão para ingressar no mestrado. Sou grata às professoras **Jéssica Bezerra, Joana Leite, Juliana Padilha, Karla Kalígia, Lavosiana Lacerda e Marli Melo**, profissionais exímias que guardo profundo respeito e admiração.

Ao meu orientador, professor **Dr. Evandro Leite de Souza**, pela confiança depositada, respeito, e por todo empenho e dedicação para a realização deste estudo. O meu mais profundo agradecimento e admiração por sua dedicação e competência.

A minha coorientadora, professora **Dra. Thatyane Mariano R. de Albuquerque**, que desde o nosso primeiro encontro se colocou à disposição, me atendendo prontamente em todos os momentos, sempre cuidadosa, atenta, dedicada, respeitosa, paciente, compreensiva... e as qualidades não terminam por aí. Muitíssimo obrigada por toda atenção, paciência e dedicação no decorrer deste processo.

À professora **Dra. Maria Elieidy**, pelos muitos ensinamentos que vão além da sala de aula e laboratório, assim como pelos bons momentos de troca. Sou imensamente feliz e grata por ter tido a sorte de tê-la nesta trajetória, de ter compartilhados momento com alguém que é diferenciada, com uma energia de puro amor, que por onde passa traz leveza e é luz.

À **Kamylla Millena, Talita Queiroga, Tatiana Zanella, Renally Lima e Aryanne Santiago** pelos bons momentos de trocas de ideias, incentivos e risadas ao longo do mestrado.

À professora **Dra. Maria Lúcia da Conceição**, pela forma em que fui recebida e acolhida em seu laboratório, mostrando-se sempre muito querida e alegre aos nossos encontros.

Aos colegas **Ludmilla Salles, Natália Sufiatti, Gil Santos, Flávia Izabely, Viviane Medeiros, Deborah Gomes, Deborah Albuquerque, Karoliny Sampaio, Jaielson Yandro, Jordana Nunes, Jociano Lins, Anuara Lima e Paulo César**, que foram colaborativos na construção deste trabalho, e que sem esse apoio, todo o processo teria sido muito mais árduo.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição (PPGCN), o professor **Dr. José Luiz**, pela competência com que vêm conduzindo este programa, assim como pela parceria e dedicação para realização deste estudo.

Ao **corpo de docentes** do PPGCN, por todo conhecimento e ensinamentos compartilhados ao longo desse mestrado, bem como ao corpo técnico administrativo, o **Sr. Carlos e Sr. Marcos**, pelo respeito, atenção e carinho com qual fui recebida e tratada.

A todos do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Alimentos (LMBA) qual faço parte, e onde sempre fui tratada com respeito. Sou grata também aos laboratórios parceiros: **Laboratório de Bromatologia (LABROM/CCS), Laboratório de Pesquisa Translacional em Nutrição e Doenças Cardiometabólica (LaNuCaM), Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA/IPEFARM), Laboratório Multiusuário de Qualidade em Alimentos (LMQA/CT), Laboratório de Análises Químicas de Alimentos (LAQA/CT)** e o **Laboratório Experimental de Alimentos (LEA/IF – Sertão - PE)**.

Aos **membros da banca examinadora**, pela disponibilidade e valiosas contribuições para a melhoria deste trabalho.

À **Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba** pela concessão de bolsa de estudos que tornou possível a realização do mestrado.

RESUMO

A beterraba (*Beta vulgaris* L.) é um dos alimentos mais produzidos no Brasil, sendo rico em nutrientes e compostos bioativos, destacando-se as quantidades de nitrato e betalaína, o que o coloca como um potencial alimento com alegação funcional. Essas características têm aumentado o interesse no vegetal devido ao potencial benefício à saúde cardiovascular a partir da produção endógena de óxido nítrico no intestino, induzindo a redução da pressão arterial. A hipertensão arterial (HA) é uma das doenças de maior prevalência em todo o mundo devido a sua etiologia multifatorial complexa. O objetivo desse estudo foi avaliar o impacto das diferentes partes da beterraba sobre a microbiota intestinal de indivíduos diagnosticados com HA utilizando sistema de fermentação colônica *in vitro*. O estudo foi realizado em diferentes etapas, tendo início a partir da liofilização da raiz da beterraba (LBR), dos talos e folhas (LBTF) e do vegetal integral (raiz, talos e folhas) (LBI). Os materiais liofilizados foram submetidos à caracterização físico-química, seguido por digestão gastrointestinal *in vitro* e fermentação colônica (48 horas) com inóculo fecal de indivíduos com HA, determinação da composição bacteriana (metagenômica), determinação de metabólitos gerados (ressonância magnética nuclear) e atividade antioxidante (ABTS^{•+}, DPPH[•], e FRAP). Os resultados demonstraram que LBR, LBTF e LBI influenciaram a composição bacteriana, atividade metabólica microbiana e capacidade antioxidante durante a fermentação. LBR, LBTF e LBI aumentaram a abundância relativa de diversas populações bacteriana após 48 horas de fermentação, incluindo Proteobactérias (LBR 3,19 - 72,0%, LBTF 2,6 - 76,5%, LBI 2,1 - 77,9%) e Bacteroidetes (LBTF 1,2 - 12,0%, LBI 1,8 - 6,9%) e redução da população de Firmicutes (LBR 85,9 - 16,6%, LBTF 88,7 - 8,9%, LBI 85,2 - 9,3%). O aumento da atividade metabólica foi evidenciado pela redução do pH (LBR $6,73 \pm 0,15$ - $5,09 \pm 0,81$, LBTF $6,74 \pm 0,22$ - $6,03 \pm 0,33$, LBI $6,68 \pm 0,18$ - $5,50 \pm 0,76$) e consumo de açúcares (celobiose, eritritol, glicose, maltose e difosfato de uridina glicose) no meio de fermentação, com aumento dos ácidos graxos de cadeia curta (acetato, butirato e propionato) e manutenção capacidade antioxidante. As diferentes partes da beterraba causaram impacto positivo sobre a microbiota intestinal de hipertensos, destacando a diversidade funcional dos substratos a partir da formação de metabólitos de controle da doença, porém a amostra LBR foi que melhor estimulou o aumento de *Bifidobacterium*, gênero que pode vir a ser explorado na prevenção e controle da HA através da restauração do equilíbrio a microbiota intestinal a partir de estratégia dietética.

Palavra-chave: Raíz tuberosa. Alimentos funcionais. Microbiota intestinal. Propriedades prebióticas. Hipertensão arterial.

ABSTRACT

Beet (*Beta vulgaris* L.) is one of the most widely produced foods in Brazil and is rich in nutrients and bioactive compounds, particularly nitrate and betalain, which makes it a potential food with functional claims. These characteristics have increased interest in the vegetable due to the potential benefit to cardiovascular health from the endogenous production of nitric oxide in the intestine, inducing a reduction in blood pressure. Arterial hypertension (AH) is one of the most prevalent diseases worldwide due to its complex multifactorial etiology. The aim of this study was to evaluate the impact of different parts of beet on the intestinal microbiota of individuals diagnosed with AH using an *in vitro* colonic fermentation system. The study was carried out in different stages, starting with the freeze-drying of the beet root (FDBR), the stalks and leaves (FDBSL) and the whole vegetable (root, stalks and leaves) (FDWB). The freeze-dried materials were subjected to physicochemical characterization, followed by *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation (48 h) with faecal inoculum from individuals with AH, determination of bacterial composition (metagenomics), metabolite formation (nuclear magnetic resonance) and antioxidant capacity (ABTS^{•+}, DPPH[•], and FRAP). The results showed that FDBR, FDBSL and FDWB influenced bacterial composition, microbial metabolic activity and antioxidant capacity during fermentation. FDBR, FDBSL and FDWB increased the relative abundance of several bacterial populations after 48 h of fermentation, including Proteobacteria (FDBR 3.19 - 72.0%, FDBSL 2.6 - 76, 5%, FDWB 2.1 - 77.9%) and Bacteroidetes (FDBSL 1.2 - 12.0%, FDWB 1.8 - 6.9%) and a reduction in the Firmicutes population (FDBR 85.9 - 16.6%, FDBSL 88.7 - 8.9%, FDWB 85.2 - 9.3%). The increase in metabolic activity was evidenced by the reduction in pH (FDBR 6.73 ± 0.15 - 5.09 ± 0.81 , FDBSL 6.74 ± 0.22 - 6.03 ± 0.33 , FDWB 6.68 ± 0.18 - 5.50 ± 0.76) and consumption of sugars (cellobiose, erythritol, glucose, maltose and glucose uridine diphosphate) in the fermentation medium, with an increase in short-chain fatty acids (acetate, butyrate and propionate) and maintenance of antioxidant capacity. The different parts of the beet had a positive impact on the intestinal microbiota of hypertensive patients, highlighting the functional diversity of the substrates from the formation of metabolites to control the disease, but the FDBR sample had the highest production of *Bifidobacterium*, a genus that could be exploited in the prevention and control of AH through the restoration of balance to the intestinal microbiota from a dietary strategy.

Key words: Tuberous root. Functional foods. Intestinal microbiota. Prebiotic properties. Hypertension.

LISTA DE QUADROS

QUADROS DA DISSERTAÇÃO

Quadro 1.	Evidências sobre benefícios à saúde decorrentes do consumo de prebiótico convencionais estabelecidos e emergentes.....	24
Quadro 2.	Descrição da fórmula de umidade.....	39
Quadro 3.	Descrição da fórmula de cinzas.....	40
Quadro 4.	Descrição da fórmula de proteínas.....	41
Quadro 5.	Descrição da fórmula de lipídios.....	42

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1.	Descrição da composição do meio de crescimento (1 L).....	50
------------------	---	----

TABELAS DO ARTIGO

Table 1.	Physicochemical parameters and antioxidant capacity (average $\pm$ standard deviation, $n = 3$) of freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL), and freeze-dried whole beet (FDWB).....	122
Table 2.	Phenolic compounds identified in freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL) and freeze-dried whole beet (FDWB) (mg/L; average, $n = 3$), as well as in media with FDBR, FDBSL, and FDWB at zero and 48 h of <i>in vitro</i> colonic fermentation with fecal inoculum from hypertensive individuals (mg/L; average, $n = 8$).....	123
Table 3.	Metabolites identified in freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL) and freeze-dried whole beet (FDWB) (mM; average, $n = 3$), as well as in media with FDBR, FDBSL, and FDWB at zero and 48 h of <i>in vitro</i> colonic fermentation with fecal inoculum from hypertensive individuals (analyzed with $^1\text{H-NMR}$) (mM; average, $n = 8$).....	125
Table 4.	pH values and antioxidant capacity (average $\pm$ standard deviation, $n = 8$) in media with freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL) and freeze-dried whole beet (FDWB) at zero and 48 h of <i>in vitro</i> colonic fermentation.....	129

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÕES DA DISSERTAÇÃO

Figura 1.	Beterraba vermelha (morfologia).....	21
Figura 2.	O impacto de diferentes dietas sobre a Microbiota intestinal.....	28
Figura 3.	Processo de fermentação colônica <i>in vitro</i>	29
Figura 4.	Fluxograma.....	35
Figura 5.	Digestão <i>in vitro</i>	36
Figura 6.	Processo de digestão simulada <i>in vitro</i>	46
Figura 7.	Amostras em diálise após 16 horas.....	47
Figura 8.	Descrição da composição do meio de crescimento.....	47

ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

Figure 1.	Relative abundance of the bacterial phyla (A) and the most predominant families (B) and main genera (C) identified in media with freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL), and freeze-dried whole beet (FDWB) at zero (t0) and 48 h (t48) of <i>in vitro</i> colonic fermentation with fecal inoculum from hypertensive individuals.....	114
Figure 2.	Alpha-diversity of the bacterial genera identified in media with freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL), and freeze-dried whole beet (FDWB) at time zero (t0) and 48 h (t48) of <i>in vitro</i> colonic fermentation.....	116
Figure 3.	Beta diversity of the bacterial genera dimensioned by Bray-Curtis index (A) and Unifrac index (B) in media with freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL), and freeze-dried whole beet (FDWB) at time zero (t0) and 48 h (t48) of <i>in vitro</i> colonic fermentation with fecal inoculum from hypertensive individuals.....	117
Figure 4.	Heatmap of correlation between organic acids and bacterial genera (A), sugars and bacterial genera (B), amino acids and bacterial genera (C) and metabolites and pH with bacterial genera (D), identified in media with freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL), and freeze-dried whole beet (FDWB) at zero (t0) and 48 h (t48) of <i>in vitro</i> colonic fermentation with fecal inoculum from hypertensive individuals.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	- 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico
AOAC	- Associação de químicos analíticos oficiais
AGCC	- Ácido graxo de cadeia curta
AH	- Arterial hypertension
ANOVA	- Análise de variância
AVC	- Acidente vascular cerebral
AVE	- Acidente vascular encefálico
AVEH	- Acidente vascular encefálico hemorrágico
AVEI	- Acidente vascular encefálico isquêmico
a_w	- Atividade de água
CaCl_2	- Cloreto de cálcio
CCS	- Centro de Ciências da Saúde
CD11b	- Marcador de superfície celular
CFM	- Citometria de fluxo multiparimétrica
CT	- Centro de Tecnologia
DAC	- Doença arterial coronária
DAOP	- Doença arterial obstrutiva periférica
DASH	- Abordagem dietética para hipertensão
DCV	- Doenças Cardiovascular
DPPH	- 2,2-difenil-1- picril-hidrazil
DN	- Departamento de nutrição
f	- Fator de correção do HCl
FC	- Fator de conversão do nitrogênio em proteína
FDWB	- Freeze-dried Whole beet (Liofilizado da beterraba integral)
FDBR	- Freeze-dried beet root (Liofilizado da beterraba raiz)
FDBSL	- Freeze-dried beet stalks and leaves (Liofilizado da beterraba talos e folhas)
FeSO_4	- Sulfato ferroso
FISH	- Fluorescência de hibridização in situ
FOS	- Frutooligossacarídeos

FRAP	- Poder antioxidante redutor do ferro
GOS	- Galactooligossacarídeos
HA	- Hipertensão arterial
HAS	- Hipertensão arterial sistêmica
HCl	- Hidróxido de cloreto
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
IC	- Insuficiência cardíaca
IgA	- imunoglobulina A
IgM	- imunoglobulina M
IL-1 β	- Interleucina 1 beta
IL- 6	- Interleucina 6
IL- 12	- Interleucina12
IMC	- Índice de massa corporal
IPEFARM	- Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
KCl	- Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	- Fosfato de potássio monobásico
K ₂ HPO ₄	- Fosfato de potássio dibásico
L-ARG	- L-arginina
LF	- Liofilizado de folha
LABROM	- Laboratório de Bromatologia
LEA	- Laboratório Experimental de Alimentos
LMBA	- Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos
LMCA	- Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises
LMQA	- Laboratório Multiusuário de Qualidade em Alimentos
LAQA	- Laboratório de Análises Químicas de Alimentos
LPS	- Lipopolissacarídeos
LR	- Liofilizado de raiz
MgSO ₄	- Sulfato de magnésio
mmHg	- Milímetros de mercúrio
MHz	- Megahertz

μL	-	Microlitro
N	-	Peso em gramas de umidade
NaCl	-	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	-	Bicarbonato de sódio
NaOH	-	Hidróxido de sódio
Nrf2	-	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
nm	-	Nanômetro
NO	-	Nitrato-nitrito-óxido nítrico
P	-	Peso em gramas da amostra ou branco
PA	-	Pressão arterial
PAD	-	Pressão arterial diastólica
PAS	-	Pressão arterial sistólica
PH	-	Potencial hidrogeniônico
PNAE	-	Programa Nacional de Alimentação Escolar
P1	-	Peso em gramas do cadinho após a formação das cinzas
P2	-	Peso em gramas do cadinho tarado
RMN	-	Ressonância magnética nuclear
rRNA	-	Ácido ribonucleico ribossômico
RTL	-	Receptores Toll-Like
SGF	-	Solução Gástrica Final
SIF	-	Solução Intestinal Final
SSF	-	Solução salivar final
SUS	-	Sistema Único de Saúde
TG	-	Triglicerídeos
TGI	-	Trato gastrointestinal
TCLE	-	Termo de consentimento livre e esclarecido
TMAO	-	N-óxido de trimetilamina
TNF-α	-	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFPB	-	Universidade Federal da Paraíba
XOS	-	Xilooligossacarídeos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 BETERRABA E SEUS BENEFÍCIOS À SAÚDE.....	20
2.2 PREBIÓTICOS	23
2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS	26
2.4 HIPERTENSÃO ARTERIAL	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	34
3.2 LOCAL DO ESTUDO	34
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	34
3.4 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS DE BETERRABA	37
3.5 PREPARAÇÃO DAS DIFERENTES PARTES DA BETERRABA	37
3.6 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	37
3.6.1 Determinação da atividade de água	38
3.6.2 Determinação do pH.....	38
3.6.3 Caracterização da cor	38
3.6.4 Determinação de umidade	39
3.6.5 Determinação de cinzas.....	39
3.6.6 Determinação de proteínas	40
3.6.7 Determinação de lipídios.....	41
3.6.8 Determinação de fibras solúveis, insolúveis e totais	42
3.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO GLOBAL POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	44
3.8 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	44
3.9 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FDBR, FDBSL E FDWB.....	45
3.10 DIGESTÃO GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>	46
3.11 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PREBIÓTICOS UTILIZANDO INÓCULO FECAL	48
3.11.1 Procedimentos éticos	48
3.11.2 Recrutamento de doadores	48

3.11.3 Coleta das amostras fecais	49
3.11.4 Preparação do inóculo fecal humano	49
3.11.5 Preparação do meio de fermentação colônica <i>in vitro</i>	50
3.11.6 Análise da comunidade bacteriana por sequenciamento do gene 16s rRNA.	51
3.11.7 Avaliação da atividade metabólica microbiana durante a fermentação colônica	51
3.12 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE A FERMENTAÇÃO COLÔNICA	51
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICES	65
APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO PARA RECRUTAMENTO	66
APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	69
APÊNDICE C – ARTIGO	72
ANEXO.....	131
ANEXO A – CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	132

1 INTRODUÇÃO

A beterraba (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) é caracterizada como um superalimento, sendo constituída por carboidratos, fibras, proteínas, minerais, vitaminas e uma variedade de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Mirmiran *et al.*, 2020). A espécie vegetal é classificada como uma planta herbácea, originária da Europa e do Norte da África, e suas partes comestíveis incluem a raiz, talos e folhas, sendo utilizadas para consumo na forma de saladas, sucos e outras preparações culinárias (Oliveira *et al.*, 2021).

No Brasil, esse vegetal é uma das hortaliças mais cultivadas, sendo a raiz a parte da planta que geralmente é mais consumida. As partes comestíveis não convencionais (talos e folhas) são frequentemente descartadas, resultando em perdas significativas de fontes de nutrientes para o consumo (Gouvea *et al.*, 2020). O seu desperdício impacta negativamente não somente a segurança alimentar e nutricional e ao meio ambiente, mas também a economia circular devido à falta de incentivo e valorização ao aproveitamento de partes não convencionais (De Lauwere *et al.*, 2024).

O teor de fibras presentes na beterraba demonstra potencial efeito prebiótico, estimulando o crescimento seletivo de microrganismos benéficos para o equilíbrio da microbiota intestinal (Oliveira *et al.*, 2023; Paviani *et al.*, 2024). Prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis, tendo como principal sítio de atuação o trato gastrointestinal (TGI), onde são fermentados pelas bactérias intestinais, desempenhando papel importante na composição e função da microbiota intestinal (Gibson *et al.*, 2017).

A microbiota intestinal, estabelecida ao nascimento, sofre constantes transformações ao longo da vida, sendo influenciada por fatores endógenos e exógenos. Essas mudanças modulam a saúde do indivíduo, impactando diretamente seus processos fisiológicos e metabólicos e predispondo ao estado de saúde e ao risco de ocorrência e desenvolvimento de diversas doenças (Franca *et al.*, 2021).

A resposta orgânica distinguida como estado de saúde ou doença dar-se em parte à característica da composição da microbiota intestinal e sua ação ao organismo humano, pois quando este meio se encontra em equilíbrio, é chamado de eubiose. Nessa condição, a microbiota intestinal é composta em maior parte por microrganismos comensais, que promovem respostas fisiológicas e metabólicas moduladoras e imunoprotetoras (Quinones *et al.*, 2018). Quando a composição da microbiota intestinal se encontra com diversidade reduzida, e até mesmo, com baixa prevalência ou ausência de alguns gêneros bacterianos, caracteriza-se como disbiose. Nessa condição, ocorre uma relação de desequilíbrio de microrganismos

patogênicos, que sobrepõe a quantidade de microrganismos comensais e expõe o indivíduo ao desenvolvimento de doença (Pantoja *et al.*, 2019).

Devido à disbiose intestinal influenciar na resposta inflamatória do hospedeiro, estudos vêm sugerindo que a microbiota pode desencadear o desenvolvimento de hipertensão arterial (HA), tendo em vista que a microbiota de pessoas com HA apresenta menor diversidade quando comparada com a microbiota de pessoas saudáveis (Canale *et al.*, 2021). Um dos fatores de relevância que impacta na composição da microbiota intestinal é a dieta, onde padrões dietéticos podem favorecer a colonização de bactérias de diferentes enterótipos e, consequentemente, interferir na escala de predominância destes microrganismos, que também impactam no processo fisiológico e metabólico do hospedeiro (Bolte *et al.*, 2021).

A HA é uma das doenças crônicas não transmissíveis com aumento progressivo nas últimas décadas e com grande prevalência em todo mundo, sendo uma das principais causas de morbimortalidade. No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) tem dispendido de gastos financeiros elevados com o tratamento medicamentoso e internações hospitalares em decorrência da etiologia multifatorial e complexa da HA (Moita *et al.*, 2022). Uma estratégia adjuvante ao tratamento da hipertensão está na dietoterapia, a partir do consumo de alimentos com propriedades bioativas dos polifenóis, flavonoides e outros, que atue na redução do estresse oxidativo e melhora da função endotelial, mitigando a prevalência da hipertensão de forma eficaz (Besbas; Takácsné, 2024; Islam *et al.*, 2023).

O potencial efeito prebiótico das diferentes partes da beterraba tem sido atribuído aos componentes presentes em sua composição, que são utilizados como substratos pelas bactérias probióticas, estimulando o seu crescimento de forma seletiva em detrimento à patógenos entéricos, atuando de forma benéfica sobre a saúde do hospedeiro (Oliveira *et al.*, 2023; Peng *et al.*, 2020; Quinones *et al.*, 2018). O objetivo deste estudo foi investigar o impacto das diferentes partes da beterraba na microbiota intestinal de hipertensos, tendo como hipótese que seu aproveitamento integral pode ampliar os benefícios ao uso exclusivo da raiz, tradicionalmente consumida. Espera-se que o uso das diferentes partes da beterraba influencie positivamente a composição e atividade metabólica da microbiota intestinal de indivíduos com HA, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias nutricionais para o manejo da doença, por meio da modulação da microbiota intestinal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BETERRABA E SEUS BENEFÍCIOS À SAÚDE

A beterraba (*Beta vulgaris* L.) é uma hortaliça tuberosa, classificada como uma herbácea bienal, originária da Europa e pertencente à família Quenopodiaceae (Aguiar *et al.*, 2021; Neha *et al.*, 2017). A beterraba apresenta melhor cultivo em regiões de baixa altitude, sob condições de temperatura mais baixa ou amenas, comum ao período outono-inverno. Entretanto, essa espécie vegetal apresenta boa adaptação à diferentes climas, desde que cultivada em solos com boa drenagem e com faixa de pH entre 6,0 e 7,0, condição importante para o seu crescimento ideal (Aguiar *et al.*, 2021; Nikan; Manayi, 2018; Syromyatnikov, 2023).

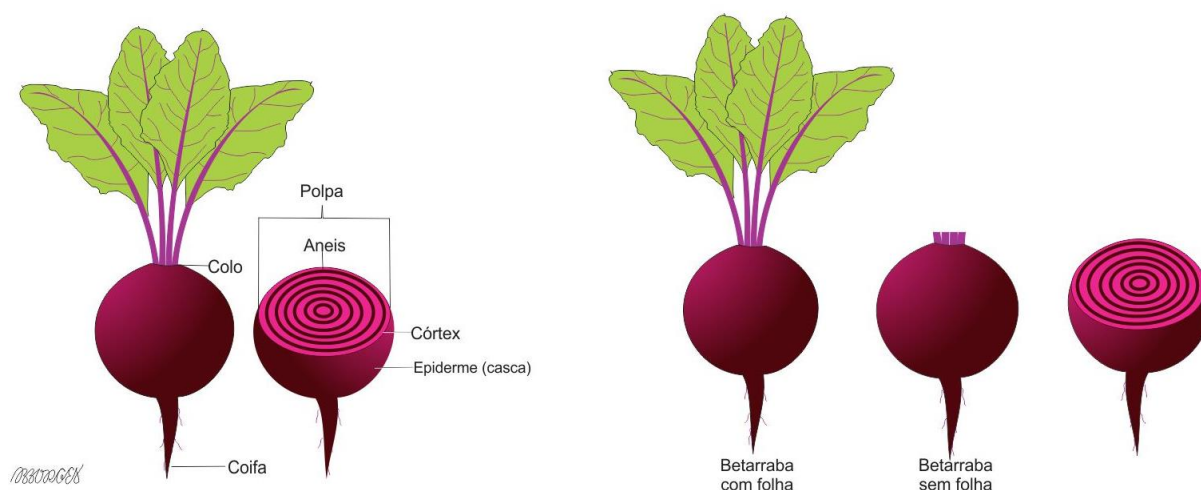
No Brasil, a beterraba é uma das hortaliças mais cultivadas, e, segundo o último Censo Agropecuário (IBGE, 2018), em 2017 foram produzidas 134 969 toneladas de beterraba no país, sendo que 41% da produção foi oriunda da agricultura familiar. As regiões sul e sudeste concentraram mais de 80% de toda a quantidade de beterraba produzida no país (IBGE, 2018). Esta espécie vegetal apresenta diversos biotipos, embora as mais produzidas e de maior importância são as beterrabas do tipo açucareira (*B. vulgaris altissima*), utilizada para produção de açúcar; tipo forrageira (*B. vulgaris rapa*), produzida para alimentação animal; e hortícola (*B. vulgaris esculenta*), comum para o consumo humano (Oliveira *et al.*, 2021).

A hortícola da espécie *Beta vulgaris* L. é também conhecida como beterraba vermelha ou beterraba de mesa, sendo comumente utilizada nas preparações do dia a dia. A beterraba vermelha pode ser consumida de maneira integral, sendo *in natura* ou processada, crua, cozida, em forma de salada ou utilizada em preparações doces e salgadas ou mesmo como bebida (Silva; Ferreira; Souza, 2022). As raízes de diferentes espécies de beterraba apresentam diferentes tamanhos e cores; entretanto, a beterraba vermelha (Figura 1) é a mais popular para o consumo humano (Varshney; Mishra, 2022). Embora a raiz seja amplamente consumida, os talos e folhas da beterraba costumam ser desprezados e seu consumo ainda é negligenciado, embora seja uma fonte de nutrientes e compostos bioativos (Lorizola *et al.*, 2021; Mella *et al.*, 2024).

Uma forma encontrada de melhorar o consumo de diferentes partes de um alimento, sendo convencionais ou não convencionais, é a produção de farinha vegetal, que permite o consumo na sua integralidade a partir de diferentes formas de preparações, diminuindo a perda nutrientes (Gouvea *et al.*, 2020). O aproveitamento de diferentes partes da beterraba permite a

implantação de modelo de negócio agroecológico a partir da valorização do produto e redução do desperdício, contribuindo para a economia circular a partir da geração de novos produtos, sustentabilidade alimentar e segurança alimentar e nutricional, permitindo a diversificação alimentar e fornecimento de nutrientes, além de incentivar a prática agrícola e valorização dos pequenos produtores, conforme os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas, em especial o ODS 2, que busca acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável. (De Lauwere *et al.*, 2024; Rodino *et al.*, 2023).

Figura 1 – Beterraba vermelha (morfologia)



Fonte: Domínio Público (2024).

A beterraba possui em sua composição vitaminas A, B1, B2, B5 e C, além de minerais, a exemplo de potássio, sódio, fósforo, cálcio, zinco, ferro e manganês, pectina, celulose e hemicelulose (Sentkowska; Pyrzyńska, 2023). Nos últimos anos, o interesse pelo vegetal tem sido crescente devido a sua quantidade de compostos bioativos, com destaque para as betalaínas. Entretanto, para garantir a manutenção das propriedades bioativas da betalaína, torna-se importante controlar fatores externos, como temperatura, oxigênio e luz, e internos, como pH, presença de enzimas e metais (Pereira *et al.*, 2022).

As betalaínas são pigmentos naturais nitrogenados hidrossolúveis, com propriedades funcionais de interesse para a indústria alimentícia devido aos efeitos promotores de saúde (Fu *et al.*, 2020). A betacianina é o composto responsável pela cor característica da beterraba, que se apresenta em ampla gama de tons, variando do vermelho ao violeta. A coloração intensa da

beterraba tem despertado interesse devido a possibilidade de extração de corantes naturais para uso em alimentos, aumentando a sua aceitação em relação à cor e sabor, além de aumentar o valor nutricional (Silva; Ferreira; Souza, 2022).

O consumo regular de betalaínas a partir da ingestão da beterraba vermelha tem demonstrado um potencial efeito antirradicais livres em diversas doenças e até mesmo na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo em humanos (Alshehry *et al.*, 2021). Junto de alguns compostos fenólicos presentes na beterraba, a betalaína apresenta capacidade de promover efeitos positivos na microbiota intestinal, resultante da produção de metabólitos bacterianos, com destaque para os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), devido aos benefícios induzidos pelos prebióticos na saúde gastrointestinal do hospedeiro (Oliveira *et al.*, 2021).

Estudos em modelos animais sugerem que o consumo de betalaínas pode reduzir marcadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β , ao mitigar a produção de ânions superóxido e a peroxidação lipídica. Além disso, essas substâncias bioativas promovem a regulação positiva da expressão dos genes relacionados à defesa antioxidante, como Nrf2 e Ho1, destacando seu potencial terapêutico em condições crônicas (Martinez *et al.*, 2020).

A beterraba vermelha apresenta benefícios à saúde relatados a partir de ensaios clínicos, que sugerem efeitos de redução do risco de doenças crônicas e melhora da saúde cardiovascular e da função cognitiva (Pinedo-Gil *et al.*, 2019; Nobari *et al.*, 2022). A beterraba é um alimento rico em nitrato inorgânico, composto que atua como recurso ergogênico e precursor do óxido nítrico (ON). O ON tem despertado interesse para uso na prática de atividades físicas por permitir a extensão do tempo de execução de exercício de resistência até a exaustão. Estes efeitos têm sido relacionados à sua capacidade de melhorar a função das fibras musculares do tipo II na prática de modalidades de exercícios de alta intensidade (Wong; Sim; Burns, 2021).

O nitrato inorgânico promove a conversão do nitrato em nitrito, que potencialmente aumenta o volume do nitrito circulante. Isso reduz os marcadores inflamatórios, que são geradores de superóxidos, diminuindo as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-12) e aumentando os níveis de citocinas anti-inflamatórias, favorecendo o aumento da biodisponibilidade de ON (Yang *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2021).

Em um estudo de modelo animal, foi sugerido que o aumento da biodisponibilidade de ON, advindo do nitrato, leva à diminuição da ativação e o recrutamento de leucócitos, que, consequentemente, reduz o número de leucócitos circulantes, atenua a expressão de neutrófilos CD11b e diminui os níveis plasmáticos de quimiocinas, suprimindo a inflamação (Khambata, *et al.*, 2016).

Estudos que avaliaram os efeitos do nitrato a partir da suplementação de suco de beterraba têm sugerido que o aumento da concentração plasmática de nitrito e nitrato tem a capacidade de reduzir a pressão arterial, melhorar o desempenho cognitivo, bem como de resistência e potência aeróbica em testes de força máxima, além da melhora na redução do humor relacionado ao estado de tensão pré-exercício (Jodra *et al.*, 2020; Burgos *et al.*, 2021; Miraftebi *et al.*, 2021; Bath *et al.*, 2022).

Os resultados de estudo que investigou os efeitos de partes comestíveis convencionais e não convencionais de beterraba vermelha mostraram o aumento das populações de *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp. durante a fermentação colônica e a diminuição das populações de *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp., *Clostridium histolyticum* e *Eubacterium rectale*/C. *coccoides*, sugerindo alterações benéficas na composição da microbiota intestinal humana. Também ocorreu aumento da atividade metabólica da microbiota intestinal por meio da diminuição dos valores de pH, aumento da produção de AGCC, alteração do perfil de compostos fenólicos e aumento da capacidade antioxidante (Oliveira *et al.*, 2023).

O aumento da população de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. tem sido relacionado aos efeitos prebióticos dos oligossacarídeos presentes na beterraba, os quais são capazes de estimular as bactérias intestinais comensais desejáveis, reduzindo a abundância de bactérias nocivas durante o processo de fermentação colônica (Paviani *et al.*, 2024).

2.2 PREBIÓTICOS

Os prebióticos são substratos utilizados seletivamente por microrganismos hospedeiros, conferindo um benefício à saúde (Gibson *et al.*, 2017). Há diferentes tipos de prebióticos, onde cada um corresponde a uma classificação de acordo com o seu desenvolvimento e sua resposta regulatória (Cardoso *et al.* 2021), que podem ser de prevenção à adesão de patógenos, modulação da resposta imune, influência nas vias de detecção de nutrientes e resistência ao estresse, de maneira a melhorar a digestão e função da barreira intestinal (Davani-Davari *et al.*, 2019).

Na literatura já existem evidências clínicas que demonstram benefícios à saúde devido o consumo de alguns prebióticos convencionais e emergentes, que podem ser observados no Quadros 1.

Quadro 1 - Evidências sobre benefícios à saúde decorrentes do consumo de prebióticos convencionais.

Prebióticos	Efeitos
Inulina	➤ Aumenta a produção de AGCC, a absorção de cálcio, magnésio e ferro; reduz o risco de doenças gastrointestinais, lipogênese sanguínea e das concentrações plasmáticas de triacilglicerol e o alívio da constipação (Yoo <i>et al.</i>, 2024). ➤ Regula a microbiota intestinal, melhora o metabolismo dos glicolipídios, reduz a inflamação, diminui o risco de câncer de cólon, alivia a constipação e ameniza os sintomas da depressão (Qin <i>et al.</i>, 2023; Sheng; Zhang, 2023).
Frutooligossacarídeos (FOS)	➤ Melhora a resposta imunomoduladora, a absorção de minerais, previne o câncer de cólon, controla e gerencia a obesidade e o diabetes, regula as concentrações séricas de lipídios e colesterol promove a estimulação e crescimento seletivo de microrganismos benéficos (de Carvalho Correa, 2024).
Galactoolissacarídeos (GOS)	➤ Reduzem a citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, TNF-α e IL-6 em macrófagos induzidos por lipopolissacarídeos (LPS) (Sum <i>et al.</i>, 2022; Tian <i>et al.</i>, 2022). ➤ Estimulam o crescimento seletivo de microrganismos benéficos, inibem as bactérias patogênicas e aliviam doenças gastrointestinais, neurológicas, metabólicas e alérgicas. Eles também aumentam a produção de ACGG, modulam os metabólitos e melhoram a saúde geral do intestino (Wang <i>et al.</i>, 2024). ➤ Melhora resposta imunológica, aumenta a absorção de minerais e gravidade reduzida da obesidade e diabetes
Lactulose	➤ Melhora a saúde intestinal, trata a constipação e a encefalopatia hepática (Tapper <i>et al.</i>, 2023). ➤ Aumenta a absorção de minerais, modula a função imunológica e pode ajudar no controle do diabetes (Chu <i>et al.</i>, 2022). ➤ Reduzem as citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-6 aliviando a doença inflamatória intestinal e tumorigênese em modelos de colite (Kurahara <i>et al.</i>, 2021; Hiraishi <i>et al.</i>, 2022). ➤ Melhora na resposta neuroprotetora no Alzheimer a partir da redução neuroinflamatória (Lee <i>et al.</i>, 2021).
Xilooligossacarídeos (XOS)	➤ Reduz o colesterol no sangue, mantém a saúde gastrointestinal, aumenta a absorção de minerais, estimula a imunidade, tem atividade antioxidante e anticancerígena e tem a capacidade de reduzir a glicose (Yoo <i>et al.</i>, 2024)

Quitoooligosacarídeos	➤ Modula a composição da microbiota intestinal, amentando bacterioidetes, diminuindo proteobactéria e Actinobactéria e diminuindo a firmicutes/ bacterioidetes. Pode auxiliar na perda de peso, melhorar a saúde intestinal e apresentar efeitos redutores do colesterol (Liu <i>et al.</i> , 2020).
-----------------------	--

Fonte: Autora (2024).

Algumas fibras dietéticas, especialmente oligossacarídeos resistentes (inulina, fruto-oligosacarídeos e galacto-oligosacarídeos), são bem reconhecidas na literatura como prebióticos (Gibson *et al.*, 2017; Bamigbade *et al.*, 2022). Apesar dos prebióticos estarem estabelecidos como à base de carboidratos, por exemplo, inulina, FOS, GOS e XOS, alguns compostos não carboidratos, como compostos fenólicos, minerais e ácidos graxos poli-insaturados, também foram propostos como candidatos à prebióticos (Gibson *et al.*, 2017; Yahfoufi *et al.*, 2018).

Além disso, os elementos que compõem a dieta podem ser metabolizados por diversas comunidades microbianas intestinais, que, por sua vez, liberam metabólitos derivados de ácidos biliares, vitaminas e ácidos graxos de cadeia curta no lúmen intestinal, influenciando a fisiologia local e sistêmica do hospedeiro (Bianco-Miotto *et al.*, 2017; Bindels *et al.*, 2015).

Os mecanismos de ação dos prebióticos são complexos, diversos, heterogêneos e, muitas vezes, específicos para cada composto. Embora muitos tenham sido descritos, ainda há necessidade de maior compreensão, especialmente considerando a estrutura e função dos efeitos observados na saúde e influências de longo prazo (Kleerebezem *et al.*, 2019; Plaza-Diaz *et al.*, 2019; Monteagudo-Mera *et al.*, 2019).

Os efeitos prebióticos clássicos são mediados pelo consumo do substrato por grupos específicos da microbiota, promovendo seu crescimento e atividade metabólica. O fornecimento de substrato para selecionar grupos de bactérias também pode influenciar indiretamente outros grupos bacterianos formadores da microbiota intestinal, promovendo o crescimento por meio de interações de alimentação cruzada, bem como efeitos inibitórios por meio do deslocamento de patógenos (Blaak *et al.*, 2020).

Os principais subprodutos da fermentação de prebióticos são os AGCC, especialmente acetato, butirato e propionato, que interagem com os sistemas hospedeiros e facilitam o estabelecimento dos efeitos prebióticos (Gibson *et al.*, 2017). Os alvos para prebióticos tem se expandido para além das bactérias lácticas, incluindo uma gama mais ampla de alvos microbianos, tais como *Roseburia* spp., *Eubacterium* spp., *Akkermansia* spp., *Christensenella*

spp., *Propionibacterium* spp. e *Faecalibacterium* spp., que são gêneros candidatos para a promoção da saúde (Blaak *et al.*, 2020).

Os prebióticos também podem ser isolados de novas fontes à medida que o foco na sustentabilidade, custo e escala emerge para consideração na pesquisa e desenvolvimento de produtos para a indústria de alimentos. Os resíduos alimentares gerados na cadeia alimentar representam uma fonte rica e sustentável de ingredientes bioativos, como pectina da casca de laranja, arabinoxilanos de destilaria e resíduos de fabricação de cerveja (Monteagudo-Mera *et al.*, 2018).

Os compostos prebióticos também podem ser quimicamente ou estruturalmente modificados por meio da aplicação de tratamentos de sonicação, alta pressão, ácidos, enzimas e oxidação, que podem modificar as suas funcionalidades. Além disso, combinações de prebióticos em misturas otimizadas podem fornecer maior capacidade de gerar benefícios (Lam; Cheung, 2019).

As dietas do tipo mediterrâneas e vegetarianas estão associadas com maior diversidade da população microbiana no intestino e aumento de microrganismos que fermentam carboidratos do tipo polissacarídeo e compostos fenólicos, tal como ingredientes prebióticos, produzindo metabólitos, como acetato, propionato e butirato, que são associados com a promoção de saúde do hospedeiro, contribuindo para a prevenção, controle e redução da incidência de doenças crônicas não transmissíveis (Barber *et al.*, 2023; O'Donnell *et al.*, 2023).

2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS

A microbiota intestinal é um eixo que faz conexão multidirecional com diferentes órgãos, sendo responsável pelas interações entre microrganismos e hospedeiro, que ocorrem por meio de comunicação por vias neurais, endócrinas, humorais, imunológicas e metabólicas (Afzaal *et al.*, 2022).

A microbiota localizada no trato gastrointestinal (TGI) é caracterizada como sendo complexa e responsável por realizar a biossíntese de vitaminas, além de atuar na absorção e metabolização de alimentos, nutrientes e fármacos (Souza *et al.*, 2021). Aproximadamente 95% da totalidade do intestino tem sua microbiota formada pela população bacteriana, possuindo seis diferentes filos (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*), dos quais *Firmicutes* e *Bacteroidetes* representam aproximadamente 90% da microbiota total (Hou *et al.*, 2022). Já em relação à população de fungos, os mais estudados

como formadores da microbiota intestinal são *Candida*, *Saccharomyces*, *Malassezia* e *Cladosporium* (Auchtung *et al.*, 2018).

O intestino é o local que abriga a maior proporção de células de resposta imune, que podem se alterar em relação à sua quantidade, tendo efeito consequente no estado de saúde ou doença do hospedeiro (Ansaldi; Farkley; Belkaid, 2021; Lynch; Vercelli, 2021; Monasterio; Kuljis, 2023). A composição da microbiota é influenciada por diversos fatores, como dieta, idade, ambiente, uso de antibióticos, genética e estado de saúde (Flandroy *et al.*, 2018). Estas alterações impactam diretamente no desempenho de várias funções essenciais para a manutenção da saúde do hospedeiro, como auxílio na nutrição, promoção de energia, homeostase epitelial intestinal, metabolismo, resposta do sistema imunológico e proteção contra patógenos (Mishima; Abe, 2022).

Os microrganismos presentes na microbiota podem gerar produtos intestinais que alteram o metabolismo do hospedeiro, como toxinas urêmicas, ácidos biliares, N-óxido de trimetilamina (TMAO), AGCC, LPS, óxido nítrico, vitamina K, complexo de vitamina B, neurotransmissores e hormônios (Kazemian *et al.*, 2020).

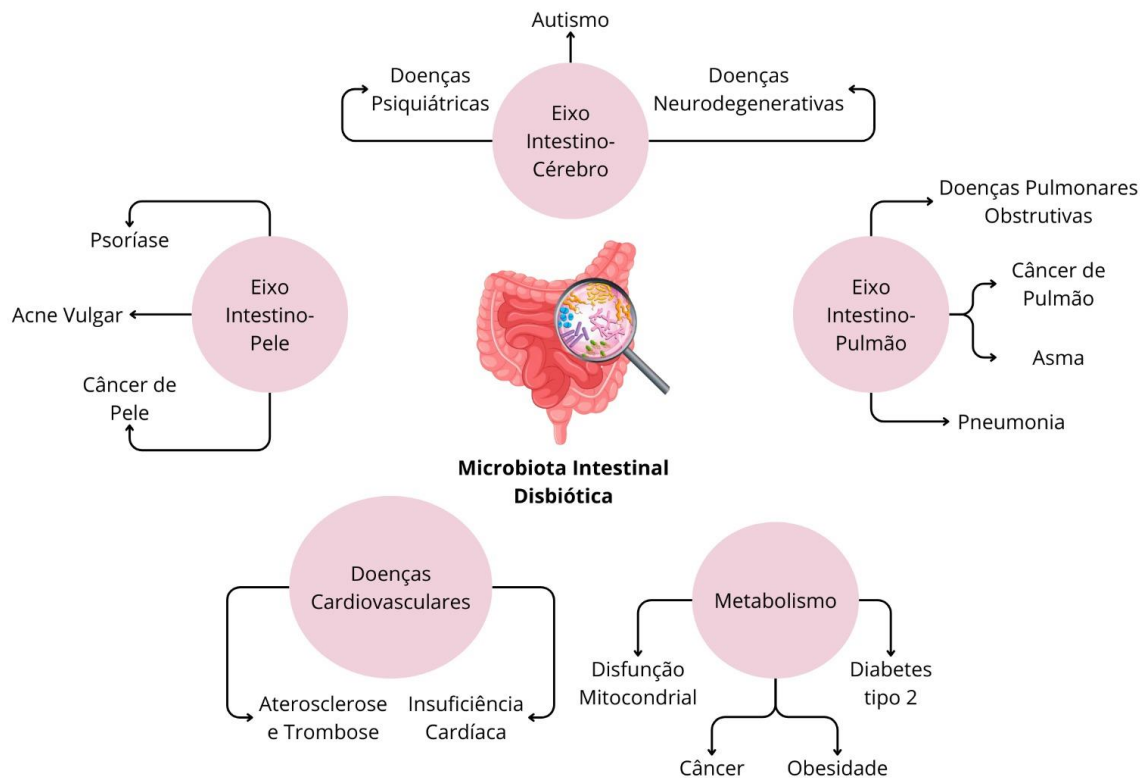
A colonização microbiana precoce da prole ocorre através da transferência vertical da microbiota intestinal da mãe para o recém-nascido (via vaginal ou cesariana e amamentação), sendo capaz de gerar impactos na fase adulta do indivíduo, quando esse “efeito de programação” pode desencadear doenças, como câncer, diabetes, alergia, aterosclerose e doença inflamatória intestinal (Alenghat; Artis, 2014, Paul *et al.*, 2019).

A maioria destes microrganismos não são patogênicos e mantém uma relação simbiótica com o hospedeiro. Ainda, estão normalmente associados com a imunidade do hospedeiro, atuando contra a invasão de agentes patogênicos. No entanto, quando esta microbiota se encontra em desequilíbrio, caracterizado por uma diversidade reduzida e aumento das populações de microrganismos patogênicos, condição conhecida como disbiose, pode ocorrer impacto na saúde, conduzindo para a progressão de muitas doenças por meio das conexões interorgânicas em diferentes eixos (Figura 2) (Afzaal *et al.*, 2022).

A disbiose intestinal é um estado de desequilíbrio na microbiota que pode mediar o desenvolvimento de doenças, comprometendo a permeabilidade intestinal, facilitando a translocação bacteriana e a elevação dos níveis circulantes de LPS e imunoglobulinas M (IgM) e A (IgA). Esses processos ativam vias inflamatórias por meio da ação direta de endotoxinas ou pela ativação de células gliais que expressam receptores Toll-like (RTL). Essa cascata

inflamatória contribui para o surgimento e agravamento de doenças inflamatórias e outras condições crônicas (Tolloto; Saragiotto, 2022).

Figura 2. Disbiose e conexões interorgânicas.



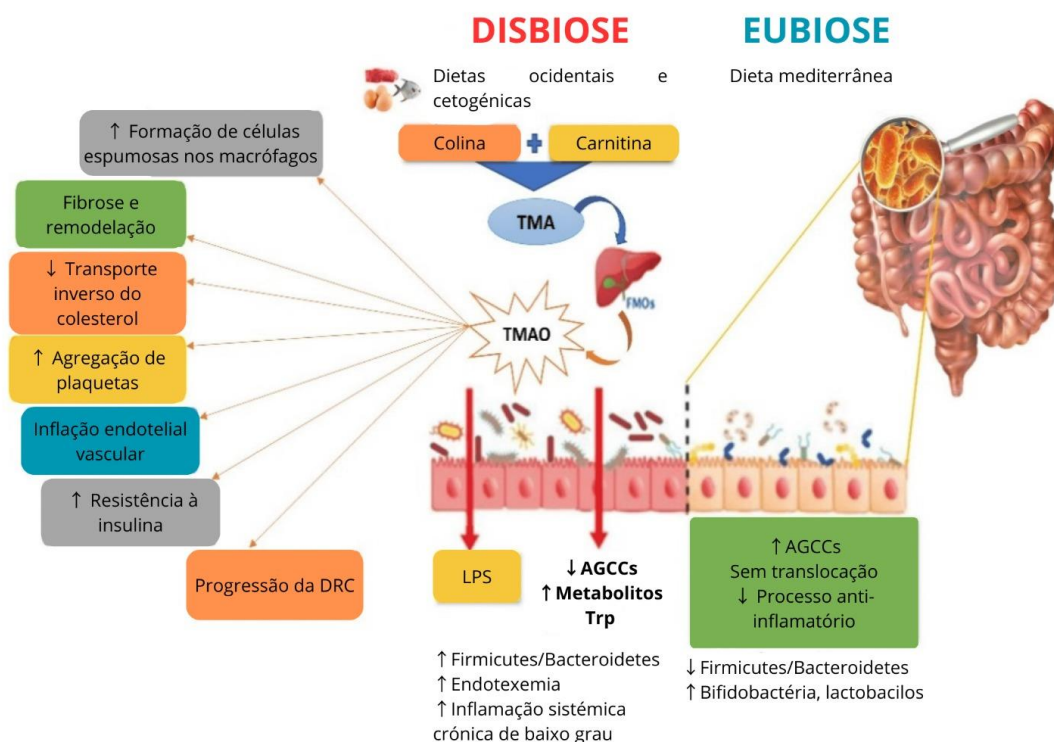
Fonte: adaptado de Gebrayel *et al.* (2022).

Nas últimas duas décadas, resultados de estudos observacionais têm sugerido que as alterações da microbiota intestinal podem perturbar as vias metabólicas e as respostas imunitárias, levando à inflamação crônica e outras complicações (Fan; Pedersen, 2021). Assim, reforça a evidência de que as doenças crônicas estão cada vez mais relacionadas às alterações específicas da microbiota intestinal, contribuindo para a progressão da doença através de mecanismos como a disbiose e a produção de metabolitos nocivos (Durry *et al.*, 2024).

Uma característica comum às doenças crônicas é a diversidade microbiana reduzida, correlacionada também com a predominância ou ausências de alguns filos ou espécies, que são importantes para a manutenção de saúde intestinal e que tem impacto direto na saúde do hospedeiro (Vijay; Valdes, 2022).

A dieta é um dos fatores associados com a diversidade da população microbiana no intestino, de modo que já há comprovação científica que dietas do tipo ocidentais e cetogênicas contribuem para o quadro de disbiose, enquanto dietas mediterrâneas podem contribuir para o estado de eubiose, como pode ser verificado na Figura 3.

Figura 3. O impacto de diferentes dietas sobre a microbiota intestinal.



Fonte: adaptado de Pires *et al.* (2024).

O consumo de uma dieta rica em gordura pode elevar o colesterol sérico, levando ao quadro de hipercolesterolemia e aumentando o risco de doenças cardiovasculares, também conhecidas como doença arterial coronariana, que é uma das principais causas de mortes no mundo (Froyen, 2021).

A microbiota intestinal quando em disbiose pode exercer efeitos que desenvolvem a patogênese da HA, tais como a produção de metabólitos considerados nocivos, como N-óxido de trimetilamina (TMAO) e diversas toxinas urêmicas, que podem promover efeitos pró-ateroscleróticos, pró-trombóticos e pró-inflamatórios. Por sua vez, quando a microbiota

intestinal é modulada de forma benéfica, há a produção de metabólitos, como os AGCC, que podem contribuir para o controle da pressão arterial (Mishima; Abe, 2022).

A microbiota intestinal pode influenciar a doença arterial coronária (DAC) por diferentes vias, que incluem: produção de metabólitos, como o TMAO, fator associado à aterosclerose e ao risco cardiovascular; a interação com o sistema imunológico por meio da inflamação sistêmica, fator fundamental na patogênese da DAC; e, por fim, a modulação dos fatores de risco modificáveis para a DAC por meio da modulação da função endotelial e da pressão arterial (Kazemian *et al.*, 2020).

2.4 HIPERTENSÃO ARTERIAL (HA)

A HA é considerada uma das doenças responsáveis por causar a morte prematura (Organização Mundial da Saúde, 2021). No Brasil, estima-se que, no ano de 2022, mais de 48 mil óbitos tenham ocorrido em consequência de doenças cardíacas causadas pela HA (Moreira *et al.*, 2024).

Em uma análise conjunta de 1201 estudos representativos da população, com 104 milhões de participantes, sobre a tendência mundial na prevalência da HA e progresso no tratamento e controle, de 1990 a 2019, foi observado que o número de pessoas com a doença e idade entre 30 e 79 anos dobrou, onde o número de 331 milhões de mulheres e 317 milhões de homens em 1990 alcançou 626 milhões de mulheres e 652 milhões de homens em 2019. Em contrapartida, esse aumento também contribuiu para a melhora do tratamento e controle na maioria dos países, em destaque para os países de renda média e elevada, incluindo o Brasil (Zhou *et al.*, 2021).

A HA no Brasil foi responsável pelo custo direto de mais de 2 bilhões de reais ao SUS, conforme estimado em 2018. Muitos desses gastos se atribuíram, em maior parte, ao público com faixa etária de 20 a 69 anos, em decorrência do fornecimento de medicamentos, atendimentos ambulatoriais e hospitalizações (Nilson *et al.*, 2020). A HA é uma das doenças que tem aumentado ao passar dos anos, e que se agrava trazendo outras complicações. Embora o SUS disponibilize medicamentos para o seu controle, ainda existe a dificuldade de adesão ao tratamento em razão de muitas pessoas não se adaptarem ao tratamento medicamentoso (Coelho *et al.*, 2022).

Alguns indivíduos preferem recorrer ao tratamento de controle alternativo com o uso de plantas medicinais, fitoterápicos e consumo de alimentos com alegação funcional na HA (Silva

et al., 2022), pois o uso de substâncias naturais tem se mostrado útil para indivíduos pré-hipertensos e hipertensos leves (Schön *et al.*, 2021).

A HA trata-se de uma doença crônica, não transmissível, caracterizada pela elevação persistente da pressão arterial (PA), que ocorre a partir do aumento de volume de sangue contra as paredes das artérias. A longo prazo, a HA causa a vasoconstrição, aumentando a resistência vascular, tornando as artérias mais rígidas e estreitas (Barroso *et al.*, 2021). Conforme as Diretrizes Brasileira, Europeia e da Sociedade Internacional de HA, os valores de referências da pressão arterial sistólica (PAS) e da pressão arterial diastólica (PAD) precisam estar aumentados para caracterizar o quando de HA. A PAS precisa ser igual ou superior a 14 mmHg, enquanto o valor da PAD precisa ser igual ou superior a 90 mmHg (Unger *et al.*, 2020; Barroso *et al.*, 2021; Mancia *et al.*, 2023). O aumento da PA em tempo prolongado promove danos às paredes arteriais, acentuando o risco de doença arterial coronariana (DAC), que pode evoluir para um quadro de agravamento, levando a uma insuficiência cardíaca (IC) (Freitas, 2021).

As lesões ocasionadas às paredes arteriais podem promover a facilitação da instalação de uma doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) a partir do depósito e acúmulo de gorduras, formando placas de ateromas, com a formação de coágulos, que podem levar ao entupimento das artérias do coração, e, assim, promover o enfarto (Martelli *et al.*, 2021; Chiella; Toregeani, 2023).

Os coágulos formados podem se desprender das paredes arteriais, circular em regiões como o cérebro, e se alojar em um vaso do cérebro, bloqueando a circulação do sangue nessa região, o que pode ocasionar acidente vascular encefálico (AVE), também conhecido como acidente vascular cerebral (AVC), seja do tipo isquêmico (AVEI) ou hemorrágico (AVEH) (Barroso *et al.*, 2021).

A elevação da PA também é responsável por causar lesões nas artérias presentes nos rins, que perdem progressivamente sua capacidade de filtrar o sangue, podendo se instalar a insuficiência renal (Russo *et al.*, 2023).

A HA apresenta fatores de riscos que são classificados como modificáveis, como excesso de peso, sedentarismo, tabagismo, consumo de álcool e dieta rica em sódio e potássio; e não modificáveis, como a genética, idade avançada, gênero e até mesmo a etnia (Mills; Stefanescu; He, 2020).

O controle da pressão arterial é realizado a partir do tratamento medicamentoso, conforme a necessidade de cada pessoa hipertensa diagnosticada, com uso de uma das classes de fármacos, que podem ser do tipo diurético, inibidor adrenérgico, de ação central agonistas

alfa-2, alfabloqueadores, betabloqueadores, vaso dilatadores diretos, bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora da angiotensina II ou inibidor direto da renina, tendo como principal objetivo reduzir a morbidade e mortalidade cardiovascular (Silva; Andrade, 2023).

O controle e prevenção da HA ocorre através da adoção de estilo de vida saudável, com a prática de exercício físico, o não consumo de bebidas alcoólicas, o não tabagismo, controle de peso corporal e a adoção de dieta com maior aporte de frutas, vegetais, fontes de proteínas com baixo teor de gorduras e ácidos graxos insaturados, assim como com abordagens dietéticas para a HA (DASH) (Anjos *et al.*, 2021).

A dieta DASH trata-se de uma abordagem que foi desenvolvida pelos Institutos Nacionais de Saúde, como estratégia de intervenção eficaz na prevenção e tratamento da HA e de doenças cardiovasculares (DCV), por apresentar característica dietética focada no consumo de alimentos ricos em potássio, cálcio, magnésio, proteínas e fibras, juntamente das mudanças no estilo de vida, impactando positivamente no controle da pressão arterial (Shoja *et al.*, 2023).

A mudança do estilo de vida de pessoas hipertensas, em estágio inicial, a partir da dieta e prática de exercício físico, é capaz de promover a melhora da PA e da função vascular e endotelial em indivíduos em estágio inicial (Vamvakis *et al.*, 2020). A melhora da PA e da função vascular ocorre devido ao aumento do fluxo sanguíneo, que reduz o estresse oxidativo e aumenta a biodisponibilidade do óxido nítrico por meio de antioxidantes presentes em uma dieta de alto valor nutricional, combinado com a prática exercícios regulares (Man; Li; Xia, 2020).

A HA é uma doença comumente associada com o envelhecimento e a menopausa devido a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico, que leva à redução dos níveis de L-arginina (L-ARG) e contribui para a disfunção endotelial, precedendo a rigidez arterial e o desenvolvimento de HA (Klawitter *et al.*, 2017; Maharaj *et al.*, 2022).

A literatura científica tem apresentado resultados que indicam impacto eficaz na modulação da funcionalidade endotelial e da PA em diferentes grupos a partir de estratégias de intervenção dietética prolongada com alto teor de nitrato ou o consumo de suplementos de nitrato e extratos padronizados rico em compostos fenólicos (Van Der Avoort *et al.*, 2021; Schön *et al.*, 2021).

A exemplo, os resultados de um estudo que investigou os efeitos sinérgicos do suco de toranja e do suco de beterraba na redução da PA indicaram que, embora o suco de beterraba reduza a PAS por meio da via NO, a adição de suco de toranja ao de beterraba aumentou o

efeito. Esse efeito foi relacionado à presença de furanocumarina, um composto orgânico que inibe o citocromo P450-3A4 (enzima), evitando a reoxidação do nitrito em nitrato (O'Gallagher *et al.*, 2021).

As intervenções dietéticas prolongadas com alto teor de nitrato ou consumo de suplementos de nitrato padronizados em compostos fenólicos também são tidas como promissoras na modulação da microbiota intestinal por estimularem o crescimento de populações microbianas, que favorecem o melhoramento da saúde intestinal por meio de vários mecanismos, incluindo a produção de AGCC (Zhang *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2024).

A relação entre a microbiota intestinal e a hipertensão tem despertado cada vez mais interesses no meio científico para elucidar as interações complexas e como podem impactar na regulação da HA. A alteração da composição do microbioma intestinal pode influenciar no desenvolvimento da doença através das vias metabólicas e mecanismos de sinalização (Lai *et al.*, 2024).

Os Firmicutes e Bacteroidetes são filos já afirmados na literatura como essenciais para a homeostase metabólica e com potencial para atuação como biomarcador de HA (Bellegarde *et al.*, 2024). A alteração entre as espécies microbianas afeta a produção de metabólitos, como colina e AGCC, que impactam na resposta imune, metabolismo do colesterol e funções vasculares, influenciando diretamente na regulação da PA (Olalekan *et al.*, 2024).

Eubacterium, *Klebsiella*, *Ruminococcus* e *Parabacteroides* são gêneros associados com anormalidade metabólicas, cujas interações impactam na produção de metabólitos, como colina, betaína e metanotiol, afetando a regulação da pressão arterial, inflamação e disfunção endotelial (Lai *et al.*, 2024).

A modulação da microbiota intestinal a partir do uso de probióticos, prebióticos e pós-bióticos (por exemplo, AGCC) tem sido considerada uma estratégia de intervenção terapêutica não farmacológica para o controle da PA e tratamento da HA (Mishima; Abe, 2022).

Dessa forma, há a necessidade de buscar alternativas dietéticas eficientes para a diminuição da prevalência de HA. O consumo de alimentos prebióticos e de efeitos prebióticos, como as fibras e compostos bioativos, a exemplo dos fenólicos, presentes nas diferentes partes da beterraba, podem estimular o crescimento de bactérias benéficas da microbiota intestinal e produzir metabólitos, como ácidos graxos e flavonoides, que emergem como estratégias adjuvantes complementar e promissoras no controle da doença, a partir da ação hipotensiva em indivíduos com HA, por meio da produção de óxido nítrico e modulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, referindo-se às condições experimentais em vidrarias (Klein; Hutmacher, 2024). Esse modelo de estudo avaliou a capacidade de diferentes partes da beterraba vermelha de causar alterações na composição e atividade metabólica da microbiota intestinal de indivíduos adultos com diagnóstico de HA.

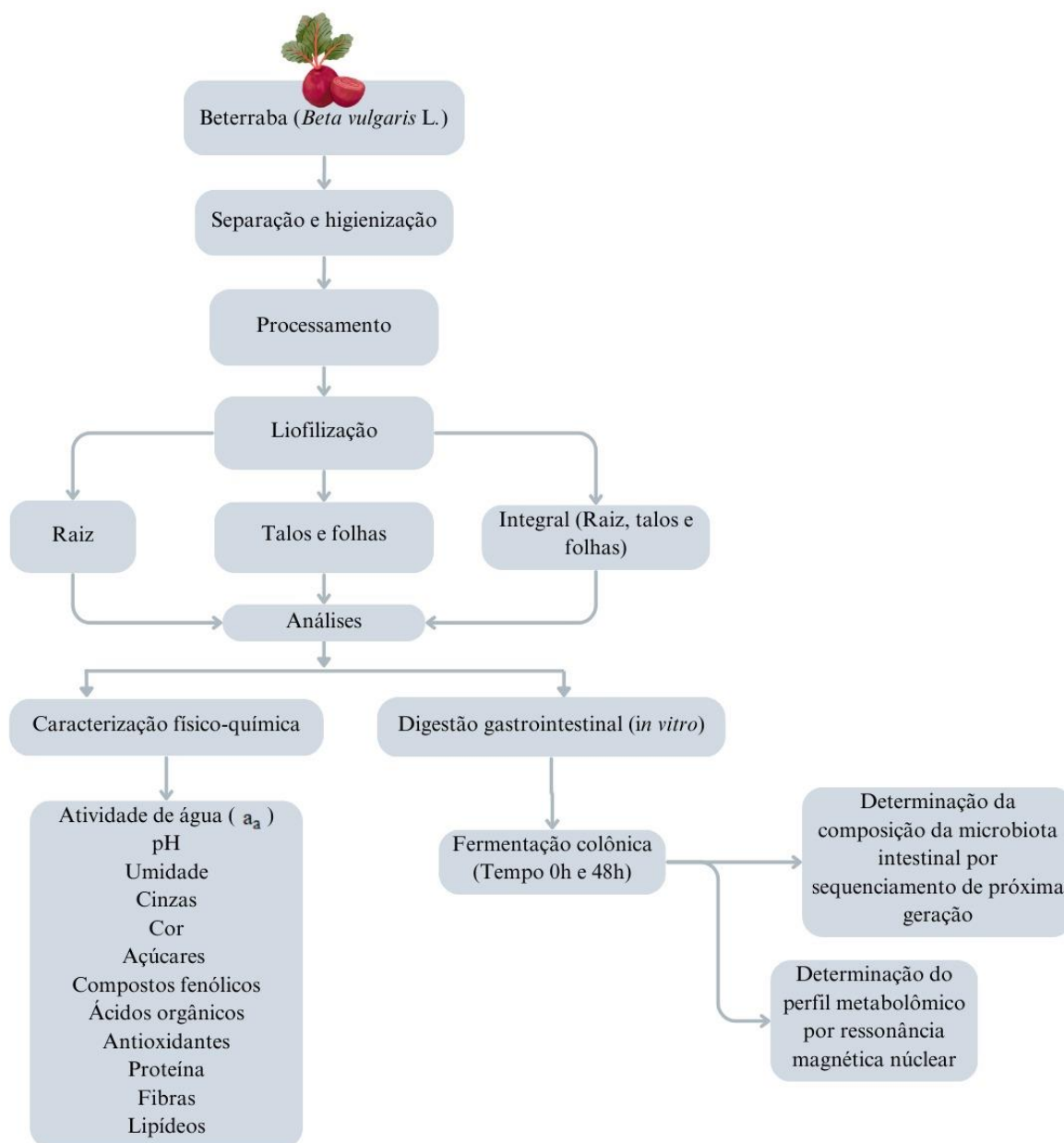
3.2 LOCAL DO ESTUDO

Parte das análises foram realizadas em laboratórios da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), a saber: Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA) e o Laboratório de Bromatologia (LABROM), vinculados ao Departamento de Nutrição (DN), Centro de Ciências da Saúde (CCS); Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA), vinculado ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM - UFPB); e Laboratório Multiusuário de Qualidade em Alimentos (LMQA) e Laboratório de Análises Químicas de Alimentos (LAQA), vinculados ao Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia (CT).

Outra parte foi realizada no Laboratório Experimental de Alimentos (LEA), vinculado ao Departamento de Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Sertão Pernambucano (IF Sertão-PE), Petrolina – PE.

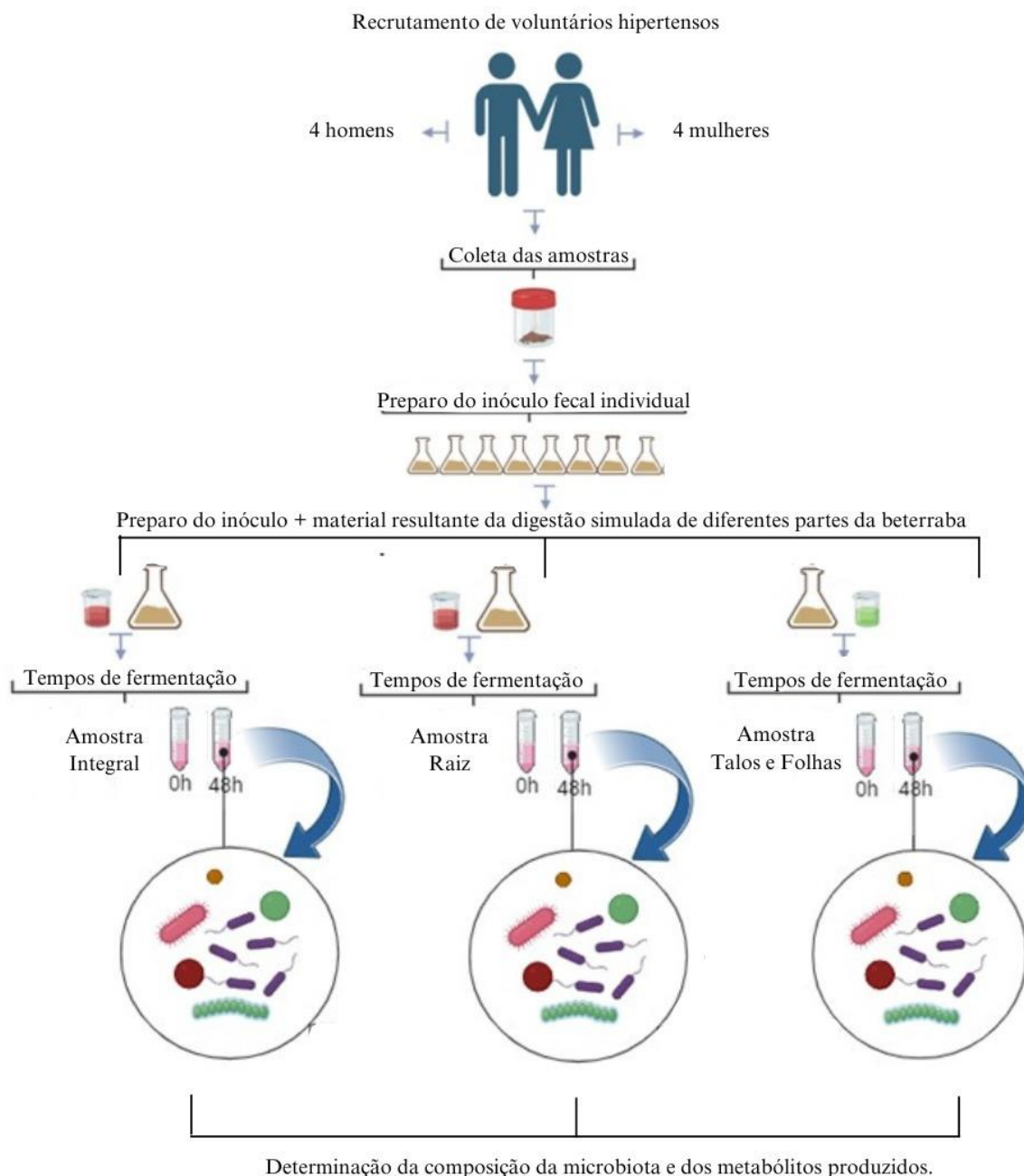
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A partir da aquisição das beterrabas, foram realizadas as separações das raízes dos talos com as folhas, para que fossem executadas as etapas subsequentes, que se iniciaram pelo processamento e liofilização das diferentes partes dos vegetais. Os diferentes materiais liofilizados foram utilizados para caracterização dos parâmetros físico-químicos, seguido por digestão gastrointestinal *in vitro* Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma experimental

As amostras obtidas após a digestão simulada, das diferentes partes da beterraba, foram testadas em ensaios de fermentação com inóculo fecal, preparado a partir de fezes doadas por quatro homens e quatro mulheres com diagnóstico de HA, como ilustrado na Figura 4. Durante os ensaios de fermentação colônica, em cada sistema de fermentação foram reservadas 7 alíquotas para análises de pH, sequenciamento do gene 16s rRNA, RMN, determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Figura 5 – Processo de fermentação colônica *in vitro*.



Fonte: Autora (2024)

As amostras de fezes de indivíduos com HA foram doadas por voluntários residentes na cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil, após a autorização de coleta e análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal da Paraíba, e utilizadas nos ensaios de fermentação colônica das diferentes partes da beterraba, seguindo para a análise de composição e atividade metabólica da microbiota intestinal. O

monitoramento de indicadores de atividade metabólica (pH e metabolômica) do sistema de fermentação foi realizado nos tempos 0 e 48 h de fermentação.

3.4 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS DE BETERRABA

Para o desenvolvimento desse estudo, foram adquiridos, no mês de agosto de 2023, aproximadamente 5 Kg de beterraba com talos e folhas, diretamente de um cultivo orgânico de base comunitária, na comunidade quilombola Senhor do Bonfim, município de Areia, localizada na região do Brejo Paraibano, Brasil.

As beterrabas adquiridas foram da cultivar Fortuna, variedade de médio porte, com alta germinação, fazendo com que o seu plantio seja popular entre os produtores. O ciclo médio de produção da variedade é de aproximadamente 80 dias, com boa adaptação ao solo e ao clima local, além de resistência às diversas doenças de cultivo, permitindo o cultivo orgânico.

3.5 PREPARAÇÃO DAS DIFERENTES PARTES DA BETERRABA

Após a aquisição, as beterrabas foram lavadas em água corrente e imersas em solução de hipoclorito de sódio (150 ppm) por 15 minutos, seguido por enxágue em água potável corrente. As beterrabas higienizadas foram fracionadas em raiz e talos e folhas, que prontamente foram processados em processador elétrico doméstico (velocidade 1, PowerChop plus, Philips Walita, Varginha, MG, Brasil) usando um disco ralador de 1,2 mm. Todo o material foi acondicionado em pratos plásticos e congelados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, e, subsequentemente, submetidos ao processo de liofilização (temperatura $-55 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, pressão do vácuo $<138\mu\text{Hg}$, velocidade 1 mm/h) por, aproximadamente, 27 horas, usando liofilizador de bancada (modelo L-101, LIOTOP, São Carlos, SP, Brasil). Para o estudo, três amostras liofilizadas foram obtidas, sendo (i) liofilizado da raiz da beterraba (LBR), (ii) liofilizado dos talos e folhas da beterraba (LBTF), misturados em igual proporção (1:1 p/p), e (iii) liofilizado da beterraba integral (LBI) misturados em igual proporção de talos, folhas e raiz (1:1:1 p/p). O material seco foi acondicionado em sacos de polietileno laminado e armazenado sob refrigeração ($4 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) até uso nos experimentos.

3.6 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS E FÍSICO-QUÍMICOS

LBR, LBTF e LBI foram analisados usando procedimentos padrão (AOAC, 2019) para obter a atividade de água (método 978.18) medida com um instrumento AquaLab Série 3TE (Decagon, São José dos Campos, SP, Brasil), valores de pH (método 981.12) determinados com um potenciômetro digital (Q400AS, Quimis, São Paulo, SP, Brasil), os teores de umidade (método 983.18), cinzas (método 935.46), proteínas determinados pelo método de Kjeldahl (método 935.58) e os teores de lipídios determinados pelo método de Folch, Lees e Sloane-Stanley (1957). Os teores de fibras insolúveis e solúveis foram determinados por um método enzimático-gravimétrico (Tobaruela *et al.*, 2018). A cor instrumental foi determinada com base no sistema CIELab (L^* , a^* e b^*) usando um colorímetro portátil (CR/10, Konica Minolta, Japão) (CIE, 1986).

3.6.1 Determinação da atividade de água

A medição da atividade de água (a_a) foi realizada por meio da disposição de cada uma das amostras do liofilizado da beterraba (média de 1 g) até preencher o suporte de leitura do equipamento Aqualab (Modelo 4TEV, Meter[®], São José dos Campos, SP, Brasil), com leitura direta a 25 ± 1 °C (AOAC, 2019).

3.6.2 Determinação do pH

Para realização do método foram pesados 5 g de cada amostra em triplicata, em balança analítica (Marte[®], Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil), o qual foi diluído em 50 mL de água destilada (1:10) e filtrado em papel filtro quantitativo (C41 faixa preta, Unifil[®], 185 mm, 504.118, Alemanha). O volume foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 125 mL e feita a leitura direta utilizando potenciômetro com eletrodo de vidro combinado (modelo Q400AS, Quimis[®], São Paulo, SP, Brasil), previamente calibrado com soluções tampão com valores de pH 7 e 4 (AOAC, 2019).

3.6.3 Caracterização da cor

Para poder expressar o espaço de cor das amostras do LBR, LBTF e LBI mediante as coordenadas de luminosidade (L^*), coordenada vermelho/verde (a^*), (onde “+a” indica vermelho e “-a” indica verde) e coordenada amarelo/azul (b^*) (onde “+b” indica amarelo e “-b” indica azul), colocou-se cada amostra em um suporte colorímetro preenchendo toda a área para então realizar a análise utilizando colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta[®], Osaka, Japão), medindo a luz refletida e assim obtendo os valores L^* , a^* e b^* .

3.6.4 Determinação de umidade

Para o procedimento de secagem direta para obtenção do valor de umidade, foram pesados, separadamente, 2 g da amostra de LBR, LBTF e LBI em cápsula de porcelana, previamente tarada. Em seguida, foram colocadas na estufa a 105 °C e mantidas por três horas. Após o tempo em estufa, foram levadas para resfriamento em dessecador até alcançar a temperatura ambiente e, em seguidas, foram pesadas consecutivamente até que o peso final fosse estabilizado.

O valor final da análise de umidade foi encontrado após o cálculo expressado pela fórmula logo abaixo:

$$\% \text{ UMIDADE} = 100 \times N / P$$

Quadro 2. Descrição da fórmula de umidade

Sigla	Descrição
N	Peso em gramas de umidade (perda de massa em g)
P	Peso em gramas da amostra

Os resultados foram expressos em percentual (AOAC, 2019).

3.6.5 Determinação de cinzas

O conteúdo de cinzas corresponde a toda a matéria orgânica a qual foi submetida a queima em forno de alta temperatura (mufla), restando apenas o resíduo inorgânico, que se refere às cinzas.

Inicialmente, as amostras de LBR, LBTF e LBI foram carbonizadas e em seguida incineradas em forno mufla (modelo EDG3PS, Tecnal[®], São Carlos, SP, Brasil) a 550 °C, com aumento gradativo de 50 °C a cada 30 minutos até atingir a temperatura de referência. Após a formação das cinzas, o material foi retirado do forno mufla (Tecnal[®]), resfriados em dessecador durante cerca de 30 minutos, até atingir temperatura ambiente, próximo aos 25 °C, e pesados em balança analítica (Marte[®]). Os dados foram aplicados à fórmula seguinte.

$$\% \text{ CINZAS} = 100 \times (P2 - P1) / P$$

A seguir está a quadro com a sigla presente na fórmula e sua descrição

Quadro 3. Descrição da fórmula de cinzas

Sigla	Descrição
P2	Peso em gramas do cadinho após a formação das cinzas
P1	Peso em gramas do cadinho tarado
P	Peso em gramas da amostra ou branco

Os resultados foram expressos em percentual (AOAC, 2019).

3.6.6 Determinação de proteínas

Para a determinação de proteínas foi utilizado o método de Kjeldahl, que decorreu em três etapas (digestão, destilação e titulação) de maneira a determinar o teor de nitrogênio orgânico em uma amostra, para ao final calcular o seu teor de proteína total. A primeira etapa consistiu na digestão a partir do contato da amostra com o ácido sulfúrico P.A. e um catalisador, aquecidos a em alta temperatura (cerca de 350 °C), permitindo que o nitrogênio seja transformado em sal amoniacal. A segunda etapa decorreu a destilação, em que a amônia é liberada do sal amoniacal pela reação com hidróxido de sódio a 40% e recepcionada em solução de ácido bórico a 4%. Já na terceira e última etapa decorreu o processo de titulação com ácido clorídrico a 0,1 N, onde o teor de nitrogênio é determinado pelo ponto de viragem.

Para tanto, pesou-se 1 g de cada amostra diretamente no tubo digestor de Kjeldahl utilizando balança analítica (Marte[®], Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil). Em seguida, os tubos foram levados para dentro de uma capela com exaustão, onde foi adicionada a mistura catalítica, seguido de 7 mL de ácido sulfúrico P.A e aquecimento dos tubos em um digestor de nitrogênio (modelo TE-040/25, Tecnal[®], Piracicaba, SP, Brasil) até que alcançassem a temperatura de 350 °C. A finalização do processo de digestão se deu quando a amostra alcançou uma tonalidade esverdeada, indicando que todo material havia sido digerido.

Passado esta etapa, o digestor foi desligado de modo com que as amostras digeridas atingissem a temperatura ambiente, para que então fossem levadas ao destilador de nitrogênio (modelo TE-0364, Tecnal[®], Piracicaba, SP, Brasil), onde foi feita a adição de hidróxido de sódio a 40%, transformando o sal amoniacal em hidróxido de amônio, que foi condensado e recepcionado em frasco Erlenmeyer contendo 25 mL de ácido bórico a 4% (contendo a mistura de indicadores – vermelho de metila a 0,1% e verde de bromocresol a 0,05%), até 2/3 do volume inicial de ácido bórico (75 mL, no total). Após a etapa de destilação, o conteúdo resultante do processo foi titulado com ácido clorídrico a 0,1 N.

Por fim, os valores encontrados na titulação foram aplicados conforme a equação abaixo, expressos em percentual, onde o valor adotado para FC foi de 5,75 por se tratar de amostras de origem vegetal (IAL, 2008).

$$\% \text{ Proteína totais em g/100g} = V \times f \times F \times 0,14g/P \quad (1)$$

Quadro 4. Descrição da fórmula

Sigla	Descrição
V	Volume de ácido clorídrico 0,1 N gasto na titulação
f	Fator de correção do HCl
F	Fator de conversão do nitrogênio em proteína
P	Peso em gramas da amostra

3.6.7 Determinação de lipídios

Para obter o teor lipídico foi utilizado o método de Folch, Lees e Sloane-Stanley (1957), o qual consiste na extração a frio de lipídios totais de amostras. Para tanto, utilizou-se um béquer de 50 mL, o qual foi previamente secado por uma hora em estufa a 105 °C, e, posteriormente, foi adicionado em um dessecador para resfriá-lo e pesá-lo. Em seguida, para cada frasco Erlenmeyer de 125 mL, foram pesados aproximadamente 2 g de cada uma das amostras de beterraba liofilizada. Foram adicionados 30 mL da solução de clorofórmio:metanol (2:1) e levado ao homogeneizador por dois a três minutos. Logo após, foi filtrado o conteúdo do frasco Erlenmeyer diretamente em uma proveta. Posteriormente, foi verificado o volume do extrato filtrado e adicionado 20% desse volume de solução de sulfato de sódio a 1,5 %. A proveta foi agitada e tampada. Em seguida, foi aguardado um tempo necessário para que houvesse a separação das fases e anotado precisamente o volume da fase inferior do extrato lipídico. A fase superior foi descartada com o auxílio de uma pipeta, e, em seguida, com uma pipeta volumétrica, uma alíquota de 5 mL da fase inferior foi coletada e transferida para o béquer que tinha sido previamente seco. Logo após, o béquer foi transferido para estufa a aproximadamente 90 °C para a evaporação dos solventes.

Para calcular a porcentagem de lipídios, utilizou-se a seguinte equação (Folch, Lees e Sloane-Stanley, 1957):

$$\text{Lipídios (\%)} = \frac{(P2 - P1) \times Vi}{Va \times P} \times 100$$

(2)

Quadro 5. Descrição da fórmula de lipídios

Sigla	Descrição
P1	Peso inicial do Becker
P2	Peso final do Becker
Vi	Volume inferior lido na proveta
Va	Volume da alíquota tomada
P	Peso da amostra

3.6.8 Determinação de fibras solúveis, insolúveis e totais

Para a determinação de fibras solúveis e insolúveis, conforme o método descrito por Tobaruela *et al.* (2018), foi realizada a higienização dos cadinhos de Gooch. Os cadinhos foram imersos em uma solução de NaOH a 4% por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, foram enxaguados com água corrente e, posteriormente, com água destilada. Para finalizar o processo, 15 mL de acetona foram aplicados na parte interna dos cadinhos, permitindo a secagem em temperatura ambiente.

3.6.8.1 Fibras insolúveis

Para análise de fibras insolúveis, 1 g de amostra de LBR, LBTF e LBI foi pesado em duplicata, utilizando uma balança analítica (Marte[®], Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil). As amostras foram transferidas para béqueres de 500 mL, juntamente com dois béqueres adicionais para controle (brancos).

Em cada béquer foram adicionados 40 mL de solução MES-TRIS (pH 8,2) e ajustado o pH para 6,0 utilizando solução de NaOH a 0,275 N ou HCl a 0,325 N. Adicionaram-se 50 µL da enzima α -amilase termorresistente (TDF 100A, Sigma Aldrich[®], St. Louis, MA, EUA) e os béqueres foram cobertos com papel alumínio e incubados em banho ultratermostatizado (SP-152/10, Splabor[®], Presidente Prudente, SP, Brasil) a 100 °C por 30 minutos, com agitação manual a cada 5 minutos.

Após o resfriamento para 60 °C, foram adicionados 100 µL de solução enzimática de protease (50 mg/mL, Sigma Aldrich[®]) e as amostras foram incubadas novamente por 30 minutos a 60 °C. Posteriormente, 5 mL de HCl a 0,561 N foram incorporados para ajuste do pH

entre 4,1 e 4,8, seguido pela adição de 200 μ L de amiloglicosidase (Sigma Aldrich®). A mistura foi incubada a 60 °C por mais 30 minutos.

A solução foi filtrada nos cadinhos de Gooch previamente preparados, utilizando sistema de vácuo. Após a filtração, os cadinhos foram lavados com água destilada a 70 °C (10 mL, duas vezes), seguidos de lavagens com etanol 95% (4 volumes de 15 mL). O material foi deixado em repouso por 12 horas à temperatura ambiente para precipitação das fibras solúveis.

Os cadinhos utilizados foram lavados três vezes, sendo duas vezes com etanol a 95% (10 mL cada) e uma com acetona PA (10 mL). Em seguida, foram secos em estufa a 105 °C (overnight), resfriados em dessecador e pesados.

3.6.8.2 Fibras solúveis

A solução precipitada após o repouso foi filtrada utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente. Durante a filtração, os cadinhos foram lavados com etanol a 78% (15 mL, duas vezes), seguido de lavagens com etanol a 95% e acetona PA (15 mL cada).

Após a filtração, os cadinhos foram secos em estufa a 105 °C, resfriados em dessecador e pesados para análises de proteínas e cinzas. A determinação de proteínas foi realizada pelo método de micro-Kjeldahl (item 3.6.6), enquanto a análise de cinzas seguiu o procedimento descrito no item 3.5.5.

3.6.8.3 Fibras totais

O teor de fibra alimentar total foi obtido pela soma dos teores de fibras insolúveis e solúveis, expressos em 100 g de amostra, conforme o método de Tobaruela *et al.* (2018).

3.6.9 Quantificação de betalaínas

Para a determinação do teor de betalaínas, um extrato aquoso (1%, p/v) foi preparado e macerado por congelamento por aproximadamente 12 horas. Depois de descongelar, o extrato aquoso foi centrifugado duas vezes ($8536 \times g$, 20 minutos, 4 °C), o sobrenadante (1 mL) foi diluído com água destilada (24 mL) e as leituras de absorbância (538 nm e 476 nm) foram realizadas em triplicata em espectrofotômetro (Biotek Multi-Detecção Synergy HTX, Winooski, VT, EUA). As absorções de luz em 538 nm e 476 nm foram usadas para calcular o conteúdo de betacianinas e betaxantinas (mg/100 g), respectivamente. A absorção a 600 nm foi medida para corrigir a ocorrência de pequenas impurezas. O conteúdo total de betalaínas foi expresso como a soma de betacianinas e betaxantinas (Nilsson, 1970; Von Elbe, 2001).

3.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO GLOBAL POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Para a determinação do perfil metabólico global por RMN, 0,1 g das amostras de LBR, LBTF e LBI foi diluído em proporção 1:1 em solução de solvente (9:1, v/v), composta por 9 µL de metanol grau CLAE (CH₃OH) e 1 µL de óxido de deutério (D₂O) contendo ácido trimetilsililpropanóico (TSP) como padrão interno. A mistura foi submetida à limpeza em banho ultrassônico por 30 minutos, seguida de centrifugação (MPW[®], 10.000 × *g*, 10 minutos, 4 °C). Após esse processo, o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de éster de celulose com porosidade de 0,45 µm (Millipore[®], Darmstadt, Alemanha). Posteriormente, 1 mL da solução de solvente foi misturado a 1 mL da amostra filtrada. A mistura foi homogeneizada manualmente e transferida para um tubo de alta performance para RMN (5 mm × 178 mm) do modelo Sample Jet (Winng 10007 sj - 100 EA), preparado para análise de ressonância.

O ensaio de RMN foi efetuado no equipamento Bruker Ascend 400, operando a 400 MHz para RMN de ¹H e 100 MHz para RMN de ¹³C (Bruker, Billerica, MA, EUA), tendo sido utilizados os seguintes parâmetros: sequência do espectro: Lc1D12gp - editado, com sequência de pulsos para dupla supressão, suprimindo assim a água e o metanol presentes na amostra; temperatura: 26 °C; número de varreduras: 64; dummer scan: 4; ganho do recetor: 36; e tempo de aquisição: 2,04 segundos (Sampaio *et al.*, 2022). Os espectros 1D ¹H-NMR foram processados utilizando o software MetaboLabPy. Todos os conjuntos de dados 1D foram preenchidos com 0 a 32.768 pontos de dados antes da transformação de Fourier. O desvio químico foi calibrado referenciando o sinal TSP a 0 ppm. Os espectros 1D foram corrigidos manualmente em fase e a correção da linha de base em lote foi obtida utilizando uma função spline, exportada para o formato Bruker para identificação e quantificação de metabolitos utilizando o Chenomx 9.0.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A execução dessa análise se deu por meio de hidrólise ácida das amostras, onde 2 g de cada amostra (LBR, LBTF e LBI) foram acidificadas com HCl 0,1 M (Neon, Suzano, São Paulo, Brasil) para atingir pH 2, seguindo-se por mistura com 10 mL de metanol (Neon):água destilada (70:30, v/v) e tratamento com ultrassom (60 minutos, 37 kHz, 30 °C). A solução foi

centrifugada ($4000 \times g$, 15 minutos, 4°C) e o sobrenadante foi filtrado com filtro de tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$ (Whatman®).

Para a separação e quantificação dos compostos fenólicos foi utilizado cromatógrafo Agilent (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies) equipado com bomba quaternária de solventes (modelo G1311C), desgaseificador, compartimento termostático da coluna (modelo G1316A) e amostrador automático (modelo G1329B), juntamente com detector de matriz de diodos (DAD) (modelo G1315D) e detector de índice de refração (DIR) (modelo G1362A). As condições analíticas foram: pré-coluna Zorbax C18 ($12,6 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) (Zorbax, EUA) e coluna Zorbax Eclipse Plus RP-C18 ($100 \times 4,6 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$) utilizadas para a separação cromatográfica dos compostos fenólicos. A fase móvel foi uma solução de água acidificada com ácido fosfórico a $0,1 \text{ M}$ ($\text{pH } 2,0$, fase A) e metanol acidificado com ácido fosfórico a $0,5\%$ (fase B) com taxa de fluxo de $0,8 \text{ mL/minutos}$. Os dados foram processados com o software OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies). Os picos das amostras de CLAE foram identificados comparando seus tempos de retenção com aqueles encontrados para os padrões de compostos fenólicos (Sigma Aldrich). Foram realizadas injeções duplicadas e as áreas médias dos picos foram usadas para quantificação dos compostos fenólicos identificados, expressando os resultados em mg/g (dos Santos Lima *et al.*, 2024).

3.9 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FDBR, FDBSL E FDWB

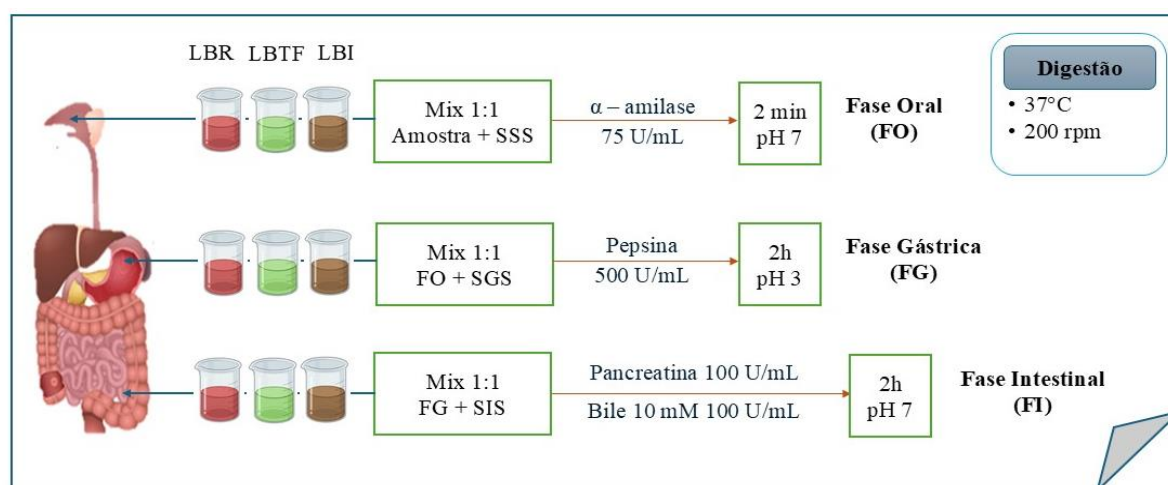
A capacidade antioxidante foi avaliada através de três métodos: ABTS^{•+} (capacidade de eliminação do radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (Re *et al.*, 1999); capacidade de eliminação do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Brand-Williams, Cuvelier; Berset, 1995); e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) através da redução do ferro férrico (Fe^{3+}) (Benzie; Strain, 1996). Extratos aquosos de LBR, LBTF e LBI com diluição de 1:50 (p/v) foram utilizados nas análises de ABTS e DPPH, utilizando uma curva padrão de Trolox, e os resultados foram expressos em μmol de equivalentes de Trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol/g}$). Já extratos com uma diluição de 1:200 (p/v) foram utilizados na análise FRAP, usando uma curva padrão de sulfato ferroso, e os resultados foram expressos em μmol de sulfato ferroso por grama de amostra ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$). As análises foram realizadas à temperatura ambiente ($27^\circ \pm 1^\circ\text{C}$), em local protegido da luz. As medições de absorvância foram efetuadas em espectrofotômetro de microplacas (BioTek Eon, Winooski, VT, EUA) a 734 nm (ABTS), 517 nm (DPPH) e 595 nm (FRAP).

3.10 DIGESTÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

Foi empregado um processo estático de digestão gastrointestinal *in vitro*, simulando os compartimentos oral, gástrico e intestinal, com o objetivo de transformar as amostras de LBR, LBTF e LBI em materiais semelhantes àqueles que alcançam o cólon e podem ser fermentados pela microbiota colônica. O procedimento foi realizado com base no protocolo padronizado por consenso internacional, desenvolvido pela Rede COST Infogest (Figura 5 e Figura 6) (Minekus *et al.*, 2014). Todas as enzimas e reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

No final da digestão simulada, o material resultante foi submetido a diálise numa membrana de celulose regenerada de 1 kDa de peso molecular (Spectra/Por® 6, Spectrum Europe BV, Breda, Países Baixos), previamente hidratada durante trinta minutos em água destilada aquecida a 60 ± 1 °C (de Albuquerque *et al.*, 2021). As membranas contendo o material digerido foram dialisadas contra uma solução de NaCl a 0,01 M e incubadas a $5 \pm 0,5$ °C para remover os produtos da digestão de baixo peso molecular. Após 15 h, os fluidos de diálise foram mudados e a diálise continuou durante mais 2 h (Figura 7). As amostras dialisadas foram congeladas a -20 °C durante 24 horas e liofilizadas (temperatura -55 ± 2 °C, pressão do vácuo $<138\mu\text{Hg}$, velocidade 1 mm/h) por 30 horas. O LBR, LBTF e LBI digeridos, dialisados e liofilizados foram armazenados em embalagens texturizadas de nylon-poli coextrudido, com ranhuras, à vácuo, resistentes a perfurações, e utilizados em ensaios de fermentação do cólon.

Figura 5 – Digestão *in vitro*.



Fonte: Autora (2025).

Figura 6 – Processo de digestão simulada *in vitro*.



Legenda *

SSF: Solução Salivar Final

SGF: Solução Gástrica Final

SIF: Solução Intestinal Final

Fonte: Autora (2024)

Figura 7 – Amostras em diálise após 16 horas.



Fonte: Autora (2024)

3.11 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PREBIÓTICOS UTILIZANDO INÓCULO FECAL

3.11.1 Procedimentos éticos

Considerando as exigências do Conselho Nacional de Saúde, este estudo foi submetido à apreciação e aprovado (Parecer número 6.597.919) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do CCS/UFPB (Anexo A), tendo em vista a utilização de material biológico proveniente de fezes humanas, conforme a declaração de Helsinque e Resolução nº 466/12 (BRASIL, 2012), que aprovam as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

3.11.2 Recrutamento de doadores

O recrutamento foi realizado a partir de um processo de busca e identificação de pessoas voluntárias residentes na cidade de João Pessoa - PB, com diagnóstico de HA e que atendiam aos critérios de inclusão. Em seguida, foi feito o convite aos doadores para participação na pesquisa, os quais foram informados quanto ao protocolo de pesquisa, esclarecidos sobre objetivo do estudo, e a relevância da pesquisa na saúde.

As abordagens foram realizadas pessoalmente. No primeiro momento, foi feita uma breve apresentação, com identificação da pesquisadora discente do Programa de Pós-Graduação de Ciências da Nutrição da UFPB, que informou os objetivos do contato, explicou o procedimento do estudo, esclareceu eventuais dúvidas, verificou a disponibilidade e interesse do participante em responder a um breve formulário de anamnese (Apêndice A). O formulário buscava coletar informações sobre o histórico de saúde e hábitos de vida, que, uma vez aceito o convite, foi solicitado a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice B).

O formulário foi composto por perguntas claras, objetivas e respeitosas, evitando perguntas que pudessem constranger ou ofender o participante. As respostas dos participantes, foram confidenciais, de conhecimento apenas da pesquisadora discente, as quais foram utilizadas apenas para avaliar a viabilidade como potencial doador do material a ser coletado, em conformidade com os critérios de inclusão.

Os critérios de inclusão foram: indivíduos entre 20 e 59 anos de idade, seguindo uma dieta onívora, sem antecedentes de comorbidades associadas (ex.: diabetes melitus tipo 2, obesidade, dislipidemias, doenças hepáticas e câncer intestinal); sem presença de doenças do sistema digestório previamente reportadas (Doença de Crohn e colite ulcerativa); sem ter feito

uso concentrado de prebiótico, probiótico, simbiótico ou antibióticos nos últimos seis meses anteriores; sem diagnóstico de doenças renais; doenças autoimunes; que não fossem tabagistas, crianças, idosos e gestantes.

Ao final da abordagem, a pesquisadora agradeceu a participação do entrevistado, que, ao verificar viabilidade de participação, conforme os critérios de inclusão propostos, informou os próximos passos. Em seguida, foi realizado um novo contato para agendamento prévio de novo encontro, respeitando a disponibilidade e preferência de horário do participante, para entrega do kit de coleta, orientação quanto à manipulação e cuidados com o material e agendamento para recolhimento do material.

3.11.3 Coleta das amostras fecais

As amostras fecais foram adquiridas de oito voluntários adultos, sendo quatro homens e quatro mulheres, residentes na cidade de João Pessoa, com diagnóstico de HA, com faixa etária entre 20 e 59 anos de idade.

Foi disponibilizado para cada doador, um kit para coleta, constituído por uma caixa de isopor pequena, para transporte dos frascos coletores, frascos coletores esterilizados, luvas, prato e espátula descartável, além de álcool a 70%, onde todos foram instruídos quanto ao manuseio asséptico das amostras. As amostras foram coletadas em até 30 minutos após a excreção, e, após recebimento, foram acondicionadas em jarra de anaerobiose (Anaerobar, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) contendo gerador de gás anaeróbico (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e utilizadas imediatamente (Rodrigues *et al.*, 2016).

Parte das amostras fecais coletadas de cada doador foram direcionadas para um laboratório privado local para realização de parasitológico de fezes e avaliação de sangue oculto nas fezes para atestar a normalidade do material fecal dos doadores.

3.11.4 Preparação do inóculo fecal humano

As amostras fecais frescas coletadas de cada doador foram individualmente pesadas, em aproximadamente 25 g, em um frasco esterilizado e diluídas a 250 mL de solução de sal fisiológico, com proporção de 1:10, constituída de 0,5 g/L de cisteína-HCl e 8,5 g/L de NaCl (Sigma-Aldrich), e, posteriormente, homogeneizadas sob agitação manual com espátula esterilizada, por aproximadamente dois minutos. O inóculo fecal diluído e homogeneizado foi filtrado com o uso de uma camada tripla de gazes esterilizadas para remoção de partículas

grandes e armazenadas (37 ± 1 °C) em frascos esterilizados sob condições anaeróbicas (AnaeroGen) (Menezes *et al.*, 2021).

3.11.5 Preparação do meio de fermentação colônica *in vitro*

Para o processo de fermentação, foi preparado 1 L de meio de crescimento, sob qual a composição pode ser observada na Tabela 1. Todos os reagentes foram diluídos em água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C, por 15 minutos.

Tabela 1. Descrição da composição do meio de crescimento (1 L)

Reagentes	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl)	4,5 g
Cloreto de potássio (KCl)	4,5 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	1,5 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,69 g
Sulfato ferroso (FeSO ₄)	0,005 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,08 g
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,5 g
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄)	0,5 g
Sais biliares	0,4 g
Polissorbato (Tween 80®)	1 mL
L-cisteína	0,8 g
Solução de resazurina (0,025%, v/v)	4 mL

As diferentes partes da beterraba digeridas foram submetidas à fermentação com o inóculo fecal dos doadores diagnosticados com HA. O volume final da fermentação foi de 40% do meio de fermentação (v/v), 40% do inóculo fecal (v/v) e 20% do LBR, LBTF e LBI digerido (p/v), que foi levado a incubação sob anaerobiose (AnaeroGen) por 48 h a 37 ± 0.5 °C (Menezes *et al.*, 2021).

Durante o processo de preparo do inóculo fecal, foram retiradas alíquotas de 2 mL dos sistemas de fermentação contendo LBR, LBTF e LBI nos tempos zero e 48 h de fermentação, acondicionadas em criotubos e armazenados em temperatura -80 °C. Os ingredientes utilizados para formular os meios de fermentação foram obtidos da Sigma Aldrich.

3.11.6 Análise da comunidade bacteriana por sequenciamento do gene 16s rRNA

A comunidade taxonômica bacteriana foi avaliada no tempo zero e 48 horas nos diferentes meios de fermentação utilizando a sequenciação da região V3/V4 do 16S rRNA com os primers 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). O ADN genômico total dos sistemas de fermentação foi extraído diretamente das amostras utilizando uma coluna de extração de sílica. As bibliotecas de 16S rRNA foram sequenciadas usando o MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA) com os primers padrão da Illumina fornecidos no kit realizado pela Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, SC, Brasil). As sequências foram agrupadas em variantes de sequência de amplicons (ASV). As sequências foram analisadas utilizando o pipeline Sentinel, onde os arquivos FASTQ foram avaliados quanto à qualidade Phred utilizando o programa FastQC v.0.11.8 (Andrews, 2010). Subsequentemente, as leituras emparelhadas sense e antisense foram fundidas em contigs, e os singletons e as quimeras foram descartados. A diversidade alfa foi estimada com o QIIME (versão 1.7.0) e a diversidade beta foi estimada pela análise de componentes principais (PCA) e posteriormente visualizada com o software R (versão 4.4.2) (de Sousa Rocha *et al.*, 2024).

3.11.7 Avaliação da atividade metabólica microbiana durante a fermentação colônica

A atividade metabólica microbiana em meios com LBR, LBTF e LBI, foi avaliada no tempo zero e 48 horas de fermentação através das medições dos valores de pH utilizando o procedimento descrito na seção 3.6.2, e da determinação do perfil metabólico global diluindo alíquotas dos sistemas de fermentação numa proporção de 1:1 com uma solução de solvente e analisadas por RMN, seguindo o procedimento descrito na seção 3.7.

3.12 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE A FERMENTAÇÃO COLÔNICA

A capacidade antioxidante nos meios com LBR, LBTF e LBI foi determinada a zero e 48 horas de fermentação utilizando os métodos ABTS, DPPH e FRAP, conforme descrito na seção 3.9.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram efetuadas em triplicata em três experimentos independentes. O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov verificou a distribuição normal dos dados. Os dados foram submetidos ao teste t de Student ou à análise de variância (ANOVA unidirecional) seguida do teste de Tukey. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A PCA verificou os índices de diversidade beta de Bray-Curtis e Unifrac. Os dados foram submetidos à estatística descritiva e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para a realização das análises estatísticas foram utilizados os softwares Jamovi (versão 2.6.16.0; Love, Dropman, & Selker, Sydney, Austrália) e R (versão 4.4.2; Ihaka & Gentleman, University of Auckland, Nova Zelândia).

4 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados como artigo original intitulado “Delving conventional and unconventional edible beet (*Beta vulgaris* L.) parts as circular resources with beneficial impacts on the composition and metabolic activity of intestinal microbiota of hypertensive individuals” (Apêndice C).

O artigo aborda os impactos do liofilizado de diferentes partes da beterraba sobre a composição microbiana e atividade metabólica da microbiota de indivíduos com HA. Observou-se que a fermentação do LBR, LBTF e LBI apresentaram capacidade de modular a composição da microbiota nos sistemas de fermentação contendo inóculo de indivíduos com HA, além de induzir intensa atividade metabólica. Foi observado aumento da abundância relativa de diversos grupos bacterianos após 48 horas de fermentação, a exemplo dos filos Proteobactérias (LBR 3,1 - 12,4%, LBTF 2,6 - 76,5%, LBI 2,1 - 77,9%) e Bacteroidetes (LBTF 1,2 - 11,2%, LBI 1,8 - 6,9%). Ainda, ocorreu diminuição da abundância relativa de Firmicutes (LBR 85,9 - 16,6%, LBTF 88,7 - 8,9%, LBI 85,2 - 9,3%). O aumento da atividade metabólica ao longo da fermentação foi evidenciado pela redução do pH (LBR $6,73 \pm 0,15$ - $5,09 \pm 0,81$, LBTF $6,74 \pm 0,22$ - $6,03 \pm 0,33$, LBI $6,68 \pm 0,18$ - $5,50 \pm 0,76$) do meio e consumo dos açúcares (celobiose, eritritol, glicose, maltose e difosfato de uridina glicose) e variação entre as quantidades de ácidos orgânicos, com destaque para os ACGG (acetato, butirato e propionato) que tiveram a sua produção aumentada após as 48 h de fermentação nos meios contendo LBR, LBTF e LBI. Ainda, foi verificada a manutenção de elevada capacidade antioxidante (ABTS⁺, DPPH[•] e FRAP) nos meios contendo LBR, LBTF e LBI durante a fermentação colônica. O LBR, LBTF e o LBI apresentaram uma combinação de nutrientes e compostos bioativos, que associados conferem propriedades promotoras da saúde, a exemplo das fibras e betalaínas, que apresentam propriedades do tipo antioxidante, anti-inflamatória e prebiótica, com destaque para a amostra FDBR que apresentou aumento de *Bifidobacterium*, gênero que pode vir a ser explorado na prevenção e controle da HA através da restauração do equilíbrio a microbiota intestinal a partir de estratégia dietética. Esses achados apoiam o impacto positivo dos LBR, LBTF e LBI como novos ingredientes com potencial significativo a promoção de saúde e da sustentabilidade, contribuindo para economia circular, tendo em vista os efeitos prebióticos a serem usados como adjuvantes no tratamento da hipertensão arterial.

REFERÊNCIAS

AFZAAL, Muhammad *et al.* Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 999001, 2022.

AGUIAR, Fabrício Resende *et al.* Produção e qualidade de beterrabas submetidas a diferentes manejos de adubação e efeito residual na produção de milho cultivado em sucessão. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 6, n. 1, p. 060-070, 2021.

AL-MOZAN, Hanaa Daaj Khalaf. Gene of 16S rRNA is the gold standard to diagnose bacteria. **World Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 139-178, 2023.

ALBUQUERQUE, Thatyane Mariano Rodrigues *et al.* Effects of digested flours from four different sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) root varieties on the composition and metabolic activity of human colonic microbiota *in vitro*. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 8, p. 3707-3719, 2021.

ALENGHAT, Theresa; ARTIS, David. Epigenomic regulation of host–microbiota interactions. **Trends in immunology**, v. 35, n. 11, p. 518-525, 2014.

ALSHEHRY, Garsa *et al.* Investigating antioxidant and antibacterial activity of functional cookies enriched with beetroot during storage. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 39, n. 6, 2021.

ANDREWS, Simon *et al.* FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Acesso em: 26 nov. 2024.

ANJOS, Karla Doralyce Gomes *et al.* Dieta DASH no tratamento da hipertensão arterial sistêmica. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, p. 621-634, 2021.

ANSALDO, Eduardo; FARLEY, Taylor K.; BELKAID, Yasmine. Controle da imunidade pela microbiota. **Revisão Anual de Imunologia**, v. 39, p. 449-479, 2021.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. 20. ed. Washington, DC: AOAC International, 2016.

AUCHTUNG, Thomas A. *et al.* Investigating colonization of the healthy adult gastrointestinal tract by fungi. **MSphere**, v. 3, n. 2, p. 10.1128/msphere. 00092-18, 2018.

BAMIGBADE, Gafar Babatunde *et al.* An updated review on prebiotics: insights on potentials of food seeds waste as source of potential prebiotics. **Molecules**, v. 27, n. 18, p. 5947, 2022.

BARBER, Thomas M. *et al.* The effects of the mediterranean diet on health and gut microbiota. **Nutrients**, v. 15, n. 9, p. 2150, 2023.

BARROSO, Weimar Kunz Sebba *et al.* Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial – 2020. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 116, p. 516-658, 2021.

BATH, Philip M. *et al.* Dietary nitrate supplementation for preventing and reducing the severity of winter infections, including COVID-19, in care homes (BEET-Winter): a randomised placebo-controlled feasibility trial. **European Geriatric Medicine**, v. 13, n. 6, p. 1343-1355, 2022.

BELLEGRARDE, Kalil. *et al.* Microbial dysbiosis and hypertensive disease: exploring the connections between the microbiome and cardiovascular health. **International journal of health sciences**, 2024.

BESBAS, Mohamed El-Amine; TAKÁCSNÉ, Mária Hájos. Evaluation of bioactive substances in different parts of the root in beetroot (*Beta vulgaris* ssp. *esculenta* var. *rubra*). **Acta Agraria Debreceniensis**, n. 1, p. 33-38, 2024.

BEZERRA, Aline. Sobreira. *et al.* Composição nutricional e atividade antioxidante de plantas alimentícias não convencionais da região sul do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Alimentação**, v. 2, n. 3, p. 182–188, 2021.

BENZIE, Iris FF; STRAIN, John J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BIANCO-MIOTTO, Tina *et al.* Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, n. 5, p. 513-519, 2017.

BINDELS, Laure B. *et al.* Towards a more comprehensive concept for prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 5, p. 303-310, 2015.

BLAAK, E. E. *et al.* Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. **Beneficial Microbes**, v. 11, n. 5, p. 411-455, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos**. 240º Reunião Ordinária. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Disponível em: <<http://www.conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>> Acesso em: 25 de janeiro de 2018.

BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BOLTE, Laura A. *et al.* Long-term dietary patterns are associated with pro-inflammatory and anti-inflammatory features of the gut microbiome. **Gut**, v. 70, n. 7, p. 1287-1298, 2021.

BURGOS, José *et al.* Combined effects of citrulline plus nitrate-rich beetroot extract co-supplementation on maximal and endurance-strength and aerobic power in trained male

triathletes: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. **Nutrients**, v. 14, n. 1, p. 40, 2021.

CANALE, Maria Paola *et al.* Gut dysbiosis and western diet in the pathogenesis of essential arterial hypertension: a narrative review. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1162, 2021.

CARDOSO, Beatriz B. *et al.* Novel and emerging prebiotics: Advances and opportunities. In: **Advances in Food and Nutrition Research**. Academic Press, 2021. p. 41-95.

CHIELLA, Rurick Vilani; TOREGANI, Jeferson Freitas. Doença arterial obstrutiva periférica: estudo comparativo das internações e procedimentos realizados em caráter de urgência na macrorregião oeste do paraná no período de 2013 a 2023. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218**, v. 4, n. 9, p. e494058-e494058, 2023.

CHU, Natural *et al.* The potential role of lactulose pharmacotherapy in the treatment and prevention of diabetes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 956203, 2022.

COELHO, Juliana *et al.* Adherence to antihypertensive drug treatment in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Journal of Hypertension**, v. 40, n. Suppl 1, p. e310-e311, 2022.

DAVANI-DAVARI, Dorna *et al.* Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 92, 2019.

DE CARVALHO CORREA, Aline *et al.* Fructan-type prebiotic dietary fibers: Clinical studies reporting health impacts and recent advances in their technological application in bakery, dairy, meat products and beverages. **Carbohydrate Polymers**, v. 323, p. 121396, 2024.

DE SOUSA ROCHA, Sara *et al.* Exploring the potential prebiotic effects of *Opuntia dillenii* (Ker Gawl). Haw (Cactaceae) cladodes on human intestinal microbiota. **Journal of Functional Foods**, v. 118, p. 106259, 2024.

DOS SANTOS LIMA, Marcos *et al.* A novel method for ultra-fast determination of phenolics with performance comparable to UPLC/DAD: Method development and validation on analysis of seedless table grapes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 134, p. 106511, 2024.

DILIP, Kumar. Prebiotics and postbiotics. **Indian Scientific Journal of Research In Engineering And Management**, v. 7, n. 8, 2023.

DURRY, Fara Disa *et al.* Exploring the Role of Gut Microbiome in Chronic Inflammatory Diseases: A Comparative Study. **Global International Journal of Innovative Research**, v. 2, n. 5, p. 1037-1045, 2024.

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

FEJES, Rebeka *et al.* Effects of increased nitrate intake from beetroot juice on blood markers of oxidative stress and inflammation in older adults with hypertension. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 222, p. 519-530, 2024.

FLANDROY, Lucette *et al.* The impact of human activities and lifestyles on the interlinked microbiota and health of humans and of ecosystems. **Science of the total environment**, v. 627, p. 1018-1038, 2018.

FRANCA, Greik Machado *et al.* O efeito imunomodulador da microbiota intestinal, as consequências de seu desequilíbrio e a profilaxia probiótica. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 9, p. 151-175, 2021.

FREITAS, Guilherme Barroso Langoni de. **Cardiologia: Teoria e Prática**. 2 ed. Paraná: Editora Pasteur, 2021. 323 p. ISBN 978-65-867-0083-1

FROYEN, Erik. The effects of fat consumption on low-density lipoprotein particle size in healthy individuals: A narrative review. **Lipids in Health and Disease**, v. 20, n. 1, p. 86, 2021.

FU, Yu *et al.* Red beetroot betalains: Perspectives on extraction, processing, and potential health benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 42, p. 11595-11611, 2020.

GEBRAYEL, Prisca *et al.* Microbiota medicine: towards clinical revolution. **Journal of translational medicine**, v. 20, n. 1, p. 111, 2022.

GIBSON, Glenn 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 & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.

GOUVEA, Izabela Fernanda Sirigatti *et al.* Caracterização física e química de farinha de talo de beterraba/Physical and chemical characterization of beet stalk flour. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 15814-15823, 2020.

GUO, Jiayue; TAN, Libo; KONG, Lingyan. Impact of dietary intake of resistant starch on obesity and associated metabolic profiles in human: a systematic review of the literature. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 6, p. 889-905, 2021.

HOU, Kaijian *et al.* Microbiota in health and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1-28, 2022.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Resultados Preliminares do Censo Agropecuário 2017**. Rio de Janeiro: IBGE, 2018.

ISLAM, Md Rezaul *et al.* Bioactive molecules from terrestrial and seafood resources in hypertension treatment: focus on molecular mechanisms and targeted therapies. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 13, n. 1, p. 45, 2023.

JODRA, Pablo *et al.* Effect of beetroot juice supplementation on mood, perceived exertion, and performance during a 30-second Wingate test. **International Journal of sports Physiology and Performance**, v. 15, n. 2, p. 243-248, 2020.

JONES, Andrew M. *et al.* Dietary nitrate and nitric oxide metabolism mouth, circulation, skeletal muscle, and exercise performance. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 53, n. 2, p. 280-294, 2021.

KAZEMIAN, Negin *et al.* Microbiota intestinal e doenças cardiovasculares: oportunidades e desafios. **Microbioma**, v. 8, n. 1, pág. 1-17, 2020.

KHAMBATA, Rayomand S. *et al.* Dietary nitrate supresses leukocyte recruitment and activation in apolipoprotein e knockout mice. **The FASEB Journal**, v. 30, p. 165.2-165.2, 2016.

KLAWITTER, Jelena *et al.* A relative L-arginine deficiency contributes to endothelial dysfunction across the stages of the menopausal transition. **Physiological Reports**, v. 5, n. 17, p. e13409, 2017.

KLEEREBEZEM, Michiel *et al.* Understanding the mode of action can drive the translation process towards more reliable health benefits for probiotics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 55-60, 2019.

KLEIN, Leopold; HUTMACHER, Dietmar W. Straddling the Line Between *In vitro* and *Ex Vivo* Investigations. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 30, n. 10, p. 443-451, 2024.

LAM, Ka-Lung; CHEUNG, Peter Chi-Keung. Carbohydrate-based prebiotics in targeted modulation of gut microbiome. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 45, p. 12335-12340, 2019.

LAI, Wenkai *et al.* Gut microbial metabolic flux disorder in hypertension. **BioRxiv**, p. 2024.10.09.617349, 2024.

LAU, C. *et al.* Inorganic nitrate attenuates endothelial dysfunction consequent to systemic inflammation. **European Heart Journal**, v. 42, n. Supplement_1, p. ehab724. 3008, 2021.

LAUWERE, Carolien *et al.* Understanding Circular and Nature-Inclusive Agricultural Business Models. **Circular Economy and Sustainability**, p. 1-32, 2024.

LEE, Yan-Suan *et al.* Prebiotic lactulose ameliorates the cognitive deficit in Alzheimer's disease mouse model through macroautophagy and chaperone-mediated autophagy pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 8, p. 2422-2437, 2021.

LIU, Wei *et al.* Effect of chitooligosaccharides on human gut microbiota and antiglycation. **Carbohydrate Polymers**, v. 242, p. 116413, 2020.

LIU, Yan *et al.* Beetroot (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva* Alef.) pretreated by freeze-thaw: influence of drying methods on the quality characteristics. **CyTA-Journal of Food**, v. 22, n. 1, p. 1-12, 2024.

LORIZOLA, Isabela Micheletti *et al.* Beet (*Beta vulgaris* L.) stalk and leaf supplementation changes the glucose homeostasis and inflammatory markers in the liver of mice exposed to a high-fat diet. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 2, p. 100018, 2021.

LYNCH, Susan V.; VERCELLI, Donata. Microbiota, epigenetics, and trained immunity. Convergent drivers and mediators of the asthma trajectory from pregnancy to childhood. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 203, n. 7, p. 802-808, 2021.

MAHARAJ, Arun *et al.* Effects of L-Citrulline supplementation on endothelial function and blood pressure in hypertensive postmenopausal women. **Nutrients**, v. 14, n. 20, p. 4396, 2022.

MAN, Andy WC; LI, Huige; XIA, Ning. Impact of lifestyles (diet and exercise) on vascular health: oxidative stress and endothelial function. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, n. 1, p. 1496462, 2020.

MANCIA, Giuseppe *et al.* Diretrizes ESH de 2023 para o tratamento da hipertensão arterial O Grupo de Trabalho para o tratamento da hipertensão arterial da Sociedade Europeia de Hipertensão Aprovado pela Associação Renal Europeia (ERA) e pela Sociedade Internacional de Hipertensão (ISH). **Jornal de Hipertensão**, p. 10.1097.

MARTELLI, Anderson *et al.* Aterosclerose e lesões do endotélio vascular e as perspectivas clínicas na utilização das células progenitoras endoteliais no seu reparo. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, p. 3207-3223, 2021.

MARTINEZ, Renata M. *et al.* Analgesic activity and mechanism of action of a *Beta vulgaris* dye enriched in betalains in inflammatory models in mice. **Inflammopharmacology**, v. 28, p. 1663-1675, 2020.

MASSA, Nayara Moreira Lacerda *et al.* *In vitro* colonic fermentation and potential prebiotic properties of pre-digested jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-products. **Food Chemistry**, v. 388, p. 133003, 2022.

MELLA, Carolina *et al.* Evaluating biocompounds in discarded beetroot (*Beta vulgaris*) leaves and stems for sustainable food processing solutions. **Foods**, v. 13, n. 16, p. 2603, 2024.

MENEZES, Francisca Nayara Dantas Duarte *et al.* Impact of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by-product on composition and metabolic activity of human colonic microbiota *in vitro* indicates prebiotic properties. **Current Microbiology**, v. 78, p. 2264-2274, 2021.

MILLS, Katherine T.; STEFANESCU, Andrei; HE, Jiang. The global epidemiology of hypertension. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 4, p. 223-237, 2020.

MIRAFETABI, Hossein *et al.* Effects of beetroot juice supplementation on cognitive function, aerobic and anaerobic performances of trained male taekwondo athletes: A pilot study.

International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 18, n. 19, p. 10202, 2021.

MIRMIRAN, Parvin *et al.* Functional properties of beetroot (*Beta vulgaris*) in management of cardio-metabolic diseases. **Nutrition & Metabolism**, v. 17, p. 1-15, 2020.

MISHIMA, Eikan; ABE, Takaaki. Role of the microbiota in hypertension and antihypertensive drug metabolism. **Hypertension Research**, v. 45, n. 2, p. 246-253, 2022.

MOITA, Marina Pereira *et al.* Análise das características clínicas e qualidade de vida de pessoas com hipertensão e diabetes: estudo transversal. **Revista de Atenção Primária a Saúde**, v. 25, n. 2, 2022.

MONASTERIO, Eduardo P. Beltran; KULJIS, Oliver Igor. The Gut-Liver-Brain Connection. **Journal of Medical Sciences**, 2023.

MONTEAGUDO-MERA, Andrea *et al.* Evaluation of the prebiotic potential of arabinoxylans extracted from wheat distillers' dried grains with solubles (DDGS) and in-process samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 7577-7587, 2018.

MONTEAGUDO-MERA, Andrea *et al.* Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 6463-6472, 2019.

MOORLAG, Simone JCFM *et al.* Targeting the 16S rRNA gene by reverse complement PCR next-generation sequencing: specific and sensitive detection and identification of microbes directly in clinical samples. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 3, p. e04483-22, 2023.

MOREIRA, Rodrigo *et al.* Persistent high mortality rates for Diabetes Mellitus and Hypertension after excluding deaths associated with COVID-19 in Brazil, 2020–2022. **PLOS Global Public Health**, v. 4, n. 5, p. e0002576, 2024.

MINEKUS, Mans *et al.* A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

NEHA, P. *et al.* Chemical and functional properties of beetroot (*Beta vulgaris* L.) for product development: A review. **International Journal of Chemical Studies**, v. 6, n. 3, p. 3190-3194, 2018.

NIKAN, Marjan; MANAYI, Azadeh. *Beta vulgaris* L. In: **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. Academic Press, 2019. p. 153-158.

NILSON, Eduardo Augusto Fernandes *et al.* Costs attributable to obesity, hypertension, and diabetes in the Unified Health System, Brazil, 2018. **Pan American Journal of Public Health**, v. 44, p. e32-e32, 2020.

NILSSON, Tornsten. Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *rubra* L.). **Lantbrukshogskolans Annaler**, 36, 179-219, 1970.

NOBARI, Hadi *et al.* A brief overview of the effects of exercise and red beets on the immune system in patients with prostate cancer. **Sustainability**, v. 14, n. 11, p. 6492, 2022.

O'DONNELL, Joanne A. *et al.* The gut microbiome and hypertension. **Nature Reviews Nephrology**, v. 3, p. 153-167, 2023.

O'GALLAGHER, Kevin *et al.* Grapefruit juice enhances the systolic blood pressure-lowering effects of dietary nitrate-containing beetroot juice. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 87, n. 2, p. 577-587, 2021.

OLALEKAN, Samuel Oluwadare *et al.* A review of gut microbial metabolites and therapeutic approaches in hypertension. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 48, n. 1, p. 95, 2024.

OLIVEIRA, Sônia Paula Alexandrino *et al.* Investigating the effects of conventional and unconventional edible parts of red beet (*Beta vulgaris* L.) on target bacterial groups and metabolic activity of human colonic microbiota to produce novel and sustainable prebiotic ingredients. **Food Research International**, v. 171, p. 112998, 2023.

OLIVEIRA, Sônia Paula Alexandrino *et al.* A review on bioactive compounds of beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) with special emphasis on their beneficial effects on gut microbiota and gastrointestinal health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 12, p. 2022-2033, 2021.

OLIVEIRA, Priscila Mayara de Lima *et al.* Juá fruit (*Ziziphus joazeiro*) from Caatinga: A source of dietary fiber and bioaccessible flavanols. **Food Research International**, v. 129, p. 108745, 2020.

PANTOJA, Caroline Lobato *et al.* Diagnóstico e tratamento da disbiose: Revisão Sistemática. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 32, p. e1368-e1368, 2019.

PAUL, Hearther *et al.* Epigenomic regulation of host–microbiota interactions. **The FASEB Journal**, v. 1, n. 2, p. 40-52, 2019.

PAVIANI, Bruna *et al.* Eat your beets: Conversion of polysaccharides into oligosaccharides for enhanced bioactivity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 256, p. 128472, 2024.

PENG, Mengfei *et al.* Effectiveness of probiotics, prebiotics, and prebiotic-like components in common functional foods. **Comprehensive Reviews in Food science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1908-1933, 2020.

PEREIRA, Thaís Regina Castro *et al.* Functional and technological properties of beet: a bibliographical survey. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 8, n. 9, p. 14901-01a, 2022.

PINEDO-GIL, Julia *et al.* Effect of red beet and betaine modulating oxidation and bioactivity of rainbow trout. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 28, n. 1, p. 38-48, 2019.

PIRES, Lara *et al.* The role of gut microbiota in the etiopathogenesis of multiple chronic diseases. **Antibiotics**, v. 13, n. 5, p. 392, 2024.

PLAZA-DIAZ, Julio *et al.* Mechanisms of action of probiotics. **Advances in Nutrition**, v. 10, p. S49-S66, 2019.

QIN, Yu-Qing *et al.* Inulin: Properties and health benefits. **Food & function**, v. 14, n. 7, p. 2948-2968, 2023.

QUINONES, Eliane Marta *et al.* Disbiose intestinal e uso de prebióticos e probióticos como promotores da saúde humana. **Revista Higei@-Revista Científica de Saúde**, v. 2, n. 3, 2018.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RODINO, Steliana *et al.* Developing an evaluation framework for circular agriculture: a pathway to sustainable farming. **Agriculture**, v. 13, n. 11, p. 2047, 2023.

RODRIGUES, D. *et al.* *In vitro* fermentation and prebiotic potential of selected extracts from seaweeds and mushrooms. **LWT-Food Science and Technology**, v. 73, p. 131-139, 2016.

RUFINO, Maria SM *et al.* Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 693-695, 2009.

RUSSO, Elisa *et al.* Non-haemodynamic mechanisms underlying hypertension-associated damage in target kidney components. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9422, 2023.

SAMPAIO, Karoliny Brito *et al.* Nutraceutical formulations combining *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin, and or resveratrol with beneficial impacts on the abundance of intestinal bacterial populations, metabolite production, and antioxidant capacity during colonic fermentation. **Food Research International**, v. 161, p. 111800, 2022.

SENTKOWSKA, Aleksandra; PYRZYŃSKA, Krystyna. Old-Fashioned, but still a superfood—red beets as a rich source of bioactive compounds. **Applied Sciences**, v. 13, n. 13, p. 7445, 2023.

SCHÖN, Christiane *et al.* Grape seed extract positively modulates blood pressure and perceived stress: a randomized, double-blind, placebo-controlled study in healthy volunteers. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 654, 2021.

SHENG, Wei; JI, Guang; ZHANG, Li. Immunomodulatory effects of inulin and its intestinal metabolites. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1224092, 2023.

SHOJA, Marzieh *et al.* The dietary patterns derived by reduced-rank regression in association with Framingham risk score and lower DASH score in Hoveyze cohort study. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 11093, 2023.

SILVA, Arlene Pinto de Miranda *et al.* **Potencial terapêutico do alho para o tratamento da hipertensão arterial: uma revisão da literatura.** In Amaral, Jeferson Falcão, Abordagens interdisciplinares sobre plantas medicinais e fitoterapia: saúde, sustentabilidade e biodiversidade / Jeferson Falcão do Amaral (Organizador). – Guarujá-SP: Editora Científica Digital, 2022.

SILVA, Josilaine Aparecida; FERREIRA, Thais Cristina Silva; DE SOUZA, Aline Francisca. Extração e aplicação de corante natural obtidos de beterraba (*Beta vulgaris* L.) em alimentos funcionais. **Revista Saúde e Biociências**, v. 4, n. 1, 2022.

SILVA, Michelle Leite; ANDRADE, Leonardo Guimarães. Tratamentos para hipertensão arterial em adultos. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 9, n. 4, p. 1144-1156, 2023.

SOUZA, Cecília Santa Cruz *et al.* A importância da microbiota intestinal e seus efeitos na obesidade. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 6, pág. e52110616086-e52110616086, 2021.

SUN, Congcong *et al.* Diverse galactooligosaccharides differentially reduce lps-induced inflammation in macrophages. **Foods**, v. 11, n. 24, p. 3973, 2022.

SYROMYATNIKOV, Yu M. Physico-chemical indicators of soil condition depending on sugar beet growing technology. **Agriculture and Plant Sciences: theory and practice**, n. 3, p. 59-69, 2023.

TAPPER, Elliot B. *et al.* Lactulose therapy for patients with cirrhosis, portal hypertension, and poor patient-reported outcomes: The Mi-Kristal trial. **Hepatology**, v. 78, n. 4, p. 1159-1167, 2023.

TIAN, Shiyi *et al.* Galacto-oligosaccharides directly attenuate lipopolysaccharides-induced inflammatory response, oxidative stress and barrier impairment in intestinal epithelium. **Journal of Functional Foods**, v. 91, p. 105006, 2022.

TOLLOTO, Gilce Helena Vaz; SARAGIOTTO, Laiz. Relationship of leaky gut syndrome and metabolic syndrome. **Health and Society**, v. 2, n. 01, 2022.

UNGER, Thomas *et al.* 2020 International Society of Hypertension global hypertension practice guidelines. **Hypertension**, v. 75, n. 6, p. 1334-1357, 2020.

VAMVAKIS, Anastasios *et al.* Impact of intensive lifestyle treatment (diet plus exercise) on endothelial and vascular function, arterial stiffness and blood pressure in stage 1 hypertension: results of the HINTreat randomized controlled trial. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1326, 2020.

VAN DER AVOORT, Cindy MT *et al.* Increased intake of nitrate-rich vegetables reduces ambulatory blood pressure in (pre)hypertensive middle-aged and elderly adults: a 12-week randomized controlled trial. **The Journal of Nutrition**, v. 151, n. 9, p. 2667-2679, 2021.

VIJAY, Amrita; VALDES, Ana M. Role of the gut microbiome in chronic diseases: a narrative. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 489-501, 2022.

VARSHNEY, Khyati; MISHRA, Kirti. An analysis of health benefits of beetroot.

International Journal of Innovative Research in Engineering & Management, v. 9, n. 1, p. 207-210, 2022.

VON ELBE, Joachim H. Betalains. **Current protocols in food analytical chemistry**, n. 1, p. F3. 1.1-F3. 1.7, 2001.

WANG, Ke *et al.* Galactooligosaccharides: Synthesis, metabolism, bioactivities and food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 64, n. 18, p. 6160-6176, 2024.

WANG, Xue *et al.* Dietary nitrate maintains intestinal epithelia homeostasis in aged mice. **Biogerontology**, v. 25, n. 6, p. 1171-1187, 2024.

WONG, Tak Hiong; SIM, Alexiaa; BURNS, Stephen F. The effect of beetroot ingestion on high-intensity interval training: a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 3674, 2021.

WORLD MEDICAL Association, WMA. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Jama*, 310(20), 2191-2194. 2013.

YAHFOUFI, N. *et al.* Role of probiotics and prebiotics in immunomodulation. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 82-91, 2018.

YANG, Ting *et al.* Dietary nitrate attenuates renal ischemia-reperfusion injuries by modulation of immune responses and reduction of oxidative stress. **Redox Biology**, v. 13, p. 320-330, 2017.

YOO, Suyeon *et al.* The role of prebiotics in modulating gut microbiota: implications for human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 9, p. 4834, 2024.

ZHOU, Bin *et al.* Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. **Lancet**, v. 398, n. 10304, p. 957-980, 2021.

APÊNDICES

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO PARA RECRUTAMENTO



Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde



Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição

QUESTIONÁRIO AVALIATIVO

Informações Pessoais

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Endereço: _____

Contato: _____

Histórico Médico

1. Você tem diagnóstico de hipertensão? sejam tabagistas, crianças, idosos e gestantes.

() sim () não

2. Você tem diagnóstico de Diabetes melitus?

() sim () não

3. Você tem Dislipidemias?

() sim () não

4. Você tem doença hepática?

() sim () não

5. Você tem diagnóstico de câncer?

() sim () não

6. Você tem diagnóstico de alguma doença autoimune?

() sim () não

7. Você tem diagnóstico de doença renal?

() sim () não

8. Você possui alguma doença do trato gastrointestinal previamente reportada (Doença de Crohn e colite ulcerativa)?

() sim () não

9. Você tem feito uso de prebiótico, probiótico, simbiótico ou antibióticos, nos últimos 6 meses?

() sim () não

10. Você tem alguma outra condição médica pré-existente? Se sim, por favor, especifique:

() sim () não

11. Você está atualmente tomando algum medicamento? Se sim, por favor, especifique:

Estilo de Vida

12. Você fuma?

13. Você consome álcool regularmente?

14. Como você descreveria sua dieta?

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento e validade as informações aqui concedidas.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Andressa Cavalcante do Nascimento.

Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição
Centro de Ciências da Saúde/UFPB - Campus I - Cidade Universitária
CEP: 58051-970, João Pessoa - PB, E-mail: ppgcn@ccs.ufpb.br, Tel: (83) 3216-7417

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Prezado (a) Senhor (a) _____

Esta pesquisa é sobre **“Avaliação *in vitro* dos impactos de diferentes partes da beterraba (*Beta vulgaris* L.) sobre a microbiota intestinal de hipertensos”** e está sendo desenvolvida pela pesquisadora **Andressa Cavalcante do Nascimento**, discente do curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação do **Prof. Dr. Evandro Leite de Souza** e Co-orientação da **Prof.^a Dra. Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque**.

Os objetivos do estudo são: Avaliar o potencial prebiótico de diferentes partes da beterraba sobre a microbiota intestinal de indivíduos com diagnóstico de hipertensão por meio da caracterização físico- química e nutricional das diferentes partes da beterraba, seguido pelo processo de fermentação *in vitro*, a partir de fermentação e digestão simulada, de modo a determinar o índice prebiótico, caracterizar o microbioma intestinal dos indivíduos com hipertensão, avaliar os indicadores de atividade metabólica.

A hipótese para a presente pesquisa é que a beterraba contém fibras alimentares que podem ser fermentadas pelas bactérias benéficas do intestino, promovendo o crescimento dessas bactérias e melhorando a saúde intestinal. O que pode levar a um efeito positivo na regulação da pressão arterial em indivíduos hipertensos, uma vez que a beterraba pode conter a compostos bioativos de ação hipotensora.

Para a realização deste estudo, foi necessário a coleta de fezes que trata-se de um procedimento simples, não invasivo, mas que requer alguns cuidados ao manipular, que para a realização de uma coleta segura, foi disponibilizado um kit com materiais adequados e de uso seguro, como álcool 70%, prato descartável, tamanho 206mm, par de luva, caixa de isopor

500ml, contendo dois frascos coletores, estéreis, com espátulas, junto a um manual de instrução de como deve ser realizado a coleta, armazenamento e entrega.

Os dois frascos a serem coletados, um foi submetido a análise parasitológico que uma vez estando apto, o outro frasco foi dividido e direcionados a etapas do estudo de fermentação colônica e determinação do microbioma intestinal.

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA), pertencente ao Departamento de Nutrição (DN), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

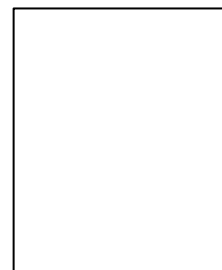
Solicitamos também a sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome foi mantido em sigilo. Informamos também que essa pesquisa não oferece riscos, previsíveis, para a sua saúde, além de um possível constrangimento em razão ao material biológico, fezes, solicitado.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o (a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido (a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

Assinatura do Participante da Pesquisa



Espaço para impressão
dactiloscópica

Assinatura da Testemunha

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para Andressa Cavalcante do Nascimento, a pesquisadora responsável, no telefone (83) 99604-7555.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

Prof.^a Dra. Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque

Andressa Cavalcante do Nascimento

Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição

Centro de Ciências da Saúde/UFPB - Campus I - Cidade Universitária

CEP: 58051-970, João Pessoa - PB, E-mail: ppgcn@ccs.ufpb.br, Tel: (83) 3216-7417

APÊNDICE C – ARTIGO

Delving conventional and unconventional edible beet (*Beta vulgaris* L.) parts as circular resources with beneficial impacts on the composition and metabolic activity of intestinal microbiota of hypertensive individuals

Abstract

This study evaluated the physicochemical characteristics, antioxidant capacity, and the impacts of freeze-dried beet (*Beta vulgaris* L.) root (FDBR), freeze-dried beet stems and leaves (FDBSL), and freeze-dried whole beet (FDWB) on the composition and metabolic activity of intestinal microbiota of hypertensive individuals during 48 h of *in vitro* colonic fermentation. FDBR, FDBSL, and FDWB had high nutritional value, various bioactive compounds, and antioxidant capacity. The colonic fermentation of FDBR, FDBSL, and FDWB with fecal inoculum from hypertensive individuals decreased the Firmicutes/Bacteroidetes ratio, decreased or maintained bacterial diversity, increased the relative abundance of Bifidobacteriaceae, Lactobacillaceae, and Enterobacteriaceae, and decreased Lachnospiraceae, Oscillospiraceae, and Peptostreptococcaceae. Colonic fermentation of FDBR mainly increased the relative abundance of *Bifidobacterium*, while FDBSL and FDWB increased the relative abundance of *Phocaeicola*. FDBR, FDBSL, and FDWB decreased pH values and changed the metabolic profile during colonic fermentation by consuming sugar and producing several metabolites linked to health-promoting properties, besides keeping antioxidant capacity (ABTS, DPPH, and FRAP). FDBR, FDBSL, and FDWB could be novel, sustainable, and circular resources with beneficial impacts on the intestinal microbiota of hypertensive individuals, which could be exploited as dietary adjuvant strategies in arterial hypertension management.

Keywords: Beet; integral use; hypertension; intestinal microbiota; metabolites.

1. Introduction

Beet (*Beta vulgaris* L.) is an herbaceous food crop of Euro-African origin, where its roots and leaves can be used in various culinary preparations (Jagadeesh et al., 2018). This plant species has a distinct composition rich in carbohydrates, fibers, proteins, vitamins, minerals, and various bioactive compounds (Mirmiran et al., 2020). Despite being widely cultivated worldwide, beet must be more utilized nutritionally because most consumption focuses only on the beetroot, and the nutrient-rich stems and leaves are commonly discarded (Pathak et al., 2022). The anti-inflammatory and antioxidant properties of beet make it a dietary option for helping to prevent various chronic diseases, including cardiometabolic diseases (de Oliveira et al., 2021).

Beet has been shown to influence colonic microbial fermentation, which results in intestinal health and exerts a potential prebiotic effect primarily linked to its dietary fiber and phenolic compound content. However, these effects have been only demonstrated in the intestinal microbiota of healthy individuals (de Oliveira et al., 2023; Wang et al., 2023). A consensus definition characterizes prebiotics as substrates selectively utilized by host microorganisms, conferring a health benefit (Gibson et al., 2017). In the intestinal environment, prebiotics are non-digestible food components that reach the gastrointestinal tract to be used by the resident microbiota, playing a fundamental role in intestinal and systemic health (Yoo et al., 2024).

The intestinal microbiota composition is influenced by endogenous and exogenous factors, which can be modified to alter various processes in the body, including predisposition to diseases (Cecchini et al., 2023). Eubiosis, characterized by the predominance of commensal microorganisms, promotes beneficial physiological and metabolic responses, contributing to

maintaining host homeostasis. However, when there is an imbalance, with a predominance of pathogenic over commensal microorganisms, this is characterized as dysbiosis (Miniello et al., 2023; de Sousa Rocha et al., 2024).

Dysbiosis is a condition that exposes the individual to increased intestinal permeability, allowing harmful substances to enter the bloodstream and triggering chronic inflammatory responses. In addition, the lack of microbial diversity and the predominance of pathogenic bacteria in the intestinal environment can compromise immune function, making the body more vulnerable to infections and autoimmune diseases (Heravi, 2024). Because intestinal dysbiosis changes the host inflammatory response, studies suggest it emerges as a risk factor for arterial hypertension (Li et al., 2024). Arterial hypertension is a complex chronic disease with multifactorial causes and a chronic inflammatory process. It is a significant public health concern, closely linked to cardiovascular morbidity and mortality, and its prevalence has been increasing annually worldwide. Arterial hypertension represents a global public health burden due to the high costs to health assistance systems, resulting in the need to seek alternatives for its management (Moita et al., 2022).

Although there is a consensus on the relationship between the regular consumption of functional foods and the intestinal microbiota (Obayomi, Olaniran, & Owa, 2024), studies to elucidate the effects of conventional and unconventional edible beet parts on the composition and metabolic activity of the intestinal microbiota of hypertensive individuals are still scarce. Investigating these effects could contribute to the development of innovative strategies targeting the intestinal microbiota for managing this disease. This study aimed to investigate the potential impacts of the conventional and unconventional edible beet parts on the composition and metabolic activity of intestinal microbiota of hypertensive individuals using an *in vitro* colonic fermentation system.

2. Materials and methods

2.1. Acquisition and preparation of beet samples

Approximately 5 kg of roots, stalks, and leaves of red beet (*Beta vulgaris* L., early fortuna cultivar) were acquired directly from a community-based organic farm (Areia, PB, Brazil), where its average production cycle is approximately 80 days, medium-sized, with high germination, good adaptation to the local soil and climate, and good resistance to various crop diseases, allowing for healthy and organic cultivation. Roots, stalks, and leaves were washed with potable running water and immersed in a sodium hypochlorite solution (150 ppm, 15 min), followed by rinsing with potable running water. Each part of the beet was processed separately in a domestic electric processor (speed 1, PowerChop plus, Philips Walita, Varginha, MG, Brazil) using a 1.2 mm grating disc, frozen at -18 °C for 24 h, subjected to the freeze-drying process (temperature -55 ± 2 °C, vacuum pressure $<138\mu\text{Hg}$, speed 1 mm/h) for approximately 27 h using a bench-top freeze-dryer (model L-101, Liotop, São Carlos, SP, Brazil), and stored in laminated polypropylene bags under refrigeration (4 ± 0.5 °C) until use in the experiments (de Oliveira et al., 2023). Three freeze-dried samples were obtained: (i) freeze-dried beet root (FDBR); (ii) freeze-dried beet stems and leaves (FDBSL), mixed in equal proportions (1:1, w/w); and (iii) freeze-dried whole beet (FDWB), mixed in equal proportions of the root, stem, and leaves (1:1:1, w/w).

2.2 Determination of physicochemical parameters

FDBR, FDBSL, and FDWB were analyzed using standard procedures (AOAC, 2019) to obtain the water activity (method 978.18) measured with an AquaLab Series 3TE instrument (Decagon, São José dos Campos, SP, Brazil), pH values (method 981.12) determined with a digital potentiometer (Q400AS, Quimis, São Paulo, SP, Brazil), protein contents determined using the Kjeldahl method (method 935.58), and lipid contents determined using the Folch,

Lees, and Sloane-Stanley method (1957). The insoluble and soluble fiber contents were determined using an enzymatic-gravimetric method (Tobaruela et al., 2018). The instrumental color was determined based on the CIELab system (L^* , a^* , and b^*) using a portable colorimeter (CR/10, Konica Minolta, Japan) (CIE, 1986).

An aqueous extract (1%, w/v) was prepared and macerated by freezing for approximately 12 h to determine the betalain content. After thawing, the aqueous extract was centrifuged twice ($8536 \times g$, 20 min, 4 °C), the supernatant (1 mL) was diluted with distilled water (24 mL), and absorbance readings (538 nm and 476 nm) were taken in triplicate on a spectrophotometer (Biotek Multi-Detection Synergy HTX, Winooski, VT, USA). The light absorptions at 538 nm and 476 nm were used to calculate the content of betacyanins and betaxanthins (mg/100 g), respectively. The absorbance at 600 nm was measured to correct for the occurrence of minor impurities. The total betalain content was expressed as the sum of betacyanins and betaxanthins (Nilsson, 1970; Von Elbe, 2001).

2.3 Global metabolic profile

To determine the global metabolic profile using Nuclear Magnetic Resonance (NMR), 0.1 g of FDBR, FDBSL, and FDWB was diluted (1:1) in a solvent solution (9:1, v/v) containing 9 μ L of HPLC standard methanol (CH_3OH) and 1 μ L of 99.9% deuterium oxide (D_2O) with trimethylsilylpropanoic acid (TSP), taken to an ultrasonic washer for 30 min, centrifuged (MPW®, $10000 \times g$, 10 min, 4° C), and filtered through a 0.45 μ m cellulose ester membrane (Millipore®). Then, 1 mL of the solvent solution was mixed with 1 mL of the filtrated sample, manually stirred, and transferred to a high-performance tube (5 mm $\times$ 178 mm) (Sample Jet model, Winng 10007 sj - 100 EA). NMR analysis was carried out with Bruker Ascend 400 equipment, operating at 400 MHz for ^1H NMR and 100 MHz for ^{13}C NMR (Bruker, Billerica, MA, USA), with the following analytical parameters: spectrum sequence: Lc1D12gp - edited,

with pulse sequence for double suppression, thus suppressing the water and methanol present in the sample; temperature: 26 °C; number of scans: 64; dummer scan: 4; receiver gain: 36; and acquisition time: 2.04 seconds (Sampaio et al., 2022). 1D ^1H -NMR spectra were processed using MetaboLabPy software. All 1D data sets were 0-filled to 32,768 data points before the Fourier transformation. The chemical shift was calibrated by referencing the TSP signal to 0 ppm. 1D spectra were manually phase corrected, and batch baseline correction was achieved using a spline function, exported into Bruker format for metabolite identification and quantification using Chenomx 9.0.

2.4 Quantification of phenolic compounds

This analysis was carried out using acid hydrolysis, where 2 g of each sample (FDBR, FDBSL, and FDWB) were acidified with 0.1 M HCl (Neon, Suzano, São Paulo, Brazil) to reach pH 2, followed by mixing with 10 mL of methanol (Neon): distilled water (70:30, v/v) and treatment with ultrasound (60 min, 37 kHz, 30 °C). The solution was centrifuged (4000 x g, 15 minutes, 4 °C), and the supernatant was filtered through a 0.45 μm pore size filter (Whatman®). For the separation and quantification of phenolic compounds, an Agilent chromatograph (model 1260 Infinity LC, Agilent Technologies) equipped with a quaternary solvent pump (model G1311C), degasser, thermostatic column compartment (model G1316A), and automatic sampler (model G1329B) was used, along with a diode array detector (DAD) (model G1315D) and refractive index detector (DIR) (model G1362A). The analytical conditions were: Zorbax C18 pre-column (12.6 $\times$ 4.6 mm, 5 μm) (Zorbax, USA) and Zorbax Eclipse Plus RP-C18 column (100 $\times$ 4.6 mm, 3.5 μm) used for the chromatographic separation of the phenolic compounds. The mobile phase was a solution of water acidified with 0.1 M phosphoric acid (pH 2.0, phase A) and methanol acidified with 0.5% phosphoric acid (phase B) at a flow rate of 0.8 mL/min. The data was processed using OpenLAB CDS ChemStation Edition™

software (Agilent Technologies). The peaks of the HPLC samples were identified by comparing their retention times with those found for the phenolic compound standards (Sigma Aldrich). Duplicate injections were made, and the average areas of the peaks were used to quantify the phenolic compounds identified, expressing the results in mg/g (dos Santos Lima et al., 2024).

2.5 Determination of the antioxidant capacity of FDBR, FDBSL, and FDWB

The antioxidant capacity was assessed using three methods: ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging capacity (Re et al., 1999); DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging capacity (Brand-Williams et al., 1995), and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) through the reduction of ferric iron (Fe³⁺) (Benzie & Strain, 1996). Aqueous FDBR, FDBSL, and FDWB extracts with a 1:50 (w/v) dilution were used in ABTS and DPPH methods using a standard Trolox curve. The results were expressed in Trolox μmol equivalents per gram of sample ($\mu\text{mol/g}$), while a 1:200 (w/v) dilution was used in FRAP analyses using a standard ferrous sulfate curve. The results were expressed in μM of ferrous sulfate per gram of sample ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$). The analyses were conducted at room temperature in a place protected from light. Absorbance measurements were performed with a microplate spectrophotometer (BioTek Eon, Winooski, VT, USA) at 734 nm (ABTS), 517 nm (DPPH), and 595 nm (FRAP).

2.6 *In vitro* gastrointestinal digestion

A static *in vitro* gastrointestinal digestion process simulating oral, gastric, and intestinal compartments was used to transform FDBR, FDBSL, and FDWB samples into materials like those that reach the colon and can be fermented by the colonic microbiota, considering a protocol standardized in an international consensus developed by the COST Infogest network

(Minékus et al., 2014). All the enzymes and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

At the end of the simulated digestion, the resulting material was subjected to dialysis on a 1 kDa molecular weight regenerated cellulose membrane (Spectra/Por® 6, Spectrum Europe BV, Breda, Netherlands), previously hydrated for thirty min in distilled water heated to 60 ± 1 °C (de Albuquerque et al., 2021). The digested materials were dialyzed against 0.01 M NaCl solution and incubated (5 ± 0.5 °C) to remove low molecular weight digestion products. After 15 h, the dialysis fluids were changed, and dialysis continued for 2 h. The dialyzed samples were frozen (-20 °C, 24 h) and freeze-dried (temperature -55 ± 2 °C, vacuum pressure, 30 h). FDBR, FDBSL, and FDWB digested, dialyzed, and freeze-dried were stored in textured nylon-poly coextruded, slotted, vacuum, oxygen- and moisture-barrier, puncture-resistant packaging and used in colonic fermentation assays.

2.7 Fecal sample preparation

The collection of human feces complied with the requirements of the National Health Council (Brazil, 2012) and Declaration of Helsinki (WMA, 2013), being approved (protocol number 6.597.919) by the Ethics Committee for Research with Human Beings (Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil). The fecal samples were obtained from eight hypertensive adult volunteers (four men and four women, 20 to 59 years old) declaring blood pressure $>140/90$ mmHg, eating an omnivorous diet with no previous associated comorbidities (e.g., diabetes mellitus type 2, obesity, dyslipidemia, liver disease, and gastrointestinal cancer); no previously reported gastrointestinal diseases (Crohn's disease and ulcerative colitis); no diagnosis of kidney or autoimmune diseases; no use of concentrated prebiotics, probiotics, synbiotics, and antibiotics in the previous 6 months; in addition to non-smokers, and non-pregnant women. Fresh fecal samples were collected in sterile tubes and placed in an anaerobic

jar containing an anaerobic gas generator (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke, UK), diluted (1:10, w/v) using a reduced physiological salt solution (0.5 g/L of cysteine-HCl + 8.5 g/L of NaCl; Sigma-Aldrich), homogenized (2 min, 200 rpm), filtered using sterile triple-layer gauze, and used immediately (Rodrigues et al., 2016). The fecal inoculum was prepared and used individually in the experiments.

2.8 Colonic fermentation system

The different parts of the digested beet were fermented with the fecal inoculum of the hypertensive donors. The colonic fermentation system was composed of 20% (w/v) of the digested FDBR, FDBSL, and FDWB (w/v) in sterile phosphate-buffered saline (0.1 M PBS; pH 7.4) under a density of 0.10, 40% (v/v) of the hypertensive human fecal inoculum, and 40% (v/v) of a fermentation medium as previously described (Menezes et al., 2021). The fermentation system underwent pH adjustment to 6.8 using 1 M NaHCO₃ to simulate colonic conditions and was incubated under anaerobiosis (AnaeroGen) for 48 h at 37 ± 0.5 °C (Massa et al., 2022). The ingredients used to formulate the fermentation media were obtained from Sigma Aldrich.

2.9 Analysis of bacterial community using 16S rRNA gene sequencing

The bacterial taxonomic community was assessed at 0 and 48 h of colonic fermentation in the different media using the sequencing of 16S rRNA V3/V4 region with primers 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG) and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). The total genomic DNA of the fermentation systems was extracted directly from the samples using silica column extraction. The 16S rRNA libraries were sequenced using the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) with the standard Illumina primers provided in the kit conducted by Neoprospecta Microbiome Technologies (Florianópolis, SC, Brazil). The

sequences were clustered into amplicon sequence variants (ASV). The sequences were analyzed using the Sentinel pipeline, where the FASTQ files were evaluated for Phred quality using the FastQC v.0.11.8 program (Andrews, 2010). Subsequently, sense and antisense paired reads were merged into contigs, and singletons and chimeras were discarded.

Alpha diversity was estimated with QIIME (version 1.7.0), and beta diversity was estimated with principal component analysis (PCA), which was subsequently visualized with R software (version 4.4.2) (de Sousa Rocha et al., 2024).

2.10 Measurements of microbial metabolic activity during colonic fermentation

The microbial metabolic activity in media with FDBR, FDBSL, and FDWB was evaluated at 0 and 48 h of colonic fermentation through the measurements of pH values using the procedures described in section 2.2, determination of global metabolic profile diluting aliquots of the fermentation media in a 1:1 ratio (v/v) with a solvent solution and analyzed with NMR technique as described in section 2.3, and quantification of phenolic compounds with HPLC technique as described in section 2.4.

2.11 Determination of antioxidant capacity during colonic fermentation

The antioxidant capacity in media with FDBR, FDBSL, and FDWB was determined at 0 and 48 h of colonic fermentation using the ABTS, DPPH, and FRAP methods, as described in section 2.5.

2.12 Statistical analysis

The analysis to determine the physicochemical characteristics of FDBR, FDBSL, and FDWB was performed in triplicate on three independent experiments. For the colonic fermentation experiments, each fermentation batch with FDBR, FDBSL, and FDWB and the

fecal inoculum of a donor was considered as an experimental unit (n: 8). The Kolmogorov-Smirnov normality test checked the data normal distribution. Data were submitted to Student's t-test or analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's test. A p-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant. The results were subjected to Pearson's correlation to verify the relationship between the bacterial genera and the variation in pH, organic acids, sugars, amino acids and other metabolites throughout colonic fermentation. PCA verified the Bray-Curtis and Unifrac indices of beta diversity. The results were expressed as average $\pm$ standard deviation. Jamovi (version 2.6.16.0; Love, Dropman, & Selker, Sydney, Australia) and R software (version 4.4.2; Ihaka & Gentleman, University of Auckland, New Zealand) were used to perform the statistical analysis.

3. Results

3.1 Physicochemical characterization of FDBR, FDBSL, and FDWB

FDBR, FDBSL, and FDWB had low water activity (≤ 0.36), low moisture contents ($\leq 2.84\%$), and low lipid contents (≤ 2.51 g/100 g), besides having similar ($P \geq 0.05$) ashes contents and pH values of approximately 6.0. FDWB showed a significantly higher protein content (10.6 ± 0.45 g/100 g), followed by FDBSL (7.34 ± 0.05 g/100 g), and FDBR (5.19 ± 0.23 g/100 g). Beta-cyanins and betaxanthins, the pigments responsible for beet color, were found in greater amounts in FDBR and FDWB (> 30 mg/100 g) than FDBR (9.47 ± 0.04 mg/100 g), respectively. FDBR, FDBSL, and FDWB had approximately three-fold higher contents of insoluble fiber (21.56 ± 0.22 - 34.70 ± 0.17 g/100 g) than soluble fiber (5.39 ± 0.03 - 11.92 ± 0.20 g/100 g), with the highest total dietary fiber content in FDBSL (46.62 ± 0.37 g/100 g) ($P < 0.05$). In general, FDBR, FDBSL, and FDWB had low luminosity (L^* : 4.26 ± 0.09 - 10.20 ± 0.10), with a bluish-red hue (a^* : 0.81 ± 0.06 - 4.09 ± 0.04 ; b^* : 2.28 ± 0.04 - 6.36 ± 0.05) (Table 1).

3.2 Phenolic compound profile and antioxidant capacity of FDBR, FDBSL, and FDWB

The phenolic profile analysis identified 28 phenolic compounds before *in vitro* digestion in FDBR, FDBSL, and FDWB, including phenolic acids, flavonoids, tannins, stilbenes, and others (Table 2). Highest contents of 3,4-dihydroxybenzoic acid (14.23 ± 0.00 mg/L), 4-hydroxybenzoic acid (10.71 ± 0.12 mg/L), delphinidin 3-glucoside (30.64 ± 0.48 mg/L), epigallocatechin gallate (49.46 ± 0.06 mg/L), and O-vanillin (12.76 ± 0.20 mg/L) were found in FDBR ($P < 0.05$). FDBSL had highest contents of fumaric acid (7.35 ± 0.03 mg/L), t-cinnamic acid (14.22 ± 0.14 mg/L), epicatechin gallate (2.17 ± 0.06 mg/L), hesperidin (41.75 ± 0.21 mg/L), naringenin (8.52 ± 0.16 mg/L), and t-resveratrol (2.47 ± 0.14 mg/L) ($P < 0.05$). Highest contents of isorhamnetin (7.81 ± 0.39 mg/L), pelargonidin 3-glucoside (9.97 ± 0.85 mg/L), procyanidin A2 (2.61 ± 0.09 mg/L), and cis-resveratrol (4.76 ± 0.29 mg/L) were found in FDWB ($P < 0.05$). Other phenolic compounds had the lowest contents (< 2 mg/L) in FDBR, FDBSL, and FDWB.

FDBR, FDBSL, and FDWB had antioxidant capacity when measured using the ABTS, FRAP, and DPPH methods (Table 1). The highest values were found for FDBR regardless of the measurement method used (ABTS: 60.6 ± 11.4 μ mol Trolox TEAC/g; DPPH: 24.0 ± 3.83 μ mol Trolox TEAC/g; and FRAP: 38.2 ± 0.625 μ mol FeSO₄/g) ($P < 0.05$).

3.3 Global metabolic profile of FDBR, FDBSL, and FDWB

The global metabolic profile analysis detected the presence of 34 compounds in FDBR, FDBSL, and FDWB before the *in vitro* digestion (Table 3). The organic acids detected were acetate, formate, succinate, and 3,4-dihydroxybenzeneacetate. The highest contents of organic acid were detected to 3,4-dihydroxybenzeneacetate in FDBR (131.5 ± 0.0 μ M), followed by FDWB (86.0 ± 0.0 μ M) and FDBSL (67.5 ± 0.0 μ M) ($P < 0.05$). High sugar contents were

detected in the different examined beet parts, with the highest glucose content ($6156.4 \pm 0.0 \mu\text{M}$) in FDBSL, the highest maltose ($10894 \pm 0.0 \mu\text{M}$), and sucrose content ($35374.9 \pm 0.0 \mu\text{M}$) in FDBR, and the highest arabinose content ($8627.5 \pm 0.0 \mu\text{M}$) in FDWB ($P < 0.05$). The contents of erythritol in FDBR, FDBSL, and FDWB did not differ ($1119.5 \pm 0.0 \mu\text{M}$) ($P \geq 0.05$). Fourteen amino acids were detected in FDBR, FDBSL, and FDWB, with glycine ($53654.3 \pm 0.0 - 57193.8 \pm 0.0 \mu\text{M}$), glutamine ($524.6 \pm 0.0 - 2934.8 \pm 0.0 \mu\text{M}$), glutamate ($547.2 \pm 0.0 - 1369.2 \pm 0.0 \mu\text{M}$), and aspartate ($827.2 \pm 0.0 - 898.5 \pm 0.0 \mu\text{M}$) as the most abundant ($P < 0.05$). FDBR had the highest contents of essential amino acids, including arginine, lysine, phenylalanine, threonine, tryptophan, and branched-chain amino acids (isoleucine, leucine, and valine). Other important detected compounds were FDBR, FDBSL, and FDWB, including choline ($12505 \pm 0.0 - 13171.3 \pm 0.0 \mu\text{M}$), riboflavin (vitamin B12; $15 \pm 0.0 - 39.4 \pm 0.0 \mu\text{M}$), and 4-aminobutyrate ($160.6 \pm 0.0 - 277.9 \pm 0.0 \mu\text{M}$).

3.4 Changes in the intestinal bacterial community during *in vitro* colonic fermentation

The intestinal bacterial community composition in media with FDBR, FDBSL, and FDWB was analyzed using 16S rRNA gene sequencing at 0 and 48 h of *in vitro* colonic fermentation (Fig. 1). All examined media had the phyla Firmicutes as predominant at zero h ($85.18\% - 88.74\%$), while Proteobacteria was the predominant phyla at 48 h of colonic fermentation ($71.96\% - 77.87\%$) (Fig. 1A). Media with FDBR, FDBSL, and FDWB had low ($< 5\%$) and similar ($P \geq 0.05$) relative abundance of Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, and Verrucomicrobia at time zero. Medium with FDBR increased the relative abundance of Actinobacteria (from 2.13% to 8.79%) ($P < 0.05$) and did not change the relative abundance of Bacteroidetes ($\sim 1.5\%$) at 48 h of colonic fermentation ($P \geq 0.05$). In comparison, media with FDBSL and FDWB did not alter the relative abundance of Actinobacteria ($\sim 2\%$ and

~5%, respectively) ($P \geq 0.05$) and increased the relative abundance of Bacteroidetes (from 1.24 to 11.99% and from 1.76% to 6.92%, respectively) at 48 h of colonic fermentation ($P < 0.05$), decreasing the Firmicutes/Bacteroidetes ratio. The relative abundance of Verrucomicrobia and Euryarchaeota decreased during colonic fermentation regardless of the media ($P < 0.05$).

When analyzing the relative abundance of bacterial families (Fig. 1B), Oscillospiraceae (45.07% - 47.18%) and Lachnospiraceae (26.14% - 27.41%) were the most abundant families ($P < 0.05$) in all fermentation media at time zero. At 48 h of colonic fermentation, there was a variation in the bacterial profile, where the relative abundance of Lachnospiraceae, Oscillospiraceae, and Peptostreptococcaceae decreased ($P < 0.05$), highlighting the predominance of Enterobacteriaceae (71.63% - 77.18%). The relative abundance of Akkermansiaceae decreased in media with FDBR, FDBSL, and FDWB during colonic fermentation ($P < 0.05$). In addition, at 48 h of colonic fermentation, medium with FDBR stood out for the increase in the relative abundance of Bifidobacteriaceae (from 3.42% to 7.56%) and Lactobacillaceae (from 2.08% to 3.81%), and the decrease of the relative abundance of other bacterial families whose taxonomic affiliation was not defined (from 3.57% to 2.23%) ($P < 0.05$).

Concerning bacterial genus (Fig. 1C), *Faecalibacterium* (33.04% - 44.90%) and *Blautia* (5.61% - 8.24%) were the most abundant genera at time zero, while the relative abundance of unclassified genera (68.31% - 74.56%) was the most predominant at 48 h of colonic fermentation. The relative abundance of *Bifidobacterium* increased in the medium with FDBR (from 1.18% to 7.63%) ($P < 0.05$). It did not change in media with FDBSL and FDWB (~1.5% and ~3%, respectively) at 48 h of colonic fermentation ($P \geq 0.05$). FDBSL and FDWB mainly increased the relative abundance of the *Phocaeicola* genus ($P < 0.05$). The relative abundance of *Enterobacter* increased at 48 h of colonic fermentation regardless of the media ($P < 0.05$). Genera, such as *Akkermansia*, *Blautia*, *Dorea*, *Romboutsia*, *Roseburia*, *Methanobrevibacter*,

Mediterraneibacter, *Lachnospira*, *Enterobacter*, and *Germmiger*, had low relative abundance during 48 h of colonic fermentation.

To assess the alpha diversity, six metrics were used to measure the bacterial genera in media with FDBR, FDBSL, and FDWB during the colonic fermentation (Fig. 2). Significant differences in Shannon, InvSimpson, and Fisher indices were detected at 48 h of colonic fermentation, highlighting lower diversity in the bacterial community compared to time zero ($P < 0.05$). Based on the Chao1 and ACE indices, bacterial diversity did not differ in media with FDBR and FDWB compared to zero time ($P \geq 0.05$). This indicates that the examined beet parts kept the bacterial richness while decreasing in the medium with FDBSL during colonic fermentation. However, the Observed index decreased ($P < 0.05$) at 48 h of fermentation regardless of the fermentation media.

The beta diversity of bacterial genera in media with FDBR, FDBSL, and FDWB was described using PCA Bray-Curtis and Unifrac indices at zero and 48 h of fermentation. Bray-Curtis index indicated that media with FDBR, FDBSL, and FDWB differed between the fermentation times ($P < 0.05$) but did not differ from each other for the same fermentation time ($P \geq 0.05$) (Fig. 3A). At time zero, there was a greater dispersion of the bacterial communities. In contrast, the communities converged towards a more homogeneous composition at 48 h of colonic fermentation. Unifrac index demonstrated a phylogenetic proximity between the genera identified at zero and 48 h of colonic fermentation, following into a single cluster (Fig. 3B).

3.5 Changes in bacterial metabolic activity during colonic fermentation

Using the NMR technique to determine the metabolite profile, it was possible to identify and quantify 66 chemical compounds, including organic acids, sugars, amino acids, and others, in media with FDBR, FDBSL, and FDWB (Table 3). Organic acids varied between the media with different beet parts during colonic fermentation. The short-chain fatty acids (SCFA)

acetate (FDBR $26392.8 \pm 9007.1 \mu\text{M}$; FDBSL $40933.4 \pm 11392.2 \mu\text{M}$; FDWB $32280 \pm 9462.2 \mu\text{M}$), butyrate (FDBR $7171.4 \pm 7200.4 \mu\text{M}$; FDBSL $6665.8 \pm 3348.9 \mu\text{M}$; FDWB $6305 \pm 3792.0 \mu\text{M}$), and propionate (FDBR $13564.6 \pm 6183.8 \mu\text{M}$; FDBSL $17828 \pm 5185.1 \mu\text{M}$; FDWB $19971.8 \pm 4963.3 \mu\text{M}$) were widely produced at 48 h of colonic fermentation. Comparing the increase between the media with FDBR, FDBSL, and FDWB, the acetate content increased more in media with FDBSL and FDWB than in FDBR compared to time zero. The highest butyrate content was detected at 48 h of colonic fermentation in medium with FDBR ($7171.4 \pm 7200.4 \mu\text{M}$). In comparison, the medium with FDBSL ($19971.8 \pm 4963.3 \mu\text{M}$) had the highest propionate content at 48 h of fermentation ($P < 0.05$). Formate content increased during colonic fermentation, with the highest content in the medium with FDBSL ($208 \pm 520.0 \mu\text{M}$). Valerate ($1967 \pm 1725.3 - 3183.7 \pm 3211.8 \mu\text{M}$), a branched-chain fatty acid, was widely produced in all fermentation media at 48 h. 3-Hydroxyisobutyrate ($813.6 \pm 690.7 - 1161.3 \pm 956.8 \mu\text{M}$) and 4-hydroxybutyrate ($971.5 \pm 721.0 - 1820.7 \pm 449.1 \mu\text{M}$) were detected only at 48 h of colonic fermentation ($P < 0.05$). The contents of citrate, fumarate, succinate, and 3,4-dihydroxybenzeneacetate decreased or were not detected at 48 h of colonic fermentation.

At time zero, media with FDBR and FDWB had glucose ($9435.4 \pm 2544.3 \mu\text{M}$ and $6808 \pm 1130.3 \mu\text{M}$, respectively) and maltose ($7480.6 \pm 5128.9 \mu\text{M}$ and $2205 \pm 1739.6 \mu\text{M}$, respectively) as the most prevalent sugars, while medium with FDBSL had glucose ($6001.2 \pm 701.4 \mu\text{M}$) and cellobiose ($1983.3 \pm 587.6 \mu\text{M}$) ($P < 0.05$). However, no sugar was detected in the examined media at 48 h of colonic fermentation. Eighteen amino acids were detected in media with FDBR, FDBSL, and FDWB at time zero, and 14 amino acids were detected at 48 h of colonic fermentation. Glycine was the amino acid with the highest content in all fermentation media at time zero ($50913 \pm 2847.6 - 54933.4 \pm 921.9 \mu\text{M}$) and 48 h of colonic fermentation ($44468.8 \pm 9193.3 - 52962.1 \pm 6966.3 \mu\text{M}$) ($P < 0.05$). In addition to glycine, high lysine content

($2252.2 \pm 453.6 - 3149.8 \pm 650.6 \mu\text{M}$) was detected in media with FDBR, FDBSL, and FDWB at 48 h of colonic fermentation. Overall, there was a decrease in the content of isoleucine, leucine, valine, alanine, betaine, and glycine. In contrast, the content of lysine, histidine, threonine, tryptophan, and tyrosine increased at 48 h of colonic fermentation ($P < 0.05$). The content of methionine and phenylalanine did not change during fermentation ($P \geq 0.05$). Other metabolites were still detected in the media with FDBR, FDBSL, and FDWB. At 48 h of colonic fermentation, serotonin was detected in the medium with FDBSL ($109.9 \pm 156.5 \mu\text{M}$), and high choline content ($16060 \pm 1026.2 - 16804 \pm 664.4 \mu\text{M}$) was detected in all fermentation media.

During colonic fermentation, 13 phenolic compounds were detected, six phenolic acids, six flavonoids, and one tannin (Table 2). The contents of some compounds decreased during fermentation, such as 3,4-dihydroxybenzoic acid, ferulic acid, t-cinnamic acid, epigallocatechin gallate, and hesperitin. In contrast, p-coumaric acid, syringic acid, catechin, epicatechin, epicatechin gallate, hesperidin, and procyanidin B1 were produced. Epigallocatechin gallate was the phenolic compound with the highest content ($126.85 \pm 15.91 - 147.05 \pm 19.96 \text{ mg/L}$) in all fermentation media at time zero ($P < 0.05$), followed by 3,4-dihydroxybenzoic acid ($9.01 \pm 1.78 - 9.46 \pm 1.79 \text{ mg/L}$). At 48 h of colonic fermentation, epicatechin gallate had the highest content ($36.97 \pm 44.43 - 137.82 \pm 73.86 \text{ mg/L}$) regardless of fermentation media ($P < 0.05$). Epicatechin ($0.29 \pm 0.31 \text{ mg/L}$) and hesperidin ($0.18 \pm 0.26 \text{ mg/L}$) were produced only in medium with FDBR at 48 h of colonic fermentation. In contrast, p-coumaric acid, syringic acid, and hesperitin were produced only in media with FDBSL and FDWB. Some compounds detected in the different beet parts before the *in vitro* digestion were not detected during colonic fermentation.

Media with FDBR, FDBSL, and FDWB decreased the pH during colonic fermentation (Table 4) ($P < 0.05$). The lowest pH values at 48 h of fermentation were detected in medium

with FDBR (5.09 ± 0.81), followed by media with FDWB (5.50 ± 0.76) and FDBSL (6.03 ± 0.33).

3.6 Changes in antioxidant capacity during colonic fermentation

Media with FDBR, FDBSL, and FDWB had high antioxidant capacity during the 48 h of colonic fermentation as measured by ABTS, DPPH, and FRAP methods ($P \leq 0.05$). Medium with FDBR did not change the antioxidant capacity during colonic fermentation, regardless of the method used ($P \geq 0.05$). The antioxidant capacity increased in medium with FDBSL when evaluated with the DPPH method ($3.29 \pm 0.27 - 6.13 \pm 1.61$ $\mu\text{mol Trolox TEAC/g}$), and in medium with FDWB when measured with the ABTS ($43.5 \pm 2.96 - 55.7 \pm 2.88$ $\mu\text{mol Trolox TEAC/g}$) and DPPH method ($3.29 \pm 0.10 - 5.18 \pm 1.49$ $\mu\text{mol Trolox TEAC/g}$). Overall, the antioxidant capacity measured with the FRAP method decreased during colonic fermentation. The ABTS method detected the highest antioxidant capacity regardless of the fermentation media, and the medium with FDWB had the highest antioxidant capacity at 48 h of colonic fermentation (Table 4).

3.7 Chemometric analysis

In the correlation analysis between different metabolites and bacterial genera, a correlation heatmap was generated, where coefficients indicated a positive, negative, or neutral correlation (Fig. 4). The correlation analysis between organic acids and bacterial genera showed that *Bifidobacterium*, *Bacteroides* and *Prevotella* genera had strongest positive correlations with SCFA, such as acetate (0.33 – 0.63), butyrate (0.38 – 0.50), and propionate (0.39 – 0.45). In contrast, *Mediterraneibacter* and *Faecalibacterium* genera had strong negative correlations with these SCFA. *Lactobacillus*, *Roseburia*, and *Ruminococcus* genera had the strongest positive correlations with citrate (0.55 – 0.72) and succinate (0.47 – 0.70) (Fig. 4A). The

correlation analysis between sugars and bacterial genera showed that *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, and *Prevotella* genera had strongest negative correlations (> -0.26) with all sugars (maltose, cellobiose, glucose, erythritol, and UDP-glucose), while *Faecalibacterium*, *Mediterranibacter*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, and *Roseburia* had strongest positive correlations (≥ 0.44) (Fig. 4B).

The correlation analysis between amino acids and bacterial genera showed that the strongest positive correlations ($0.57 - 0.88$) were found to the non-essential amino acids asparagine, glutamate, glutamine, aspartate, and methylhistidine with *Roseburia*, *Lactobacillus*, *Fecalibacterium*, and *Mediterraneibacter* genera (Fig. 4C). *Akkermansia*, *Romboustsia*, *Methanobrevibacter*, and *Lactobacillus* genera had strong positive correlation with most of the essential amino acids, such as leucine ($0.28 - 0.41$), isoleucine ($0.24 - 0.41$), and valine ($0.31 - 0.47$). Tryptophan had the strongest positive correlation with *Lactobacillus* (0.58), followed by *Fecalibacterium* (0.53), *Romboustsia* (0.49), and *Mediterraneibacter* (0.49) genera. Overall, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, and *Prevotella* genera had the strongest negative correlation with all amino acids.

The correlation analysis between phenolic compounds and bacterial genera showed that the strongest positive correlations to 3,4-dihydroxybenzoic acid ($0.42 - 0.81$) and fumaric acid ($0.32 - 0.82$) with *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Streptococcus*, *Gemmiger*, *Mediterraneibacter*, *Fecalibacterium*, and *Lactobacillus*, while these genera and *Romboustsia*, *Methanobrevibacter*, *Akkermansia*, *Eubacterium*, and *Dorea* negatively correlated with epicatechin (< -0.01), syringic acid (< -0.07), catechin (< -0.22), and epicatechin gallate (< -0.19). The strongest negative correlations were detected to *Bacteroides* genus and epicatechin gallate (< -0.71) (Fig. 4D). *Lachnospira* genus positively correlated with hesperitin (0.44) and choline (0.31), while *Akkermansia* and *Ruminococcus* genera negatively correlated with hesperitin (-0.23) and choline (-0.19), respectively. The correlation between pH and bacterial genera was negative

with *Bacteroides* (-0.44), *Bifidobacterium* (-0.39), and *Prevotella* (-0.26) genera. *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Streptococcus*, *Gemmiger*, *Mediterraneibacter*, *Fecalibacterium*, and *Lactobacillus* genera positively correlated with pH (> 0.54) (Fig. 4D).

4. Discussion

The nutrients in the different examined beet parts were preserved after freeze-drying, allowing for the retention of sensitive bioactive compounds (e.g., phenolic compounds) (Bhatta, Stevanovic-Janezic, Ratti, 2020). FDBR, FDBSL, and FDWB had low water activity and moisture, and slightly acidic pH, helping to ensure product stability throughout storage and increased shelf life (Nascimento et al., 2024). FDBR, FDBSL, and FDWB had low luminosity and a bluish-red color, an important parameter that highlights the presence of phytochemicals with antioxidant capacity, helping to prevent or reduce the risk of cardiovascular diseases (Cömert et al., 2020). The highest concentration of betalains in FDBR and FDWB indicates an anti-inflammatory potential and high antioxidant capacity, which may have health implications, such as the prevention of chronic and cardiovascular diseases (Amin et al., 2023; Hussain et al., 2017; Sassonia, 2022; Slimen; Najar; Abderrabba, 2017).

The expanding market of ingredients combining significant contents of protein and low content of lipids, as detected in FDBR, FDBSL, and FDWB, has driven the need to diversify food choices since it is still dominated by animal-origin food products, which have consumption limitations for several groups, e.g., vegan, vegetarian, and flexitarian individuals, in addition to those with chronic diseases, such as hypertension (Rolands et al., 2024). The higher dietary fiber contents in FDBR, FDBSL, and FDWB could contribute to achieving the recommended daily fiber intake (25–30 g/day) (WHO, 2003). As a non-digestible component, the presence of soluble and insoluble fiber in different beet parts could induce changes in the relative abundance

of bacterial populations and the production of metabolites during colonic fermentation (de Oliveira et al., 2023).

To assess how FDBR, FDBSL, and FDWB influence the intestinal microbial population of hypertensive individuals, 16S rRNA sequencing was carried out to identify the taxonomic composition of phyla, families, and genera, as well as alpha and beta diversity during colonic fermentation. When analyzing the abundance of the phyla, Firmicutes were more abundant in media with FDBR, FDBSL, and FDWB at time zero, possibly as a characteristic of the colonic microbiota of hypertensive individuals. Although Firmicutes influence the regulation of systemic immunity (Jordan et al., 2023) and are associated with beneficial effects on health, their exacerbated presence may also indicate dysbiosis, which consequently increases the production of pro-inflammatory cytotoxins, contributing to vascular inflammation and hypertension (Nishimoto et al., 2024). Despite the highest initial abundance of Firmicutes, its decline at 48 h of colonic fermentation decreased the Firmicutes/Bacteroidetes ratio, indicating a healthier environment for favoring the growth of desirable bacteria and health-promoting effects (Zhou et al., 2021). The predominance of Proteobacteria at 48 h of colonic fermentation in all tested media could be linked to the greater availability of propionate and depletion of amino acids, favoring change in the relative abundance of the phylum, which are usually determinants of an unstable microbiota, such as that of hypertensive individuals (Duncan, Iyer, & Russel, 2021). The high glycine content found in FDBR, FDBSL, and FDWB is important since glycine is an amino acid that reduces hypertension risk (Arjmand et al., 2023). Medium with FDBR increased the relative abundance of Actinobacteria at 48 h of colonic fermentation, possibly due to the components present in beet root, acting to maintain gut homeostasis. Actinobacteria phylum includes *Bifidobacterium* genus, a critical bacterium linked to intestinal and systemic health (Bocchio et al., 2024; Binda et al., 2018).

Oscillospiraceae and Lachnospiraceae were the most abundant families in the fecal microbiota of hypertensive individuals. Colonic fermentation with FDBR, FDBSL, and FDWB decreased the relative abundance of Oscillospiraceae and Lachnospiraceae. In contrast, it increased the relative abundance of Enterobacteriaceae, which could help to produce inhibitory compounds against pathogens in an anaerobic environment. The increased relative abundance of Oscillospiraceae and Lachnospiraceae has been linked to inflammatory diseases and obesity due to their imbalance in the intestinal microbiota (Salazar-Jaramillo et al., 2024). Despite the decreased relative abundance at 48 h of fermentation, Oscillospiraceae could act in the metabolism of cholesterol, SCFA, and bile acids, which are essential for preserving cholesterol homeostasis (Vourakis et al., 2021). Lachnospiraceae family members are anaerobic, which allows them to use various substrates, mainly available in the gastrointestinal tract resulting from complex carbohydrate fermentation for their ecological success (Zaplana et al., 2024). Medium with FDBR increased the relative abundance of Bifidobacteriaceae and Lactobacillaceae, indicating that sugars, such as maltose and sucrose, present in beet root could favor the increase of these populations, which are associated with the production of acetate, butyrate, and propionate related to beneficial health effects (Li et al., 2024).

Faecalibacterium and *Blautia* were the most abundant genera at time zero of colonic fermentation. At 48 h of fermentation, there was a decrease in the relative abundance of these genera and a greater abundance of *Bifidobacterium* in the medium with FDBR and *Phocaeicola* in media with FDBSL and FDWB. The predominance of these genera at the end of the colonic fermentation could be linked to their high capacity to utilize the substrates available in the media with FDBR, FDBSL, and FDWB, e.g., soluble and insoluble fiber, sugars, and amino acids (Xiong et al., 2023). *Phocaeicola* is a genus proposed as a potential probiotic for alleviating the progression of chronic diseases (Jin et al., 2024).

The alpha diversity of bacterial communities in media with FDBR, FDBSL, and FDWB was measured using various indices. The results demonstrated a decreased or maintained bacterial diversity, indicating that FDBR, FDBSL, and FDWB may have impacted microbial diversity by reducing the number of species, diversity, and richness during colonic fermentation. In parallel, PCA Bray-Curtis and Unifrac indices highlighted the beta diversity, demonstrating that media with FDBR, FDBSL, and FDWB differed between zero and 48 h of colonic fermentation. Additionally, media with FDBR, FDBSL, and FDWB did not differ regarding the phylogenetic proximity between the genera identified at zero and 48 h of colonic fermentation. However, the presence of compounds with prebiotic properties in media during colonic fermentation could contribute to the growth of beneficial bacteria to the detriment of undesirable bacteria, resulting in low microbial diversity (Mafaldo et al., 2024).

During colonic fermentation, the correlation between the bacterial genera and the various metabolites, including organic acids, sugars, amino acids, and phenolic compounds showed a complex network of interactions with positive, negative, and neutral correlations, indicating the metabolic diversity between the different genera. This suggests that the availability of nutrients, pH, and redox potential of FDBR, FDBSL, and FDWB could influence and modulate microbial interactions with the environment because plant-based foods contribute to the proliferation of microbial populations, especially those beneficial, which confer health benefits (Pearce; Groisman & Townsend, 2023).

The contents of phenolic compounds in the different beet parts indicate that their concentrations and distributions are not homogeneous in the different beet parts, as well as that these concentrations were changed during colonic fermentation since they are being metabolized as a substrate by the intestinal microbiota. Phenolic compounds present in vegetable-rich diets interact with the intestinal microbiota, promoting microbial growth and diversity due to the ability of some of these compounds (especially polyphenols) to act like

prebiotics, favoring the growth of beneficial bacterial genera, such as lactobacilli and bifidobacteria, and the production of other compounds (Albin et al., 2024). Different correlations were detected between phenolic compounds and bacterial genera, showing a strong positive correlation between 3,4-dihydroxybenzoic acid and fumaric acid and a strong negative correlation between epicatechin, syringic acid, catechin, and epicatechin gallate with some bacterial genera, such as *Ruminococcus*, *Roseburia*, and *Lactobacillus*. The increase in diversity and bacterial abundance due to the presence of bioactive metabolites, such as phenolic acids, flavonoids, stilbenes, and tannins, contribute to intestinal health and disease prevention due to antioxidant and anti-inflammatory activity, influencing positively the regulation of metabolic responses and the reduction of systemic inflammation, and contributing to the prevention and control of hypertension (Has et al., 2023; Peñaloza et al., 2024).

Several metabolites, including organic acids and amino acids, were produced in media with FDBR, FDBSL, and FDWB during colonic fermentation, demonstrating the complex metabolic capacity of the microbiota and its importance in maintaining intestinal homeostasis (Hackmann, 2024). Low initial contents of SCFA, i.e., acetate, butyrate, and propionate, in media with FDBR, FDBSL, and FDWB indicate low activity of butyrate-producing bacteria, such as *Faecalibacterium*, *Roseburia*, and *Blautia*, which were negatively correlated. Butyrate serves colonocytes as an energy source that influences lipid metabolism and fat deposition linked to gene expression (Zhang et al., 2022). After 48 h of colonic fermentation, sugars from media with FDBR, FDBSL, and FDWB were exhaustively consumed to increase the SCFA contents, indicating the ability of these substrates to ameliorate endothelial function induced by angiotensin II (Robles-Vera et al., 2020). Production of SCFA highlights the importance of these metabolites in the maturation of the microbial community, in addition to exerting beneficial effects in arterial hypertension, mainly through G protein-coupled receptors (GPCR). It activates signaling cascades that modulate inflammation, enhance the integrity of the intestinal

barrier, and improve the recovery of the intestinal epithelium affected by bacterial toxins (Adams et al., 2024). GPCR activation improves endothelial function and reduces sympathetic nervous system activity, lowering blood pressure (Maruta & Yamashita, 2020; Tavares et al., 2024).

The high contents of acetate, butyrate, and propionate in media with FDBR, FDBSL, and FDWB suggests a positive impact on the intestinal microbiota of hypertensive individuals since SCFA act by reducing trimethylamine N-oxide (TMAO), which is associated with improvements in cardiovascular diseases (Wu et al., 2021). Butyrate is primarily produced in the colon, and its absorption passes to various organs (Amiri et al., 2022), acting in the anti-inflammatory function and production of nitric oxide, which helps regulate cardiovascular health (Jung et al., 2023; Robles-Vera et al., 2020). Propionate acts on cholesterol metabolism by decreasing the absorption of serum LDL, which is crucial for atherosclerosis formation (Haghikia et al., 2021). It also induces the production of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and YY peptides, sensitizing energy metabolism and appetite and indirectly influencing cardiovascular health (Fadeenko & Gridnev, 2021). In this way, SCFA improve endothelial function and increase nitric oxide bioavailability, reducing blood pressure (Yang et al., 2022).

The gradual depletion of simple sugars during colonic fermentation, especially in media with FDBSL and FDWB, demonstrates the efficacy of the intestinal microbiota in using these substrates as an energy source. The increase in the abundance of genera dominant in medium with FDBR at the beginning of the fermentation, such as *Bifidobacterium*, reflects the adaptation of the microbial community to the new conditions imposed by the limitation of sugars since this genus could undergo genomic changes that improve their metabolic functions, allowing them to adapt to the variable availability of carbohydrates in the intestinal environment (Camargo et al., 2022). *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, and *Prevotella* had strong negative correlations with sugar contents and pH values, indicating their high potential for sugar

consumption, production of SCFA, and decrease of pH values in media with FDBR, FDBSL, and FDWB. The increased abundance of *Bifidobacterium* is directly related to SCFA production, as these bacteria can use acetate as a substrate for butyrate production (Gehad et al., 2023). The presence of *Akkermansia* in acetate-rich environments indicates a possible synergy between these bacterial groups so that they positively regulate the expression of the serotonin transporter, which can improve motility and influence immune responses, and reduce blood pressure (Yaghoubfar et al., 2021).

On the other hand, the varying contents of different organic acids, such as the decrease in fumarate, succinate, and formate contents, in media with FDBR, FDBSL, and FDWB, evidence the versatile use of metabolic routes by the intestinal microbiota (Winiarska et al., 2022). Fumarate can be an electron acceptor, leading to metabolic changes and inhibitory effects toward some anaerobic bacterial populations, such as *Bacteroides* (Schuber & Uden, 2022). Fumarate can also alter fermentation pathways, increasing lactate production and decreasing succinate production (Dong et al., 2024). The presence of fumarate may exert a promising therapeutic effect in hypertension control by influencing L-arginine metabolism and nitric oxide production, contributing to vasodilation and blood pressure regulation (Edosuyi et al., 2021; Edosuyi et al., 2022; Edosuyi et al., 2023).

The high contents of essential amino acids, such as isoleucine, leucine, and valine, in media with FDBR, FDBSL, and FDWB denotes an abundant nitrogen source for bacterial growth. These amino acids were positively correlated with *Akkermansia*, *Romboutsia*, and *Lactobacillus* genera. Some bacterial genera, such as *Romboutsia* and *Dorea*, could produce bioactive peptides from food proteins that modulate physiological processes, including the regulation of blood pressure since some amino acids (e.g., L-arginine) are crucial to producing nitric oxide that promotes vasodilation and lower blood pressure (Ichim et al., 2024). *Romboutsia* is a recently characterized genus demonstrating diverse metabolic capabilities,

including carbohydrate utilization and amino acid fermentation. It is crucial for maintaining intestinal homeostasis, given its fermentation and nitrogen fixation (Gerritsen et al., 2019). *Dorea* produces butyrate that promotes intestinal health and exerts anti-inflammatory and anti-hypertensive properties. Butyrate increases renal expression of the SCFA receptors GPR41 and GPR109A, restoring the balance in the renin-angiotensin system (RAS) and counteracting hypertension (Robles-Vera et al., 2020; Chien-Ning et al., 2022).

In parallel, the depletion of essential amino acids during colonic fermentation of FDBR, FDBSL, and FDWB could be linked to the use of these compounds by intestinal bacteria as a carbon and nitrogen source (Qingyang et al., 2018). The contents of threonine and tryptophan were substantially reduced during colonic fermentation. Tryptophan had a strong positive correlation with *Lactobacillus* and *Romboutsia*. The catabolism of threonine mainly involves its conversion into acetyl-CoA and glycine, which can subsequently be metabolized into pyruvate. Colonic fermentation could decrease threonine contents (Zhao et al., 2020). Valerate is a branched-chain fatty acid produced during the colonic fermentation of protein. Valerate can be used by commensal intestinal bacteria as a substrate to produce SCFA, inhibiting the overgrowth of opportunistic pathogens (Bosnar et al., 2022).

During colonic fermentation, other metabolites were found in media with FDBR, FDBSL, and FDWB. The colonic microbiota of hypertensive individuals produced serotonin from FDBSL. Serotonin is derived from tryptophan and is essential to intestinal homeostasis (Koopman et al., 2022). Production of serotonin could be linked to the most significant decrease of tryptophan in the medium with FDBSL. In addition, intestinal microbiota regulates the maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks (De Vadder et al., 2018). Medium with FDWB increased choline contents during colonic fermentation. Choline is an essential nutrient vital to human metabolism and health and synthesizes phospholipids, betaine, and acetylcholine (Leermakers et al., 2015). Elevated contents of choline metabolites

generated from the metabolism of dietary choline and phosphatidylcholine (mainly originating from red meat, eggs, and fish) by intestinal microbiota are linked to increased risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes (Xu et al., 2022). *Ruminococcus* negatively correlated with choline, indicating the importance of this genus in protecting cardiovascular health. Interestingly, the content of betaine, a choline metabolite, decreased in media with FDBR, FDBSL, and FDWB during colonic fermentation.

Overall, the media with FDBR, FDBSL, and FDWB had a high antioxidant capacity during colonic fermentation. The distinct results in the scavenging abilities of ABTS, DPPH, and FRAP radicals found in media with FDBR, FDBSL, and FDWB could be related to the presence of specific phenolic compounds, such as phenolic acids, flavanols, flavanones, and stilbenes, in different beet parts, neutralizing reactive oxygen species and reducing the formation of free radicals, as well as to the various chemical properties of the metabolites formed during the colonic fermentation (Fan et al., 2022; de Oliveira et al., 2023; de Sousa Rocha et al., 2024).

5. Conclusion

FDBR, FDBSL, and FDWB had high nutritional value and the presence of bioactive compounds associated with health-promoting properties, particularly highlighting their antioxidant capacity and potential beneficial effects on the intestinal microbiota of hypertensive individuals. Colonic fermentation of FDBR, FDBSL, and FDWB induced favorable changes in intestinal microbiota composition, decreasing the Firmicutes/Bacteroidetes ratio and reducing or maintaining bacterial diversity, with an increase in the relative abundance of beneficial bacterial populations and a decrease in the relative abundance of non-beneficial bacterial populations. Additionally, the colonic fermentation of FDBR, FDBSL, and FDWB maintained the antioxidant capacity and produced various metabolites with properties linked to intestinal

and systemic health, with the potential to have a positive impact on cardiovascular health and hypertension. FDBR, FDBSL, and FDWB are novel, sustainable, and circular resources with beneficial effects on the intestinal microbiota of hypertensive individuals, which could be used as dietary adjuvant strategies in arterial hypertension management.

References

- Abdallah, A., Elemba, E., Zhong, Q., & Sun, Z. (2020). Gastrointestinal interaction between dietary amino acids and gut microbiota: with special emphasis on host nutrition. *Current Protein and Peptide Science*, 21(8), 785-798.
- Adams, L., Li, X., Burchmore, R., Goodwin, R. J., & Wall, D. M. (2024). Microbiome-derived metabolite effects on intestinal barrier integrity and immune cell response to infection. *Microbiology*, 170(10), 001504. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001504>
- Albin, K. J., Noble, P. N. N., Kumar, N., & Imran, K. (2024). The Nexus between Polyphenols and Gut Microbiota and Their Interplay in Human Health: A Brief Review. *Journal of Natural Remedies*, 1895–1908. <https://doi.org/10.18311/jnr/2024/35974>
- Ali, N., Gong, H., Giwa, A. S., Yuan, Q., & Wang, K. (2019). Metagenomic analysis and characterization of acidogenic microbiome and effect of pH on organic acid production. *Archives of microbiology*, 201, 1163-1171.
- Amin, O.-H., Rasmy, N., Nabieh, N., & Ahmed, E. (2023). Phytochemical and Physicochemical properties of betalains extracted from red beetroot (*Beta vulgaris* L.). *Egyptian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2023.232670.8527>
- Amiri, P., Hosseini, S. A., Ghaffari, S., Tutunchi, H., Ghaffari, S., Mosharkesh, E., ... & Roshanravan, N. (2022). Role of butyrate, a gut microbiota derived metabolite, in cardiovascular diseases: A comprehensive narrative review. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 837509. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.837509>

Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.

Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of AOAC International, 21th Edition, Washington, DC – USA, 2019.

Arjmand, B., Dehghanbanadaki, H., Yoosefi, M., Rezaei, N., Mohammadi Fateh, S., Ghodssi-Ghassemabadi, R., Najjar, N., Hosseinkhani, S., Tayanloo-beik, A., Adibi, H., Farzadfar,

Farshad., Larijani, Bagher. & Razi, F. (2023). Association of plasma acylcarnitines and amino acids with hypertension: A nationwide metabolomics study. *PloS One*, 18(1), e0279835.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279835>

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.

Bhatta, S., Stevanovic Janezic, T., & Ratti, C. (2020). Freeze-drying of plant-based foods. *Foods*, 9(1), 87. <https://doi.org/10.3390/foods9010087>

Binda, C., Lopetuso, L. R., Rizzatti, G., Gibiino, G., Cennamo, V., & Gasbarrini, A. (2018). Actinobacteria: a relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Digestive and Liver Disease*, 50(5), 421-428. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.012>

Bocchio, F., Mancabelli, L., Milani, C., Lugli, G. A., Tarracchini, C., Longhi, G., ... &

Ventura, M. (2024). Compendium of Bifidobacterium-based probiotics: characteristics and therapeutic impact on human diseases. *Microbiome Research Reports*, 4(1), N-A.

Bosnar, L., Shindler, A., Wood, J., Patch, C., & Franks, A. (2022). The potential to lower the incidence of necrotising enterocolitis with branched chain fatty acids. *Journal of*

Clinical Gastroenterology and Treatment, 8(1), 1-19. [https://doi.org/10.23937/2469-](https://doi.org/10.23937/2469-584X/1510085)

584X/1510085

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

BRAZIL. Ministry of Health. National Health Council. Approves guidelines and regulatory standards for research involving human beings. 240th Regular Meeting. Resolution N°. 466, of December 12, 2012. Available at:

<<http://www.conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>> Access at: 25th January 2018.

Camargo, A. R. O., van Mastrigt, O., Bongers, R. S., Ben-Amor, K., Knol, J., Abee, T., & Smid, E. J. (2023). Quantitative physiology and proteome adaptations of *Bifidobacterium breve* NRBB57 at near-zero growth rates. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e0256822. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02568-22>

Cecchini, L., Barmaz, C., Cea, M. J. C., Baeschlin, H., Etter, J., Netzer, S., ... & Ganai-Vonarburg, S. C. (2023). The Bern Birth Cohort (BeBiCo) to study the development of the infant intestinal microbiota in a high-resource setting in Switzerland: rationale, design, and methods. *BMC Pediatrics*, 23(1), 560. <https://doi.org/10.1186/s12887-023-04198-5>

Cömert, E. D., Mogol, B. A., & Gökmen, V. (2020). Relationship between color and antioxidant capacity of fruits and vegetables. *Current Research in Food Science*, 2, 1-10.

Comission Internationale de l'eclairage (CIE). (1986). *Colorimetry* (2. ed., p. 78). Viena: Central Bureau of the CIE.

de Albuquerque, T. M. R., Magnani, M., Lima, M. D. S., Castellano, L. R. C., & de Souza, E. L. (2021). Effects of digested flours from four different sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) root varieties on the composition and metabolic activity of human colonic microbiota *in vitro*. *Journal of Food Science*, 86(8), 3707-3719. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15852>

de Oliveira, S. P. A., de Albuquerque, T. M. R., Massa, N. M. L., Rodrigues, N. P. A., Sampaio, K. B., do Nascimento, H. M. A., ... & de Souza, E. L. (2023). Investigating the effects of conventional and unconventional edible parts of red beet (*Beta vulgaris* L.) on target bacterial groups and metabolic activity of human colonic microbiota to produce novel and sustainable prebiotic ingredients. *Food Research International*, 171, 112998.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112998>

de Oliveira, S. P. A., do Nascimento, H. M. A., Sampaio, K. B., & de Souza, E. L. (2021). A review on bioactive compounds of beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) with special emphasis on their beneficial effects on gut microbiota and gastrointestinal health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(12), 2022-2033.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768510>

de Sousa Rocha, S., da Silva, S. R. F., da Silva, J. Y. P., de Medeiros, V. P. B., Aburjaile, F. F., de Oliveira Carvalho, R. D., ... & de Souza, E. L. (2024). Exploring the potential prebiotic effects of *Opuntia dillenii* (Ker Gawl). Haw (Cactaceae) cladodes on human intestinal microbiota. *Journal of Functional Foods*, 118, 106259.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106259>

De Vadder, F., Grasset, E., Mannerås Holm, L., Karsenty, G., Macpherson, A. J., Olofsson, L. E., & Bäckhed, F. (2018). Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(25), 6458-6463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720017115>

do Nascimento, H.M.A., da Silva, J.Y.P., de Oliveira, S.P.A. et al. Thermal and storage stability of novel nutraceuticals combining potential probiotic *Limosilactobacillus fermentum* strains and freeze-dried jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg] peel. *Brazilian Journal of Microbiology* (2024). <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01576-8>

- Dong, H., Tan, J., Li, S., Ma, J., Tang, G., Dai, J., Yao, J., & Li, Z. (2024). Effect of fumarate and live yeast on methane emissions, rumen fermentation, blood metabolites, and lactation performance in dairy goats. *bioRxiv*, 2024-08. <https://doi.org/10.1101/2024.08.31.610449>
- dos Santos Lima, M., Dantas, B. S., Carvalho, A. J. D. B. A., Pereira, G. E., Pimentel, T. C., & Magnani, M. (2024). A novel method for ultra-fast determination of phenolics with performance comparable to UPLC/DAD: Method development and validation on analysis of seedless table grapes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 134, 106511. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106511>
- Duncan, S.H., Iyer, A., & Russell, W.R. (2021). Impact of protein on the composition and metabolism of the human gut microbiota and health. *Proceedings of the Nutrition Society*, 80(2), 173-185. <https://doi.org/10.1017/S0029665120008022>
- Edosuyi, O., Choi, M., Igbe, I., & Oyekan, A. (2021). Fumarate exerted an antihypertensive effect and reduced kidney injury molecule (KIM)-1 expression in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, 43(6), 555-564.
- Edosuyi, O., Choi, M. S., Igbe, I., & Oyekan, A. (2022). Effects of Fumarate on Blood Pressure and Renal Hemodynamics in Normotensive Rats: Possible Contribution of Sodium Potassium Co-transporter (NKCC). *The FASEB Journal*, 36(S1). <https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.s1.r2850>
- Edosuyi, O., Igbe, I., & Oyekan, A. (2023). Fumarate and its downstream signalling pathways in the cardiorenal system: Recent insights and novel expositions in the etiology of hypertension. *European Journal of Pharmacology*, 176186. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.176186>
- Fan, S., Li, J., Zhang, X., Xu, D., Liu, X., Dias, A. C., ... & Chen, C. (2022). A study on the identification, quantification, and biological activity of compounds from *Cornus officinalis* before and after *in vitro* gastrointestinal digestion and simulated colonic fermentation. *Journal of Functional Foods*, 98, 105272. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105272>

- Gehad, M. H., Elsaadany, H. F., El-Korashi, L., Ahmed, A. M., & Yousif, Y. M. (2023). Butyrate-producing bacteria as microbiomarkers of chronic kidney disease progression in children. *GEGET*, 18(1), 1-11. <https://doi.org/10.21608/geget.2023.308020>
- Gerritsen, J., Hornung, B., Ritari, J., Paulin, L., Rijkers, G. T., Schaap, P. J., ... & Smidt, H. (2019). A comparative and functional genomics analysis of the genus *Romboutsia* provides insight into adaptation to an intestinal lifestyle. *BioRxiv*, 845511.
- Hackmann, T. J. (2024). The vast landscape of carbohydrate fermentation in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, fuae016. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuae016>
- Haghikia, A., Zimmermann, F., Schumann, P., Jasina, A., Roessler, J., Schmidt, D., ... & Landmesser, U. (2022). Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *European Heart Journal*, 43(6), 518-533. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab644>
- Haş, I. M., Tit, D. M., Bungau, S., Pavel, F. M., Teleky, B.-E., Vodnar, D. C., & Vesa, C. M. (2023). Cardiometabolic Risk: Characteristics of the Intestinal Microbiome and the Role of Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Hussain, E. A., Sadiq, Z., & Zia-Ul-Haq, M. (2018). *Bioactivities of Betalains* (pp. 109–124). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95624-4_6
- Ichim, N., Marín, F., & Orenes-Piñero, E. (2024). Potential impact of bioactive peptides from foods in the treatment of hypertension. *Molecular Nutrition & Food Research*, 68(14), 2400084. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202400084>
- Jagadeesh, C., Madhavi, M., Padmaja, V. V., & Prasad, M. S. (2018). Effect of organic manures on quality and shelf life of beet root cv. crimson globe. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(11), 3615-3621. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.711.414>

- Jin, S., Chen, P., Yang, J., Li, D., Liu, X., Zhang, Y., Xia, Q., Li, Y., Chen, G., Li, Y., Tong, Y., Yu, W., Fan, X., & Lin, H. (2024) *Phocaeicola vulgatus* alleviates diet-induced metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease progression by downregulating histone acetylation level via 3-HPAA. *Gut Microbes*, 16(1), 2309683.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2309683>.
- Jordan, C. K., Brown, R. L., Larkinson, M. L., Sequeira, R. P., Edwards, A. M., & Clarke, T. B. (2023). Symbiotic Firmicutes establish mutualism with the host via innate tolerance and resistance to control systemic immunity. *Cell Host & Microbe*, 31(9), 1433-1449.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.07.008>
- Jung, J., Niraula, S., Du, J., Pamulapati, V., Jang, J. W., Xiong, L., ... & Ho, K. J. (2023). Microbe-derived butyrate activation of free fatty acid receptor-3 reduces neointimal hyperplasia after arterial injury by regulating immune response transcription networks in endothelial cells. *JVS-Vascular Science*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.jvssci.2023.100144>
- Heravi, F. S. (2024). Gut microbiota and autoimmune diseases: mechanisms, treatment, challenges, and future recommendations. *Current Clinical Microbiology Reports*, 11(1), 18–33. <https://doi.org/10.1007/s40588-023-00213-6>
- Koopman, N., Katsavelis, D., Ten Hove, A. S., Brul, S., de Jonge, W. J., & Seppen, J. (2021). The multifaceted role of serotonin in intestinal homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9487. <https://doi.org/10.3390/ijms22179487>
- Leermakers, E. T., Moreira, E. M., Kiefte-de Jong, J. C., Darweesh, S. K., Visser, T., Voortman, T., ... & Franco, O. H. (2015). Effects of choline on health across the life course: a systematic review. *Nutrition Reviews*, 73(8), 500-522. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv010>
- Li, J., Wang, S. Y., Yan, K. X., Wang, P., Jiao, J., Wang, Y. D., ... & Zhong, J. C. (2024). Intestinal microbiota by angiotensin receptor blocker therapy exerts protective effects against hypertensive damages. *Imeta*, 3(4), e222. <https://doi.org/10.1002/imt2.222>

Li, M., Xu, X., Jia, Y., Yuan, Y., Na, G., Zhu, L., ... & Ye, H. (2024). Transformation of mulberry polyphenols by *Lactobacillus plantarum* SC-5: Increasing phenolic acids and enhancement of anti-aging effect. *Food Research International*, 192, 114778.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114778>

Mafaldo, Í. M., Araújo, L. M., Cabral, L., Barão, C. E., Noronha, M. F., Fink, J. R., ... & Magnani, M. (2024). Cassava (*Manihot esculenta*) Brazilian cultivars have different chemical compositions, present prebiotic potential, and beneficial effects on the colonic microbiota of celiac individuals. *Food Research International*, 195, 114909.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114909>

Maruta, H., & Yamashita, H. (2020). Acetic acid stimulates G-protein-coupled receptor GPR43 and induces intracellular calcium influx in L6 myotube cells. *PLoS One*, 15(9), e0239428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239428>

Massa NML, Oliveira SPA, Rodrigues NPA, Menezes FNDD, Lima MS, Magnani M, Souza EL (2022) *In vitro* colonic fermentation and potential prebiotic properties of pre-digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-products. *Food Chemistry*, 388:133003.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133003>

Menezes FNDD, Almeida ETC, Vieira ARS, Aquino JS, Lima MS, Magnani M, Souza EL (2021) Impact of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by-product on composition and metabolic activity of human colonic microbiota *in vitro* indicates prebiotic properties. *Current Microbiology*. 78:2264–2274. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02502-z>

Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... & Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124.

<https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>

- Miniello, V., Miniello, A., Ficele, L., Skublewska-D'Elia, A., Dargenio, V., Cristofori, F., & Francavilla, R. (2023). Imunobiose intestinal e biomoduladores. *Nutrientes*, 15. <https://doi.org/10.3390/nu15092114> .
- Mirmiran, P., Houshialsadat, Z., Gaeini, Z., Bahadoran, Z., & Azizi, F. (2020). Functional properties of beetroot (*Beta vulgaris*) in management of cardio-metabolic diseases. *Nutrition & Metabolism*, 17, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0421-0>
- Moita, M. P.; Brito, M.C. C.; Rodrigues, P.V.; Freitas, C.A.S.L; Silva, L.C.C. & Dias, M.S.A. (2022). Analysis of clinical characteristics and quality of life of people with hypertension and diabetes: Cross-sectional study. *Revista de Atenção Primária à Saúde*, 25(2).
- Nilsson, T. (1970). Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *rubra* L.). *Lantbrukshogskolans Annaler*, 36, 179-219.
- Nishimoto, M., Griffin, K. A., Wynne, B. M., & Fujita, T. (2024). Salt-sensitive hypertension and the kidney. *Hypertension*, 81(6), 1206-1217. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.123.21369>
- Nshanian, M., Geller, B. S., Gruber, J. J., Chleilat, F., Camarillo, J. M., Kelleher, N. L., Zhao, Y., & Snyder, M. P. (2024). Short-chain fatty acids propionate and butyrate control growth and differentiation linked to cellular metabolism. *Research Square*, rs.3.rs-3935562. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3935562/v1>
- Obayomi, O. V., Olaniran, A. F., & Owa, S. O. (2024). Unveiling the role of functional foods with emphasis on prebiotics and probiotics in human health: A review. *Journal of Functional Foods*, 119, 106337. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106337>
- Pathak, A. D., Srivastava, S., Misra, V., Mall, A. K., & Srivastava, S. (2022). Evolution and history of sugar beet in the world: an overview. *Sugar Beet Cultivation, Management and Processing*, 3-10. https://doi.org/10.1007/978-981-19-2730-0_1

Pearce, V. H., Groisman, E. A., & Townsend, G. E. (2023). Dietary sugars silence the master regulator of carbohydrate utilization in human gut *Bacteroides* species. *Gut microbes*, 15(1), 2221484.

Peñaloza, R., Bermúdez, V., Galbán, N., Garrido, B., Santeliz, R., Gotera, M. P., Durán, P., Boscán-González, A., Carbonell-Zabaleta, A.-K., Durán Agüero, S., Rojas, D. M., González-Casanova, J., Díaz-Vásquez, W. A., Chacín, M., & Angarita, L. (2024). Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Cross-Talk: Molecular and Therapeutic Perspectives for Cardiometabolic Disease: A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(16), 9118. <https://doi.org/10.3390/ijms25169118>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Robles-Vera, I., Toral, M., de la Visitación, N., Aguilera-Sánchez, N., Redondo, J. M., & Duarte, J. (2020). Protective effects of short-chain fatty acids on endothelial dysfunction induced by angiotensin II. *Frontiers in physiology*, 11, 277. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00277>

Robles-Vera, I., Toral, M., de la Visitación, N., Sánchez, M., Gómez-Guzmán, M., Romero, M., ... & Duarte, J. (2020). Probiotics prevent dysbiosis and the rise in blood pressure in genetic hypertension: role of short-chain fatty acids. *Molecular Nutrition & Food Research*, 64(6), 1900616. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900616>

Rodrigues, D., Walton, G., Sousa, S., Rocha-Santos, T. A. P., Duarte, A. C., Freitas, A. C., & Gomes, A. M. P. (2016). *In vitro* fermentation and prebiotic potential of selected extracts from seaweeds and mushrooms. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.004>

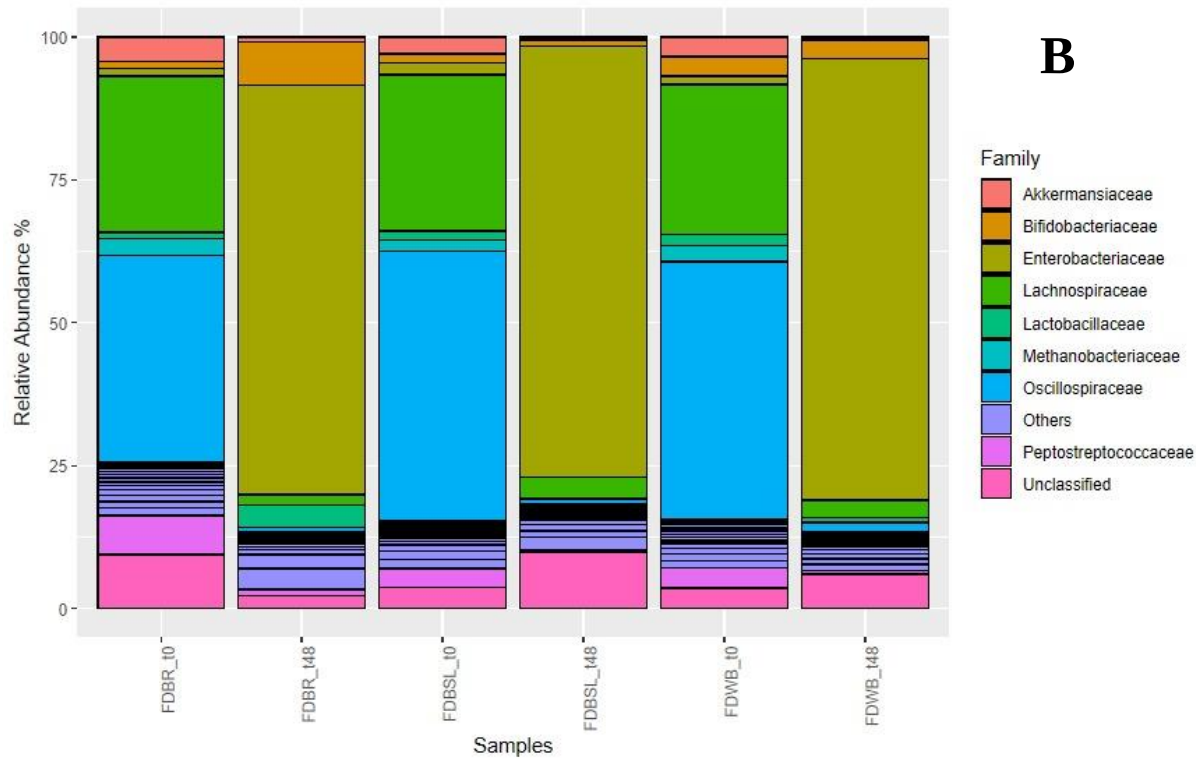
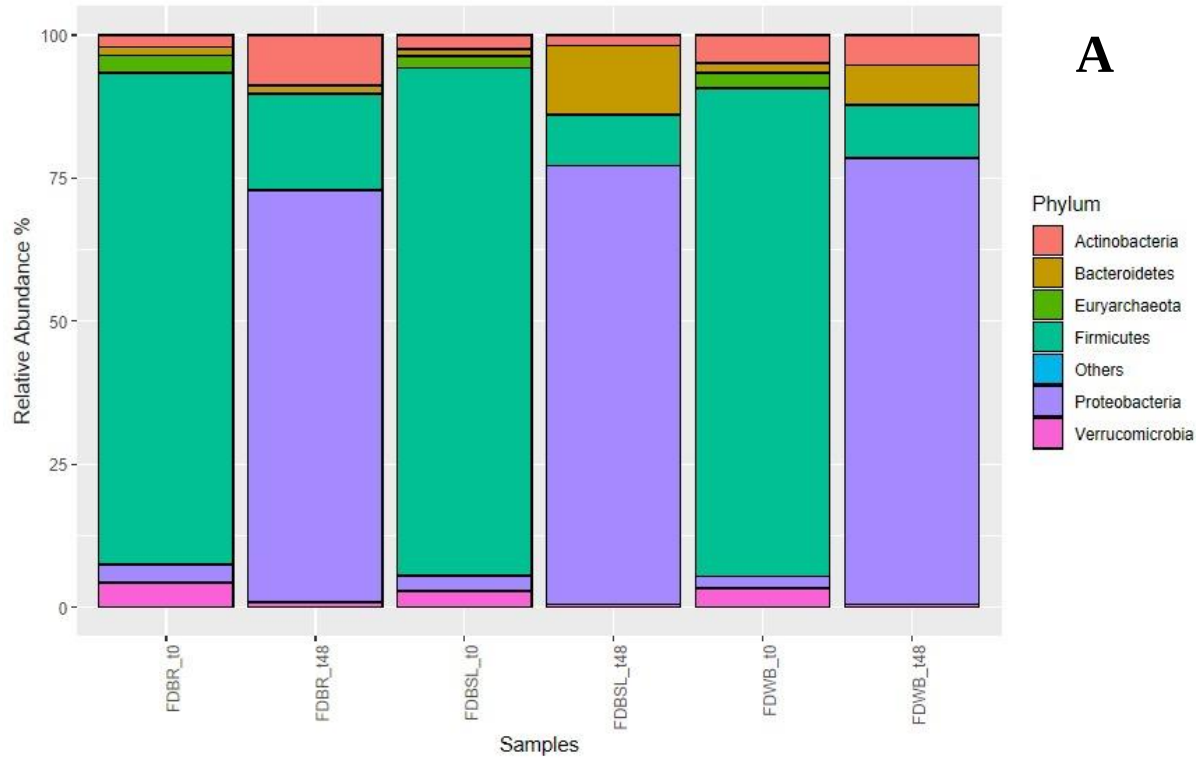
- Rolands, M. R., Hackl, L. S., Bochud, M., & Lê, K. A. (2024). Protein adequacy, plant protein proportion and main plant protein sources consumed across vegan, vegetarian, pesco-vegetarian and semi-vegetarian diets: A systematic review. *The Journal of Nutrition*, *in press*. <https://doi.org/10.1016/j.tjnut.2024.07.033>
- Salazar-Jaramillo, L., de la Cuesta-Zuluaga, J., Chica, L. A., Cadavid, M., Ley, R. E., Reyes, A., & Escobar, J. S. (2024). Gut microbiome diversity within Clostridia is negatively associated with human obesity. *Msystems*, *9*(8), e00627-24.
- Sampaio K. B., Brito Alves, J. L., Nascimento, Y. M., Tavares, J. F., Silva, M.S., Nascimento, D. S., Lima, M. S., Rodrigues, N. P. A., Garcia, E. F., Souza, E. L. (2022). Nutraceutical formulations combining *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin, and or resveratrol with beneficial impacts on the abundance of intestinal bacterial populations, metabolite production, and antioxidant capacity during colonic fermentation. *Food Research International*, *161*, 111800. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111800>
- Sassonia, R. C. (2022). Betalains as adjuvant for the treatment of obesity and associated diseases and a simple method to isolate them from beet roots. *International Journal of Health Science*, *2*(30), 2–12. <https://doi.org/10.22533/at.ed.1592302215062>
- Slimen, I., Najar, T., & Abderrabba, M. (2017). Chemical and Antioxidant Properties of Betalains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(4), 675–689. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.6B04208>
- Schubert, C., & Uden, G. (2023). Fumarate, a central electron acceptor for Enterobacteriaceae beyond fumarate respiration and energy conservation. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 82, pp. 267-299). Academic Press.
- Sorndech, W., Rodtong, S., Blennow, A., & Tongta, S. (2019). Impact of resistant maltodextrins and resistant starch on human gut microbiota and organic acids production. *Starch-Stärke*, *71*(5-6), 1800231.

- Von Elbe, J.H. (2001) Betalains. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F3.1.1-F3.1.7. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0301s00>
- Vourakis, M., Mayer, G., & Rousseau, G. (2021). The role of gut microbiota on cholesterol metabolism in atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8074. <https://doi.org/10.3390/ijms22158074>
- Yang, P., Zhou, L., Chen, M., Zeng, L., Ouyang, Y., Zheng, X., ... & Tian, Z. (2022). Supplementation of amino acids and organic acids prevents the increase in blood pressure induced by high salt in Dahl salt-sensitive rats. *Food & Function*, 13(2), 891-903.
- Wang, Y., Do, T., Marshall, L. J., & Boesch, C. (2023). Effect of two-week red beetroot juice consumption on modulation of gut microbiota in healthy human volunteers—a pilot study. *Food Chemistry*, 406, 134989. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134989>
- Winiarska, A., Hege, D., Gemmecker, Y., Kryściak-Czerwenka, J., Seubert, A., Heider, J., & Szaleniec, M. (2022). Tungsten enzyme using hydrogen as an electron donor to reduce carboxylic acids and NAD⁺. *ACS Catalysis*, 12(14), 8707-8717. <https://doi.org/10.1021/acscatal.2c02147>
- World Health Organization. (2003). Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Available in <http://health.euroafrica.org/books/dietnutritionwho.pdf>.
- World Medical Association, WMA. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310(20), 2191-2194.
- Wu, Y., Xu, H., Tu, X., & Gao, Z. (2021). The role of short-chain fatty acids of gut microbiota origin in hypertension. *Frontiers in Microbiology*, 12, 730809. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.730809>

- Xiong, W., Zhang, B., Gu, Z., Muir, J., & Dhital, S. (2023). The microbiota and metabolites during the fermentation of intact plant cells depend on the content of starch, proteins and lipids in the cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 226, 965-973. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.108>
- Xu, M., Zheng, J., Hou, T., Lin, H., Wang, T., Wang, S., ... & Wang, W. (2022). SGLT2 inhibition, choline metabolites, and cardiometabolic diseases: a mediation Mendelian randomization study. *Diabetes Care*, 45(11), 2718-2728. <https://doi.org/10.2337/dc22-0323>
- Yaghoubar, R., Behrouzi, A., Zare Banadkoki, E., Ashrafian, F., Lari, A., Vaziri, F., ... & Siadat, S. D. (2021). Effect of *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, and their extracellular vesicles on the serotonin system in intestinal epithelial cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09786-4>
- Yin, H., Huang, J., Guo, X., Xia, J., & Hu, M. (2023). *Romboutsia lituseburensis* JCM1404 supplementation ameliorated endothelial function via gut microbiota modulation and lipid metabolisms alterations in obese rats. *FEMS Microbiology Letters*, 370, fnad016. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnad016>
- Yoo, S., Jung, S. C., Kwak, K., & Kim, J. S. (2024). The Role of Prebiotics in Modulating Gut Microbiota: Implications for Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(9), 4834. <https://doi.org/10.3390/ijms25094834>
- Zaplana, T., Miele, S., & Tolonen, A. C. (2024). Lachnospiraceae are emerging industrial biocatalysts and biotherapeutics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1324396. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1324396>
- Zhang, B., Liu, H., Liu, M., Yue, Z., Liu, L., & Fuchang, L. (2022). Exogenous butyrate regulates lipid metabolism through GPR41-ERK-AMPK pathway in rabbits. *Italian Journal of Animal Science*, 21(1), 473-487. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2022.2049985>

Zhao, L., Lu, Y., Yang, J., Fang, Y., Zhu, L., Ding, Z., ... & Wang, X. (2020). Expression regulation of multiple key genes to improve L-threonine in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 19, 1-23.

Zhou, X., Guan, Q., Qin, Y., Qin, Z., Du, B., & Lin, D. (2021). Dynamic changes in physico-chemical properties and bacterial community during natural fermentation of tomatoes. *Food Science and Technology*, 42, e63520. <https://doi.org/10.1590/fst.63520>



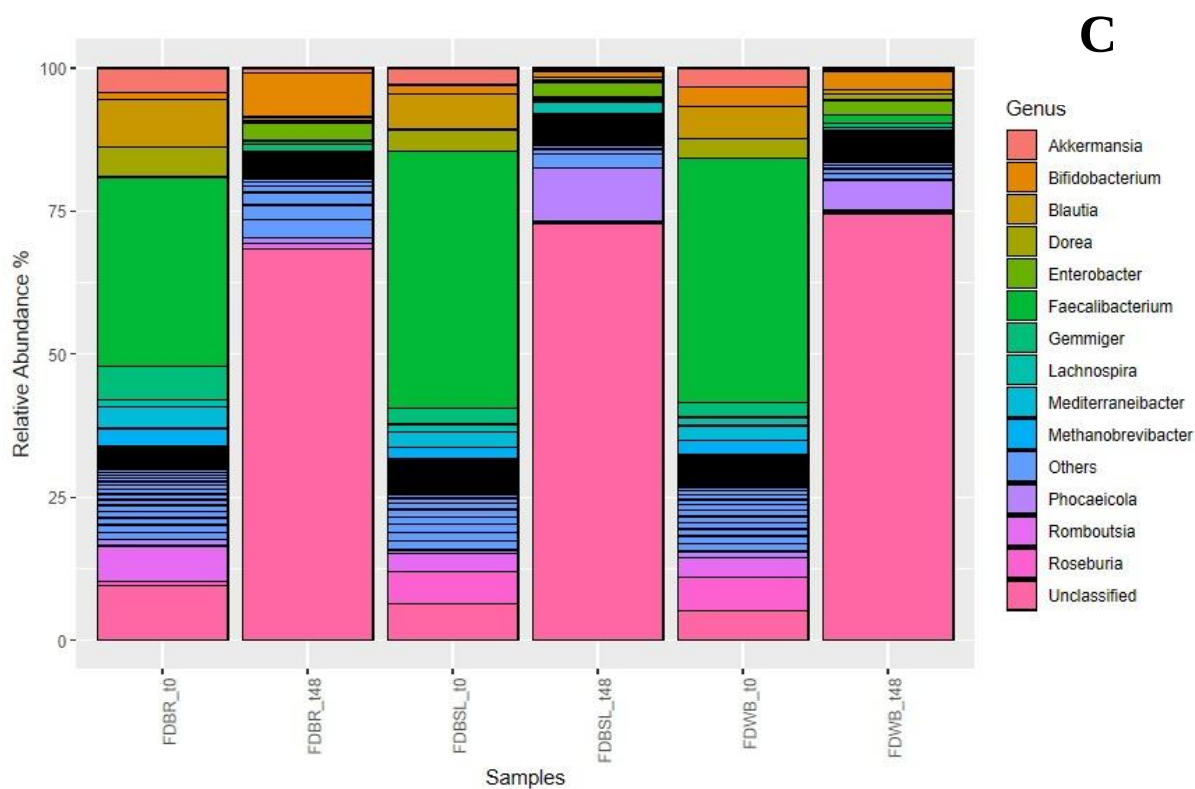


Fig 1. Relative abundance of the bacterial phyla (A) and the most predominant families (B) and main genera (C) identified in media with freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL), and freeze-dried whole beet (FDWB) at zero (t0) and 48 h (t48) of *in vitro* colonic fermentation with fecal inoculum from hypertensive individuals.

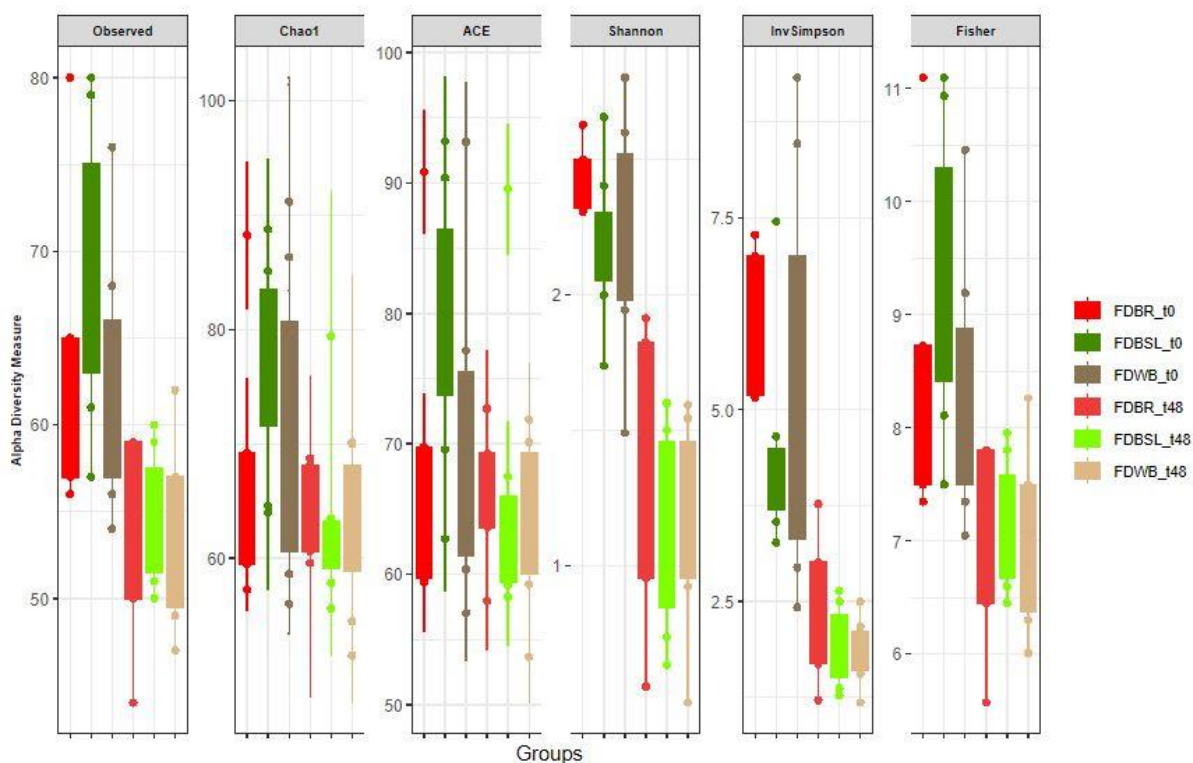


Fig 2. Alpha-diversity of the bacterial genera identified in media with freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL), and freeze-dried whole beet (FDWB) at time zero (t0) and 48 h (t48) of *in vitro* colonic fermentation.

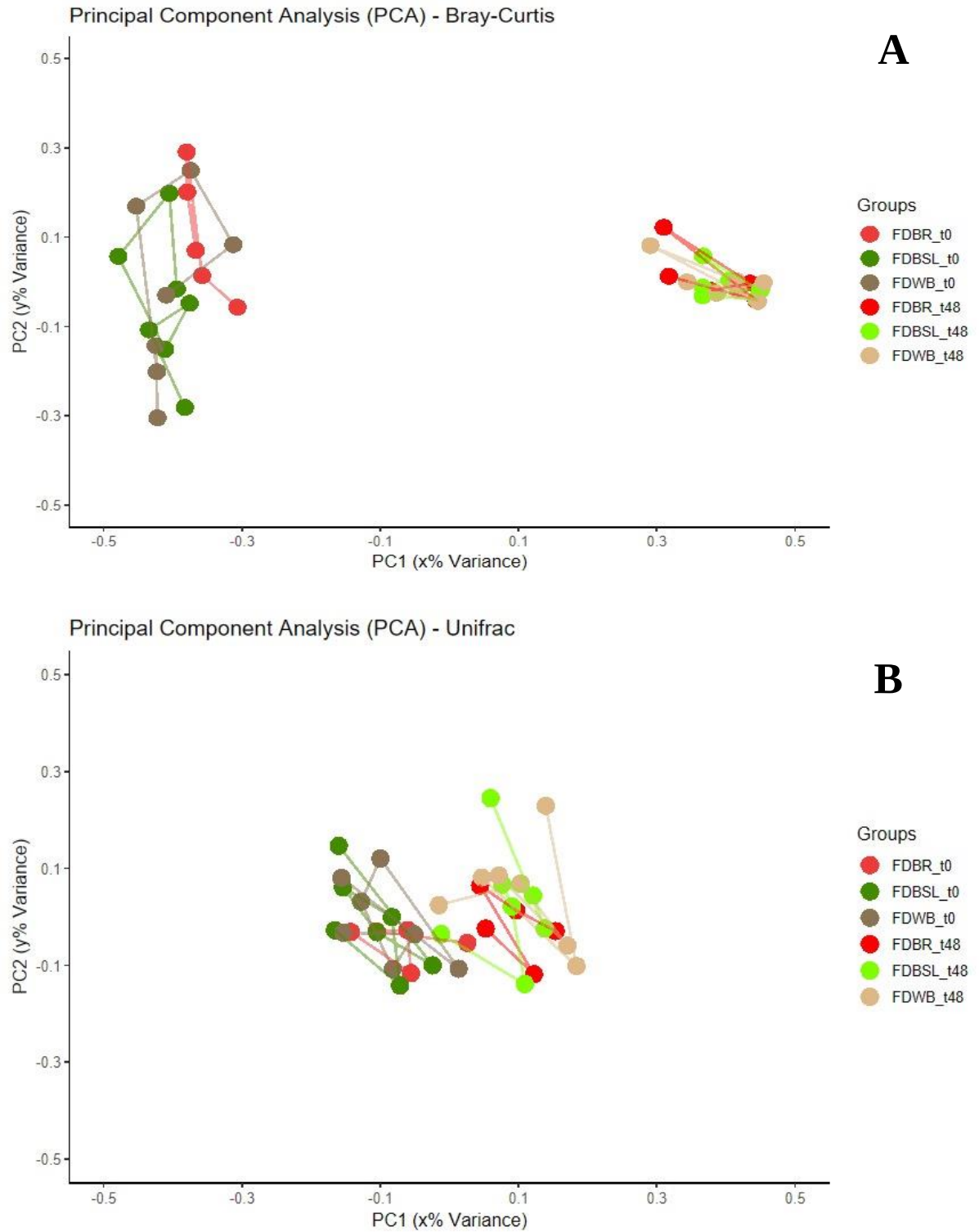
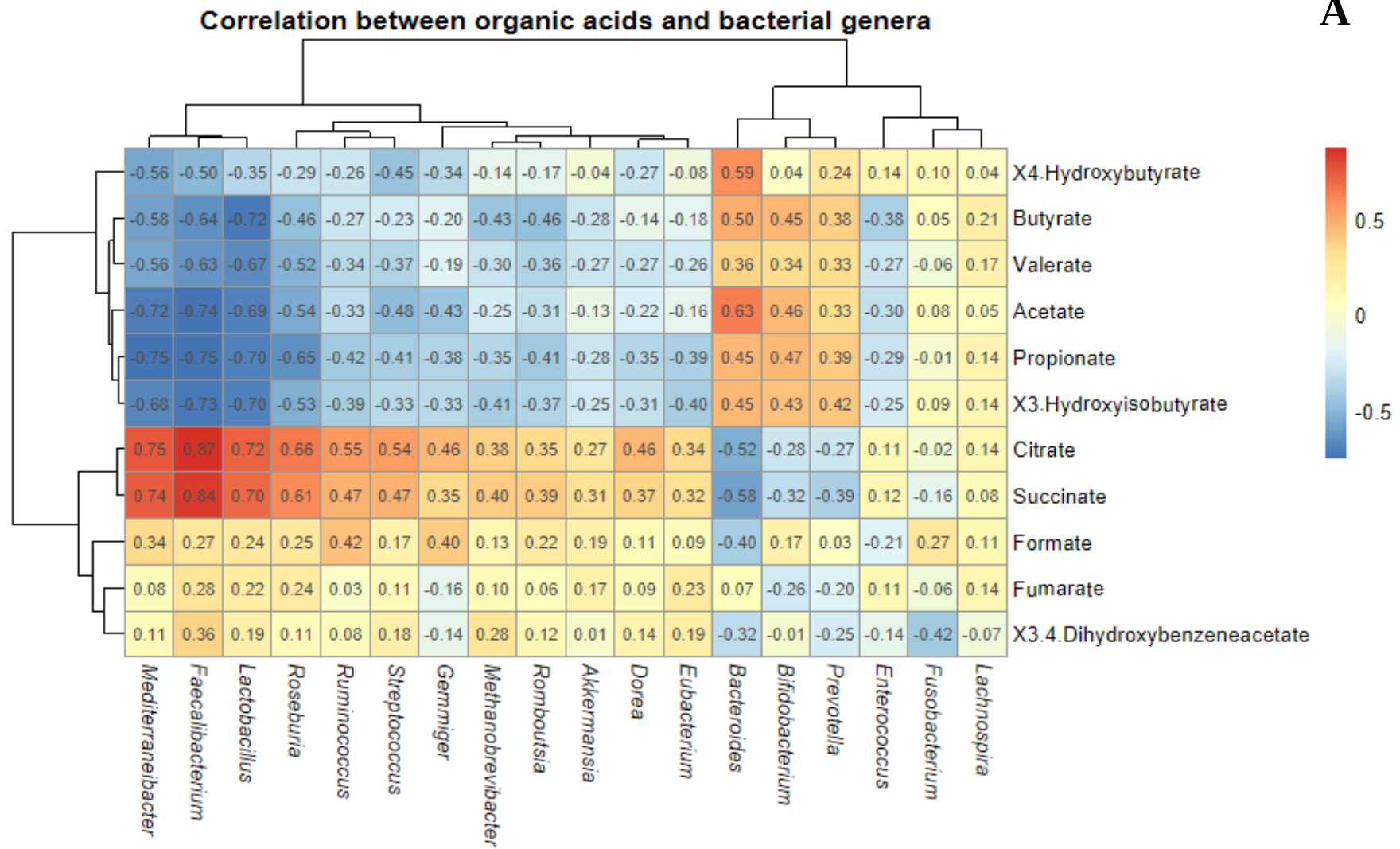
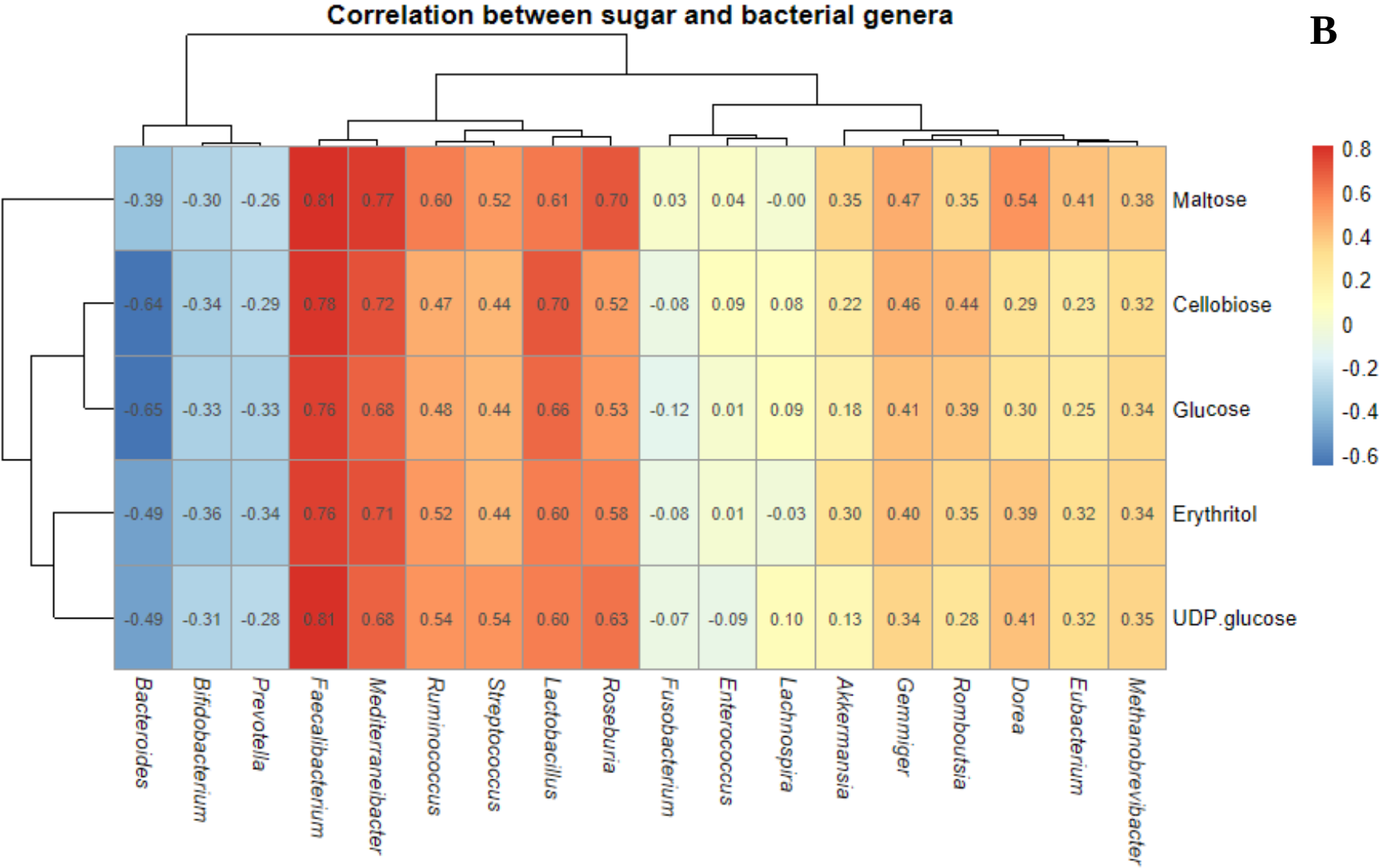


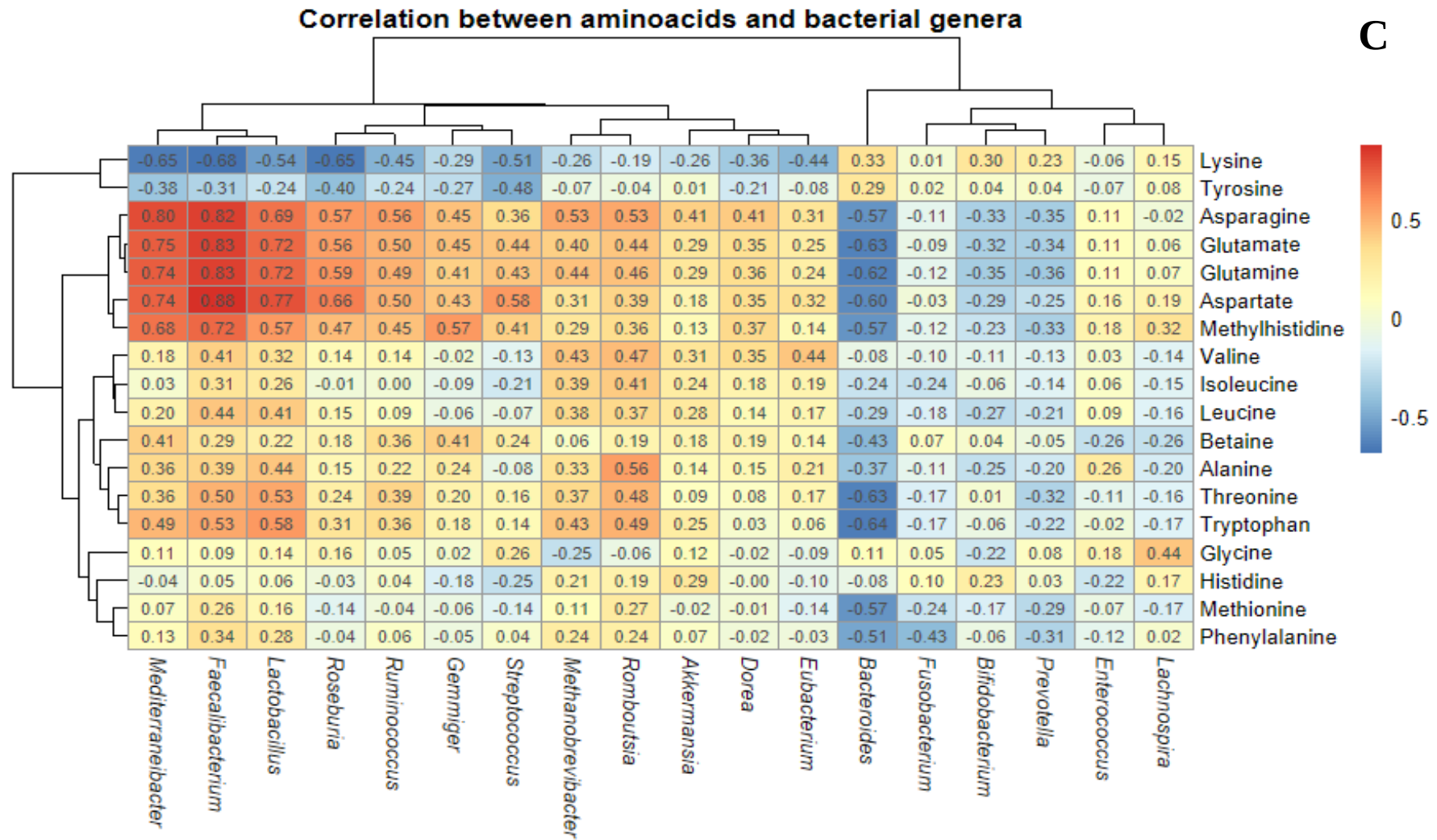
Fig 3. Beta diversity of the bacterial genera dimensioned by Bray-Curtis index (A) and Unifrac index (B) in media with freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL), and freeze-dried whole beet (FDWB) at time zero (t0) and 48 h (t48) of *in vitro* colonic fermentation with fecal inoculum from hypertensive individuals.

A



B





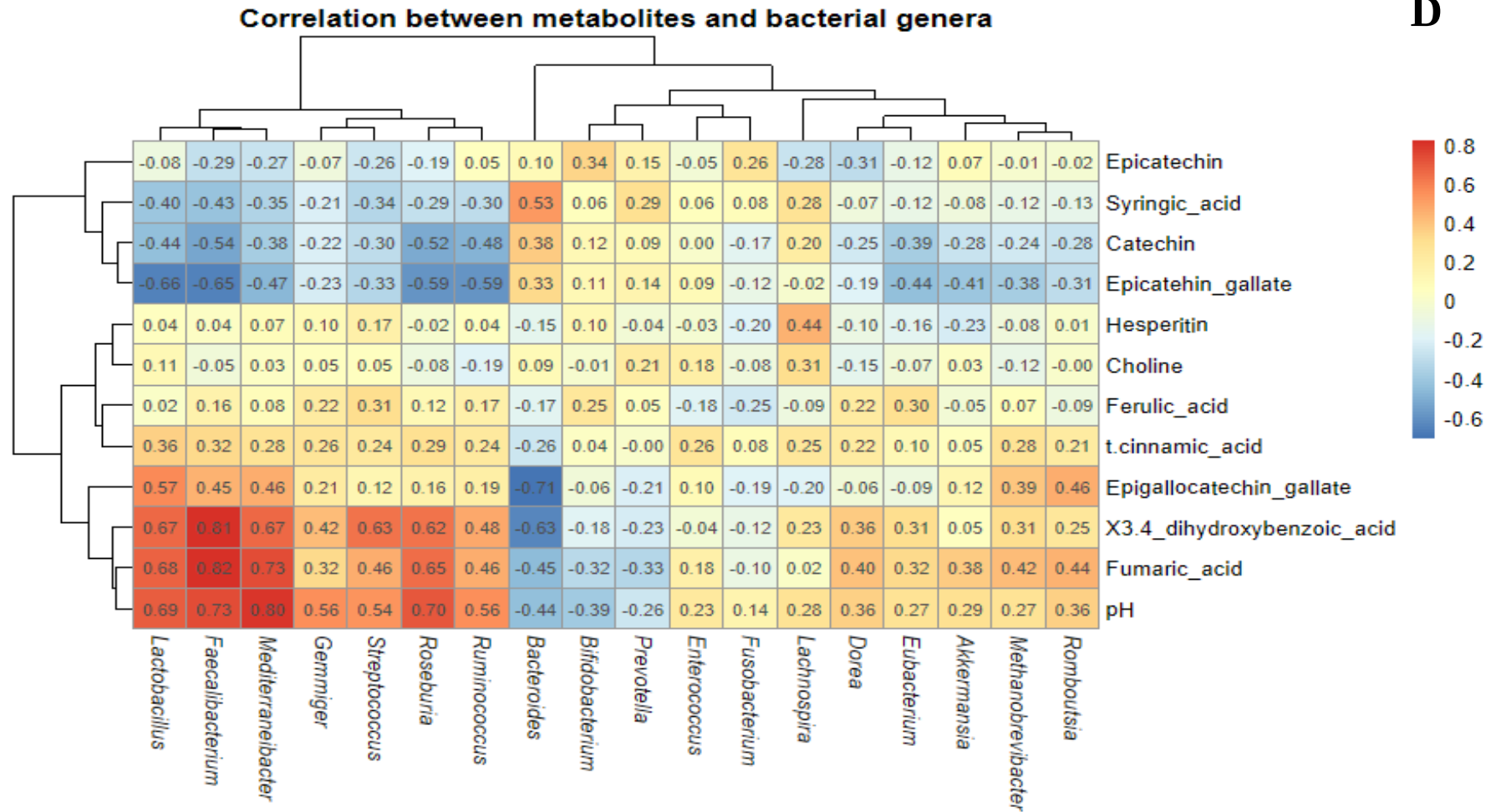
D

Fig. 4. Heatmap of correlation between organic acids and bacterial genera (A), sugars and bacterial genera (B), amino acids and bacterial genera (C) and metabolites and pH with bacterial genera (D), identified in media with freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL), and freeze-dried whole beet (FDWB) at zero (t0) and 48 h (t48) of *in vitro* colonic fermentation with fecal inoculum from hypertensive individuals.

Table 1. Physicochemical parameters and antioxidant capacity (average $\pm$ standard deviation, $n = 3$) of freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL), and freeze-dried whole beet (FDWB).

Parameters	Contents		
	FDBR	FDBSL	FDWB
a_w	0.29 ± 0.01^B	0.24 ± 0.00^C	0.36 ± 0.01^A
Ashes (%)	1.72 ± 0.33^A	1.71 ± 0.01^A	1.64 ± 0.08^A
Moisture (%)	2.84 ± 0.01^A	2.50 ± 0.58^A	0.09 ± 0.02^B
pH	5.90 ± 0.16^B	6.33 ± 0.09^A	6.20 ± 0.04^A
Proteins (g/100 g)	5.19 ± 0.23^C	7.34 ± 0.05^B	10.60 ± 0.45^A
Lipids (g/100 g)	0.26 ± 0.08^C	2.51 ± 0.14^A	1.68 ± 0.04^B
<i>Betalains</i>			
Betacyanins (mg/100 g)	30.26 ± 0.09^A	6.34 ± 0.10^B	31.02 ± 0.13^A
Betaxanthins (mg/100 g)	9.47 ± 0.04^A	6.09 ± 0.06^C	6.36 ± 0.05^B
<i>Color</i>			
L^*	4.26 ± 0.09^C	8.84 ± 0.12^B	10.20 ± 0.10^A
a^*	4.09 ± 0.04^A	0.81 ± 0.06^C	2.94 ± 0.09^B
b^*	2.28 ± 0.04^C	6.09 ± 0.06^B	6.36 ± 0.05^A
<i>Non-digestible carbohydrates</i>			
Soluble fiber (g/100g)	5.39 ± 0.03^C	11.92 ± 0.20^A	8.85 ± 0.04^B
Insoluble fiber (g/100g)	21.56 ± 0.22^C	34.70 ± 0.17^A	27.60 ± 0.20^B
Total dietary fiber (g/100g)	26.95 ± 0.19^C	46.62 ± 0.37^A	36.45 ± 0.16^B
<i>Antioxidant capacity</i>			
ABTS ^{•+} (μ mol Trolox TEAC/g)	60.6 ± 11.4^A	30.8 ± 1.12^B	20.0 ± 1.84^C
DPPH [•] (μ mol Trolox TEAC/g)	24.0 ± 3.83^A	15.2 ± 0.28^B	11.3 ± 0.05^C
FRAP (μ mol FeSO ₄ /g)	38.2 ± 0.625^A	23.6 ± 1.49^C	32.5 ± 1.77^B

A–C: Different superscript capital letters on the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$) between samples of different freeze-dried beet parts, based on Tukey's test. Abbreviations: a_w , water activity; ABTS^{•+} cation-2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-tiazoline)-6-sulfonic acid; DPPH[•], 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; FRAP, ferric-reducing ability of plasma; FeSO₄, ferrous sulfate.

Table 2. Phenolic compounds identified in freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL), and freeze-dried whole beet (FDWB) (mg/L; average, n = 3), as well as in media with FDBR, FDBSL, and FDWB at zero and 48 h of *in vitro* colonic fermentation with fecal inoculum from hypertensive individuals (mg/L; average, n = 8).

Compounds	Vegetable samples			Colonic fermentation					
	Before digestion			Zero			48 h		
	FDBR	FDBSL	FDWB	FDBR	FDBSL	FDWB	FDBR	FDBSL	FDWB
<i>Phenolic acids</i>									
3,4-dihydroxybenzoic acid	14.23 ± 0.00 ^A	nd	7.09 ± 0.04 ^B	9.01 ± 1.78 ^A	9.46 ± 1.79 ^A	9.14 ± 1.89 ^A	0.82 ± 1.66 ^A	nd	0.42 ± 1.19 ^A
4-hydroxybenzoic acid	10.71 ± 0.12 ^A	nd	5.31 ± 0.08 ^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Caftaric acid	1.24 ± 1.75 ^A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Chlorogenic acid	1.23 ± 0.01 ^C	1.82 ± 0.01 ^A	1.57 ± 0.01 ^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ferulic acid	nd	nd	nd	0.41 ± 0.29 ^A	0.16 ± 0.22 ^A	0.41 ± 0.29 ^A	0.12 ± 0.22 ^A	0.04 ± 0.11 ^A	0.25 ± 0.35 ^A
Fumaric acid	7.02 ± 0.02 ^B	7.35 ± 0.03 ^A	6.82 ± 0.00 ^C	1.97 ± 1.41 ^B	4.97 ± 0.65 ^A	2.37 ± 0.98 ^B	nd	nd	nd
p-coumaric acid	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.06 ± 0.16 ^A	0.07 ± 0.19 ^A
Syringic acid	1.69 ± 0.05 ^B	nd	1.97 ± 0.03 ^A	nd	nd	nd	nd	2.79 ± 2.24 ^A	1.29 ± 1.58 ^A
t-cinnamic acid	nd	14.22 ± 0.14 ^A	7.53 ± 0.11 ^B	nd	0.09 ± 0.18 ^A	nd	nd	nd	nd
Vanillic acid	nd	1.84 ± 0.02 ^A	1.47 ± 0.01 ^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Flavonoids</i>									
Catechin	0.49 ± 0.01 ^A	0.23 ± 0.00 ^C	0.31 ± 0.00 ^B	nd	nd	nd	0.18 ± 0.34 ^A	0.52 ± 0.46 ^A	0.90 ± 1.93 ^A
Delphinidin 3-glucoside	30.64 ± 0.48 ^A	nd	2.46 ± 0.01 ^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Epicatechin	nd	1.07 ± 0.00 ^A	0.61 ± 0.03 ^B	nd	nd	nd	0.29 ± 0.31 ^A	nd	nd
Epicatechin gallate	2.06 ± 0.00 ^B	2.17 ± 0.06 ^A	0.96 ± 1.36 ^C	nd	nd	nd	137.82 ± 73.86 ^A	36.97 ± 44.43 ^B	46.58 ± 44.01 ^B
Epigallocatechin gallate	49.46 ± 0.06 ^A	21.11 ± 0.01 ^C	31.65 ± 0.43 ^B	132.32 ± 22.34 ^B	147.05 ± 19.96 ^A	126.85 ± 15.91 ^C	1.98 ± 5.60 ^C	11.86 ± 10.80 ^B	27.35 ± 25.88 ^A
Hesperidin	nd	41.75 ± 0.21 ^A	23.38 ± 0.72 ^B	nd	nd	nd	0.18 ± 0.26 ^A	nd	nd
Hesperitin	nd	nd	nd	0.49 ± 0.21 ^A	0.24 ± 0.33 ^A	0.40 ± 0.27 ^B	nd	0.47 ± 0.20 ^A	0.51 ± 0.27 ^A
Isorhamnetin	nd	4.05 ± 0.07 ^B	7.81 ± 0.39 ^A	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Kaempferol 3-glucoside	nd	6.64 ± 0.01^A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Naringenin	nd	8.52 ± 0.16^A	4.80 ± 0.19^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Naringin	nd	3.56 ± 0.19^A	1.90 ± 0.02^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pelargonidin 3-glucoside	6.70 ± 0.62^B	nd	9.97 ± 0.85^A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quercetin 3-glucoside	nd	2.64 ± 0.02^A	1.44 ± 0.01^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quercetin hydrate	nd	3.64 ± 0.04^A	1.96 ± 0.05^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Tannin</i>									
Procyanidin A2	1.74 ± 0.05^B	nd	2.61 ± 0.09^A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Procyanidin B1	1.41 ± 0.00^A	1.12 ± 0.02^C	1.21 ± 0.00^B	nd	nd	nd	nd	nd	0.14 ± 0.38^A
Procyanidin B2	0.43 ± 0.01^C	0.60 ± 0.01^A	0.55 ± 0.01^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Stilbenes</i>									
cis-Resveratrol	nd	2.32 ± 0.00^B	4.76 ± 0.29^A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
t-Resveratrol	nd	2.47 ± 0.14^A	1.32 ± 0.01^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Others</i>									
O-Vanillin	12.76 ± 0.20^A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Vanillin	nd	0.99 ± 0.00^A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

A–C: Different superscript capital letters on the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$) between samples of different freeze-dried beet parts, based on Tukey's test.

Nd: Not detected.

Table 3. Metabolites identified in freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL), and freeze-dried whole beet (FDWB) (mM; average, n = 3), as well as in media with FDBR, FDBSL, and FDWB at zero and 48 h of *in vitro* colonic fermentation with fecal inoculum from hypertensive individuals (analyzed with ¹H-NMR) (mM; average ± standard deviation, n = 8).

Compounds	Vegetable samples			Colonic fermentation					
	Before digestion			Zero			48 h		
	FDBR	FDBSL	FDWB	FDBR	FDBSL	FDWB	FDBR	FDBSL	FDWB
<i>Organic acids</i>									
Acetate	41.7 ± 0.0 ^A	41.7 ± 0.0 ^A	41.7 ± 0.0 ^A	2516.8 ± 1145.2 ^A	2473.6 ± 1245.1 ^B	2379 ± 1009.1 ^C	26392.8 ± 9007.1 ^C	40933.4 ± 11392.2 ^A	32280 ± 9462.2 ^B
Butyrate	nd	nd	nd	990.6 ± 445.7 ^B	1064 ± 389.5 ^A	990 ± 317.1 ^C	7171.4 ± 7200.4 ^A	6665.8 ± 3348.9 ^B	6305 ± 3792.0 ^C
Citrate	nd	nd	nd	285.9 ± 56.0 ^B	306.9 ± 39.6 ^A	271 ± 41.4 ^C	nd	nd	nd
Formate	29.5 ± 0.0 ^A	13.9 ± 0.0 ^C	18.5 ± 0.0 ^B	122.8 ± 175.9 ^A	53 ± 15.0 ^C	68.8 ± 28.8 ^B	156.9 ± 163.6 ^B	208 ± 520.0 ^A	119 ± 246.7 ^C
Fumarate	nd	nd	nd	35 ± 17.3 ^C	80.2 ± 12.7 ^A	44.8 ± 7.5 ^B	15.8 ± 14.9 ^C	65.2 ± 20.7 ^A	43.6 ± 17.1 ^B
Propionate	nd	nd	nd	431.9 ± 312.7 ^B	604.2 ± 366.4 ^A	336.4 ± 30.3 ^C	13564.6 ± 6183.8 ^C	19971.8 ± 4963.3 ^A	17828 ± 5185.1 ^B
Succinate	17.9 ± 0.0 ^C	38.1 ± 0.0 ^B	49.7 ± 0.0 ^A	73.2 ± 79.5 ^B	84.8 ± 11.0 ^A	62.1 ± 17.4 ^C	10.3 ± 17.6 ^A	nd	nd
Valerate	nd	nd	nd	518.2 ± 171.4 ^C	537.9 ± 111.7 ^B	630 ± 215.9 ^A	3183.7 ± 3211.8 ^A	2653.9 ± 2278.8 ^B	1967 ± 1725.3 ^C
3,4-Dihydroxybenzeneacetate	131.5 ± 0.0 ^A	67.5 ± 0.0 ^C	86 ± 0.0 ^B	133.4 ± 41.0 ^C	198.8 ± 48.3 ^A	149.2 ± 31.0 ^B	106.5 ± 48.8 ^C	124.5 ± 37.2 ^B	125.6 ± 40.0 ^A
3-Hydroxyisobutyrate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	813.6 ± 690.7 ^C	1161.3 ± 956.8 ^A	1023.5 ± 981.8 ^B
4-Hydroxybutyrate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	971.5 ± 721.0 ^B	1820.7 ± 449.1 ^A	420.5 ± 784.3 ^C
<i>Sugars</i>									
Arabinose	3976.1 ± 0.0 ^B	3482.4 ± 0.0 ^C	8627.5 ± 0.0 ^A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cellobiose	nd	nd	nd	2398.1 ± 1136.1 ^A	1983.3 ± 587.6 ^C	2125 ± 666.8 ^B	nd	nd	nd

Erythritol	1119.5 ± 0.0 ^A	1119.5 ± 0.0 ^A	1119.5 ± 0.0 ^A	2062.8 ± 352.7 ^A	419.3 ± 87.9 ^C	1278 ± 169.6 ^B	nd	nd	nd
Glucose	901.4 ± 0.0 ^C	6156.4 ± 0.0 ^A	3186.4 ± 0.0 ^B	9435.4 ± 2544.3 ^A	6001.2 ± 701.4 ^C	6808 ± 1130.3 ^B	nd	nd	nd
Maltose	10894 ± 0.0 ^A	nd	7859.3 ± 0.0 ^B	7480.6 ± 5128.9 ^A	798.3 ± 317.7 ^C	2205 ± 1739.6 ^B	nd	nd	nd
UDP-glucose	nd	nd	nd	346.1 ± 117.5 ^B	390.5 ± 120.4 ^A	318 ± 107.8 ^C	nd	nd	nd
Sucrose	35374.9 ± 0.0 ^A	500.3 ± 0.0 ^C	8251.9 ± 0.0 ^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Amino acids</i>									
Alanine	813 ± 0.0 ^A	134.2 ± 0.0 ^C	325.6 ± 0.0 ^B	1557.8 ± 301.9 ^B	1911.1 ± 265.4 ^A	1461 ± 222.0 ^C	1600.1 ± 741.0 ^A	1577.2 ± 800.0 ^B	937 ± 789.4 ^C
Arginine	487.1 ± 0.0 ^A	352.4 ± 0.0 ^C	400.5 ± 0.0 ^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Asparagine	nd	nd	nd	538.1 ± 203.5 ^B	662.3 ± 173.5 ^A	487 ± 156.6 ^B	nd	nd	nd
Aspartate	827.2 ± 0.0 ^C	839.5 ± 0.0 ^B	898.5 ± 0.0 ^A	1204.9 ± 239.7 ^C	1463.5 ± 196.4 ^A	1320 ± 201.7 ^B	nd	nd	nd
Betaine	746.7 ± 0.0 ^A	263.5 ± 0.0 ^B	746.7 ± 0.0 ^A	1392.3 ± 606.1 ^A	343.4 ± 90.0 ^C	419.4 ± 113.5 ^B	396.5 ± 107.7 ^A	191.5 ± 67.2 ^C	265.5 ± 110.7 ^B
Glutamate	1369.2 ± 0.0 ^A	547.2 ± 0.0 ^C	804.5 ± 0.0 ^B	1559 ± 355.9 ^B	1669.1 ± 236.9 ^A	1495 ± 271.6 ^C	nd	nd	nd
Glutamine	2934.8 ± 0.0 ^A	524.6 ± 0.0 ^C	956.3 ± 0.0 ^B	1025.1 ± 162.1 ^B	1153.6 ± 144.5 ^A	912 ± 115.2 ^C	nd	nd	nd
Glycine	53654.3 ± 0.0 ^B	57193.8 ± 0.0 ^A	57193.8 ± 0.0 ^A	52982.5 ± 2888.0 ^B	54933.4 ± 921.9 ^A	50913 ± 2847.6 ^C	44468.8 ± 9193.3 ^C	52962.1 ± 6966.3 ^A	45779 ± 10006.9 ^B
Histidine	nd	nd	nd	121.2 ± 47.6 ^B	155.6 ± 20.2 ^A	108 ± 33.5 ^C	136.5 ± 43.0 ^C	265 ± 262.1 ^B	268 ± 229.4 ^A
Isoleucine	185.6 ± 0.0 ^A	114.2 ± 0.0 ^C	161.6 ± 0.0 ^B	1053.9 ± 179.9 ^C	1340.1 ± 162.0 ^A	1146 ± 186.7 ^B	734.9 ± 510.5 ^C	1058.6 ± 626.0 ^A	911 ± 656.3 ^B
Leucine	240.9 ± 0.0 ^A	83.9 ± 0.0 ^C	148.6 ± 0.0 ^B	1322.6 ± 181.8 ^B	1689.2 ± 138.9 ^A	1293.5 ± 215.6 ^C	903.4 ± 462.3 ^C	1187.3 ± 795.7 ^A	928 ± 534.9 ^B
Lysine	568.2 ± 0.0 ^A	23.1 ± 0.0 ^C	283.5 ± 0.0 ^B	1180.1 ± 158.4 ^B	1303.3 ± 271.3 ^A	1049 ± 194.9 ^C	2252.2 ± 453.6 ^C	3149.8 ± 650.6 ^A	2728 ± 1041.9 ^B

Methionine	nd	nd	nd	284.7 ± 47.9 ^B	358 ± 64.8 ^A	271 ± 64.3 ^C	335 ± 178.5 ^A	247.3 ± 144.3 ^C	302 ± 84.2 ^B
Phenylalanine	41.5 ± 0.0 ^A	20.6 ± 0.0 ^C	29.4 ± 0.0 ^B	736.2 ± 130.7 ^C	959.1 ± 112.5 ^A	802 ± 94.0 ^B	744.9 ± 203.3 ^A	695.9 ± 299.3 ^B	687 ± 146.8 ^C
Threonine	422.2 ± 0.0 ^A	187.5 ± 0.0 ^C	283.5 ± 0.0 ^B	1011.4 ± 182.8 ^C	1269.3 ± 210.0 ^A	1070 ± 261.5 ^B	850 ± 849.9 ^A	154.7 ± 75.1 ^C	397 ± 573.6 ^B
Tryptophan	58.2 ± 0.0 ^A	23.7 ± 0.0 ^C	32.4 ± 0.0 ^B	363.9 ± 70.3 ^C	422.5 ± 56.0 ^A	368 ± 57.0 ^B	357 ± 172.3 ^A	119.5 ± 84.3 ^B	108 ± 48.6 ^C
Tyrosine	nd	nd	nd	391.8 ± 70.3 ^C	1014.7 ± 194.3 ^A	561 ± 163.4 ^B	959.4 ± 192.8 ^C	1165.3 ± 478.5 ^A	967 ± 183.8 ^B
Valine	372.6 ± 0.0 ^A	132.8 ± 0.0 ^C	193.9 ± 0.0 ^B	1373.8 ± 244.7 ^C	1661.2 ± 295.2 ^A	1553 ± 226.8 ^B	714.2 ± 621.8 ^C	1398.1 ± 883.4 ^A	1174 ± 857.7 ^B
τ-Methylhistidine	nd	nd	nd	532.4 ± 450.4 ± 67.8 ^B	58.8 ^C	452 ± 64.6 ^A	142.9 ± 171.9 ^B	179.7 ± 183.4 ^A	128 ± 86.1 ^C
<i>Others</i>									
Adenine	nd	nd	nd	230 ± 122.8 ^A	222.9 ± 76.7 ^B	218 ± 82.6 ^C	358.6 ± 180.7 ^A	72.3 ± 43.9 ^C	118 ± 114.2 ^B
Chlorogenate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	22.7 ± 64.0 ^A	nd
Cholate	nd	nd	nd	531.4 ± 57.0 ^B	534.6 ± 62.5 ^A	510 ± 88.5 ^C	413.1 ± 109.8 ^A	276.7 ± 83.0 ^C	348 ± 108.6 ^B
Choline	12925.1 ± 0.0 ^B	13171.3 ± 0.0 ^A	12505 ± 0.0 ^C	15358.2 ± 985.8 ^C	16810.6 ± 250.6 ^A	16225.4 ± 675.2 ^B	16438.8 ± 709.3 ^B	16804 ± 664.4 ^A	16060 ± 1026.2 ^C
cis-Aconitate	nd	nd	nd	68.4 ± 43.6 ^A	68 ± 28.6 ^B	28.7 ± 12.2 ^C	85.9 ± 76.7 ^A	31.2 ± 21.5 ^C	38 ± 13.6 ^B
Cytidine	nd	nd	nd	64.8 ± 32.0 ^A	52.5 ± 32.2 ^B	49.6 ± 20.5 ^C	nd	nd	nd
DSS-d6 (Chemical Shape Indicator)	290.5 ± 0.0 ^A	287.3 ± 0.0 ^B	287.3 ± 0.0 ^B	288.7 ± 0.0 ^B	289.2 ± 0.0 ^A	287.3 ± 0.0 ^C	288.9 ± 0.0 ^B	289.2 ± 0.0 ^A	287 ± 0.0 ^C
Ethanol	487 ± 0.0 ^A	175.4 ± 0.0 ^C	274.1 ± 0.0 ^B	1738.9 ± 275.7 ^A	1723.5 ± 414.6 ^B	1702 ± 436.5 ^C	10406.4 ± 4735.8 ^A	6958.9 ± 1724.9 ^C	7556 ± 1701.4 ^B
Gallate	25.7 ± 0.0 ^C	97.6 ± 0.0 ^A	69.8 ± 0.0 ^B	nd	92.9 ± 23.0 ^A	19.4 ± 27.7 ^B	nd	nd	nd
Glycocholate	nd	nd	nd	276.6 ± 61.0 ^C	309.2 ± 70.4 ^B	403 ± 93.1 ^A	130.7 ± 86.5 ^A	69.9 ± 47.3 ^C	104 ± 40.8 ^B
Guanosine	29.9 ± 0.0 ^C	39.4 ± 0.0 ^A	34.2 ± 0.0 ^B	129.7 ± 68.4 ^C	165.2 ± 63.7 ^A	136 ± 50.0 ^B	nd	nd	nd
Indole-3-acetate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	32.1 ± 84.9 ^C	200 ± 141.9 ^A	146.7 ± 151.0 ^B

Indole-3-lactate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	167.7 ± 337.2 ^A	50.6 ± 143.1 ^C	114.6 ± 162.1 ^B
Inosine	nd	nd	nd	79 ± 40.2 ^A	63.1 ± 32.8 ^B	54.9 ± 30.4 ^C	nd	nd	nd
Methanol	73610.5 ± 0.0 ^C	164894.1 ± 0.0 ^A	160192 ± 0.0 ^B	nd	nd	nd	98268 ± 75105.1 ^A	62406.5 ± 52791.7 ^B	51159.8 ± 82450.2 ^C
N-Phenylacetylphenylalanine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	106.1 ± 148.7 ^A	nd
Propylene glycol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	968.9 ± 2563.5 ^A	nd	nd
Riboflavin	15 ± 0.0 ^C	39.4 ± 0.0 ^A	30.1 ± 0.0 ^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Serotonin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	109.9 ± 156.5 ^A	nd
Syringate	54.7 ± 0.0 ^A	25.9 ± 0.0 ^C	47.2 ± 0.0 ^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Trimethylamine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	131.4 ± 119.4 ^C	360.1 ± 35.2 ^A	228 ± 76.2 ^B
Uracil	nd	nd	nd	207.1 ± 86.0 ^C	229 ± 72.5 ^A	212 ± 64.1 ^B	429.6 ± 155.3 ^A	349.6 ± 224.9 ^C	397 ± 211.7 ^B
Xanthine	26.9 ± 0.0 ^C	48.3 ± 0.0 ^A	40.2 ± 0.0 ^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1,7-Dimethylxanthine	100.7 ± 0.0 ^A	97 ± 0.0 ^B	97 ± 0.0 ^B	nd	nd	nd	nd	nd	78.6 ± 222.3 ^A
2'-Deoxyadenosine	nd	nd	nd	186.9 ± 28.9 ^C	249.4 ± 42.5 ^A	206.7 ± 33.1 ^B	nd	nd	nd
3-Methylxanthine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	213.3 ± 233.3 ^A	4.6 ± 11.5 ^C	21.7 ± 56.0 ^B
3-Methyl-2-oxovalerate	391.8 ± 0.0 ^A	158.1 ± 0.0 ^C	244.5 ± 0.0 ^B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4-Aminobutyrate	277.9 ± 0.0 ^A	160.6 ± 0.0 ^C	239 ± 0.0 ^B	nd	nd	nd	1989 ± 691.2 ^A	732.1 ± 357.1 ^C	1140.7 ± 1036.4 ^B
5-Hydroxytryptophan	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	17.8 ± 50.4 ^A

A–C: Different superscript capital letters on the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$) between samples of different freeze-dried beet parts, based on Tukey's test.

Nd: not detected.

Table 4. pH values and antioxidant capacity (average $\pm$ standard deviation, $n = 8$) in media with freeze-dried beet root (FDBR), freeze-dried beet stem and leaves (FDBSL) and freeze-dried whole beet (FDWB) at zero and 48 h of *in vitro* colonic fermentation.

Parameters	Fermentation media					
	FDBR		FDBSL		FDWB	
	Zero	48 h	Zero	48 h	Zero	48 h
pH	6.73 ± 0.15^A	5.09 ± 0.81^B	6.74 ± 0.22^A	6.03 ± 0.33^B	6.68 ± 0.18^A	5.50 ± 0.76^B
Antioxidant capacity						
ABTS ^{•+} ($\mu\text{mol Trolox TEAC/g}$)	45.4 ± 3.86^A	50.4 ± 5.04^{Aa}	50.0 ± 2.93^{Aa}	52.0 ± 0.36^{Aa}	43.5 ± 2.96^{Ba}	55.7 ± 2.88^{Aa}
DPPH [•] ($\mu\text{mol Trolox TEAC/g}$)	2.88 ± 0.64^{Ac}	5.51 ± 2.57^{Ab}	3.29 ± 0.27^{Bc}	6.13 ± 1.61^{Ab}	3.29 ± 0.10^{Bc}	5.18 ± 1.49^{Ac}
FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$)	9.48 ± 2.11^{Ab}	5.60 ± 3.54^{Ab}	12.7 ± 1.73^{Ab}	5.28 ± 2.18^{Bb}	13.8 ± 1.40^{Ab}	8.48 ± 1.05^{Bb}

A–C: Different superscript capital letters on the same line for the same media and evaluated parameter indicate a significant difference ($p \leq 0.05$), based on Student's t-test.

a–c: Different superscript small letters in the same column at the same time interval denote difference ($p \leq 0.05$) among antioxidant capacity, based on Tukey's test.

Abbreviations: pH, hydrogenic potential; ABTS^{•+} cation-2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-tiazoline)-6-sulfonic acid; DPPH[•], 1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl; FRAP, ferric-reducing ability of plasma; FeSO₄, ferrous sulfate.

ANEXO

ANEXO A – CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IN VITRO DOS IMPACTOS DE DIFERENTES PARTES DA BETERRABA (Beta Vulgaris L.) SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL DE INDIVÍDUOS COM DIAGNÓSTICO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL

Pesquisador: Andressa Cavalcante do Nascimento

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 75905823.3.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.597.919

Apresentação do Projeto:

Trata-se de analisar o projeto de pesquisa intitulado " Avaliação in vitro dos impactos de diferentes partes da beterraba (Beta Vulgaris L.) sobre a microbiótica intestinal de indivíduos com diagnóstico de Hipertensão arterial" que será desenvolvido pela mestrandia Andressa Cavalcante do Nascimento do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição do CCS/UFPB, sob a orientação do Professor Evandro Leite de Souza e Co-orientação de Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o potencial prebiótico das farinhas de diferentes partes da beterraba sobre a microbiota intestinal de indivíduos com diagnóstico de Hipertensão arterial por meio do sistema de fermentação in vitro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e Benefícios vide parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo experimental in vitro que avaliará se a farinha de diferentes partes da beterraba apresenta propriedades prebióticas capaz de promover impacto na microbiótica intestinal de indivíduos com diagnóstico de hipertensão. Para isto, será necessário coletar fezes

Endereço: Campus I / Prédio do CCS UFPB - 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 6.597.919

desses indivíduos, recrutados a domicílio com todos os cuidados necessários para a coleta do material, que será armazenada e analisada no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos alimentos do Departamento de Nutrição do CCS/UFPB. São recrutados 6 homens e 6 mulheres.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto em tela se encontra bem instruído de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que rege as pesquisas envolvendo seres humanos.

Recomendações:

Recomenda-se manter a metodologia proposta.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa. Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2228749.pdf	18/12/2023 23:14:43		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2228749.pdf	18/12/2023 22:52:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Andressa_Projeto_comite_atualizado.pdf	18/12/2023 22:02:14	Andressa Cavalcante do Nascimento	Aceito
Outros	Questionario_recrutamento.pdf	18/12/2023 15:19:42	Andressa Cavalcante do Nascimento	Aceito
Outros	Certidao_aprovacao_colegiado.pdf	18/12/2023 14:01:46	Andressa Cavalcante do Nascimento	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_Comite.pdf	18/12/2023	Andressa	Aceito

Endereço: Campus I / Prédio do CCS UFPB - 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 6.597.919

Cronograma	CRONOGRAMA_Comite.pdf	13:54:36	Cavalcante do Nascimento	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	14/11/2023 19:08:34	Andressa Cavalcante do Nascimento	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Andressa_Projeto.pdf	14/11/2023 16:57:41	Andressa Cavalcante do Nascimento	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	14/11/2023 16:55:34	Andressa Cavalcante do Nascimento	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 21 de Dezembro de 2023

Assinado por:

**Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador(a))**

Endereço: Campus I / Prédio do CCS UFPB - 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br