



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

SUÊNIA GABRIELA GONÇALVES MORAIS

**EFEITOS DO METABOLISMO DE PROBIÓTICOS NA BIOACESSIBILIDADE E
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Hylocereus*
polyrhizus (PITAYA VERMELHA)**

JOÃO PESSOA

2019

SUÊNIA GABRIELA GONÇALVES MORAIS

**EFEITOS DO METABOLISMO DE PROBIÓTICOS NA BIOACESSIBILIDADE E
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Hylocereus*
polyrhizus (PITAYA VERMELHA)**

JOÃO PESSOA

2019

SUÊNIA GABRIELA GONÇALVES MORAIS

**EFEITOS DO METABOLISMO DE PROBIÓTICOS NA BIOACESSIBILIDADE E
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Hylocereus*
polyrhizus (PITAYA VERMELHA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de
Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, em
cumprimento dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marciane Magnani

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M827e Moraes, Suênia Gabriela Gonçalves.

Efeitos do metabolismo de probióticos na bioacessibilidade e capacidade antioxidante dos compostos fenólicos de pitaya vermelha / Suênia Gabriela Gonçalves Moraes. - João Pessoa, 2019.
70 f. : il.

Orientação: Marciane Magnani.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Diálise. 2. Digestão in vitro. 3. Fenólicos. 4. Metabolismo de probióticos. I. Magnani, Marciane. II. Título.

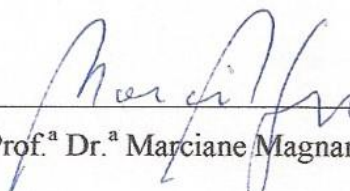
UFPB/BC

SUÊNIA GABRIELA GONÇALVES MORAIS

**EFEITOS DO METABOLISMO DE PROBIÓTICOS NA BIOACESSIBILIDADE
E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE
Hylocereus polyrhizus (PITAYA VERMELHA)**

Dissertação _____ em ____/____/2019

BANCA EXAMINADORA

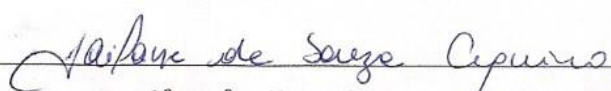


Prof.^a Dr.^a Marciane Magnani- DEA/CT/UFPB

Coordenador da Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Graciele da Silva Campelo Borges-DTA/CTDR/UFPB

Examinadora Interna



Prof.^a Dr.^a Jailane de Souza Aquino-DN/CCS/UFPB

Examinadora Externa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por Ele me dar forças para continuar quando nem eu mesma acreditava que seria capaz.

À Universidade Federal da Paraíba, especialmente ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), seu corpo docente e funcionários.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e apoio à pesquisa científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio à pesquisa - Código de Financiamento 001.

À minha orientadora, prof.^a Dr.^a Marciane Magnani, por ter aceitado me orientar, pela disponibilidade, paciência e oportunidades concedidas ao longo desses dois anos. Obrigada por todo incentivo e cobranças, sem dúvidas contribuíram para o meu crescimento científico.

À prof.^a Dr.^a Olga Martín-Belloso por todas as contribuições científicas para o aperfeiçoamento deste estudo.

À prof.^a Dr.^a Graciele da Silva Campelo Borges, membro da banca examinadora, pelo suporte desde o início desta dissertação, além da disponibilização de materiais e infraestrutura de laboratório.

À prof.^a Dr.^a Jailane de Souza Aquino, membro da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Ao prof., Dr. Marcos dos Santos Lima por todo suporte dado para o desenvolvimento deste trabalho e atenção prestada.

Aos meus pais, Geraldo Gonçalves e Solange Moraes, pelo amor, companheirismo e respeito às minhas escolhas mesmo, muitas vezes, sem entendê-las. Eu amo vocês!

A todos os meus familiares, especialmente Graça Moraes, Gustavo Moraes, Renê Moraes, Sinelândia Moraes, Wênia Cristina e Wesley Moraes por todo o carinho, conversas e torcida. Ao meu namorado, Hemerson Albuquerque, por toda a compreensão e suporte emocional ao longo dessa caminhada. Aos meus sobrinhos (tetezinhos), Júlia e Murilo, por encherem meu coração de amor e alegria.

Às minhas amigas Jéssica Guedes e Flávia de Melo, pela amizade e cumplicidade. Sem dúvidas esses dois anos seriam bem mais difíceis sem a presença de vocês e independentemente dos caminhos que seguiremos a partir de agora, eu guardarei com carinho os momentos que compartilhamos.

À Dr.^a Whyara Almeida pelo acolhimento e ajuda durante o treinamento no início das minhas análises. Obrigada por ser esse ser de luz!

Às minhas amigas da turma de mestrado 2017 do PPGCTA, Anna Karoline (Karol), Darlinne Lima, Miriane Moreira, Tammyrys Dantas, Thaís Ribeiro e Thaianaly Abreu por todos os momentos maravilhosos.

A todos os colegas do Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos (LPMA) Adma Melo, Daniele Schabo, Élvira Chaves, Helena Diniz, Iara Gomes, Geany Targino, Isabella Portela, Keyth Sulamita, Laênia Lopes, Myrella Cariri, Viviane Medeiros e Winnie Alencar.

À Aline Macedo e Priscilla Oliveira por toda paciência, gentileza e disponibilidade.

Aos técnicos, Seu Gilvandro da Costa e Seu Claudionor de Oliveira, por toda boa vontade e conversas no decorrer de dias tão cansativos.

Aos meus amigos, Beatriz Santos, Érika Peixoto, Jacinta Vitorino, Jéssica Rodrigues, Manuelle Macêdo, Mariana Montenegro, Matheus Carvalho e Wellysson Magno por me ouvirem nos momentos de alegria e também naqueles de ansiedade e frustrações.

Enfim, agradeço a todos, embora não citados, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e torcem por mim. Gratidão!

RESUMO

A pitaya vermelha (*Hylocereus polyrhizus*) é uma fruta originária do México e América Central e do Sul, difundida em regiões subtropicais e tropicais. Em sua composição, a pitaya vermelha possui considerável quantidade de compostos fenólicos que possuem reconhecida atividade antioxidante. A interação entre compostos fenólicos e bactérias probióticas têm atraído o interesse da comunidade científica, pois por meio de biotransformações podem ser obtidas formas mais ativas destes compostos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 sobre o conteúdo, bioacessibilidade dos compostos fenólicos e capacidade antioxidante da fração dialisada (absorvível) da pitaya vermelha. A contagem de células viáveis e parâmetros associados ao metabolismo dos probióticos teste foram determinados após 48 h de cultivo em pitaya vermelha. A sobrevivência de *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 na pitaya vermelha fermentada em condições gastrointestinais simuladas foi também determinada, bem como os efeitos das cepas teste no conteúdo e bioacessibilidade dos fenólicos da pitaya vermelha utilizando um modelo de digestão acoplado a uma barreira intestinal simulada. A fração dialisada da pitaya vermelha fermentada foi avaliada quanto à capacidade de desativação de radicais oxigenados. Após 48 h de cultivo em pitaya vermelha, as contagens iniciais (aproximadamente 7 log UFC/mL) de *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 aumentaram ($p < 0,05$) 1.59 ± 0.18 e 1.43 ± 0.15 log UFC/mL, respectivamente. No mesmo período, os teores de açúcar e pH diminuíram ($p < 0,05$), enquanto o conteúdo de ácidos orgânicos aumentou ($p < 0,05$). Após a exposição a condições gastrointestinais simuladas, foram observadas contagens de *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 na pitaya vermelha fermentada, em torno de 8 e 7 log CFU/mL, respectivamente. De modo geral, a fermentação com as cepas probióticas reduziu ($p < 0,05$) o conteúdo da maioria de ácidos fenólicos e flavonóides na pitaya vermelha. *L. acidophilus* LA-05 aumentou ($p < 0,05$) o conteúdo dos ácidos clorogênico, gálico e sirínico, cianidina 3,5 diglicosídeo, procianidina B1 e procianidina B2, quercetina e rutina na fração não dialisada (não absorvível) enquanto *B. lactis* BB-12 aumentou ($p < 0,05$) o conteúdo dos ácidos caféico, clorogênico e sirínico e procianidina B1 nesta mesma fração. A bioacessibilidade do ácido caféico, catequina, galato de epigallocatequina, kaempferol 3-glicosídeo, procianidina B1 e procianidina B2 aumentou ($p < 0,05$) na pitaya vermelha fermentada por *L. acidophilus* LA-05. Aumentos ($p < 0,05$) da bioacessibilidade da catequina, galato de epigallocatequina e procianidina B2 também foram observados na pitaya vermelha fermentada por *B. lactis* BB-12. A fração bioacessível da pitaya vermelha fermentada por *L. acidophilus* LA-05 ou *B. lactis* BB-12 apresentou maior atividade antioxidante do que a pitaya vermelha não fermentada. Estes resultados mostram o impacto das cepas probióticas *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 sobre os compostos fenólicos na pitaya vermelha e sugerem que estes microrganismos podem ser utilizados como uma alternativa para aumentar o potencial antioxidante desta fruta, além de aumentar o conteúdo de fenólicos disponíveis na fração não dialisada.

Palavras-chave: diálise, digestão *in vitro*, fenólicos, metabolismo de probióticos

ABSTRACT

The red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) is a fruit original from Mexico and Central and South America, widespread in tropical and subtropical regions. Red pitaya has considerable contents of phenolic compounds with recognized antioxidant activity. The interaction between phenolic compounds and probiotic bacteria have attracted the interest of the scientific community, because through transformations more active forms of these compounds may be obtained. The aim of the present study was to assess the effects of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 on the content, bioaccessibility of the compounds phenolics and antioxidant capacity of the dialyzed fraction in red pitaya. For this, viable counts and parameters associated to the metabolism of the test probiotic strains were assessed after 48 h-cultivation in red pitaya. The survival of *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 in fermented red pitaya under simulated gastrointestinal conditions, as well as the effects of the metabolism of these strains on the content and bioaccessibility of phenolic compounds in red pitaya using a digestion model coupled with a simulated intestinal barrier were also determined. The bioaccessible fraction of the red pitaya fermented by the test strains was evaluated for the oxygen radical absorption capacity. After 48 h of incubation in red pitaya, the initial viable counts (approximately 7 log CFU/mL) of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 increased ($p < 0.05$) 1.59 ± 0.18 and 1.43 ± 0.15 log CFU/mL respectively. At the same time, the sugar and pH contents decreased ($p < 0.05$), while the organic acid content increased ($p < 0.05$). After exposure to simulated gastrointestinal conditions, viable counts of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 in fermented red pitaya were around 8 and 7 log CFU/mL, respectively. In general, fermentation with probiotic strains decreased ($p < 0.05$) the content of most phenolic acids and flavonoids in red pitaya. *L. acidophilus* LA-05 increased ($p < 0.05$) the content of chlorogenic, gallic and syringic acids, cyanidin 3,5-diglucoside, procyanidin B1 and procyanidin B2, quercetin and rutin in the non dialyzed (non-absorbable) fraction while *B. lactis* BB-12 increased ($p < 0.05$) the content of caffeic, chlorogenic and syringic acids and procyanidin B1 in this same fraction. The bioaccessibility of caffeic acid, catechin, epigallocatechin gallate, kaempferol 3-glucoside, procyanidin B1 and procyanidin B2 increased ($p < 0.05$) in the red pitaya fermented by *L. acidophilus* LA-05. Increases ($p < 0.05$) in the bioaccessibility of catechin, epigallocatechin gallate and procyanidin B2 were also observed in the red pitaya fermented by *B. lactis* BB-12. The bioaccessible fraction of the red pitaya fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12 showed higher antioxidant activity than that obtained from the non-fermented red pitaya. These results show the impact of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 on phenolic compounds in the red pitaya and suggest that these microorganisms may be used as an alternative to enhance the antioxidant potential of this fruit beside an increase of phenolic contents available in the non dialyzed fraction.

Keywords: dialysis, in vitro digestion, phenolics, probiotic metabolism

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1- *Hylocereus polyrhizus* (pitaya vermelha) utilizada no estudo..... 13

Figura 2- Estrutura genérica de flavonóides (A) e ácidos fenólicos (B).....15

Figura 3-Classificação de flavonóides com base no padrão de substituição do anel C 16

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 4- Desenho esquemático do estudo.....22

ARTIGO

Fig. 1. Survival (log CFU/mL) of *L. acidophilus* LA-05 in MRS broth (—▲—) and fermented red pitaya pulp (—▲—) during exposure to simulated gastrointestinal conditions (A). Survival (log CFU/mL) of *B. lactis* BB-12 in cMRS broth (—○—) and fermented red pitaya pulp (—●—) during exposure to simulated gastrointestinal conditions (B).....64

Supplementary Figure 1. Fluorescence decay curves of fluorescein in ORAC assay of the dialyzed fractions of red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12.....65

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1. Condições utilizadas durante a digestão simulada e as contagens de células viáveis de <i>L. acidophilus</i> LA-05 e <i>B. lactis</i> BB-12.	25
---	----

ARTIGO

Table 1. Conditions used during the simulated digestion and the resultant viable cell counts of <i>L. acidophilus</i> LA-05 and <i>B. lactis</i> BB-12.	66
Table 2. Physicochemical parameters, sugars and organic acids contents in red pitaya pulp fermented by <i>L. acidophilus</i> LA-05 and <i>B. lactis</i> BB-12.	67
Table 3. Bioaccessibility of phenolic compounds in red pitaya pulp fermented by <i>L. acidophilus</i> LA-05 or <i>B. lactis</i> BB-12.	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 <i>Hylocereus polyrhizus</i> (PITAYA VERMELHA).....	13
3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS	14
3.2.1 Bioacessibilidade de compostos fenólicos	17
3.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR PROBIÓTICOS	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. CEPAS TESTE E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	22
4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA FERMENTAÇÃO.....	23
4.3 DETERMINAÇÃO DO pH, ACIDEZ TITULÁVEL (AT), SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (SST)	23
4.4 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS DE <i>L. acidophilus</i> LA-05 e <i>B. lactis</i> BB-12	24
4.5 SOBREVIVÊNCIA DE <i>L. acidophilus</i> LA-05 E <i>B. lactis</i> BB-12 EM PITAYA VERMELHA FERMENTADA SOB CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS	24
4.6 DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES, ÁCIDOS ORGÂNICOS E COMPOSTOS FENÓLICOS	25
4.7 DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE	26
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DIALISADA.....	27
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70

1 INTRODUÇÃO

As frutas são componentes importantes de uma dieta saudável e sua ingestão tem sido associada à diminuição do risco de doenças crônicas não transmissíveis (BVENURA; SIVAKUMAR, 2017). Os componentes bioativos naturalmente presentes em frutas e, em particular, os compostos fenólicos podem atuar como ingredientes funcionais na dieta, contribuindo para além da nutrição básica (CORRADINI; LANTANO; CAVAZZA, 2013).

A pitaya vermelha (*Hylocereus polyrhizus*) é uma fruta rústica, nativa do México e América Central e do Sul, também conhecida como fruta dragão (HUA et al., 2018). Pertencente à família *Cactaceae*, a pitaya vermelha é apreciada no mercado europeu e americano, devido à sua aparência atrativa, sabor doce e suave (DEMBITSKY et al., 2011). Em particular, a pitaya vermelha possui quantidades consideráveis de betacianinas, flavonóides e ácidos fenólicos, compostos com reconhecido potencial antioxidante (TENORE; NOVELLINO; BASILE, 2012), os quais estão associados a efeitos positivos na saúde dos consumidores (THIRUGNANASAMBANDHAM; SIVAKUMAR, 2017). Embora a pitaya vermelha seja sugerida como fonte de compostos bioativos, ainda são escassos os estudos que relatam a bioacessibilidade de compostos fenólicos encontrados em sua polpa.

Compostos fenólicos estão associados a diversos efeitos benéficos ao organismo humano por meio de propriedades antioxidantes (WANG et al., 2014), anti-inflamatórias (SOARES et al., 2019) e antimicrobianas (XU et al., 2018). Entretanto, para que exerçam tais atividades, estes precisam estar disponíveis para a absorção pós digestão (CZUBINSKI et al., 2019).

Neste sentido, é importante considerar a bioacessibilidade de tais compostos em cada matriz alimentar, ou seja, a quantidade ou fração que será liberada no trato gastrointestinal e que, portanto, se torna disponível para absorção no intestino (CARBONELL-CAPELLA et al., 2015; HEANEY, 2001). Por outro lado, a fração não absorvível permanece disponível no cólon juntamente com outros componentes alimentares e pode servir como substrato para reações enzimáticas ou para a fermentação colônica (ROCCHETTI et al., 2019).

Existe um crescente interesse na interação entre os compostos fenólicos e as bactérias presentes na microbiota intestinal humana (GWIAZDOWSKA et al., 2015). Sabe-se que há uma interação bidirecional em que os compostos fenólicos modulam a microbiota intestinal e,

reciprocamente, as bactérias residentes são capazes de metabolizar os compostos fenólicos, convertendo-os em metabólitos com maior bioatividade (OZDAL et al., 2016).

A biotransformação de compostos fenólicos também pode ocorrer durante a fermentação de alimentos ricos em fenólicos por bactérias probióticas (VALERO-CASES; JÁUREGUI; FRUTOS, 2017). Entre os probióticos mais estudados para incorporação em alimentos, espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* têm sido extensivamente estudadas (FILANNINO et al., 2015; DE BRITO ALVES et al., 2016). Por meio da atividade enzimática, esses probióticos são capazes de liberar compostos fenólicos conjugados com outros constituintes da matriz alimentar, como os açúcares (DELGADO et al., 2019). Consequentemente, as formas agliconas, biologicamente mais ativas, podem ser liberadas de seus glicosídeos correspondentes (HATI et al., 2015).

Assim, fica evidente a necessidade de novos estudos que contribuam com a geração de dados relacionados à biotransformação de compostos fenólicos por microrganismos probióticos, para que se possa avaliar o real potencial de utilização destes como ferramentas biotecnológicas para a obtenção de matrizes de valor agregado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do metabolismo dos probióticos *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 sobre o conteúdo, bioacessibilidade dos compostos fenólicos e capacidade antioxidante da fração dialisada (absorvível) da pitaya vermelha.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar viabilidade de *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 durante cultivo em pitaya vermelha e parâmetros fermentativos associados ao seu crescimento;
- Avaliar a sobrevivência das cepas probióticas teste durante cultivo em pitaya vermelha sob condições gastrointestinais simuladas;
- Analisar os efeitos do metabolismo das cepas probióticas teste no conteúdo e bioacessibilidade dos compostos fenólicos da pitaya vermelha;
- Avaliar a atividade antioxidante da fração dialisada (absorvível) da pitaya vermelha fermentada ou não por *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 sob condições fisiológicas simuladas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Hylocereus polyrhizus* (PITAYA VERMELHA)

As espécies do gênero *Hylocereus* são distribuídas mundialmente, principalmente em regiões subtropicais e tropicais, porém pouco exploradas no Brasil (XU et al., 2019).

Os frutos do gênero *Hylocereus*, são também conhecidos como fruta dragão ou pitaya. A *H. undatus* tem frutos caracterizados pela casca vermelha e polpa branca, os frutos de *H. megalanthus* (anteriormente conhecida como *Selenicereus megalanthus*) apresentam epicarpo amarelo e polpa branca, enquanto aqueles da espécie *H. polyrhizus* (Weber) Britton e Rose são caracterizados pela polpa e casca vermelha e conhecidos como pitaya vermelha (Figura 1) (NERD; MIZRAHI, 1997; TEL-ZUR et al., 2011).



Figura 1- *Hylocereus polyrhizus* (pitaya vermelha) utilizada no estudo
Fonte: Autoral.

Os frutos de pitaya vermelha apresentam excepcional tolerância à seca e destacam-se pelo sabor doce e pela abundância de nutrientes e compostos bioativos (TRAN; YEN; CHEN, 2015). A pitaya vermelha é consumida principalmente na forma da fruta fresca, porém também tem sido utilizada como um ingrediente na elaboração de sorvetes, xaropes e doces (ONG et al., 2014).

A pitaya vermelha destaca-se como uma fonte potencial de micronutrientes e compostos antioxidantes, os quais estão presentes nas diversas partes do fruto e particularmente na polpa e sementes (LIM et al., 2010; CHIA; CHONG, 2015). Tem sido relatado que extratos da polpa da pitaya vermelha apresentam elevadas quantidades de betacianinas, flavonóides e ácidos fenólicos, os quais apresentam um amplo espectro antimicrobiano e atividade antioxidante (TENORE; NOVELLINO; BASILE, 2012). Em um estudo anterior, Wu et al (2006) relataram quantidades consideráveis de compostos fenólicos presentes na polpa e na casca de pitaya vermelha. De acordo com estes autores, os conteúdos

de compostos fenólicos presentes na polpa ($42,4 \pm 0,04$ mg de equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco) são semelhantes àqueles encontrados na casca ($39,7 \pm 5,39$ mg de ácido gálico/100 g de peso fresco) (WU et al., 2006).

Em estudo *in vivo* foi sugerido que a pitaya vermelha pode auxiliar na prevenção da obesidade e diabetes tipo 2 (OMIDIZADEH et al., 2014). Ainda, foi sugerido que os oligossacarídeos da pitaya vermelha podem apresentar potencial prebiótico (WICHIENTHOT; JATUPORNPIPAT; RASTALL 2010).

As cascas da pitaya vermelha têm sido citadas como subprodutos do processamento com potencial para a formulação de nutracêuticos e aplicações em matrizes alimentares por serem fontes promissoras de antioxidantes naturais (TENORE; NOVELLINO; BASILE, 2012). Ainda, a partir da casca da pitaya vermelha é possível obter pectina com potencial utilização em alimentos de baixa viscosidade (MUHAMMAD et al., 2014) e corantes naturais para indústria alimentícia e cosmética em atendimento a demanda de utilização de pigmentos naturais (ESQUIVEL et al., 2007a; HARIVAINDRAN; REBECCA; CHANDRAN, 2008). Particularmente, a polpa de pitaya vermelha tem sido estudada como uma fonte alternativa de betacianina para aplicação como corantes naturais na indústria de alimentos (GENGATHARAN; DYKES; CHOO, 2017).

Dentre os compostos bioativos encontrados na pitaya vermelha, destaca-se as betalaínas devido sua reconhecida capacidade antioxidante. Um estudo anterior relatou que as betalaínas foram os principais compostos associados à atividade antioxidante de sucos de pitaya vermelha, diversos outros compostos fenólicos contribuíram em menor extensão (ESQUIVEL; STINTZING; CARLE, 2007b). A abundância de pigmentos naturais com bioatividade na pitaya vermelha eleva o valor nutricional do fruto e torna sua exploração promissora em países tropicais e subtropicais (JAMALUDIN; DING; HAMID, 2011).

3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos têm sido extensivamente estudados, pois apresentam reconhecida atividade antioxidante, além de contribuir para a prevenção de inflamações crônicas, doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários derivados de matrizes vegetais constituintes de um grupo heterogêneo de substâncias, caracterizado pela presença de um anel benzeno substituído por um ou vários grupos hidroxilas (-OH) e uma cadeia lateral funcional

(ESTEBAN-FERNÁNDEZ et al., 2017). Os compostos fenólicos podem ser divididos em ácidos fenólicos, flavanóides, taninos, estilbenos, lignanas e cumarinas (SHAHIDI; YEO, 2018).

Os flavonóides (Figura 2A) e os ácidos fenólicos (Figura 2B) constituem as classes de compostos fenólicos mais abundantes na dieta, abrangendo aos 60 e 30% do total, respectivamente, com mais de 8000 estruturas fenólicas conhecidas (OUCHEMOUKH et al., 2016).

Os flavonóides possuem baixo peso molecular, contendo quinze átomos de carbono, organizados em uma configuração C6-C3-C6 em sua estrutura, que é constituída por dois anéis aromáticos A e B (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; WANG; LI; BI, 2018). Estes, por sua vez estão unidos por uma ponte 3-carbono, geralmente na forma de um anel heterocíclico C (Figura 2A) (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; WANG; LI; BI, 2018).

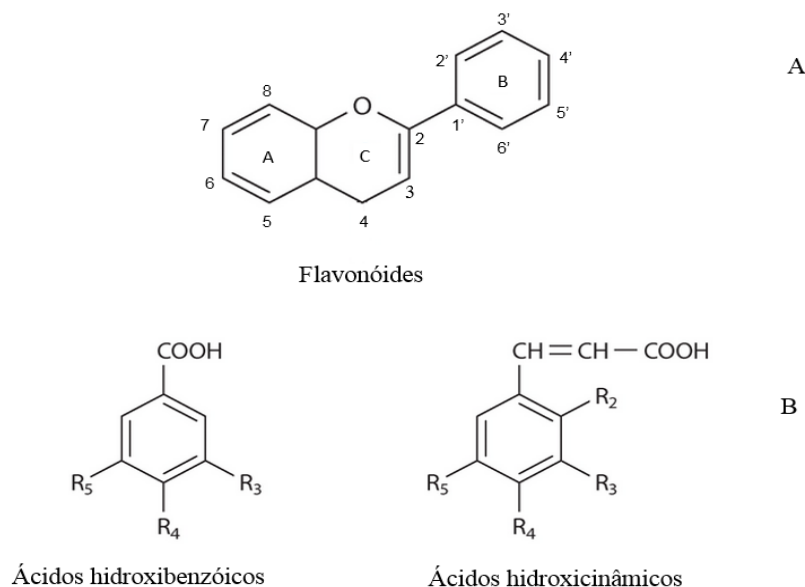


Figura 2-Estrutura genérica de flavonóides (A) e ácidos fenólicos (B)
Fonte: Khoddami; Wilkes; Roberts (2013).

Com base no padrão de substituição do anel C, os principais flavonóides são classificados em flavonóis, flavanona, flavonas, isoflavonas, antocianidinas e flavanóis (HOLLMANN; KATAN, 1999; NAGULA; WAIRKAR, 2019) (Figura 3). As diferenças nas estruturas dos subgrupos de flavonóides estão intimamente associadas ao seu potencial funcional (BALASUNDRAM et al., 2006). Os flavonóides podem se ligar a uma ou mais

moléculas de açúcar, sendo denominados flavonóides glicosídeos e, quando não estão ligados a uma molécula de açúcar, são chamados de agliconas (HAMINIUK et al., 2012).

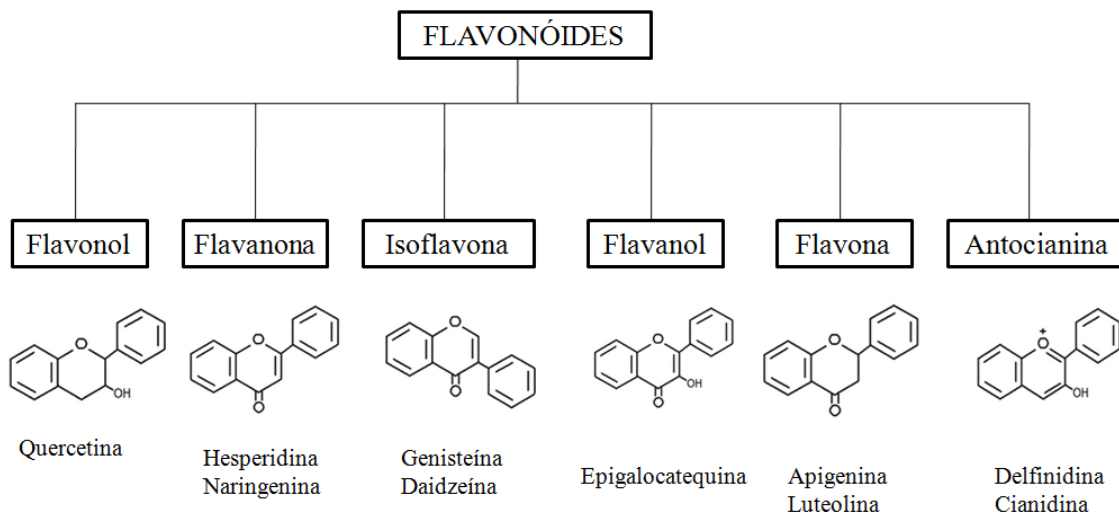


Figura 3-Classificação de flavonóides com base no padrão de substituição do anel C
Fonte: Adaptado de Nagula; Wairkar (2019).

Os ácidos fenólicos apresentam duas estruturas de carbono distintas: as hidroxibenzóicas, com sete átomos de carbono e as hidroxicinâmicas, contendo nove átomos de carbono (Figura 2B). Embora, o esqueleto básico permaneça o mesmo, os números e posições dos grupos hidroxila no anel aromático estabelecem as diferenças de atividade biológica (STALIKAS, 2007). Os ácidos hidroxicinâmicos geralmente estão presentes nos alimentos como ésteres simples com ácido quínico, enquanto os derivados do ácido hidroxibenzóico ocorrem principalmente nos alimentos sob a forma de glicosídeos (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Devido à enorme diversidade estrutural, os ácidos fenólicos estão associados a funções importantes nas plantas, como síntese de proteínas, absorção de nutrientes e atividade enzimática (STALIKAS, 2010). A ingestão de ácidos fenólicos é associada a muitos efeitos protetores à saúde, auxiliando na prevenção de estresse oxidativo (ZHANG et al., 2011), diabetes (LIU et al., 2000; ONG; HSU; TAN, 2012), além de possuir efeitos inibitórios em genes associados à inflamação (PEIFFER et al., 2014).

Os taninos são compostos fenólicos com peso molecular variando de 500 a 3000 D, encontrados em complexos com polissacarídeos, alcalóides e proteínas. Estes compostos podem ser classificados como taninos hidrolisáveis e não hidrolisáveis (taninos condensados) (SHING et al., 2017). Os taninos estão principalmente presentes na casca das sementes de leguminosas, exercendo funções importantes no sistema de defesa dessas sementes, que

normalmente são expostas a danos oxidativos (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Já os estilbenos pertencem ao grupo de compostos derivados de fenilpropanóides caracterizados por um esqueleto de 1,2-difeniletileno (C6-C2-C6) (GOYAL et al., 2012). O representante principal dos estilbenos é o resveratrol, o qual está presente na dieta principalmente na forma glicosilada (IGNAT et al., 2011).

3.2.1 Bioacessibilidade de compostos fenólicos

O termo bioacessibilidade pode ser entendido como quantidade ou fração de compostos bioativo que é liberada da matriz alimentar no trato gastrointestinal e, assim, tornam-se potencialmente disponíveis para absorção no intestino (HEANEY, 2001; CARBONELL-CAPELLA et al., 2015). Desta forma, mais interessante do que apenas avaliar o teor de compostos fenólicos presente em matrizes alimentares é determinar a bioacessibilidade (ŽUGČIĆ et al., 2019), visto que a quantidade ingerida não reflete necessariamente a real quantidade absorvida pelo organismo (CELEP et al., 2017).

Diversas metodologias têm sido utilizadas para avaliar a bioacessibilidade de compostos fenólicos, incluindo, principalmente, modelos *in vitro* (digestão simulada do trato gastrointestinal utilizando membranas artificiais ou membranas celulares; digestão simulada do trato gastrointestinal sem a utilização de membranas) e modelos *in vivo* (estudos com animais e humanos) (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014). A metodologia de digestão *in vitro* é amplamente difundida por ser rápida, menos dispendiosa e trabalhosa, além de não apresentar restrições éticas (MINEKUS et al., 2014). Assim, diversas metodologias *in vitro* têm sido desenvolvidas a fim de simular as condições do trato gastrointestinal. Por meio destas metodologias tem se buscado a investigação do efeito da matriz alimentar sobre a bioacessibilidade de fenólicos, de modo a obter dados essenciais para apoiar reivindicações da relevância biológica desses compostos no contexto da nutrição e da saúde humana (CHANG; ALASALVAR; SHAHIDI, 2016).

Os modelos de digestão *in vitro* geralmente incluem as fases oral, gástrica, intestinal e, eventualmente, fermentação colônica (VAN DE VELDE; PIROVANI; DRAGO, 2018; GONG et al., 2019). Estes modelos são úteis para estudar, de maneira simplificada, a digestão no primeiro trecho do canal alimentar em humanos, simulando condições fisiológicas químicas e enzimáticas de fluídos digestivos, pH e períodos de residência típicos de cada compartimento (TAGLIAZUCCHI; VERZELLONI; CONTE, 2012).

Atualmente, há diferentes metodologias para determinar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos. A abordagem mais simplificada analisa o conteúdo resultante de toda a fração intestinal, apenas por sua filtração e / ou centrifugação para separar o material solúvel (fração disponível para captação) (BERMÚDEZ-SOTO; TOMÁS-BARBERÁN; GARCIA-CONESA, 2007; GAYOSO et al., 2016). Outra metodologia de simulação mais realista baseia-se em uma abordagem utilizando membranas de diálise para simular a barreira intestinal a fim de determinar a bioacessibilidade de compostos fenólicos (DANTAS et al., 2019). Desse modo, a fração capaz de atravessar a membrana de diálise representa os compostos potencialmente disponíveis para absorção, enquanto a fração de compostos fenólicos que permanece fora da membrana de diálise corresponde aos compostos não-absorvíveis (DUTRA et al., 2017; DANTAS et al., 2019). Entretanto, sabe-se que bioacessibilidade dos compostos fenólicos está associada à capacidade de resistir à digestão no trato gastrointestinal e à extensão em que esses compostos são absorvidos nos tecidos e órgãos-alvo em nível biologicamente expressivo nas formas ativas (ZHANG et al., 2017).

Os aumentos ou diminuições no conteúdo dos compostos fenólicos durante a exposição às diferentes etapas da digestão parece ser fundamentada por algumas propriedades físicas e bioquímicas do trato gastrointestinal, como alterações de pH, atividade enzimática e temperatura (BARAK et al., 2019). Rodríguez-Roque et al. (2013) observaram aumento do conteúdo dos compostos fenólicos em leite de soja após a digestão gástrica. Os pesquisadores mencionaram que o pH ácido, juntamente com a atividade enzimática durante esta fase digestiva pode induzir a hidrólise de alguns compostos fenólicos ligados a outros constituintes dos alimentos (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013). Em contrapartida, a digestão gástrica também pode reduzir o conteúdo de compostos fenólicos, possivelmente, devido a alterações no peso molecular, solubilidade e estrutura química dos compostos fenólicos (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2014).

Por sua vez, as condições alcalinas também podem exercer influência variável no conteúdo de compostos fenólicos. Por exemplo, as condições alcalinas utilizadas para simular a fase intestinal podem favorecer a liberação de compostos fenólicos ligados a macromoléculas, como proteínas e fibras (CELEP et al., 2017). Em contrapartida, outros autores têm observado diminuições significativas no conteúdo de compostos fenólicos após a digestão intestinal (BARAK et al., 2019; GULLON et al., 2015).

A ação enzimática também exerce influência no conteúdo de compostos bioativos presente na matriz, visto que podem promover a hidrólise dos compostos na fase da digestão gástrica (BARAK et al., 2019). Gullon et al (2015) observaram aumentos no conteúdo de

flavonóides de farinha de casca de romã após a exposição às condições gástricas. Os pesquisadores sugeriram que tais aumentos estão associados à ação das enzimas digestivas capazes de liberar flavonóides ligados a compostos de elevado peso molecular, como proteínas e carboidratos (GULLON et al., 2015). Desta forma, a quantidade de compostos fenólicos bioacessíveis pode diferir consideravelmente da sua concentração total na matriz alimentar, pois pode ser influenciada pela própria composição dos alimentos, processamento e interação dos fenólicos com outros componentes alimentares (ALMINGER et al., 2014).

3.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR PROBIÓTICOS

A depender da complexidade e polimerização da estrutura dos fenólicos, estes compostos podem ser diretamente absorvidos no intestino delgado ou alcançar o cólon praticamente sem alterações (MONOGAS et al., 2010). Existem evidências de que a maioria das formas fenólicas ingeridas na dieta segue para o colón, onde sofrem metabolismo extensivo pela microbiota intestinal e produz metabólitos (MOSELE et al., 2015; ESPÍN et al., 2017; WILLIAMSON; CLIFFORD, 2017). Neste contexto, os potenciais efeitos benéficos dos compostos fenólicos à saúde dependem fortemente de sua bioconversão por meio da ação de bactérias colônicas, as quais possuem atividades enzimáticas específicas (POSSEMIERS et al., 2011). Via metabolismo de bactérias da microbiota, algumas formas fenólicas, as quais podem estar conjugadas com outros constituintes da matriz alimentar, como açúcares, proteínas e lipídios, podem resultar em compostos com maior bioatividade (SELMA et al., 2009; SEPTEMBRE-MALATERRE; REMIZE; POUCHERET, 2018). A ação dessas bactérias auxilia a biotransformação de fenólicos em compostos com maior bioatividade do que suas estruturas precursoras (CHIOU et al., 2014; OZDAL et al., 2016), ou protege estes compostos contra a degradação química em condições fisiológicas (ZHAO; SHAH, 2014).

A biotransformação de compostos fenólicos também pode ocorrer durante o processamento de alimentos, tais como: fermentação, maltagem e processos termomecânicos, os quais auxiliam a liberação de fenólicos conjugados (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014), melhorando a bioacessibilidade (MUÑOZ et al., 2017).

Assim, entre diversas estratégias tecnológicas, a fermentação de alimentos com bactérias probióticas pode ser considerada uma biotecnologia valiosa para melhorar as propriedades nutritivas e bioativas das matrizes alimentares (MARCO et al., 2018). Probióticos são microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, são

capazes de proporcionar efeitos positivos à saúde do hospedeiro (FAO/OMS, 2002). A ingestão de probióticos tem sido associada à redução dos níveis de colesterol e pressão arterial (LOLLO et al., 2015), alívio de constipação (EOR et al., 2019) e prevenção de câncer (DESROUILLÈRES et al., 2015).

Bactérias probióticas, principalmente as espécies pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são amplamente utilizadas na formulação de alimentos fermentados (KAPRASOB et al., 2018; BUJNA et al., 2018; VALERO-CASES; NUNCIO-JÁUREGUI; FRUTOS, 2017). Estudos relatam que cepas de diferentes espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* possuem sistemas enzimáticos específicos como, por exemplo, β -glicosidase, atuando na clivagem de ligações glicosídicas de compostos fenólicos, originando novos metabólitos capazes de exercer um papel importante na produção de compostos com atividades biológicas diferentes (ÁVILA et al., 2009; BRAGA et al., 2018). Sendo assim, as diferenças no grau de atividade enzimática durante a fermentação podem ser devido ao tipo de microrganismo, características bacterianas, tipo de substrato, meio de crescimento e presença de isoenzimas (LOPES et al., 2017).

A conversão de compostos fenólicos através do processo de fermentação utilizando *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. tem sido explorada em alguns estudos, sendo evidenciadas modificações no tipo e quantidade de compostos fenólicos. Valero-Cases, Nuncio-Jáuregui e Frutos (2017), observaram mudanças no tipo e quantidade de compostos fenólicos de suco de romã após fermentação com *Lactobacillus acidophilus* CECT 903, *Lactobacillus plantarum* CECT 220, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 4551 e *Bifidobacterium bifidum* CECT 870. Particularmente, dois derivados fenólicos (catequina e α -punicalagina) não detectados no suco antes da fermentação estavam presentes nos sucos fermentados.

Filannino et al. (2015) relataram que diferentes espécies de *Lactobacillus* são capazes de metabolizar ácidos fenólicos em sucos de cereja ou purê de brócolis. Ainda de acordo com os autores, as rotas metabólicas utilizadas na fermentação de vegetais são fortemente dependentes da composição e fatores intrínsecos da matriz alimentar.

Em um recente estudo, Braga et al. (2018) avaliaram a conversão de antocianinas da polpa jussara por *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. e constataram que as alterações promovidas pela fermentação aumentou a capacidade antioxidante destes compostos. De acordo com os autores, a fermentação é uma tecnologia promissora para o desenvolvimento de produtos alimentícios utilizando matrizes ricas em antocianinas, melhorando suas propriedades e proporcionando uma ampla gama de aplicações na indústria alimentícia.

Hashemi et al. (2017) avaliaram a influência do metabolismo de *L. plantarum* LS5 nos compostos bioativos de suco de limão doce e observaram uma redução no total de compostos fenólicos após 48 h de cultivo a 37 ° C. Em outro estudo, Fritsch, Vogel e Toelstede (2015) observaram que *B. animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 e *L. plantarum* TMW 1.460 foram capazes de aumentar a qualidade nutricional de semente de tremoço através da degradação parcial de compostos antinutricionais, como o ácido fítico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 4 estão destacadas sequencialmente as etapas executadas no presente estudo.

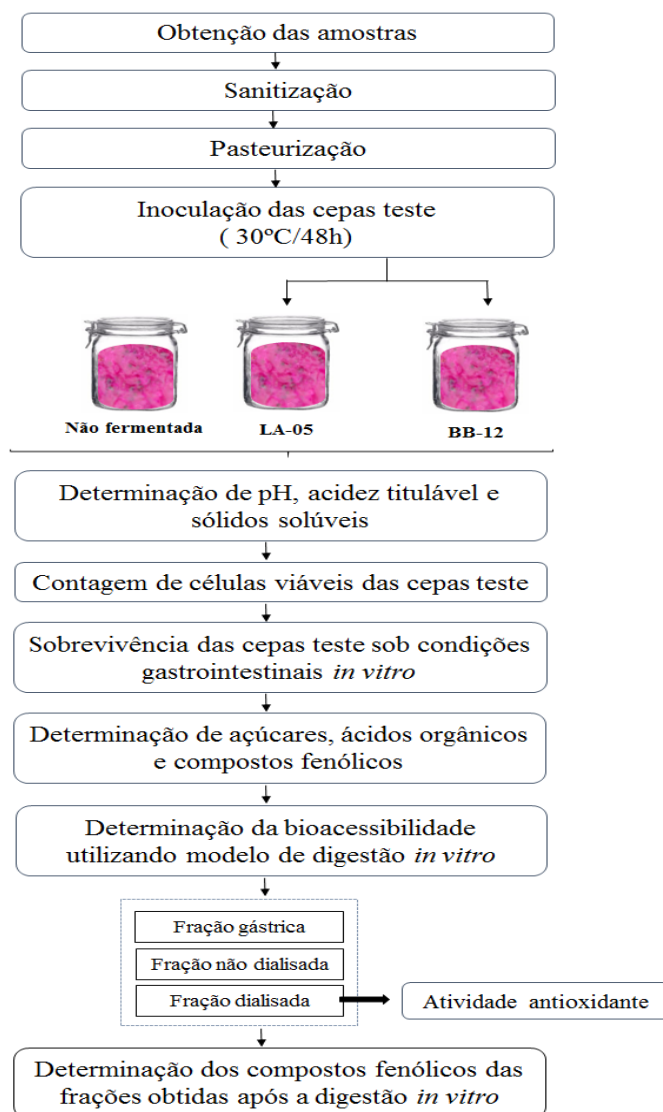


Figura 4- Desenho esquemático do estudo

Fonte: Autoral.

4.1. CEPAS TESTE E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

As culturas liofilizadas de *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 foram obtidas junto à empresa Chr. Hansen SA (Valinhos, São Paulo). *L. acidophilus* LA-05 foi cultivado durante 24 h a 37 °C sob condições aeróbias em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia) e *B. lactis* BB-12 foi cultivado durante 48 h a 37 °C em caldo MRS

suplementado com cisteína (cMRS) (0,05 g/100 mL, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) sob condições anaeróbicas (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). Para obter o inóculo de cada cepa, a cultura celular foi centrifugada ($4500\text{ g} \times 15\text{ min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), lavada duas vezes em solução salina estéril e ressuspensas em solução salina estéril para obtenção de suspensões celulares. A densidade ótica de 1,0 e 0,9 a 660 nm forneceu contagem de células viáveis de aproximadamente 8 log UFC/mL para *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12, respectivamente. As culturas estoque foram mantidas em criotubos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ contendo MRS ou caldo cMRS e glicerol a 20% (v/v) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA).

4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA FERMENTAÇÃO

Os frutos de pitaya vermelha (2,5 kg) utilizados neste estudo foram obtidos de um distribuidor atacadista local (João Pessoa, Brasil) com mesmo grau de maturação (15 °Brix). Antes dos ensaios, as amostras foram lavadas e sanitizadas através de imersão em solução de hipoclorito de sódio (150 ppm, pH 7,2 ajustado com NaOH 1 mM / L) por 5 min., lavadas duas vezes com água destilada estéril e secas por 30 min em uma cabine de biossegurança. Os frutos descascados foram misturados com o auxílio de um misturador doméstico (durante 3 min), pasteurizados a $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min e resfriados até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras de pitaya vermelha foram inoculadas com *L. acidophilus* LA-05 ou *B. lactis* BB-12 (contagem final viável de aproximadamente 7 UFC/mL, respectivamente) e incubada a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h (KAPRASOB et al., 2017) sob condições aeróbias para *L. acidophilus* LA-05 e anaeróbias para *B. lactis* BB-12. As amostras sem a adição de *L. acidophilus* LA-05 ou *B. lactis* BB-12 foram utilizadas como controle.

4.3 DETERMINAÇÃO DO pH, ACIDEZ TITULÁVEL (AT), SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (SST)

O pH, acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (SST) da pitaya vermelha não fermentada e pitaya vermelha fermentada com *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* foram medidos após 48 h de fermentação seguindo procedimentos padrões (AOAC, 2016).

Os valores de pH foram determinados por meio de pHmetro digital (Quimis, São Paulo, Brasil). A AT foi medida por titulação das amostras com 0,1 N NaOH e os resultados foram expressos em porcentagem de ácido málico. O conteúdo de SST (°Brix) foi medido com o auxílio de um refratômetro digital (modelo HI 96801, São Paulo, Brasil) a $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12

As células viáveis de *L. acidophilus* LA-5 e *B. lactis* BB-12 foram enumeradas após 48 h de cultivo em pitaya vermelha utilizando a técnica de microgotas (HERIGSTAD, HAMILTON, HEERSINK, 2001). Para isso, alíquotas de 100 µL das amostras foram diluídas em série em solução salina estéril (10^{-1} – 10^{-6}) e homogeneizadas em vórtex por 30 s. Posteriormente, alíquotas de 20 µL de cada diluição foram inoculados em ágar MRS ou cMRS. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h em aerobiose para *L. acidophilus* LA-05 e 48 h sob condições anaeróbicas (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) para *B. lactis* BB-12. Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

4.5 SOBREVIVÊNCIA DE *L. acidophilus* LA-05 E *B. lactis* BB-12 EM PITAYA VERMELHA FERMENTADA SOB CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS

As condições gastrointestinais foram simuladas em estágios referentes às condições do esôfago-estômago, duodeno e íleo, conforme descrito por Luciano et al. (2018) com pequenas adaptações. O ensaio foi realizado em estufa incubadora a 37 °C e os movimentos peristálticos foram simulados com agitação mecânica (rotação ajustada a cada etapa digestiva). O volume inicial da amostra submetida à digestão foi de 25 mL. *L. acidophilus* LA-05 ou *B. lactis* BB-12 cultivados em MRS ou cMRS, respectivamente foram também testados para avaliar o comportamento de células cultivadas em condições ótimas.

As condições esôfago-estômago foram simuladas utilizando 25 mg de pepsina diluída em 1 mL de HCl 0,1 mM/L, adicionado a uma taxa de 0,05 mL/mL, com uma diminuição gradual no pH com HCl 1 mM/L (pH 5,5/10 min; pH 4,6/10 min; pH 3,8/10 min; pH 2,8/20 min; pH 2,3/20 min e pH 2,0/20 min) sob agitação (130 rpm). As condições duodenais foram simuladas utilizando solução de pancreatina (2 g de pancreatina/mL de NaHCO₃ 0,1 mM/L) e solução de sais de bile (12 g de sais de bile/mL de NaHCO₃ 0,1 mM/L), com ajuste de pH para 5,0 com NaHCO₃ 0,1 mM/L e tempo de exposição de 30 min sob agitação (45 rpm). Por fim, as condições do íleo foram simuladas através do ajuste de pH para 6,5 utilizando NaHCO₃ 0,1 mM/L e tempo de exposição de 60 min sob agitação (45 rpm).

Após cada fase da digestão simulada, 100 µL de amostras foram coletadas, diluídas em série em solução salina estéril e plaqueadas em MRS ou cMRS ágar. Como controle do experimento, também foram realizados ensaios semelhantes com *L. acidophilus* LA-05

inoculado em caldo MRS e *B. lactis* BB-12 em caldo cMRS. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h sob aerobiose para *L. acidophilus* LA-05 e 48 h sob anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) para *B. lactis* BB-12. Os resultados foram expressos em log UFC / mL.

As condições gastrointestinais simuladas utilizadas neste estudo estão resumidas na Tabela 1, incluindo os compostos utilizados, o tempo de exposição e a intensidade da agitação em todas as etapas.

Tabela 1- Condições utilizadas durante a digestão simulada e as contagens de células viáveis de *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12.

Simulação das etapas digestivas	Fases	Condições	Agitação (rpm)	pH final	Tempo de exposição (min)
	Antes da simulação	-	-	-	-
1	Esôfago-Estômago	Pepsina	130	5,5	10
2				4,6	10
3				3,8	10
4				2,8	20
5				2,3	20
6				2,0	20
7	Duodeno	Pancreatina + sais biliares	45	5,0	30
8	Íleo		45	6,5	60

Etapas 1 a 6: etapas para simular as condições esôfago-estômago; Etapa 7: etapa para simular as condições no duodeno; Etapa 8: etapa para simular as condições no íleo.

Fonte: Adaptado de de Melo et al. (2017)

4.6 DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES, ÁCIDOS ORGÂNICOS E COMPOSTOS FENÓLICOS

Para avaliar o metabolismo de *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 quando inoculados em pitaya vermelha, bem como os efeitos dessas linhagens sobre os conteúdos açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos, estes parâmetros foram determinados após as 48 h de incubação.

As amostras de pitaya vermelha não fermentadas e pitaya vermelha fermentadas por *L. acidophilus* LA-05 ou *B. lactis* BB-12 foram centrifugadas (4000 g x 15 min) e o sobrenadante foi filtrado através de um filtro Millex-HA de 0,45 µm (Millipore Co., Bedford, MA). Os açúcares e ácidos orgânicos foram determinados como descrito anteriormente (COELHO et al., 2018). Para isso, os filtrados obtidos anteriormente foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo Agilent

(modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, EUA) acoplado a um detector de arranjo de diodo (DAD) e um detector de índice de refração (DIR). As condições analíticas foram as seguintes: uma coluna Agilent Hi-Plex H ($7,7 \times 300$ mm, $8 \mu\text{m}$); H_2SO_4 4 mmol / L em água ultrapura como fase móvel (vazão 0,5 mL / min).

Para quantificação dos compostos fenólicos, as amostras foram centrifugadas ($4000 g \times$ por 15 min) e o sobrenadante filtrado através de filtro Millex-HA de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore Co., Bedford, MA) e injetado (20 μL) como descrito anteriormente (PADILHA et al., 2017). A coluna utilizada para separar os compostos fenólicos foi um Zorbax Eclipse Plus RP-C18 ($100 \times 4,6$ mm, $3,5 \mu\text{m}$) e a pré-coluna Zorbax C18 ($12,6 \times 4,6$ mm, $5 \mu\text{m}$). A temperatura da coluna foi ajustada para 35°C e as fases móveis foram compostas de água acidificada (pH 2,0) com ácido fosfórico 0,1 mM/L (fase A) e metanol acidificado com ácido fosfórico a 0,5% (fase B). A vazão foi mantida a 0,8 mL/min. As aquisições de dados do DAD foram processadas utilizando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies).

Os picos de açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos foram identificados comparando seus tempos de retenção com os de padrões (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e a quantificação foi realizada utilizando a área média de injeções triplicatas.

4.7 DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE

A digestão gastrointestinal *in vitro* para determinar a bioacessibilidade foi realizada em três fases sequenciais: digestão oral, gástrica e intestinal (incluindo diálise) como descrito anteriormente por Dutra et al. (2017).

Na fase oral, 5 mL de solução salina (2,38g de Na_2HPO_4 , 0,19g de KH_2PO_4 , 8g de NaCl e 200U/L de α -amilase) foram misturados com 50 mL de amostras e a fração foi agitada a 90 rpm para 10 min a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Em seguida, condições gástricas foram simuladas com 13 mg de pepsina, pH ajustado para 2,0 com HCl 0,1 M e a mistura foi incubada a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ no agitador a 90 rpm durante 2 h. Finalmente, as condições de digestão intestinal foram simuladas utilizando uma membrana de diálise de celulose (peso molecular de 12,000 Da) preenchida com NaHCO_3 (0,5 M). A membrana foi adicionada às frações obtidas durante a fase gástrica até atingir um pH de 5,0. Em seguida, foi adicionada uma solução contendo sais biliares e pancreatina e a mistura foi incubada a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ e 90 rpm durante 2 h. Ao fim desse período, a membrana de diálise foi removida e enxaguada com água destilada.

Assim, duas frações foram obtidas após a digestão intestinal: frações não dialisadas e dialisadas. Os compostos bioativos considerados como não absorvidos estavam na fração não dialisada (fora da membrana de diálise), enquanto os compostos bioativos disponíveis para absorção estavam na fração dialisada (dentro da membrana de diálise). Os resultados foram expressos como porcentagens e foram determinados conforme descrito na Equação 1 (DUTRA et al., 2017):

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = (\text{CF dialisada} / \text{CF não digerida}) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

CF dialisada = concentração do composto fenólico na fração dialisada

CF não digerida = concentração do composto fenólico nas amostras não digeridas

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DIALISADA

O ensaio ORAC (do inglês Oxygen Radical Absorbance Capacity) foi utilizado para medir a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos disponíveis da fração dialisada de acordo com a metodologia adaptada de (ZULUETA; ESTEVE; FRIGOLA, 2009) utilizando um espectrofotômetro com leitor de multiplacas (Fluostar Omega, BMG). Em cada poço da microplaca, foram adicionados 20 µL das frações dialisadas e 120 µL de fluoresceína (61,2 nM). A microplaca foi incubada durante 10 min a 37 com 3 min de agitação. Em seguida, adicionou-se a cada poço 60 µL do radical AAPH [2,2'-Azobis (2- methylpropionamidine) dihydrochloride] (19 mM) para iniciar a reação. A intensidade de fluorescência (excitação = 485 nm / 20 nm e emissão = 528/20 nm) foi verificada em modo cinético, com leitura em intervalos de 1 min, durante o período de 60 min. Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4 e o volume final da mistura foi de 200 µL. Os resultados foram expressos em µmol de equivalente Trolox (ET) por 100 mL de amostra (µmol ET/100 mL).

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises foram realizadas em triplicata, em três experimentos distintos, e os resultados foram expressos como médias dos ensaios e desvio-padrão. A análise estatística foi realizada para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) utilizando análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ou teste *t*-de Student. Para isso, foi utilizado o software Sigma-Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia).

REFERÊNCIAS

ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46-55, 2014.

ALMINGER, M.; AURA, A. M.; BOHN, T.; DUFOUR, C.; EL, S. N.; GOMES, A.; KARAKAYA, M. C.; MARTÍNEZ-CUESTA, G.J.; MCDOUGAKK, T.; SANTOS, C. N. In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 413-436, 2014.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, **Official Methods of Analysis of A.O.A.C.** International., United States, 20th ed., 2016.

ÁVILA, M.; HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PELAEZ, C.; REQUENA, T.; DE PASCUAL-TERESA, S. Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*. **Food Research International**, v. 42, n. 10, p. 1453-1461, 2009.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BARAK, T. H.; CELEP, E.; İNAN, Y.; YESILADA, E. Influence of in vitro human digestion on the bioavailability of phenolic content and antioxidant activity of *Viburnum opulus* L. (*European cranberry*) fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 131, p. 62-69, 2019.

BERMÚDEZ-SOTO, M.-J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.-A.; GARCÍA-CONESA, M.-T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 865-874, 2007.

BRAGA, A. R. C.; DE SOUZA MESQUITA, L. M.; MARTINS, P. L. G.; HABU, S.; DE ROSSO, V. V. *Lactobacillus* fermentation of jussara pulp leads to the enzymatic conversion of anthocyanins increasing antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 69, p. 162-170, 2018.

BUJNA, E.; FARKAS, N. A.; TRAN, A. M.; SAO DAM, M.; NGUYEN, Q. D. Lactic acid fermentation of apricot juice by mono-and mixed cultures of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Food Science and Biotechnology**, v. 27 (2) p.1-8, 2018.

BVENURA, C.; SIVAKUMAR, D. The role of wild fruits and vegetables in delivering a balanced and healthy diet. **Food Research International**, v. 99, p. 15-30, 2017.

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

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

CELEP, E.; İNAN, Y.; AKYÜZ, S.; YESİLADA, E. The bioaccessible phenolic profile and antioxidant potential of *Hypericum perforatum* L. after simulated human digestion. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 717-723, 2017.

CHANG, S. K.; ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 113-132, 2016.

CHIA, S. L.; CHONG, G. H. Effect of drum drying on physico-chemical characteristics of dragon fruit peel (*Hylocereus polyrhizus*). **International Journal of Food Engineering**, v. 11, n. 2, p. 285-293, 2015.

CHIOU, Y. S.; WU, J. C.; HUANG, Q.; SHAHIDI, F.; WANG, Y. J.; HO, C. T.; PAN, M. H. Metabolic and colonic microbiota transformation may enhance the bioactivities of dietary polyphenols. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 3-25, 2014.

COELHO, E. M.; DA SILVA PADILHA, C. V.; MISKINIS, G. A.; DE SÁ, A. G. B.; PEREIRA, G. E.; DE AZEVEDO, L. C.; DOS SANTOS LIMA, M. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160-167, 2018.

CORRADINI, C.; LANTANO, C.; CAVAZZA, A. Innovative analytical tools to characterize prebiotic carbohydrates of functional food interest. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 13, p. 4591-4605, 2013.

CZUBINSKI, J.; WROBLEWSKA, K.; CZYZNIEJEWSKI, M.; GÓRNAŚ, P.; KACHLICKI, P.; SIGER, a. Bioaccessibility of defatted lupin seed phenolic compounds in a standardized static in vitro digestion system. **Food Research International**, v. 116, p. 1126-1134, 2019.

DANTAS, A. M.; MAFALDO, I. M.; DE LIMA OLIVEIRA, P. M.; DOS SANTOS LIMA, M.; MAGNANI, M.; BORGES, G. D. S. C. Bioaccessibility of phenolic compounds in native and exotic frozen pulps explored in Brazil using a digestion model coupled with a simulated intestinal barrier. **Food Chemistry**, v. 274, p. 202-214, 2019.

DE BRITO ALVES, J. L.; DE SOUSA, V. P.; CAVALCANTI NETO, M. P.; MAGNANI, M.; BRAGA, V. D. A.; COSTA-SILVA, J. H. D.; LEANDO, C. G.; VIDAL, H.; PIROLA, L. New insights on the use of dietary polyphenols or probiotics for the management of arterial hypertension. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 1-8, 2016.

DELGADO, S.; GUADAMURO, L.; FLÓREZ, A. B.; VÁZQUEZ, L.; MAYO, B. Fermentation of commercial soy beverages with *lactobacilli* and *bifidobacteria* strains featuring high β -glucosidase activity. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 51, p. 148-155, 2019.

DEMBITSKY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition

properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1671-1701, 2011.

DE MELO, A. N. F.; DE SOUZA, G. T.; SCHAFFNER, D.; MOREIRA DE OLIVEIRA, T. C.; MACIEL, J. F.; DE SOUZA, E. L.; Magnani, M. Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions of *Salmonella Enteritidis* PT4 and *Salmonella Typhimurium* PT4 in chicken breast meat after exposure to sequential stresses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 251, p. 15-23, 2017.

DESROUILLÈRES, K.; MILLETTE, M.; VU, K. D.; TOUJA, R.; LACROIX, M. Cancer preventive effects of a specific probiotic fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 on male F344 rats treated with 1, 2-dimethylhydrazine. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 816-827, 2015.

DUTRA, R. L. T.; DANTAS, A. M.; DE ARAÚJO MARQUES, D.; BATISTA, J. D. F.; DE ALBUQUERQUE MEIRELES, B. R. L.; DE MAGALHÃES CORDEIRO; Â. M. T., MAGNANI, M.; BORGES, G. D. S. C. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 100, p. 650-657, 2017.

EOR, J. Y.; TAN, P. L.; LIM, S. M.; CHOI, D. H.; YOON, S. M.; YANG, S. Y.; KIM, S. H. Laxative effect of probiotic chocolate on loperamide-induced constipation in rats. **Food Research International**, v. 116, p. 1173-1182, 2019.

ESPÍN, J. C.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly) phenols. **Biochemical Pharmacology**, v. 139, p. 82-93, 2017.

ESQUIVEL, P.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Pigment pattern and expression of colour in fruits from different *Hylocereus* sp. genotypes. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 451-457, 2007a.

ESQUIVEL, P.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Phenolic compound profiles and their corresponding antioxidant capacity of purple pitaya (*Hylocereus* sp.) genotypes. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 9-10, p. 636-644, 2007b.

ESTEBAN-FERNÁNDEZ, A.; ZORRAQUÍN-PEÑA, I.; DE LLANO, D. G.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. The role of wine and food polyphenols in oral health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 118-130, 2017.

FAO/WHO -FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION- **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, 2002.

FILANNINO, P.; BAI, Y.; DI CAGNO, R.; GOBBETTI, M.; GÄNZLE, M. G. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. **Food Microbiology**, v. 46, p. 272-279, 2015.

FRITSCH, C.; VOGEL, R. F.; TOELSTEDE, S. Fermentation performance of lactic acid bacteria in different lupin substrates-influence and degradation ability of antinutritives and secondary plant metabolites. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 4, p. 1075-1088, 2015.

GAYOSO, L.; CLAERBOUT, A. S.; CALVO, M. I.; CAVERO, R. Y.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. Bioaccessibility of rutin, caffeic acid and rosmarinic acid: Influence of the in vitro gastrointestinal digestion models. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 428-438, 2016.

GENGATHARAN, A.; DYKES, G. A.; CHOO, W. The effect of pH treatment and refrigerated storage on natural colourant preparations (betacyanins) from red pitahaya and their potential application in yoghurt. **LWT-Food Science and Technology**, v. 80, p. 437-445, 2017.

GONG, L.; CHI, J.; ZHANG, Y.; WANG, J.; SUN, B. In vitro evaluation of the bioaccessibility of phenolic acids in different whole wheats as potential prebiotics. **LWT-Food Science and Technology**, v. 100, p. 435-443, 2019.

GOYAL, S.; LAMBERT, C.; CLUZET, S.; MÉRILLON, J. M.; RAMAWAT, K. G. Secondary metabolites and plant defence. In: **Plant Defence: Biological Control**. Springer Netherlands, p. 109-138, 2012.

GULLON, B.; PINTADO, M. E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. In vitro gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 617-628, 2015.

GWIAZDOWSKA, D.; JUŚ, K.; JASNOWSKA-MAŁECKA, J.; KLUCZYŃSKA, K. The impact of polyphenols on *Bifidobacterium* growth. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, p. 895-901, 2015.

HAMINIUK, C. W.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits—an overview. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023-2044, 2012.

HARIVAINDARAN, K.; REBECCA, O.; CHANDRAN, S. Study of optimal temperature, pH and stability of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, p. 2259-2263, 2008.

HASHEMI, S. M. B.; KHANEGHAH, A. M.; BARBA, F. J.; NEMATİ, Z., SHOKOFTI, S. S.; ALIZADEH, F. Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 409-414, 2017.

HATI, S.; VIJ, S.; SINGH, B. P.; MANDAL, S. β -Glucosidase activity and bioconversion of isoflavones during fermentation of soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 1, p. 216-220, 2015.

HEANEY, R. P. Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 4, p. 1344S-1348S, 2001.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121–129, 2001.

HOLLMAN, P. C. C.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n.9-10, p. 937-942, 1999.

HUA, Q.; CHEN, C.; ZUR, N. T.; WANG, H.; WU, J.; CHEN, J.; ZHANG, Z.; ZHAO, J.; HU, G.; QIN, Y. Metabolomic characterization of pitaya fruit from three red-skinned cultivars with different pulp colors. **Plant physiology and Biochemistry**, v. 126, p. 117-125, 2018.

IGNAT, I.; VOLFE, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

JAMALUDIN, N. A.; DING, P.; HAMID, A. A. Physico-chemical and structural changes of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) during fruit development. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 2, p. 278-285, 2011.

KAPRASOB, R.; KERDCHOECHUEN, O.; LAOHAKUNJIT, N.; SARKAR, D.; SHETTY, K. Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v. 59, p. 141-149, 2017.

KAPRASOB, R.; KERDCHOECHUEN, O.; LAOHAKUNJIT, N.; SOMBOONPANYAKUL, P. B vitamins and prebiotic fructooligosaccharides of cashew apple fermented with probiotic strains *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* and *Bifidobacterium longum*. **Process Biochemistry**, v. 70, p. 9-19, 2018.

KHODDAMI, A.; WILKES, M.; ROBERTS, T. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328-2375, 2013.

LIM, H. K.; TAN, C. P.; KARIM, R.; ARIFFIN, A. A.; BAKAR, J. Chemical composition and DSC thermal properties of two species of *Hylocereus* seed oil: *Hylocereus undatus* and *Hylocereus polyrhizus*. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1326–1331, 2010.

LIU, I. M.; HSU, F. L.; CHEN, C. F.; CHENG, J. T. Antihyperglycemic action of isoferulic acid in streptozotocin-induced diabetic rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 4, p. 631-636, 2000.

LOLLO, P. C.; MORATO, P. N.; MOURA, C. S.; ALMADA, C. N.; FELICIO, T. L.; ESMERINO, E. A.; BARROS, M.E. ; AMAYA-FARFAN, J. ; SANT'ANA, A.S. ; RAICES, R.R.S. ; SILVA, M.C. ; CRUZ, A.G. Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. **Food Research International**, v. 76, p. 611-617, 2015.

LOPES, D. B.; DE QUEIRÓS, L. D.; DE ÁVILA, A. R.; MONTEIRO, N. E.; MACEDO, G. A. The Importance of Microbial and Enzymatic Bioconversions of Isoflavones in Bioactive Compounds. In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A.M. **Food Bioconversion**. v. 2, p. 55-93, 2017.

LUCIANO, W. A.; MATTE, T. C.; PORTELA, I. A.; DE MEDEIROS, L. L.; DOS SANTOS LIMA; M., MACIEL, J. F.; SOUZA, E. L.; GARCIA, E. F.; MAGNANI, M. Effects of *Lactobacillus acidophilus* LA-3 on physicochemical and sensory parameters of açai and mango based smoothies and its survival following simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 114, p. 159-168, 2018.

MARCO, M. L.; HEENEY, D.; BINDA, S.; CIFELLI, C. J.; COTTER, P. D.; FOLIGNÉ, B.; SMID, E. J.; GÄNZLE, M.; KORT, R.; PASIN, G.; PIHLANTO, A.; SMID, E. J. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94-102, 2017.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A.; MARZE, S.; MCCLEMENTS, D. J.; MÉNARD, O.; RECIO, I.; SANTOS, C. N.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S. J.; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

MONAGAS, M.; URPI-SARDA, M.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; LLORACH, R.; GARRIDO, I.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; ANDRES-LACUEVA, C.; BARTOLOMÉ, B. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. **Food & Function**, v. 1, n. 3, p. 233-253, 2010.

MOSELE, J. I.; MACIÀ, A.; ROMERO, M. P.; MOTILVA, M. J.; RUBIÓ, L. Application of *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 529-540, 2015.

MUHAMMAD, K.; ZAHARI, N. I. M.; GANNASIN, S. P.; ADZAHAN, N. M.; BAKAR, J. High methoxyl pectin from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 289-297, 2014.

MUÑOZ, R.; DE LAS RIVAS, B.; DE FELIPE, F. L.; REVERÓN, I.; SANTAMARÍA, L.; ESTEBAN-TORRES, M.; CURIEL, J.A.; RODRÍGUEZ, J.M.; LANDETE, J. M. Biotransformation of phenolics by *Lactobacillus plantarum* in fermented foods. In: FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; PEÑAS, E. Amsterdam: Elsevier. **Fermented Foods in Health and Disease Prevention**, p. 63-83. 2017.

NAGULA, R. L.; WAIRKAR, S. Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 296, p.190-201, 2019.

NERD, A.; MIZRAHI, Y. Reproductive biology of cactus fruit crops. **Horticultural Reviews**, v. 18, p. 321-346, 1997.

OMIDIZADEH, A.; YUSOF, R. M.; ROOHINEJAD, S.; ISMAIL, A.; BAKAR, M. Z. A.; BEKHIT, A. E. D. A. Anti-diabetic activity of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) fruit. **RSC Advances**, v. 4, n. 108, p. 62978-62986, 2014.

ONG, K. W.; HSU, A.; TAN, B. K. H. Chlorogenic acid stimulates glucose transport in skeletal muscle via AMPK activation: a contributor to the beneficial effects of coffee on diabetes. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. 32718, 2012.

ONG, Y. Y.; TAN, W. S.; MOHAMAD, R., SIEO, C. C.; TEY, B. T. Biochemical and molecular identification of *Enterococcus* spp. from red pitaya. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 563-568, 2014.

OUCHEMOUKH, S.; AMESSIS-OUCHEMOUKH, N.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ABOUD, F.; GIUSEPPE, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. Characterisation of phenolic compounds in Algerian honeys by RP-HPLC coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. **LWT-Food Science and Technology**, v. 85, p. 460-469, 2016.

OZDAL, T.; SELA, D. A.; XIAO, J.; BOYACIOGLU, D.; CHEN, F.; CAPANOGLU, E. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 78, 2016.

PADILHA, C. V. S.; MISKINIS, G. A.; DE SOUZA, M. E. A. O.; PEREIRA, G. E.; DE OLIVEIRA, D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; DOS SANTOS LIMA, M. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, v. 228, p. 106-115, 2017.

PEIFFER, D. S.; ZIMMERMAN, N. P.; WANG, L. S.; RANSOM, B. W.; CARMELLA, S. G.; KUO, C. T.; SIDDIQUI, J.; CHEN, J.; OSHIMA, K.; HUANG, Y.; HECHT, S. S. Chemoprevention of esophageal cancer with black raspberries, their component anthocyanins, and a major anthocyanin metabolite, protocatechuic acid. **Cancer Prevention Research**, v. 7, n. 6, p. 574-584, 2014.

POSSEMIERS, S.; BOLCA, S.; VERSTRAETE, W.; HEYERICK, A. The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 53-66, 2011.

ROCCHETTI, G.; BHUMIREDDY, S. R.; GIUBERTI, G.; MANDAL, R.; LUCINI, L.; WISHART, D. S. Edible nuts deliver polyphenols and their transformation products to the large intestine: An in vitro fermentation model combining targeted/untargeted metabolomics. **Food Research International**, v. 116, p. 786-794, 2019.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. In vitro bioaccessibility of health-related compounds from a blended fruit juice–soymilk beverage: Influence of the food matrix. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 161-169, 2014.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 206-212, 2013.

SELMA, M. V.; ESPIN, J. C.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6485-6501, 2009.

SEPTEMBRE-MALATERRE, A.; REMIZE, F.; POUCHERET, P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. **Food Research International**, v. 104, p. 86-99, 2018.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHAHIDI, F.; YEO, J. Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, p. 1573, 2018.

SHIN, Y. S.; KANG, S. U.; PARK, J. K.; KIM, Y. E.; KIM, Y. S.; BAEK, S. J.; LEE, S.; KIM, C. H. Anti-cancer effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in head and neck cancer through repression of transactivation and enhanced degradation of β -catenin. **Phytomedicine**, v. 23, n. 12, p. 1344-1355, 2016.

SINGH, B.; SINGH, J. P.; KAUR, A.; SINGH, N. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: a review. **Food Research International**, v. 101, p. 1-16, 2017.

SOARES, J. C.; ROSALEN, P. L.; LAZARINI, J. G.; MASSARIOLI, A. P.; DA SILVA, C. F.; NANI, B. D.; FRANCHIN, M.; DE ALENCAR, S. M. Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and anti-inflammatory activity. **Food Chemistry**, v. 281, p. 178-188, 2019.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, 2007.

STALIKAS, C. D. Phenolic acids and flavonoids: occurrence and analytical methods. **Free Radicals and Antioxidant Protocols**, v. 610, p. 65-90, 2010.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; CONTE, A. The first tract of alimentary canal as an extractor. Release of phytochemicals from solid food matrices during simulated digestion. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 555-568, 2012.

TEL-ZUR, N.; MIZRAHI, Y.; CISNEROS, A.; MOUYAL, J.; SCHNEIDER, B.; DOYLE, J. J. Phenotypic and genomic characterization of vine cactus collection (*Cactaceae*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, n. 7, p. 1075-1085, 2011.

TENORE, G. C.; NOVELLINO, E.; BASILE, A. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 129-136, 2012.

THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SIVAKUMAR, V. Microwave assisted extraction process of betalain from dragon fruit and its antioxidant activities. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v.16, n.1, p. 2017.

TRAN, D. H.; YEN, C. R.; CHEN, Y. K. H. Effects of bagging on fruit characteristics and physical fruit protection in red pitaya (*Hylocereus* spp.). **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 31, n. 3, p. 158-166, 2015.

VALERO-CASES, E.; NUNCIO-JÁUREGUI, N.; FRUTOS, M. J. Influence of fermentation with different lactic acid bacteria and in vitro digestion on the biotransformation of phenolic compounds in fermented pomegranate juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 6488-6496, 2017.

VAN DE VELDE, F.; PIROVANI, M. E.; DRAGO, S. R. Bioaccessibility analysis of anthocyanins and ellagitannins from blackberry at simulated gastrointestinal and colonic levels. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 72, p. 22-31, 2018.

WANG, T.; LI, Q.; BI, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 12-23, 2018.

WANG, X.; YANG, L.; YANG, X.; TIAN, Y. In vitro and in vivo antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 8, p. 1693-1700, 2014.

WICHIENTHOT, S.; JATUPORNPIPAT, M.; RASTALL, R. A. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 850-857, 2010.

WILLIAMSON, G.; CLIFFORD, M. N. Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. **Biochemical Pharmacology**, v. 139, p. 24-39, 2017.

WU, L. C.; HSU, H. W.; CHEN, Y. C.; CHIU, C. C.; LIN, Y. I.; HO, J. A. A. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. **Food Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 319-327, 2006.

XU, D.; DENG, Y.; HAN, T.; JIANG, L.; XI, P.; WANG, Q.; JIANG, Z.; GAO, L. In vitro and in vivo effectiveness of phenolic compounds for the control of postharvest gray mold of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 139, p. 106-114, 2018.

XU, M.; LIU, C. L.; LUO, J.; QI, Z.; YAN, Z.; FU, Y.; WEI, S.; TANG, H. Transcriptomic de novo analysis of pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) canker disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum*. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2019.

ZHANG, B.; DENG, Z.; TANG, Y.; CHEN, P. X.; LIU, R.; RAMDATH, D. D.; LIU, Q.; HERNANDEZ, M.; TSAO, R. Bioaccessibility, in vitro antioxidant and anti-inflammatory

activities of phenolics in cooked green lentil (*Lens culinaris*). **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 248-255, 2017.

ZHANG, X.; SHI, G. F.; LIU, X. Z.; AN, L. J.; GUAN, S. Anti-ageing effects of protocatechuic acid from *Alpinia* on spleen and liver antioxidative system of senescent mice. **Cell Biochemistry and Function**, v. 29, n. 4, p. 342-347, 2011.

ZHAO, D.; SHAH, N. P. Antiradical and tea polyphenol-stabilizing ability of functional fermented soymilk–tea beverage. **Food Chemistry**, v. 158, p. 262-269, 2014.

ŽUGČIĆ, T.; ABDELKEBIR, R.; ALCANTARA, C.; COLLADO, M. C.; GARCÍA-PÉREZ, J. V.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; JAMBRAK, A.R.; LORENZO, J.M.; BARBA, F. J. From extraction of valuable compounds to health promoting benefits of olive leaves through bioaccessibility, bioavailability and impact on gut microbiota. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 63-77, 2019.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 310-316, 2009.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão da presente dissertação estão apresentados na forma de um artigo científico, original intitulado: Effects of probiotics on the content and bioaccessibility of phenolic compounds in red pitaya pulp.

O referido artigo encontra-se submetido e formatado nas normas do periódico Food Research International.

Effects of probiotics on the content and bioaccessibility of phenolic compounds in red pitaya pulp

Abstract

This study assessed the effects of the incorporation of *Lactobacillus acidophilus* LA-05 or *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 in the content and bioaccessibility of phenolics in red pitaya pulp. The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of the dialyzed (bioaccessible) fraction of red pitaya pulp fermented by these probiotics was also assessed. After 48 h of cultivation in red pitaya pulp, the pH and sugar contents decreased, while organic acids and viable counts of the tested probiotics increased ($p < 0.05$). After exposure to simulated gastrointestinal conditions the viable counts of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 in fermented red pitaya pulp were close to 8 and 7 log CFU/mL, respectively. Fermentation with probiotics decreased ($p < 0.05$) the contents of phenolic acids and flavonoids in red pitaya pulp. Both, *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 increased the presence of phenolics in the non dialyzed fraction of the red pitaya pulp. The bioaccessibility of catechin, epigallocatechin gallate, and procyanidin B2 increased ($p < 0.05$) in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12. The bioaccessible fraction of red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12 showed higher antioxidant activity than that of the non-fermented red pitaya pulp. These findings indicate the fermentation of red pitaya by probiotics as an alternative to increase the bioaccessibility of specific phenolics, as well as the antioxidant activity in this fruit.

Keywords: antioxidant, dragon fruit, fermentation, probiotics, phenolics, pitaya

1. Introduction

The *Hylocereus polyrhizus* (red pitaya), also known as dragon fruit, is a rustic fruit native to Mexico and Central and South America, belonging to the family *Cactaceae* (Hua et al., 2018). Red pitaya is widely appreciated in the European and American market due its exotic appearance and slightly sweet taste (Dembitsky et al. 2011). Additionally, this fruit has attracted attention because it is a promising source of nutrients able of exerting positive effects on the consumers' health (Thirugnanasambandham & Sivakumar, 2017). Red pitaya possesses great amounts of phenolics compounds (e.g betacyanins, flavonoids and phenolic acids) with recognized antioxidant activity (Teneore, Novellino, & Basile, 2012).

Phenolic compounds are secondary plant metabolites able to scavenge free radicals and to modulate various signaling pathways which play an important role in chronic diseases prevention (Girard & Awika, 2018). To be able to exert such benefits, these compounds need to be released from the food matrix and become absorbable during gastrointestinal digestion, thus bioaccessible (Czubinski et al., 2019). In addition, when the fraction of unabsorbable phenolics reach the colon, they are transformed by the colonic microflora leading to metabolites that are potentially more active and better absorbed (Rocchetti et al., 2019; Espín, González-Sarriás, & Tomás-Barberán, 2015).

The bio-conversion of phenolic compounds also occurs during the fermentation of fruits by probiotic species of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera (Valero-Cases, Jáuregui, & Frutos, 2017). By enzymatic activity, these probiotics are able to release phenolic compounds conjugated with other constituents of the food matrix such as sugars (Delgado et al., 2019; Kaprasob et al., 2017). Consequently, aglycone forms, which are biologically more active, may be released from their corresponding glycosides (Hati et al., 2015). Thus, studies that address the effects of probiotics strains on the profile and biaccessibility of the phenolic

compounds in red pitaya may provide relevant information that can be used in the elaboration of high-added value derived products from this fruit.

Therefore, the present study was performed to assess i) the growth of the well-known probiotic strains *L. acidophilus* LA-05 and *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 (*B. lactis* BB-12) in red pitaya pulp and related changes in sugar and organic acids contents; ii) the survival of the tested probiotic strains in fermented red pitaya pulp under simulated gastrointestinal conditions; iii) the effects of the tested probiotic strains on the profile of phenolic compounds of red pitaya pulp; iv) the bioaccessibility of phenolic compounds in red pitaya fermented by *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 using a digestion model coupled with a simulated intestinal barrier; and, v) the antioxidant activity of the dialyzed fraction of red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 under simulated physiological conditions.

2. Material and methods

2.1 Test strain and growth conditions

Lyophilized cultures of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 were obtained from Chr. Hansen SA (Valinhos, São Paulo). *L. acidophilus* LA-05 was grown for 24 h at 37 °C under aerobiosis in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India). *B. lactis* BB-12 was grown for 48 h at 37 °C in MRS broth + cysteine (cMRS) (0.05 g /100 mL, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) under anaerobic conditions (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). To obtain the inoculum of each strain, the cell culture was centrifuged (4500 g × 15 min, 4 °C), washed twice in sterile saline solution and re-suspended in sterile saline solution to obtain cell suspensions. Optical density of 1.0 and 0.9 at 660 nm provided viable cell counts of approximately 8 log CFU/mL for *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* LA-05, respectively. Stock cultures were maintained in

cryovials at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ containing MRS or cMRS broth and glycerol 20% (v/v) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

2.2 Samples preparation for fermentation

Red pitaya fruits were purchased at commercial maturity ($\sim 15^{\circ}\text{Brix}$) from a local wholesale distributor (João Pessoa, Brazil). Fruits with absence visible signs of infection or mechanical damage were selected for the experiments. The fruit were surface disinfected by 5-min immersion in a sodium hypochlorite solution (150 ppm), washed twice with sterile distilled water and dried in a biosafety cabinet for 30 min. The peeled fruits were mixed using a domestic blender (for 3 min.), pasteurized at $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min and cooled to room temperature. Afterwards, the red pitaya pulp was inoculated with *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12 (viable final counts of approximately 7 CFU / mL, respectively) and incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h (Kapasob et al., 2017) under aerobic conditions for *L. acidophilus* LA-05 and anaerobic for *B. lactis* BB-12. Samples without the addition of *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12 were used as control.

2.3 Determination of pH, titratable acidity (TA), total soluble solids (TSS)

The pH, titratable acidity (TA) and total soluble solids (SST) of the non-fermented and fermented red pitaya pulp by *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* were measured after 48 hours of fermentation following standard procedures (AOAC, 2016). The pH values were determined using digital pHmeter (Quimis, São Paulo, Brazil) (981.12). The TA (expressed as percent of malic acid) was measured by titrating the samples with 0.1 N NaOH (942.15). The TSS ($^{\circ}\text{Brix}$) was measured using a digital refractometer (Model HI 96801, São Paulo, Brazil) at $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (932.12).

2.4 Viable counts of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 in red pitaya pulp

The viable cells of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 were enumerated after 48 h of incubation in red pitaya pulp using a microdrop inoculation technique (Herigstad, Hamilton, & Heersink, 2001). For this, aliquots of 100- μ L were collected, serially diluted in sterile saline solution (10^{-1} - 10^{-6}) and homogenized 30 s using a vortex. Subsequently, 20- μ L aliquots of each dilution were dispensed into MRS or cMRS agar. The plates were incubated at 37 °C for 24 h under aerobiosis for *L. acidophilus* LA-05 and 48 h under anaerobiosis (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) for *B. lactis* BB-12. The results were expressed as log CFU/mL.

2.5 Survival of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 in fermented red pitaya pulp under simulated gastrointestinal conditions

The gastrointestinal conditions were simulated in stages to mimic conditions in the esophagus-stomach, duodenum, and ileum as described by Luciano et al. (2018) with minor adaptations (Table 1). The test was performed in an incubator at 37°C and the peristaltic movements were simulated using mechanical agitation (rotation adjusted to each digestive step). The initial volume of the sample submitted to digestion was 25 mL, *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 cultivated in MRS and cMRS were also tested to assess the behavior of cells grown in optimal conditions. The esophagus-stomach conditions were simulated using 25 mg of pepsin diluted in 1 mL of 0.1 mM/L HCl, added at a rate of 0.05 mL/mL, with a gradual decrease in pH using 1 mM/L HCl (pH 5.5/10 min; pH 4.6/10 min; pH 3.8/10 min; pH 2.8/20 min; pH 2.3/20 min and pH 2.0/20 min) with stirring (130 rpm). Duodenal conditions were simulated using 2 g pancreatin/L of 0.1 mM/L NaHCO₃ and 12 g bovine bile salts/L of 0.1 mM/L NaHCO₃, with the pH adjusted to 5.0 with 0.1 mM/L NaHCO₃ and exposure time of 30 min under stirring (45 rpm). Finally, ileum

conditions were simulated with the pH adjusted to 6.5 using 0.1 mM/L NaHCO₃, exposure time of 60 min under stirring (45 rpm). Enzymes and bovine bile salts were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). After each phase of the simulated digestion, 100-μL of samples were collected, serially diluted in sterile saline solution and plated on MRS or cMRS agar. As control of the experiment, similar assays were also performed with *L. acidophilus* LA-05 inoculated in MRS broth and *B. lactis* BB-12 on cMRS broth. The plates were incubated at 37 °C for 24 h under aerobiosis for *L. acidophilus* LA-05 and 48 h under anaerobiosis (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) for *B. lactis* BB-12. The results were expressed as log CFU/mL.

2.6 Determination of the sugars, organic acids and phenolic compounds in fermented red pitaya pulp

Sugars, organic acids and phenolic compounds were determined after the 48 h of cultivation of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 in red pitaya pulp. Samples were centrifugated (4000 *g* × 15 min) and the supernatant filtered through a 0.45 μm Millex-HA filter (Millipore Co., Bedford, MA). Sugars and organic acids were determined as previously described (Coelho et al., 2018). For this, the previously obtained filtrates were quantified by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) using an Agilent chromatograph (model 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, USA) coupled with a diode arrangement detector (DAD) and a refractive index detector (RID). The analytic conditions were as follows: an Agilent Hi-Plex H column (7.7 × 300 mm, 8 μm); H₂SO₄ 4 mmol/L in ultrapure water as mobile phase (flow rate 0.5 mL/min).

For quantification of phenolic compounds, the samples were centrifugation (4000 × *g* for 15 min) and the supernatant were filtered through a 0.45 μm Millex-HA filter (Millipore Co., Bedford, MA) and injected (20-μL) as previously described (Padilha et al., 2017). The

column used to separate the phenolic compounds was a Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (100 × 4.6 mm, 3.5 µm) and Zorbax C18 (12.6 × 4.6 mm, 5 µm). The oven temperature was set to 35 °C and the mobile phases were composed of acidified water (pH 2.0) with 0.1 mM/L phosphoric acid (phase A) and acidified methanol with 0.5% phosphoric acid (phase B). The flow rate was maintained at 0.8 mL/min. The DAD data acquisitions were processed using the OpenLAB CDS ChemStation Edition™ software (Agilent Technologies). The peaks of sugars, organic acids and phenolic compounds were identified by comparing their retention times with those of standards (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) and the quantification was performed using the average area of injections.

2.7 Determination of bioaccessibility in fermented red pitaya pulp using a digestion model coupled with a simulated intestinal barrier

The in vitro gastrointestinal digestion to determine the bioaccessibility was carried out in three sequential phases: oral, gastric and intestinal digestion (including dialysis) as described by Dutra et al. (2017). In the oral phase, 5 mL of saline solution (2.38 g of Na_2HPO_4 , 0.19 g of KH_2PO_4 , 8 g of NaCl and 200 U/L α -amylase) was mixed with 50 mL of samples and the fraction was shaken at 90 rpm for 10 min at 37 ± 2 °C. Then, gastric conditions were simulated with 13 mg of pepsin, pH adjusted for 2.0 with 0.1 mol L^{-1} HCl and the mixture was incubated at 37 ± 2 °C in the shaker at 90 rpm for 2 h. Finally, intestinal digestion conditions were simulated using a cellulose dialysis membrane (molecular weight cut off of 12,000 Da) filled with NaHCO_3 (0.5 mol L^{-1}). The membrane was added in the gastric-digested samples until a pH of 5.0 was reached. Then, a solution containing bile salts and pancreatin was added, and the mixture was incubated at 37 ± 2 °C and 90 rpm for 2 h. In the final intestinal phase, the dialysis membrane was removed and rinsed with distilled water. Thus, two fractions were obtained after intestinal digestion: non dialyzed and dialyzed

fractions. The bioactive compounds considered as unabsorbed were in the non dialyzed fraction (outside the membrane) while the bioactive compounds available for absorption were in the dialyzed fraction (inside the dialysis membrane). The results were expressed as percentages and were determined as described in the Equation 1:

$$\text{Bioaccessibility (\%)} = (\text{BC dialyzed} / \text{BC non-digested}) \times 100 \quad \text{Equation 1.}$$

where BC dialyzed and BC non-digested corresponded to the phenolic compound concentration in dialyzed fraction and non-digested samples, respectively (Dutra et al., 2017).

2.8 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of dialyzed fraction

The Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay was used to measure the antioxidant capacity of the dialyzed fraction according the methodology adapted from Zulueta, Esteve, & Frigola (2009) using a microtiter plate spectrophotometer reader (Fluostar Omega, BMG). In each well of the microplates, aliquots of 20- μL of the dialyzed fractions and 120- μL of fluorescein (61.2 nM) were added. The microplate was incubated for 10 min at 37 °C with 3 min of shaking. Then 60- μL of AAPH (19 mM) [2,20-azobis(2-methylpropionamidine)] was added to each well to start the reaction. The fluorescence intensity (excitation = 485 nm / 20 nm and emission = 528/20 nm) was read over a 60-minute period each 1 min. All reagents were prepared in 75 mM phosphate buffer, pH 7.4 and the final volume of the mixture 200- μL . The results were expressed as $\mu\text{mol TEAC}$ per 100 mL of sample ($\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ mL}$).

2.9 Statistical analysis

All assays were performed in triplicate in three independent experiments and the results were expressed as an average of the assays $\pm$ standard deviation. Statistical analysis was performed to determine significant differences ($p < 0.05$) using ANOVA followed by Tukey or Student *t*-test. All analyses were performed using the software Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, California)

3. Results

3.1 Viable counts and fermentation parameters of red pitaya pulp

After 48 h of incubation in red pitaya, initial counts of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 increased ($p < 0.05$) 1.59 ± 0.18 and 1.43 ± 0.15 log CFU/mL, respectively. In this same period, the initial pH and STT values decreased ($p < 0.05$) while TA values increased ($p < 0.05$) in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12 (Table 2). In the same way, glucose and fructose of the red pitaya pulp decreased ($p < 0.05$) by the fermentation process exerted by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12, while no changes ($p \geq 0.05$) were observed in maltose contents (Table 2).

Lactic and acetic acids increased ($p < 0.05$) in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12 (Table 2). Otherwise, malic acid only decreased ($p < 0.05$) in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 (Table 2), while succinic acid increased ($p < 0.05$) only when red pitaya pulp was fermented by *L. acidophilus* LA-05 (Table 2). No changes ($p \geq 0.05$) were observed in contents of citric acid.

3.2 Survival of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 in fermented red pitaya pulp under simulated gastrointestinal conditions

At the beginning of the *in vitro* digestive process (time zero, before exposure to the 1st digestive step; pH 5.5, 10 min), the viable counts of *L. acidophilus* LA-05 were 8.55 ± 0.26 and 8.59 ± 0.18 log CFU/mL, in MRS broth and fermented red pitaya pulp, respectively (Table 1; Fig. 1A). Counts of *B. lactis* BB-12 before exposure to esophagus-stomach conditions (1st digestive step) were 8.53 ± 0.18 and 8.43 ± 0.15 log CFU/mL in cMRS broth and fermented red pitaya pulp, respectively (Table 1; Fig. 1A).

At the end of the *in vitro* digestion (after the 8th digestive step; pH 6.5, 60 min), counts of *L. acidophilus* LA-05 were 7.78 ± 0.06 log CFU / mL in MRS broth and 7.76 ± 0.15 log CFU/mL in fermented red pitaya pulp (Fig. 1A). *L. acidophilus* LA-05 maintained similar ($p \geq 0.05$) viable counts in each successive step comprising the simulated digestive process in MRS broth or fermented red pitaya pulp (Table 1; Fig. 1A).

No decreases ($p \geq 0.05$) were observed in counts of *B. lactis* BB-12 in cMRS broth or fermented red pitaya pulp until exposure to 4th digestive step (stomach, pH 2.8, 20 min) (Table 1; Fig. 1B). After the 5th digestive step (stomach pH 2.0, 20 min), a decrease ($p < 0.05$) of approximately 1 log CFU/mL was observed in counts of *B. lactis* BB-12 in cMRS broth and fermented red pitaya pulp (Table 1; Fig. 1B). At the end of the *in vitro* digestion (after the 8th digestive step), counts of *B. lactis* BB-12 were 6.94 ± 0.17 log CFU/mL in cMRS broth and 6.85 ± 0.13 log CFU/mL in fermented red pitaya pulp (Table 1; Fig. 1B).

3.2 Effect of the *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 on the phenolic compounds in red pitaya

Caffeic, caftaric and syringic acids were the phenolic acids identified in non-fermented and red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12. The phenolic acid contents were generally higher ($p < 0.05$) in the non-fermented red pitaya pulp, except for

gallic acid in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 and chlorogenic acid in red pitaya pulp fermented by *B. lactis* BB-2 (Table 3).

The contents of catechin and hesperidin increased ($p < 0.05$) in the red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12 (Table 3). Contents of quercetin 3-glucoside increased ($p < 0.05$) in red pitaya fermented by *L. acidophilus* LA-05 and decreased ($p < 0.05$) in red pitaya pulp fermented by *B. lactis* BB-12 when compared to non-fermented red pitaya pulp (Table 3). The amounts of procyanidin B1 and procyanidin B2 decreased ($p < 0.05$) in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12 (Table 3). Anthocyanins were present in higher ($p < 0.05$) contents in the non-fermented red pitaya pulp than in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12 (Table 3).

3.3 Bioaccessibility of phenolic compounds

In general, after gastric digestion the phenolics decreased ($p < 0.05$), except for gallic acid in non-fermented red pitaya pulp and chlorogenic acid in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 (Table 3). However, in the red pitaya pulp fermented by *B. lactis* BB-12 the content of most phenolic acids, flavonols and procyanidin B2 increased ($p < 0.05$) after gastric digestion (Table 3).

The exposure of non-fermented red pitaya pulp or that fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12 to the in vitro digestion decreased ($p < 0.05$) the contents of phenolics in the dialyzed fraction, with exception of gallic acid in red pitaya pulp fermented by *B. lactis* BB -12 (not detected before digestion) (Table 3). The contents of caffeic acid, catechin, epigallocatechin gallate and procyanidin B1 increased ($p < 0.05$) in the dialyzed fraction of the red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 when compared to that obtained from the non-fermented red pitaya pulp (Table 3). On the other hand, in the dialyzed

fraction of red pitaya pulp fermented by *B. lactis* only the contents of catechin increased ($p < 0.05$) in comparison to that obtained from the non-fermented red pitaya pulp (Table 3).

Contents of chlorogenic, gallic and syringic acids, cyanidin 3,5-diglucoside, procyanidin B1, procyanidin B2, quercetin 3-glucoside and rutin were higher ($p < 0.05$) in the non dialyzed fraction (unabsorbed) of red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 when compared to that of the non-fermented red pitaya pulp (Table 3). Similarly, the contents of caffeic, chlorogenic and syringic acids, as well as procyanidin B1 increased ($p < 0.05$) in the unabsorbed fraction of red pitaya pulp fermented by *B. lactis* BB-12 compared to that obtained from the non-fermented red pitaya pulp (Table 3).

A total of 14 phenolics were identified in the dialyzed fraction of the non-fermented red pitaya pulp, while six and five phenolics were detected in the dialyzed fraction of the red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12, respectively (Table 3). Overall, the bioaccessibility of phenolic compounds in non-fermented red pitaya pulp ranged from 4.33 to 80.34%, while in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 it varied from 14.01 to 85.22% (Table 3). In red pitaya pulp fermented by *B. lactis* BB-12, the bioaccessibility of phenolic compounds ranged from 5.77 to 34.96% (Table 3).

The bioaccessibility of caffeic acid, catechin, epigallocatechin gallate, procyanidin B1, procyanidin B2 and kaempferol 3-glucoside increased ($p < 0.05$) in the fermented red pitaya pulp by *L. acidophilus* LA-05 when compared to non-fermented red pitaya pulp (Table 3). Catechin, epigallocatechin gallate and procyanidin B2 showed increased ($p < 0.05$) bioaccessibility also in red pitaya pulp fermented by *B. lactis* BB-12 (Table 3). Hesperidin was the most bioaccessible phenolic compound in the non-fermented red pitaya pulp (Table 3). In contrast, this compound was not bioaccessible in the red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 (Table 3).

3.4 ORAC

The highest ($p < 0.05$) capacity of oxygen radical absorbance ($31.15 \pm 0.07 \mu\text{mol TEAC}/100 \text{ mL}$) was observed in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05, followed by red pitaya pulp fermented by *B. lactis* BB-12 ($22.60 \pm 0.05 \mu\text{mol TEAC}/100 \text{ mL}$) (Supplementary Figure 1). The ORAC value of the dialyzed fraction of the non-fermented red pitaya pulp was $8.04 \pm 0.13 \mu\text{mol TEAC}/100 \text{ mL}$.

4 Discussion

Viable cell count of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 increased after 48 h of incubation in red pitaya pulp. The low pH and the presence of phenolics was previously mentioned as the primary factors associated with the low survival of probiotics in fruit juices (Nualkaekul & Charalampopoulos, 2011; Nualkaekul, Salmeron, & Charalampopoulos, 2011). The increase of viable counts together with the decrease in glucose and fructose contents observed in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12 is mostly associated to their bioconversion in lactic acid. These effects together with the observed increase of TA and decrease of pH and SST in red pitaya pulp fermented by the test strains show their intense metabolic activity during cultivation (Duarte et al. 2017, Sousa et al., 2015). Overall, the higher contents of lactic acid detected in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 compared to the red pitaya pulp fermented by *B. lactis* BB-12 is associated to the fact that lactic acid is the main end-product of the metabolism of this homofermentative strain (da Costa et al., 2018), while the heterofermentative *B. lactis* BB-12 can produce other substances in addition to lactic acid, such ethanol, organic acids and carbon dioxide (Pedersen & Vogensen, 2016).

Probiotics should be able to maintain their viability during the passage to the gastrointestinal tract until reaching the colon (Yonekura, Sun, Soukoulis, & Fisk, 2014). In

the present study, after exposure to the last step of the simulated gastrointestinal digestion, *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 counts in the fermented red pitaya pulp showed counts close to 8 and 7 log CFU/mL, respectively. This is considered an adequate number of viable cells in foods portions to ensure a positive effect on the consumers' health (Meira et al., 2015). Similar results were reported for *L. acidophilus* CECT 903, *L. plantarum* CECT 220, *B. longum* subsp. *infant* CECT 4551 and *B. bifidum* CECT 870 in fermented pomegranate juice after in vitro digestion (Valero-Cases, Jáuregui, & Frutos, 2017).

The higher counts of *L. acidophilus* LA-05 in fermented red pitaya pulp compared to those obtained for *B. lactis* BB-12 after the the last step of the simulated gastrointestinal conditions, suggest that *L. acidophilus* LA-05 cells were less affected by stressful conditions imposed during the simulated digestion than *B. lactis* BB-12 cells. Despite a recent number of studies reporting great survival of *Lactobacillus* species in fruit derived products under simulated gastrointestinal conditions (Garcia et al., 2018, Luciano et al., 2018) the incorporation of *Bifidobacterium* spp. in plant matrices is rather scarce than in dairy products (Dias et al., 2018).

The decrease in the contents of most phenolic compounds in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12 show that phenolic compounds of distinct nature (i.e. phenolic acids and flavonoids) may be used as substrate for their metabolism. Studies have demonstrated that several species of *Lactobacillus* are able to metabolize phenolic acids in nutrient media, fruit juices or vegetable puree (Filannino et al., 2015, Sanchez-Maldonado, Schieber, & Gänzle, 2011). Hashemi et al. (2017) evaluated the influence of *L. plantarum* LS5 in sweet lemon juice and observed a decrease in total phenolic compounds after 48 h of cultivation at 37 °C. Campanella et al (2017) reported decreases in the content of phenolic compounds in grape marc after fermentation by *L. plantarum* 12A and PU1, *L. paracasei* 14A and *B. breve* 15A suggesting that these bacteria use some phenolics for their metabolism.

Particularly, the decrease in the phenolic contents promoted by microorganisms in vegetable matrices is due their ability degrade phenolic acids (Fritsch, Heinricha, Vogel, & Toelstede, 2016).

Overall, changes in phenolic profiles through fermentation by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12 may be due to the action of specific enzymes of each strain. These enzymes are capable of breaking down the chemical components of plant cell walls hydrolyzing ester bonds, which link phenolic compounds to the cell wall matrix (Huynh, Van Camp, Smagghe, & Raes, 2014). Consequently, the free phenolic compounds and bound forms can be released more efficiently from the plant matrix (Huynh, Van Camp, Smagghe, & Raes, 2014). The genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* can hydrolyze β -glycosides of vegetables through β -glucosidase activity and this activity is proposed as the first step in cleavage of the glucosidic bond in the phenolic compounds structure (Avila et al., 2009). This enzymatic activity could explain the decrease of the glucoside phenolic compounds in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12.

Despite differences in the quantities of each phenolic compound identified, similar profile of phenolics was observed in non-fermented and fermented red pitaya pulp with *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12. To a greater or lesser extent, the contents of each phenolic compound changed in red pitaya pulp non-fermented or fermented by the tested probiotics after gastrointestinal digestion. During the digestion, the phenolic compounds could undergo various reactions leading to the formation of phenolic derivatives with different physicochemical properties (Rodríguez-Roque, Rojas-Graü, Elez-Martínez, & Martín-Belloso, 2014). Probably different products generated during fermentation by the studied strains are related to the differences in the content of phenolic compounds found during exposure to gastric conditions. In addition, it should be considered that the tested

probiotics were detected in a high number of viable cells through the gastrointestinal tract, thus new transformations may have occurred.

Phenolic contents increased in the non dialyzed fraction of red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12, which corresponds to the portion that is unabsorbed in the small intestine. These means that the tested strains were able to use phenolic compounds as substrate for their fermentative metabolism. Thus, the availability of these phenolics in the colon may exert a positive modulation in the intestinal bacterial population (Coman et al., 2018). A study carried out with apple peel-rich-extracts phenolics showed increases in the adhesion properties of *Lactobacillus* strains, suggesting that these compounds may promote the adhesion of beneficial microorganisms or native gut microbiota (Volstatova et al. 2017). Cell adhesion is considered an important characteristic of probiotic microorganisms because it facilitates the colonization by stimulating the contact between the bacterial cell membrane and the interacting surfaces (Duary, Rajput, Batish, & Grover, 2011) and it is also due to the antagonism against pathogens (Papadimitriou et al., 2015). On the other hand, the unabsorbed phenolic compounds may also be transformed by the microbiota into more active forms (Cheng et al. 2016).

The increases in the contents of specific phenolics observed in the non dialyzed fraction of the non-fermented pitaya are probably related to the liberation of phenolic compounds from the plant matrix in alkaline media simulating the intestinal conditions (Celep, İnan, Akyüz, & Yesilada, 2017).

The absorption of phenolic compounds is determined by their physicochemical characteristics (Gil-Sánchez et al., 2018). Monomers and some dimers are directly absorbed in the small intestine (Gil-Sánchez et al., 2018). This can explain why catechin (monomer) and procyanidin B1 (dimer) were the compounds detected in greater amount in the dialyzed

fraction of the non-fermented red pitaya pulp and that fermented by *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12.

The increased bioaccessibility of caffeic acid, catechin, epigallocatechin gallate, kaempferol 3-glucoside, procyanidin B1 and procyanidin B2 in the red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05, or catechin, epigallocatechin gallate and procyanidin B2 in that fermented by *B. lactis* BB-12 is probably associated with the specific metabolic pathways used by these bacteria. Bacterial fermentation can enhance the release of bound phenolic compounds from the plant cell walls and convert the phenolic compounds into different forms (Huynh, Van Camp, Smagghe, & Raes, 2014).

Despite the higher amounts of total phenolic in the dialyzed fraction of the non-fermented red pitaya pulp, the antioxidant activity of the dialyzed fraction of red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 was higher than the dialyzed fraction of the non-fermented red pitaya pulp, respectively. The structural changes resulting from the bacterial fermentation may be associated with the increased antioxidant activity observed (Hur et al., 2014, Braga et al., 2018). In consistency with our results, some studies have demonstrated the contrast detected between the decreased concentration of phenolics and the increased antioxidant activity after bacterial fermentation (Mousavi et al. 2013, Hashemi et al. 2017).

Our results can be attributed to the increased in specific phenolic compounds (e.g. catechin) in the dialyzed fraction of red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12, which under the experimental conditions showed enhanced scavenging activity of oxygen species.

5. Conclusions

The results show that *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 are able to growth in red pitaya pulp and survive in this fruit during exposure to simulated gastrointestinal conditions. The incorporation of the tested probiotics in red pitaya pulp changed the amounts of distinct phenolics and affected the bioaccessibility in red pitaya pulp, mostly by increasing the amounts of compounds in the non dialyzed fraction. In addition, both, *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12 increased the bioaccessibility of some phenolics and the antioxidant activity of dialyzed fraction resulting from fermented red pitaya pulp. The results show the impact of the probiotics on phenolic compounds of distinct nature in red pitaya and suggest their incorporation as an alternative to enhance the antioxidant of this fruit beside an increase of phenolics available for fermentation by colonic bacteria.

Acknowledgements

The authors thank CAPES for partial funding of this research (Finance code 001) and CNPq (Brazil) for financial support and scholarship awarded to the first author (S.G. G. Moraes).

References

- AOAC (Ed.), *Official methods of analysis* (20th ed.), AOAC Intl, Gaithersburg, MD (2016).
- Ávila, M., Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., Pelaez, C., Requena, T., & de Pascual-Teresa, S. (2009). Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*. *Food Research International*, 42(10), 1453-1461.
- Braga, A. R. C., de Souza Mesquita, L. M., Martins, P. L. G., Habu, S., & de Rosso, V. V. (2018). *Lactobacillus* fermentation of jussara pulp leads to the enzymatic conversion of anthocyanins increasing antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 69, 162-170.

- Campanella, D., Rizzello, C. G., Fasciano, C., Gambacorta, G., Pinto, D., Marzani, B., Scarano, N., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2017). Exploitation of grape marc as functional substrate for lactic acid bacteria and *bifidobacteria* growth and enhanced antioxidant activity. *Food Microbiology*, 65, 25-35.
- Celep, E., İnan, Y., Akyüz, S., & Yesilada, E. (2017). The bioaccessible phenolic profile and antioxidant potential of *Hypericum perforatum* L. after simulated human digestion. *Industrial Crops and Products*, 109, 717-723.
- Cheng, J. R., Liu, X. M., Chen, Z. Y., Zhang, Y. S., & Zhang, Y. H. (2016). Mulberry anthocyanin biotransformation by intestinal probiotics. *Food Chemistry*, 213, 721-727.
- Coelho, E. M., Padilha, C. V. S., Miskinis, G. A., de Sá, A. G. B., Pereira, G. E., Azevêdo, L. C., & Lima, M. S. (2018). Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from Northeast Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 160–167.
- Coman, M. M., Oancea, A. M., Verdenelli, M. C., Cecchini, C., Bahrim, G. E., Orpianesi, C., Cresci, A., & Silvi, S. (2018). Polyphenol content and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and prebiotic properties of red fruit extracts. *European Food Research and Technology*, 244(4), 735-745.
- Czubinski, J., Wroblewska, K., Czyżniewski, M., Górnaś, P., Kachlicki, P., & Siger, A. (2019). Bioaccessibility of defatted lupin seed phenolic compounds in a standardized static in vitro digestion system. *Food Research International*, 116, 1126-1134.
- da Costa, W. K. A., de Souza, G. T., Brandão, L. R., de Lima, R. C., Garcia, E. F., dos Santos Lima, M., de Souza, E. L., Saarela, M., & Magnani, M. (2018). Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. *Food Research International*, 108, 172-182.

- Delgado, S., Guadamuro, L., Flórez, A. B., Vázquez, L., & Mayo, B. (2019). Fermentation of commercial soy beverages with lactobacilli and bifidobacteria strains featuring high β -glucosidase activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, 148-155.
- Dembitsky, V. M., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Vearasilp, S., Trakhtenberg, S., & Gorinstein, S. (2011). The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International*, 44(7), 1671-1701.
- Dias, C. O., de Almeida, J. D. S. O., Pinto, S. S., de Oliveira Santana, F. C., Verruck, S., Müller, C. M. O., Prudêncio, E. S., & Amboni, R. D. D. M. C. (2018). Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery. *Food Bioscience*, 24, 26-36.
- Duarte, F. N. D., Rodrigues, J. B., da Costa Lima, M., Lima, M. D. S., Pacheco, M. T. B., Pintado, M. M. E., Aquino, J. S., & de Souza, E. L. (2017). Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11), 3712-3719.
- Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K., & Grover, S. (2011). Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *The Indian Journal of Medical Research*, 134(5), 664-671.
- Dutra, R. L. T., Dantas, A. M., de Araújo Marques, D., Batista, J. D. F., de Albuquerque Meireles, B. R. L., de Magalhães Cordeiro, Â. M. T., Magnani, M., & Borges, G. D. S. C. (2017). Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 100, 650-657.

- Espín, J. C., González-Sarrías, A., & Tomás-Barberán, F. A. (2017). The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly) phenols. *Biochemical Pharmacology*, 139, 82-93.
- Filannino, P., Bai, Y., Di Cagno, R., Gobbetti, M., & Gänzle, M. G. (2015). Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology*, 46, 272-279.
- Fritsch, C., Heinrich, V., Vogel, R. F., & Toelstede, S. (2016). Phenolic acid degradation potential and growth behavior of lactic acid bacteria in sunflower substrates. *Food Microbiology*, 57, 178-186.
- Garcia, E. F., de Oliveira Araújo, A., Luciano, W. A., de Albuquerque, T. M. R., de Oliveira Arcanjo, N. M., Madruga, M. S., Lima, M. S., Magnani, M., Saarela, M., & de Souza, E. L. (2018). The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange, and grape juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(13), 5000-5010.
- Gil-Sánchez, I., Cueva, C., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolomé, B. (2018). Dynamic gastrointestinal digestion of grape pomace extracts: Bioaccessible phenolic metabolites and impact on human gut microbiota. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 41-52.
- Girard, A. L., & Awika, J. M. (2018). Sorghum polyphenols and other bioactive components as functional and health promoting food ingredients. *Journal of Cereal Science*, 84, 112-124.
- Hashemi, S. M. B., Khaneghah, A. M., Barba, F. J., Nemati, Z., Shokofti, S. S., & Alizadeh, F. (2017). Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Functional Foods*, 38, 409-414.

- Hati, S., Vij, S., Singh, B. P., & Mandal, S. (2015). β -Glucosidase activity and bioconversion of isoflavones during fermentation of soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 216-220.
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44(2), 121–129.
- Hua, Q., Chen, C., Zur, N. T., Wang, H., Wu, J., Chen, J., Zhang, Z., Zhao, j., Hu, G., Qin, Y. (2018). Metabolomic characterization of pitaya fruit from three red-skinned cultivars with different pulp colors. *Plant Physiology and Biochemistry*, 126, 117-125.
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I., & Kim, G. B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160, 346-356.
- Huynh, N. T., Van Camp, J., Smagghe, G., & Raes, K. (2014). Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 19369-19388.
- Kaprasob, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N., Sarkar, D., & Shetty, K. (2017). Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 59, 141-149.
- Luciano, W. A., Matte, T. C., Portela, I. A., de Medeiros, L. L., dos Santos Lima, M., Maciel, J. F., Souza, E. L.; Garcia, E. F., & Magnani, M. (2018). Effects of *Lactobacillus acidophilus* LA-3 on physicochemical and sensory parameters of açaí and mango based smoothies and its survival following simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 114, 159-168.
- Meira, Q. G. S., Magnani, M., de Medeiros Júnior, F. C., do Egito, R. D. C. R., Madruga, M. S., Gullón, B., Gomes, A. M. P., Pintado, M. M. E., & de Souza, E. L. (2015). Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality

characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions.

Food Research International, 76, 828-838.

Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Hadinejad, M., Emam-Djomeh, Z., & Mirzapour, M. (2013). Effect of fermentation of pomegranate juice by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* on the antioxidant activity and metabolism of sugars, organic acids and phenolic compounds. *Food Biotechnology*, 27(1), 1-13.

Nuallkaekul, S., Charalampopoulos, D., 2011. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*. 146, 111–117.

Nuallkaekul, S., Salmeron, I., Charalampopoulos, D., 2011. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. *Food Chemistry*. 129, 1037–1044.

Padilha, C. V., Miskinis, G. A., De Souza, M. E., Pereira, G. E., De Oliveira, D., Bordignon-Luiz, M. T., & Lima, M. D. (2017). Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chemistry*, 228, 106–115.

Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2015). Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-28.

Pedersen, T. B., Vogensen, F. K., & Ardö, Y. (2016). Effect of heterofermentative lactic acid bacteria of DL-starters in initial ripening of semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 57, 72-79.

Rocchetti, G., Bhumireddy, S. R., Giuberti, G., Mandal, R., Lucini, L., & Wishart, D. S.

(2019). Edible nuts deliver polyphenols and their transformation products to the large intestine: An in vitro fermentation model combining targeted/untargeted metabolomics. *Food Research International*, 116, 786-794.

- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2014). In vitro bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice-and milk-based beverages. *Food Research International*, 62, 771-778.
- Sánchez-Maldonado, A. F., Schieber, A., & Gänzle, M. G. (2011). Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 1176-1184.
- Sousa, S., Pinto, J., Pereira, C., Malcata, F. X., Pacheco, M. B., Gomes, A. M., & Pintado, M. (2015). In vitro evaluation of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour prebiotic potential. *Food and Bioproducts Processing*, 95, 96-105.
- Tenore, G. C., Novellino, E., & Basile, A. (2012). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 129-136.
- Thirugnanasambandham, K., & Sivakumar, V. (2017). Microwave assisted extraction process of betalain from dragon fruit and its antioxidant activities. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(1), 41-48.
- Valero-Cases, E., Nuncio-Jáuregui, N., & Frutos, M. J. (2017). Influence of fermentation with different lactic acid bacteria and in vitro digestion on the biotransformation of phenolic compounds in fermented pomegranate juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(31), 6488-6496.
- Volstatova, T., Marsik, P., Rada, V., Geigerova, M., & Havlik, J. (2017). Effect of apple extracts and selective polyphenols on the adhesion of potential probiotic strains of *Lactobacillus gasseri* R and *Lactobacillus casei* FMP. *Journal of Functional Foods*, 35, 391-397.
- Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying:

Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 6, 205-214.

Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310-316.

Figures

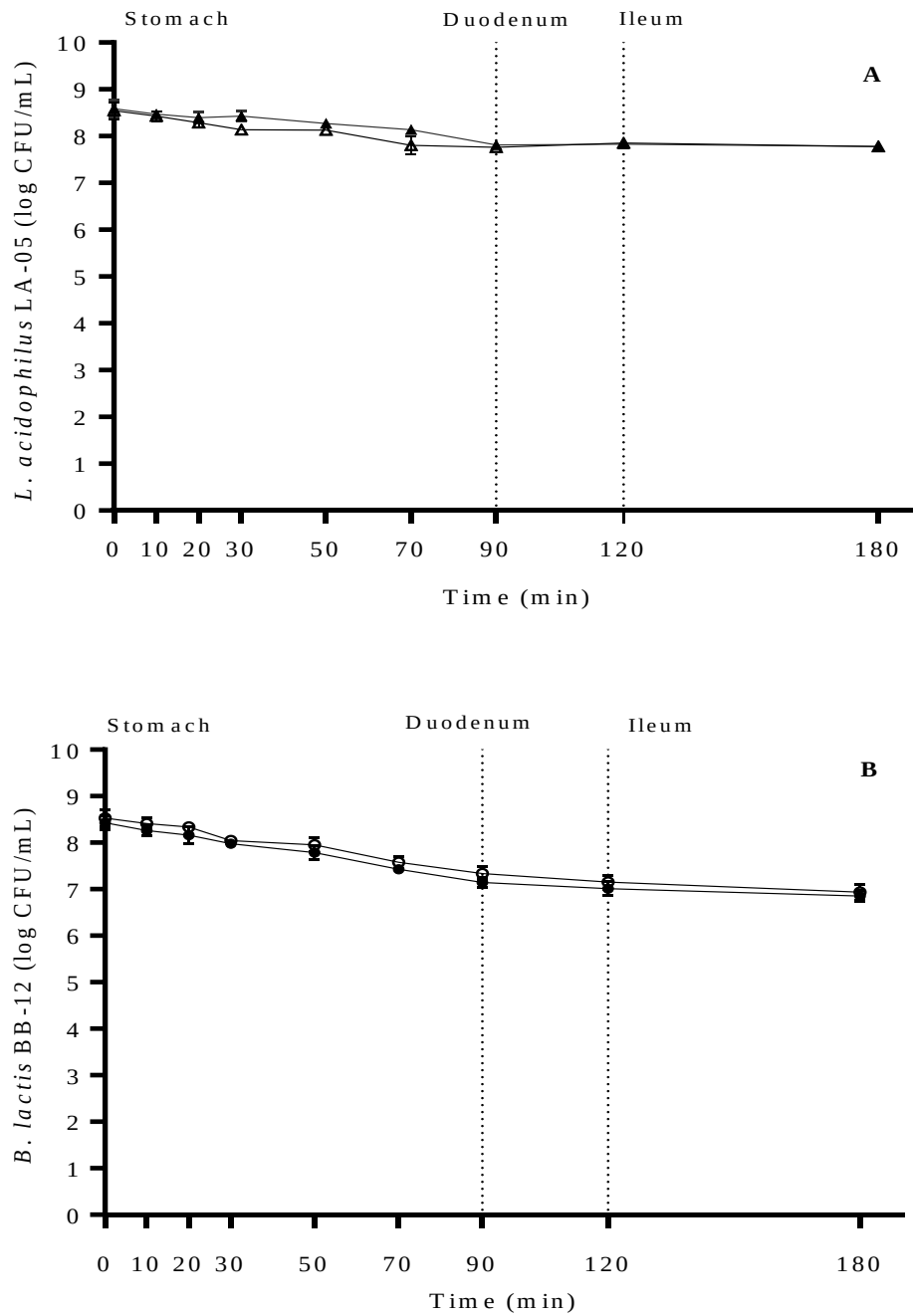
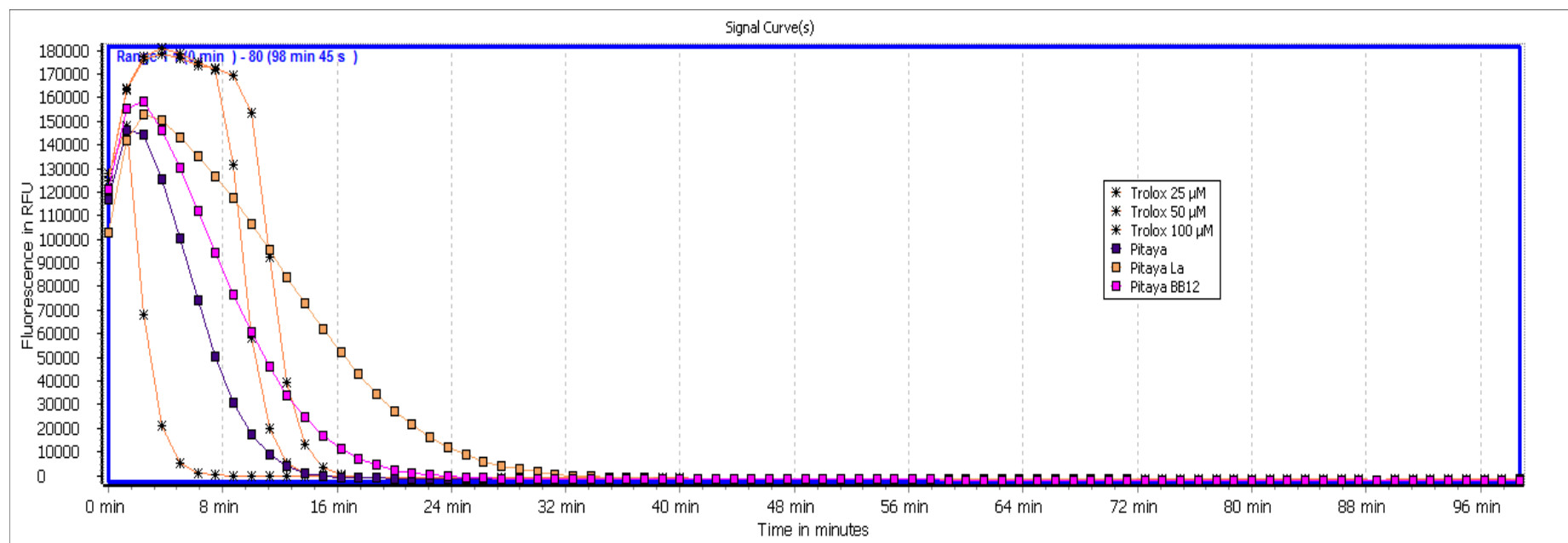


Fig. 1. Survival (log CFU/mL) of *L. acidophilus* LA-05 in MRS broth (—△—) and fermented red pitaya pulp (—▲—) during exposure to simulated gastrointestinal conditions (A). Survival (log CFU/mL) of *B. lactis* BB-12 in cMRS broth (—○—) and fermented red pitaya pulp (—●—) during exposure to simulated gastrointestinal conditions (B).



Supplementary Figure 1. Fluorescence decay curves of fluorescein in ORAC assay of the dialyzed fractions of red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12.

Tables

Table 1. Conditions used during the simulated digestion and the resultant viable cell counts of *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12.

Simulated digestive steps	Phase	Conditions	Stirring (rpm)	Final pH	Time of exposure (min)	<i>L. acidophilus</i> LA-05 (log CFU/mL)		<i>B. lactis</i> BB-12 (log CFU/mL)	
						MRS* broth	Red pitaya pulp	cMRS** broth	Red pitaya pulp
	Before simulation	-	-	-	-	8.55±0.26 ^a	8.59±0.18 ^a	8.53±0.18 ^a	8.43±0.15 ^a
1				5.5	10	8.43±0.15 ^a	8.47±0.08 ^a	8.42±0.12 ^a	8.27±0.12 ^a
2				4.6	10	8.30±0.13 ^a	8.40±0.16 ^a	8.34±0.08 ^a	8.17±0.19 ^a
3	Esophagus-stomach	Pepsin	130	3.8	10	8.24±0.08 ^a	8.43±0.15 ^a	8.05±0.08 ^a	7.98±0.07 ^a
4				2.8	20	8.13±0.09 ^a	8.28±0.12 ^a	7.96±0.10 ^a	7.79±0.16 ^a
5				2.3	20	7.80±0.28 ^a	8.14±0.13 ^a	7.58±0.15 ^b	7.43±0.08 ^b
6				2.0	20	7.77±0.09 ^a	7.82±0.11 ^a	7.34±0.13 ^b	7.15±0.12 ^b
7	Duodenum	Pancreatin + bile salts	45	5.0	30	7.86±0.08 ^a	7.83±0.08 ^a	7.16±0.16 ^b	7.01±0.16 ^b
8	Ileum		45	6.5	60	7.78±0.06 ^a	7.76±0.15 ^a	6.94±0.17 ^b	6.85±0.13 ^b

*MRS: Man, Rogosa and Sharpe broth; **cMRS: Man, Rogosa and Sharpe broth + cysteine.

Steps 1 to 6: stages to mimic the conditions in the esophagus - stomach; step 7: stage to mimic the conditions in the duodenum; step 8: stage to mimic the conditions in the ileum.
a - b: different superscript letters in the same column denote differences ($p < 0.05$) between the counts of viable cells obtained in each digestion step and the counts of viable cells before the simulation for the same bacterial strain exposed to the experimental digestion tested in MRS or cMRS broth and fermented red pitaya pulp, according to the *t*-test.

Table 2. Physicochemical parameters, sugars and organic acids contents in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 and *B. lactis* BB-12.

Parameters	Control	<i>L. acidophilus</i> LA-05	<i>B. lactis</i> BB-12
pH	4.32±0.05 ^A	3.50±0.06 ^B	3.59±0.03 ^B
Titratable acidity (% malic acid)	0.45±0.05 ^B	0.79±0.05 ^A	0.76±0.05 ^A
Total soluble solids (°Brix)	15.30±0.07 ^A	13.20±0.14 ^B	13.00±0.15 ^B
Sugars (g/L)			
Maltose	0.20±0.03 ^A	0.25±0.01 ^A	0.22±0.03 ^A
Glucose	35.18±0.03 ^A	26.21±0.03 ^B	25.27±0.01 ^C
Fructose	19.17±0.02 ^A	11.79±0.04 ^C	14.53±0.01 ^B
Organic acids (g/L)			
Citric	0.24±0.03 ^A	0.21±0.03 ^A	0.22±0.04 ^A
Malic	2.47±0.05 ^A	ND	2.39±0.04 ^A
Succinic	0.53±0.05 ^B	1.18±0.03 ^A	0.49±0.03 ^B
Lactic	ND	13.02±0.01 ^A	2.20±0.01 ^B
Acetic	ND	0.30±0.03 ^A	0.28±0.04 ^A

Control: non-fermented red pitaya pulp

A-C: different superscript capital letters in the same row denote differences ($p < 0.05$) among the different treatments, according to the Tukey's test or *t*-test.

ND: No detected

Table 3. Bioaccessibility of phenolic compounds in red pitaya pulp fermented by *L. acidophilus* LA-05 or *B. lactis* BB-12.

Phenolics (µg/100mL)		Digestion phase				Bioaccessibility (%)
		Before digestion	Gastric	Dialyzed fraction	Non dialyzed fraction	
Phenolic acids						
Caffeic acid	Control	46.58±0.04 ^{Aa}	6.77±0.04 ^{Cb}	2.94±0.01 ^{Db}	16.15±0.02 ^{Bb}	6.30±0.02 ^b
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	18.29±0.04 ^{Ab}	2.54±0.01 ^{Dc}	4.75±0.01 ^{Ca}	12.40±0.03 ^{Bc}	25.95±0.02 ^a
	<i>B. lactis</i> BB-12	10.33±0.01 ^{Cc}	11.83±0.02 ^{Ba}	ND	19.85±0.03 ^{Aa}	ND
Caftaric acid	Control	47.90±0.03 ^{Aa}	46.17±0.04 ^{Ba}	7.15±0.01 ^C	ND	14.89±0.01
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	38.07±0.02 ^{Ac}	12.68±0.03 ^{Bc}	ND	ND	ND
	<i>B. lactis</i> BB-12	47.85±0.04 ^{Aa}	17.40±0.02 ^{Bb}	ND	ND	ND
Chlorogenic acid	Control	ND	ND	ND	ND	ND
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	ND	8.24±0.03 ^{Bb}	ND	44.09±0.01 ^{Ab}	ND
	<i>B. lactis</i> BB-12	7.53±0.02 ^C	23.18±0.05 ^{Ba}	ND	37.96±0.02 ^{Ac}	ND
Gallic Acid	Control	144.05±0.02 ^{Ba}	192.30±0.04 ^{Aa}	31.72±0.03 ^{Ca}	ND	22.02±0.02
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	191.95±0.03 ^{Bb}	41.81±0.02 ^{Cc}	ND	570.36±0.01 ^A	ND
	<i>B. lactis</i> BB-12	ND	48.47±0.01 ^{Ab}	14.77±0.01 ^{Bc}	ND	ND
Syringic acid	Non-fermented	65.10±0.04 ^{Aa}	22.68±0.04 ^{Ba}	6.75±0.01 ^C	4.60±0.02 ^{Dc}	10.36±0.01
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	38.02±0.01 ^{Ab}	4.44±0.03 ^{Cb}	ND	10.19±0.01 ^{Ba}	ND
	<i>B. lactis</i> BB-12	28.14±0.02 ^{Ac}	3.69±0.01 ^{Cc}	ND	7.69±0.02 ^{Bb}	ND
Anthocyanins						
Cyanidin 3,5-diglucoside	Control	150.31±0.02 ^{Aa}	98.78±0.01 ^B	6.57±0.01 ^C	ND	4.37±0.01
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	69.94±0.03 ^{Ab}	ND	ND	68.88±0.01 ^B	ND
	<i>B. lactis</i> BB-12	ND	ND	ND	ND	ND
Delphinidin 3-glucoside	Control	20.82±0.03	ND	ND	ND	ND
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	ND	ND	ND	ND	ND
	<i>B. lactis</i> BB-12	ND	ND	ND	ND	ND
Flavanols						
Catechin	Control	570.49±0.05 ^{Bc}	263.81±0.01 ^{Cb}	139.00±0.01 ^{Dc}	1680.64±0.08 ^{Aa}	24.36±0.00 ^c
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	769.28±0.06 ^{Ba}	180.06±0.03 ^{Dc}	655.58±0.05 ^{Ca}	1150.36±0.06 ^{Ac}	85.22±0.01 ^a
	<i>B. lactis</i> BB-12	652.72±0.04 ^{Bb}	387.75±0.02 ^{Ca}	228.20±0.02 ^{Db}	1669.49±0.09 ^{Ab}	34.96±0.00 ^b
Epicatechin	Control	30.77±0.04 ^{Ba}	9.14±0.02 ^{Ca}	3.04±0.01 ^D	33.59±0.04 ^{Aa}	9.87±0.01
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	7.00±0.06 ^{Ab}	0.63±0.03 ^{Bc}	ND	ND	ND
	<i>B. lactis</i> BB-12	5.04±0.01 ^{Ac}	2.60±0.01 ^{Cb}	ND	3.85±0.01 ^{Bb}	ND
Epigallocatechin gallate	Control	58.99±0.01 ^{Aa}	18.77±0.01 ^{Ca}	3.38±0.01 ^{Db}	29.52±0.02 ^{Ba}	5.72±0.01 ^c
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	41.29±0.04 ^{Ab}	8.24±0.03 ^{Dc}	9.50±0.01 ^{Ca}	15.15±0.01 ^{Bb}	23.00±0.01 ^a

	<i>B. lactis</i> BB-12	19.04±0.05 ^{Bc}	14.54±0.04 ^{Cb}	3.27±0.01 ^{Dc}	29.49±0.02 ^{Aa}	17.16±0.01 ^b
Procyanidin B1	Control	1325.61±0.07 ^{Aa}	697.02±0.07 ^{Ba}	168.01±0.03 ^{Bb}	598.21±0.04 ^{Cc}	12.67±0.00 ^b
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	957.49±0.02 ^{Ab}	176.25±0.04 ^{Dc}	203.33±0.07 ^{Ca}	686.08±0.01 ^{Bb}	21.24±0.01 ^a
	<i>B. lactis</i> BB-12	725.20±0.02 ^{Ac}	449.21±0.05 ^{Cb}	93.34±0.03 ^{Dc}	711.65±0.03 ^{Ba}	12.87±0.00 ^b
Procyanidin B2	Control	589.26±0.03 ^{Aa}	282.62±0.05 ^{Ba}	25.53±0.02 ^{Ba}	72.78±0.01 ^{Ca}	4.33±0.00 ^c
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	149.17±0.06 ^{Bb}	41.21±0.01 ^{Cc}	20.90±0.03 ^{Db}	165.32±0.04 ^{Ab}	14.01±0.00 ^a
	<i>B. lactis</i> BB-12	105.14±0.03 ^{Bc}	158.21±0.03 ^{Ab}	6.07±0.01 ^{Dc}	67.96±0.01 ^{Cc}	5.77±0.00 ^b
Flavanone						
Hesperidin	Control	57.70±0.06 ^{Ac}	ND	46.36±0.01 ^B	ND	80.34±0.09
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	273.01±0.07 ^a	ND	ND	ND	ND
	<i>B. lactis</i> BB-12	151.82±0.02 ^b	ND	ND	ND	ND
Flavonol						
Kaempferol 3-glucoside	Control	39.69±0.02 ^{Ba}	3.55±0.01 ^{Cb}	2.84±0.01 ^{Da}	60.61±0.03 ^{Aa}	7.14±0.01 ^b
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	18.03±0.04 ^{Ab}	ND	2.85±0.01 ^{Ca}	13.78±0.02 ^{Bc}	15.78±0.01 ^a
	<i>B. lactis</i> BB-12	NQ	5.24±0.01 ^{Ba}	ND	56.01±0.01 ^{Ab}	ND
Quercetin 3-glucoside	Control	31.93±0.04 ^{Ab}	23.42±0.01 ^{Ba}	6.23±0.01 ^C	ND	19.50±0.00
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	36.41±0.02 ^{Aa}	10.78±0.01 ^{Bc}	ND	19.29±0.01 ^C	ND
	<i>B. lactis</i> BB-12	NQ	18.81±0.01 ^b	ND	ND	ND
Rutin	Control	26.57±0.04 ^{Aa}	8.68±0.01 ^{Ba}	3.51±0.01 ^C	ND	13.19±0.01
	<i>L. acidophilus</i> LA-05	20.81±0.04 ^{Ab}	3.17±0.01 ^{Cc}	ND	3.79±0.01 ^B	ND
	<i>B. lactis</i> BB-12	NQ	6.94±0.02 ^b	ND	ND	ND

Control: non-fermented red pitaya pulp; Values are expressed as the mean ± standard deviation. ND: non detected NQ: non quantified

a-c: different superscript lowercase letters in the same column for the same compound denote difference (p<0.05) among the samples, based on Tukey's test or t-test;

A-D: different superscript capital letters in the same row denote difference (p < 0.05) among the digestive phases for the same sample, based on Tukey's test or t-test.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com o presente estudo demonstram que cepas reconhecidamente probióticas de *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 apresentaram intensa atividade metabólica sendo capazes de aumentar a viabilidade quando cultivadas em pitaya vermelha e sobreviver nesta fruta durante a exposição a condições gastrointestinais simuladas. Adicionalmente, por meio do seu metabolismo, os probióticos testados modificaram as quantidades de fenólicos distintos e afetaram a bioacessibilidade destes compostos na pitaya vermelha, principalmente aumentando as quantidades de compostos na fração duodenal. Além disso, *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 aumentaram a bioacessibilidade de alguns compostos fenólicos e a atividade antioxidante da fração dialisada resultante da fermentação da pitaya vermelha. Essas descobertas sugerem que a fermentação da pitaya vermelha por *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 pode ser uma estratégia para produzir produtos derivados de pitaya vermelha de alto valor agregado.