



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

THAIS SANTANA RIBEIRO

SUCO DE XIQUE-XIQUE (*Pilosocereus gounellei*): CARACTERIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL PREBIÓTICO FRENTE À *Lactobacillus*
spp.

JOÃO PESSOA

2019

THAIS SANTANA RIBEIRO

**SUCO DE XIQUE-XIQUE (*Pilosocereus gounellei*): CARACTERIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL PREBIÓTICO FRENTE À *Lactobacillus*
*spp.***

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga

JOÃO PESSOA- PB

2019

**Catálogo na publicação Seção de
Catálogo e Classificação**

R484s Ribeiro, Thais Santana.

Suco de xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) : caracterização e avaliação in vitro do potencial prebiótico frente à *Lactobacillus* spp. / Thais Santana Ribeiro. - João Pessoa, 2019.

44 f. : il.

Orientação: Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga. Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Cactácea. 2. Suco de xique-xique. 3. Atividade prebiótica. 4. *Lactobacillus*. I. Queiroga, Rita de Cássia Ramos do Egypto. II. Título.

UFPB/BC

CDU 582.661.56(043)



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Tecnologia



Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – PPGCTA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

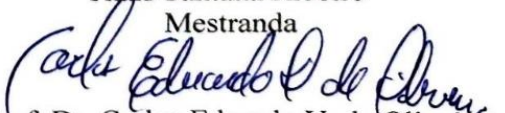
Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezenove, no Centro de Tecnologia, desta Universidade, às 14:00 horas, reuniu-se a Banca Examinadora composta pela Prof.^a Dr.^a Rita de Cassia Ramos do Egypto Queiroga, orientadora do trabalho e presidente da Banca, Dr.^a Maria Elieidy Gomes de Oliveira (Membro Interno/UFPB) e Dr. Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira (Membro Externo/IFPB). A reunião teve por objetivo julgar o trabalho da estudante **Thais Santana Ribeiro, matrícula 20171016426** sob o Título “*CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUCO DE XIQUE-XIQUE (PILOSOCEREUS GOUNELLE) FRENTE À LACTOBACILLUS SPP*”. Os trabalhos foram abertos pela Prof.^a Dr.^a Rita de Cassia Ramos do Egypto Queiroga. A seguir foi dada a palavra a estudante para apresentação do trabalho. Cada Examinador(a) arguiu a mestranda, com tempos iguais de arguição e resposta. Terminadas as arguições, procedeu-se o julgamento do trabalho, concluindo a Banca Examinadora por sua **APROVADA** (Aprovação ou reprovação). Atendidas as exigências da Resolução nº 56/2014/CONSEPE que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, e nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente Ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela mestranda.

João Pessoa, 28 de fevereiro de 2019.

Se houver alteração no título do trabalho, informar o no título abaixo:


Prof.^a Dr.^a Rita de Cassia Ramos do E. Queiroga
Orientador e Presidente


Prof.^a Dr.^a Maria Elieidy Gomes de Oliveira
Membro Interno/UFPB


Thais Santana Ribeiro
Mestranda

Prof. Dr. Carlos Eduardo V. de Oliveira
Membro Externo/IFPB

*À minha família por todo amor, carinho e
compreensão.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu percorrer caminhos inimagináveis, que está sempre comigo para renovar minhas forças e me ajudar a superar cada obstáculo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba (PPGCTA/UFPB), pela oportunidade na realização do mestrado, a todos os professores que o fazem pelos ensinamentos ao longo do curso que foram essenciais à minha formação e a funcionária Fernanda Feitosa, pela atenção, assistência e amizade.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, pela disponibilidade e confiança, pelo cuidado de mãe, momentos de trocas, lições, descontração, crescimento e amizade ao qual sempre me proporciona.

À Prof^a. Dr^a. Maria Eliedy Gomes de Oliveira, por ser um anjo de luz, sempre disposta a ajudar, pelo carinho, dedicação e sugestões de melhorias na construção deste trabalho.

Ao Prof^o Dr^o Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira, por ter participado da banca avaliadora, pelas valiosas contribuições ao presente trabalho e por ser tão solícito e prestativo.

À Prof^a Maria Lúcia da Conceição, por ter me introduzido no mundo da pesquisa, me acolheu e me ensinou a amar a microbiologia, um presente que Deus colocou em minha vida. Exemplo de pessoa e profissional, sou muito grata por tudo.

Às companheiras do Laboratório de Bromatologia (CCS/UFPB) Fabrícia França, Tamires Alcântara, Yasmim Regis, Tayanna Bernado, Francielly Araújo, Cecília Feitosa, Letícia Medeiros, Júlia Caju, Neusa Lygia e Natália Sufiatti, pela amizade, carinho, momentos de descontração, pela disposição a sempre me ajudar, em especial à Fernanda Rolim e Paloma Antonino.

Aos companheiros do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos Karoliny Sampaio, Caroline Mesquita, Maiara Lima, Ana Cristina, Selma, Giovanna Lundgren, Nayara Massa, Aldeir Sabino, Éryka Tayse, Arthur Rodrigo, Noádia Priscila, Thatyanne Mariano, Samara Macedo e Isabella Medeiros, pela companhia e amizade.

As técnicas do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos Sônia Oliveira e Heloísa Almeida, por toda a ajuda, paciência e amizade, vocês são muito especiais para mim.

À Nayara Menezes, meu anjo da guarda, que não mediu esforços para me ajudar na realização dos experimentos e no tratamento dos dados. Sou muito grata por sua ajuda e amizade.

As amigas que ganhei no mestrado do PPGCTA/UFPB, Vanessa Bomfim, Thaianaly Abreu, Bruna Melo, Érica Andrade, em especial a Tammyrys Dantas, Karoline Lima, Suênia Gabriela, Jéssica Guedes, Miriane Moreira e Darlinne Amanda, pelos momentos únicos compartilhados com vocês, os quais tornaram essa experiência maravilhosa em minha vida.

A minha melhor amiga Vanessa Ramos, por todo o incentivo, carinho, palavras de conforto nos dias difíceis e pelas diversas vezes que acreditou mais em mim do que eu mesma.

Aos meus pais, pelo apoio, carinho e incentivo a buscar a realização dos meus sonhos.

Aos meus irmãos Thiago Santana, Daniel Santana e Danielle Santana por iluminarem os meus dias, me fazerem sorrir nos dias mais tristes, os amo incondicionalmente.

Ao meu namorado, companheiro e amigo Jadielson Brito, por estar sempre ao meu lado, me ajudando a superar fases muito difíceis em minha vida; por sair mais cedo de casa e voltar mais tarde, depois de um dia exaustivo e ainda assim, me auxiliar na realização dos experimentos. Obrigada por lutar comigo pelos meus sonhos.

A toda minha família que mesmo estando um pouco longe ora e torce por mim, em especial a minha avó Cicera Maria, que não mede esforços para nos ajudar, com quem sempre posso contar.

E a todos os que não foram citados, mas que colaboraram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho e minha formação durante este período, obrigada pelos melhores momentos nesses anos.

RESUMO

O xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) é uma espécie de cactácea endêmica da região nordeste do Brasil. Constitui um recurso natural, sendo utilizado pela população do semiárido para diversos fins, incluindo alimentícios e medicinais, representando uma importante fonte de minerais, compostos bioativos e fibras. Neste estudo objetivou-se avaliar *in vitro* os efeitos prebióticos do suco de xique-xique (denominado SX) frente a diferentes cepas probióticas de *Lactobacillus*, a citar *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 e *L. paracasei* L-10. O crescimento e o número de células viáveis das cepas de *Lactobacillus* foram monitorados em caldo de Mann, Rogosa e Sharpe (MRS), contendo o SX 1% (10 g/L) e SX 2% (20 g/L), glicose (20 g/L) e fruto-oligossacarídeos - FOS (20 g/L), durante um período de 48 h. Também foram avaliados alguns parâmetros relacionados à atividade metabólica das cepas probióticas ensaiadas quando cultivadas nos diferentes meios de cultura, como os valores de pH, produção de ácidos orgânicos e o consumo de açúcares. Para cada cepa de *Lactobacillus* ensaiada, foram observadas contagem similares de células viáveis nos diferentes meios de cultivo, sendo alcançadas contagens entre 8.3 – 9.0 log UFC/mL e os valores de pH que situaram-se entre 3,5 e 3,8, exceto dos caldos contendo SX, que ficaram entre 5,4 e 5,9 ao final do cultivo de 48 h. O cultivo de todas as cepas de *Lactobacillus* em MRS contendo glicose, FOS ou SX resultou em decréscimos de pH, produção de ácidos orgânicos (acético, málico, succínico, tartárico e lático) e consumo de açúcares (glicose, frutose e maltose) ao longo do tempo de incubação avaliado, indicando intensa atividade metabólica bacteriana. Em geral, todas as cepas de *Lactobacillus* testadas apresentaram capacidade semelhante para fermentar FOS e SX, embora algumas diferenças quantitativas relacionadas com a produção de ácidos orgânicos e consumo de açúcares tenham sido detectadas. Observou-se através dos resultados deste estudo que o SX possui potencial prebiótico frente a cepas de *Lactobacillus*. Estes resultados podem agregar valor positivo ao desenvolvimento e utilização desta cactácea, proporcionando a inserção de um novo produto para a indústria de alimentos, além de potencial uso como fonte de carbono em meios de cultivo.

Palavras-chave: suco de xique-xique, atividade prebiótica, *Lactobacillus*.

ABSTRACT

The xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) is a species of cactus endemic to the northeastern region of Brazil. It is a natural resource and has been used in the semi-arid population for fauna purposes, including food and medicines, representing an important source of minerals, bioactive compounds and fibers. The objective of this study was to evaluate in vitro the practical effects of the xique-xique juice (denominated XJ) against several probiotic strains of *Lactobacillus*, one to mention *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 and *L. paracasei* L-. The total number of viable cells from the *Lactobacillus* strains was monitored in Mann, Rogosa and Sharpe (MRS) broth, containing 1% XJ (10 g/L⁻¹) and XJ 2% (20 g/L⁻¹), glucose (20 g/L⁻¹) and fructo-oligosaccharides - FOS (20 g/L⁻¹) for a period of 48 h. In addition, the evidence was conditioned to the metabolic activity of probiotic strains when culture forms were cultivated, such as pH, bacterial production and sugar consumption. For each *Lactobacillus* strain tested, similar concentrations of viable cells were observed in different culture media, ranging between 8.3 - 9.0 log CFU/mL and pH values ranging from 3.5 to 3.8, except for broths containing SX, which between 5.4 and 5.9 at the end of the 48h culture. The cultivation of all strains of *Lactobacillus* in MRS with glucose, FOS or XJ, the production of organic acids (acid acetic, malic, succinic and lactic) and the consumption of sugars (glucose, fructose and maltose) over time incubation, binding to high bacterial metabolic activity. In general, all tested *Lactobacillus* strains have similar capacity to ferment FOS and XJ, although some quantities have been related to sugar production and sugars consumption have been detected. Another way to make XJ present a prebiotic potential against *Lactobacillus* strains was observed. The results obtained can add value to the development and utilization of this cactus, providing an insertion of a new product for a food industry, as well as potential use as a carbon source in the culture media.

Keywords: xique-xique juice, prebiotic activity, *Lactobacillus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica da família <i>Cactaceae</i>	14
Figura 2 – Ilustração do <i>Pilosocereus gounellei</i> (xique-xique) situado em Boa Vista – PB ..	16
Figura 3 – Fluxograma do delineamento experimental	23
Figura 4 – Cladódio do xique-xique utilizado para obtenção do suco in natura	24
Figura 5 – Fluxograma de processamento do suco de xique xique	25

ARTIGO 1

Fig.1 – Viable counts (1) of <i>L. acidophilus</i> LA-05 (a), <i>L. casei</i> L-26 (b) and <i>L. paracasei</i> L-10 (c) and pH values (2) in media with glucose (20 g/L, -●-), fructooligosaccharides (20 g/L, -■-) and freeze-dried xique-xique (<i>Pilosocereus gounellei</i>) cladode juice (XCJ, 20 g/L, -▼-) during a 48 h-cultivation (37 °C) (<i>n</i> = 3).....	41
--	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1- Physicochemical parameters (mean $\pm$ standart deviation, $n = 3$) of juices extracted from xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) cladodes. Results are expressed under a dry matter basis40

Table 2- Prebiotic activity scores (mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$) of freeze-dried xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) cladode juice (XCJ, 20 g/L) and fructooligosaccharides (FOS, 20 g/L) on different probi- otic *Lactobacillus* isolates 40

Table 3- Contents of sugars and organic acids (g/L, $n = 3$) in media with glucose (20 g/L), fructooligosaccharides (FOS, 20 g/L) or freeze-dried xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) cladode juice (XCJ, 20 g/L) inoculated with *Lactobacillus acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 or *L. paracasei* L-10 during a 48 h-cultivation (37 °C).....42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 FAMILIA CACTACEAE	14
2.2 <i>Pilosocereus gounellei</i> ((A. Weber ex. K. Schum.) Bly. ex Rowl.)	16
2.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS: PROBIÓTICOS	17
2.4 COMPONENTES PREBIÓTICOS	19
2.5 UTILIZAÇÃO DE CACTÁCEAS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.2 OBTENÇÃO DO SUCO DE XIQUE-XIQUE	24
3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	25
3.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE PREBIÓTICA	25
3.4.1 Microrganismos e preparação do inóculo	25
3.4.2 Meio de cultura e condições de crescimento	26
3.4.3 Monitoramento do crescimento bacteriano	27
3.3.4 Avaliação da viabilidade celular bacteriana	27
3.4.5 Parâmetros da atividade metabólica dos probióticos	27
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4 RESULTADOS	36

1 INTRODUÇÃO

A família Cactaceae é uma das mais representativas do Nordeste brasileiro e possui relevância cultural e econômica para os agricultores do semiárido (LUCENA et al., 2015). Apesar de disponível em todos os períodos do ano, a utilização das cactáceas na alimentação humana se restringe aos períodos de carência de alimentos, tornando-as subutilizadas, gerando preconceitos e tabus a respeito da utilização de espécies silvestres na alimentação (CHAVES; BARROS, 2015).

Embora a utilização das cactáceas na alimentação ainda não seja valorizada, estudos demonstraram a importância nutricional acerca deste gênero, como conteúdo de açúcares solúveis, fibras dietéticas, presença de vitaminas como ácido ascórbico e carotenoides, polifenóis e betacianinas (SOUZA, 2014; FILHO et al., 2015). Além disso, são uma boa fonte de minerais, em especial, cálcio e potássio, os quais poderiam ser utilizados por populações que apresentem deficiência destes minerais em sua dieta (RAMÍREZ-MORENO et al., 2011).

Dentre as espécies de cactáceas mais utilizadas pela população do Semiárido brasileiro, o *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum. Bly. ex Rowl), conhecido popularmente como xique-xique, constitui um recurso natural com importante contribuição para a subsistência das populações locais e tem sido utilizada para diversos fins, incluindo alimentícios e medicinais (MONTEIRO et al., 2015; SOUSA, 2018).

Além do consumo da fruta “*in natura*”, a polpa extraída do caule do xique-xique tem sido utilizada na elaboração de diversos produtos como cocada, doces, farinha, cuscuz, geleias e a polpa seca e transformada em pó pode ser incorporada ao trigo para a elaboração de produtos de panificação (PEREIRA et al., 2013; BEZERRIL, 2017; ALMEIDA et al., 2007).

Nos últimos anos, o estudo de componentes bioativos naturalmente presentes em alimentos, incluindo-se os probióticos e prebióticos tem ganhado destaque (TURKMEN; AKAL; OZER, 2019). Os probióticos compõem-se de um grupo de microrganismos que, por meio de mecanismos de imunomodulação, conferem benefícios à saúde de quem os ingere (FAO/WHO, 2002; KAKELAR et al., 2019). Entre esses microrganismos, encontram-se espécies do gênero *Lactobacillus*, que juntamente com outras espécies probióticas, são capazes de fermentar seletivamente ingredientes prebióticos, permitindo assim alterações específicas, na composição e na atividade da microbiota do trato gastrointestinal (AL-SHERAJI et al., 2013; FONTELES; RODRIGUES, 2018).

Os prebióticos caracterizam-se como componentes capazes de modular o crescimento de microrganismos probióticos, e influenciar positivamente os seus efeitos sobre o organismo

hospedeiro. Neste grupo de componentes, encontram-se os fruto-oligossacarídeos, os quais estão presentes em uma grande variedade de frutos (GIBSON et al., 2017). O elevado teor de carboidratos fermentáveis nos vegetais, em especial no xique-xique, o torna uma potencial fonte de componentes com propriedades prebióticas (BEZERRIL, 2017).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo a caracterização nutricional, bem como avaliar *in vitro* o potencial prebiótico do suco de xique-xique frente a *Lactobacillus* spp. Desta maneira, acredita-se que a obtenção e a caracterização desse produto, possam agregar valor positivo ao desenvolvimento e utilização desta cactácea, a qual está presente abundantemente na região do Nordeste brasileiro, em todas as épocas do ano. Além disso, mostra-se como uma proposta promissora, especialmente devido à escassez de estudos tecnológicos com essa matriz, podendo proporcionar a inserção de um novo produto, com propriedades tecnológicas, terapêuticas e nutricionais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FAMILIA CACTACEAE

A família Cactaceae é formada por plantas suculentas, geralmente dotadas de espinhos, e que habitam principalmente ecossistemas áridos e semiáridos (MENEZES; RIBEIRO E SILVA, 2015). É dividida em quatro subfamílias: Maihuenioideae, Pereskioideae, Opuntioideae e Cactoideae (PINTO; SCIO, 2014). Os cactos são nativos do continente Americano, com maior número e diversidade de espécies ocorrendo no México (CACTUS, 2012) (Figura 1).

Figura 1 – Distribuição geográfica da família *Cactaceae*.



FONTE: http://www.thecompositae hut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/cactaceae.html.

Os cactos são vegetais que possuem cerca de 130 gêneros e 1500 espécies, sendo nativos do México e encontrados principalmente nas regiões áridas e semiáridas (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2011). No Brasil, há cerca de 40 gêneros e 200 espécies, sendo 24 gêneros e 88 espécies presentes na região Nordeste. As cactáceas encontradas na região Nordeste, são diferentes das cactáceas encontradas na região Sul e Sudeste, sendo o estado da Bahia o centro de disseminação (LUCENA et al., 2013).

A família Cactaceae é uma das mais relevantes fanerógamas da Caatinga. Sendo classificadas neste ambiente em espécies endêmicas e “indicadoras da caatinga”. Dentre as espécies desta família, destacam-se o *Cereus jamacaru* DC. subsp. *jamacaru*, *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber.) Byles & G.D. Rowley subsp. *gounellei* e *Pilosocereus pachyclauds* F. Ritter. subsp. *pernambucoensis* (F. Ritter) Zappi (DRUMOND et al., 2000; TAYLOR et al., 2015; ZAPII, 2008).

Algumas espécies, são aplicadas na medicina tradicional, como por exemplo *Nopalea cochenillifera* e do mandacaru que atuam como agente anti-inflamatório, diurético e hipoglicemiante e em tratamento de úlceras e bronquites respectivamente (NECCHI et al., 2012; SILVA, 2015). As cactáceas são utilizadas na alimentação de bovinos, caprinos e ovinos, em particular na época da estiagem e representam um papel importante na economia rural do Nordeste, devido ao seu valor forrageiro (NUNES et al., 2015). No entanto, o uso forrageiro é um dos mais citados na literatura brasileira sobre a utilização desta família, enquanto no México é mais utilizado na alimentação humana e em Cuba que sua utilidade é predominantemente medicinal e ornamental (DAVET et al., 2009; LUCENA et al., 2015).

As cactáceas têm a característica de se desenvolver em regiões semiáridas, tal fato se deve a sua adaptação morfológica e fisiológica à baixa precipitação. A sua estrutura física permite o armazenamento de água durante os períodos de estiagem, além de sua estatura e folhas, as quais evoluíram em espinhos, e evitam a perda de água por evaporação (LUCENA et al., 2013).

Estudos demonstram, que mesmo estando disponível em todos os períodos do ano, as cactáceas são pouco ou mal utilizadas no Brasil, mesmo sendo tão características da região do Semiárido do nordeste brasileiro (SILVA, 2015). Pesquisas etnobotânicas com cactáceas foram realizadas em países como México, Cuba, Colômbia, EUA, África do Sul, Etiópia e Índia. Esta família tem sido utilizada como fonte de micronutrientes na dieta de alguns países, principalmente nos que estão em desenvolvimento, devido à presença de alguns minerais como cálcio e potássio que, entre outros nutrientes, são encontrados em abundância na composição das cactáceas (BATISTA et al., 2003; MCCONN et al., 2004; RAMÍREZ-MORENO et al., 2011).

Considerando o Nordeste brasileiro, a família Cactaceae é uma das mais representativas e, segundo Chaves; Barros (2015), é um grupo dentro das angiospermas de importância econômica relevante, visto que, algumas de suas espécies, são utilizadas como forragem, alimento humano, medicinal e ornamental, além de realizarem interações ecológicas com a fauna.

No Brasil, os estudos etnobotânicos realizados registraram várias potencialidades para as cactáceas, dentre elas o uso como forragem, a exemplo de *Cereus jamacaru* DC, subsp. *Jamacaru*, *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber) Byles & G.D. Rowley subsp. *Gounellei* e *Pilosocereus chrysostele* (Vaupel) Byles & G.D. Rowley, úteis na alimentação de animais como bovinos e caprinos (ANDRADE et al., 2006; LUCENA et al., 2012; 2012b; 2013; NUNES et al., 2015). Já na alimentação humana, Lucena et al. (2013) registraram o uso da

polpa (miolo) de *P. gounellei* subsp. *Gounellei* em uma comunidade rural da microrregião do cariri paraibano para fazer farinha e produzir cuscuz.

2.2 *Pilosocereus gounellei* ((A. Weber ex. K. Schum.) Bly. ex Rowl.)

O xique-xique é uma espécie da família Cactaceae e o gênero *Pilosocereus* da subfamília Cactoideae, da tribo Cereeae. São aproximadamente 34 espécies, distribuídas do México ao Paraguai, apresentando vinte e seis espécies no Brasil, onde seis encontram-se no estado de Pernambuco (MARTINS et al., 2007; ZAPPI, 1994). É apresentada como uma cactácea bastante usual no Semiárido nordestino, de tronco ereto, com galhos laterais afastados e que descreve suavemente uma curva ampla em direção ao solo, armada de espinhos fortes e de coloração verde opaca (BARBOSA, 1998) (Figura 2).

Figura 2– Ilustração do *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) situado em Boa Vista – PB.



FONTE: Arquivo pessoal (2017).

Pode ser encontrado em solos pouco favoráveis a exemplo de solos rasos e sobre rochas e é uma espécie endêmica da região Nordeste do Brasil, que tem distribuição nas regiões semiáridas, com ocorrência nos estados do Maranhão até a Bahia. Não obstante ao pouco conhecimento a respeito de sua constituição físico-química, o xique-xique é bastante usado na elaboração de bolos, doces e biscoitos, pela população rural. Sua polpa, retirada do caule, apresenta uma consistência que, segundo Almeida et al. (2007), lembra o mamão verde. Lucena et al. (2013) apontaram a utilização da polpa (miolo) do xique-xique pela população do cariri paraibano na produção de farinha e cuscuz. Pela medicina, é muito utilizada no tratamento de infecções e inflamações (MACIEL et al., 2016).

Apesar do conhecimento medicinal de algumas espécies de cactos, os fundamentos obtidos pela população do semiárido sobre essas espécies são passadas de geração em geração, a partir de informações obtidas através da experiência com o meio em que vivem. Partes do xique-xique, como o caule, raiz, e as flores, são popularmente usados para tratar a

inflamação da próstata, icterícia, hiperglicemia e lesões, corroborando com estudos que detectaram vestígios de cumarinas, flavonoides e saponinas na polpa do xique-xique (AGRA et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2007; LUCENA et al., 2015; MEIADO et al., 2010; ROQUE et al., 2010).

Nascimento et al. (2012), citam informações a respeito da utilização do xique-xique pela população local do município de Soledade, localizado no estado da Paraíba, na utilização do cladódio para obtenção de farinha, assim como as famílias locais de Bebedouro e Oitica que fazem coletas dos frutos do xique-xique devido ao seu sabor palatável, em comparação aos demais frutos encontrados em época de seca. Na época de seca, nas regiões do nordeste brasileiro o xique-xique é utilizado como recurso na alimentação animal, entretanto, apesar de ser uma fonte estratégica nessas regiões, o conhecimento a respeito desta cactácea é escasso, necessitando-se um maior aprofundamento a respeito de seu valor nutritivo (SILVA et al., 2005). Dessa forma, Monteiro et al. (2015), demonstraram em seus estudos, que o xique-xique possibilita fornecer a população do semiárido nordestino, condições de subsistência, por ser utilizado como um importante recurso natural.

2.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS: PROBIÓTICOS

Os benefícios trazidos pela ingestão de alimentos funcionais, sobre a saúde de quem os ingere já são conhecidos há bastante tempo. A preocupação com o aumento da expectativa de vida, a busca por uma alimentação mais saudável e que proporcione uma melhoria no funcionamento do organismo, tem influenciado a comunidade científica a realizar pesquisas com esse grupo alimentar (SABATER et al., 2019).

Os alimentos funcionais têm potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição tradicional. Devem apresentar-se sobre forma de alimentos convencionais, normalmente consumidos na dieta, porém devem normalizar funções corporais de modo que auxiliem na proteção contra doenças crônicas degenerativas, como por exemplo, de hipertensão e diabetes (FAZILAH et al., 2018). Esse grupo alimentar oferece a utilidade de combinar produtos comestíveis a moléculas biologicamente ativas, com a finalidade de reparar determinados distúrbios metabólicos (TURKMEN et al., 2019).

Planejando seguir a ação dos outros países, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA lançou a Resolução n. 18 do ano de 1999, elucidando as diretrizes básicas para comprovação das propriedades funcionais de um alimento (ANVISA, 1999). Esse regulamento tem por objetivo propor que as alegações quanto a funcionalidade do produto

seja comprovada cientificamente, a fim de garantir segurança ao consumidor. O englobamento e registro desses alimentos estão previstos na Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999 e Resolução n. 2, de 07 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2002).

Dentre os nutrientes e não nutrientes com alegação de propriedades funcionais fazem parte da lista da ANVISA: ácidos graxos eicosapentaenoicos (EPA) e docosaexaenoico (DHA), carotenoides, luteína, zeaxantina, fibras alimentares, frutooligossacarídeos, goma guar parcialmente hidrolisada, inulina, lactulose, polidextrose, quitosana, fitoesteróis, probióticos e proteína de soja.

O termo probióticos foi introduzido em meados da década de 60 por Lilly e Stillwell (1965), referenciando-se um fator de origem microbiológica que impulsiona o desenvolvimento de outros organismos. Nos dias atuais, são descritos como microrganismos vivos, não patogênicos, que apresentam capacidade de atuar com efeito benéfico sobre a saúde de quem os consome, quando ingeridos em quantidade adequada (YANG et al., 2019). Várias espécies compõem o grupo dos probióticos, no entanto, as linhagens mais importantes comercialmente são as das bactérias ácido lácticas, sendo as de maior relevância as pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, visto que são cepas que podem ser isoladas e produzidas industrialmente (SAARELA, 2019). Os principais benefícios atribuídos à ingestão de culturas probióticas são: modulação da microbiota intestinal, equilíbrio da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da resistência à colonização intestinal por patógenos, redução da população de patógenos por meio da produção de substâncias com propriedades antimicrobianas, estímulo da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose, melhoria do sistema imune, atenuação da constipação, e aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (SAAD, 2012; DÍAZ et al., 2017; QUIGLEY, 2019). Porém, de acordo com a lista de alegações de propriedade funcional aprovada pela ANVISA, a comprovação da eficácia para efeitos deve estar baseada em evidências científicas robustas construídas por meio de estudos clínicos randomizados. Além disso, é fundamental a identificação da cepa e das quantidades testadas nos estudos utilizados como referência (EFSA, 2012).

Para ser utilizado como probiótico, o microrganismo estudado, precisa ser reconhecido internacionalmente, além de se enquadrar nos critérios de segurança, tecnológicos e funcionais. As considerações de segurança incluem: não ter histórico de patogenicidade, não estar associadas a outras doenças, ser estáveis geneticamente e não apresentar genes dominantes de resistência a antimicrobianos bem como transmiti-los (URNAU, 2012; QUIGLEY, 2019). Tratando-se dos aspectos tecnológicos, as cepas devem possuir atributos

sensoriais agradáveis, manter características desejáveis e apresentar estabilidade durante processamento e armazenamento do produto (SILVA; BORGES, 2019). Os critérios funcionais que devem ser atendidos para o uso como probiótico são: estabilidade quando expostos a pH ácido e aos sais de bile, capacidade de adesão à mucosa intestinal, capacidade de colonização, ao menos temporariamente, do intestino, produção de compostos antimicrobianos e manter-se metabolicamente ativo a nível intestinal (KAKELAR et al, 2019).

Os prováveis mecanismos de ação desses micro-organismos estão relacionados às alterações na microbiota intestinal. Os probióticos afetam as bactérias do intestino, promovendo uma elevação da quantidade de bactérias anaeróbias benéficas, simultaneamente à redução das populações patogênicas. Essas alterações na microbiota intestinal incitam o sistema imunológico da mucosa e o não imunológico através do antagonismo frente aos patógenos potenciais, resultando nos benefícios promovidos por tais microrganismos (RINALDI, 2018). No entanto, os mecanismos pelos quais os probióticos desempenham esses efeitos ainda não são bem definidos. Acredita-se que envolvem alterações no pH, a produção de compostos antimicrobianos, competição com patógenos pelos sítios de ligação e por nutrientes, estimulação de células imunomoduladoras entre outras ações (KUMAR et al., 2015).

2.4 COMPONENTES PREBIÓTICOS

Os prebióticos são componentes não digeríveis, que fornecem fonte de carbono para o crescimento de organismos probióticos no intestino. Estes substratos suportam o crescimento da microflora probiótica e limitam a proliferação de microrganismos prejudiciais à saúde (SABATER et al, 2019). Atualmente, os prebióticos são definidos como "substrato que é seletivamente utilizado por microrganismos probióticos, que pode influenciar positivamente os seus efeitos sobre o organismo hospedeiro conferindo benefícios sobre o bem-estar e saúde" (GIBSON et al., 2017).

Os prebióticos mais conhecidos atualmente são carboidratos não digeríveis, onde estão incluídos a lactulose, inulina e diversos oligossacarídeos que fornecem carboidratos fermentáveis pelas bactérias benéficas do cólon, podendo ser encontrados em fontes naturais como vegetais, raízes, frutas, leite e mel (FONTELES; RODRIGUES, 2018). Segundo Wang (2019), não é o prebiótico em si, que é responsável pelos efeitos benéficos, e sim as mudanças induzidas na composição da microbiota, considerando que esses efeitos estão relacionados

com o crescimento limitado de microrganismos, provocando uma mudança seletiva na microflora intestinal (especialmente no cólon). Faz-se importante destacar que a definição de prebióticos se sobrepõe de forma significativa com a definição de fibra dietética; com a exceção da sua seletividade para os vários gêneros ou espécies de bactérias endógenas (FLOCH, 2018).

Os frutanos são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado humano, e conseguem alcançar o cólon, onde são seletivamente fermentados por bactérias benéficas, tais como *bifidobacterium* e *lactobacillus* (RUBEL et al., 2014). Os galactooligossacarídeos (GOS), fruto-oligossacarídeos (FOS) e inulina são os prebióticos que mais se destacam. A lactulose é um conhecido dissacarídeo com excelente atividade prebiótica, sendo principalmente consumido pelas bactérias do cólon proximal (DELGADO; TAMASHIRO, 2018). Os GOS são carboidratos não-digeríveis, derivados a partir de lactose, que ocorre naturalmente no leite de mamíferos, e são constituídos por cadeias de monômeros de galactose (YOUNG, et al, 2019). Vários destes compostos prebióticos fazem parte de uma dieta comum. No caso dos frutanos, são encontrados em vegetais, incluindo, por exemplo, alho-poró, cebola e alcachofra; enquanto a inulina é comercialmente disponível, sendo produzida a partir da raiz da chicória. Com relação aos GOS, estes ocorrem naturalmente no leite humano, enquanto betaglucanos ocorrem principalmente em grãos e cereais (RIEDER et al., 2018).

A comunidade científica, nos últimos anos, tem aplicado seus esforços na busca de novos ingredientes com potencial prebiótico. Em estudo realizado por Wichienchot, Jatupornpipat e Rastall, (2010), foram avaliados oligossacarídeos presentes na pitaya, que foram capazes de fermentar *lactobacillus* e *bifidobacterium*. Yang et al., (2011), identificaram as propriedades prebióticas de oligossacarídeos presentes em molho de soja, frente à ação de cepas de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. Um estudo realizado por Gullón et al. (2014) detectaram efeitos prebióticos causados por um produto refinado contendo oligossacarídeos pécicos que atuaram na promoção do crescimento de bactérias benéficas, causando também aumento das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Rodrigues et al., (2016) detectaram que extratos selecionados de algas marinhas e cogumelos promoveram o aumento seletivo de bifidobactérias, além do aumento consistente na produção total de AGCC.

Atualmente, existe uma atenção voltada ao uso de prebióticos como ingredientes de alimentos funcionais com potencial de modulação da composição da microbiota do cólon (RIEDER et al., 2018). Contudo, para que esses carboidratos não digeríveis possam ser

classificados como prebióticos, devem atender alguns critérios, tais como: resistência à acidez gástrica e enzimas digestivas e a capacidade de aumentar a viabilidade e/ou atividade de microrganismos benéficos (SABATER et al., 2019).

Pesquisadores ainda sugerem que a presença de carboidratos não-digeríveis, que são seletivamente fermentados por bactérias benéficas, na dieta, favorece o chamado princípio prebiótico (SAAD et al., 201; LICHT; EBERSBACH; FROKIER, 2012). Segundo Gibson et al. (2017), qualquer componente alimentar que atinge o cólon íntegro é um prebiótico potencial. No entanto, são necessários estudos que comprovem o provável efeito prebiótico de determinados alimentos, tendo em vista o conhecimento de novas fontes alimentares com potencial prebiótico.

2.5 UTILIZAÇÃO DE CACTÁCEAS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA

No que se refere a utilização de cactáceas como fonte alimentar pela população da região do Semiárido Nordeste, ainda há uma escassez de pesquisas que possam garantir a segurança alimentar e nutricional desse produto. A maioria dos estudos tem relação com o gênero *Opuntia*, que de acordo com Morales et al. (2012) e Osorio-Esquivel et al. (2011), esse gênero ocorre em maior amplitude em diversas regiões da América Latina, com destaque na culinária Mexicana, na elaboração de doces, sucos e geleias. Ramírez-Moreno et al. (2011) citam vários estudos que mostraram a importância e a composição nutricional acerca deste gênero, como conteúdo de açúcares solúveis, fibras dietéticas, presença de vitaminas como ácido ascórbico e carotenoides, polifenóis e betacianinas, além de serem uma boa fonte de minerais, em especial, cálcio e potássio, os quais poderiam ser utilizados por populações que possuem deficiência destes minerais em sua dieta.

Algumas espécies de cactáceas mostram-se também como fonte de fibra dietética. A citar, espécies de *Opuntia dillenii* e *Opuntia ficus indica* estudadas por Mendez et al. (2015) os quais obtiveram nos cladódios, 3,73 e 2,70 g/100 g de fibra alimentar total em base seca, e através dos estudos acerca dos cladódios do xique-xique (*Pilosocereus gounellei*), os quais apresentaram aproximadamente 46,19 g/100 g de fibra alimentar total, verificando-se que a ingestão de 54 g do cilindro vascular, poderia suprir as recomendações diárias de fibra dietética recomendadas (25 g/dia) (BEZERRIL, 2017). Sobre esses aspectos, a utilização de cactáceas como ingrediente no desenvolvimento de novos produtos, pode suprir a demanda por produtos com potencial funcional.

Na legislação brasileira não há uma categoria para alimentos funcionais, entretanto, há a classificação para diversos tipos de alimentos, com base na alegação de propriedades

funcionais ou de saúde. Segundo a RDC nº 18 de 1999, alimentos com propriedades funcionais podem ser definidos como aquele que exerça o papel metabólico ou fisiológico com o nutriente ou outros constituintes (substâncias bioativas ou microrganismos) e possibilitem o crescimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (BRASIL, 1999).

Os efeitos benéficos proporcionados pela ingestão de fibras dietéticas, como a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis, têm despertado o interesse tecnológico e nutricional (SALEHI et al., 2019). Em particular a fibra solúvel, a qual é evidenciada com um elevado potencial prebiótico e de aplicação tecnológica (LOPEZ-VARGAS et al., 2013). Dessa forma, os prebióticos podem ser classificados como fibras alimentares, que permitem o crescimento dos microrganismos probióticos, mediante seu consumo no intestino.

Contudo, as pesquisas acerca das características do perfil químico e nutricional do suco de xique-xique, permitirão um maior conhecimento acerca da sua utilização, na elaboração de novos produtos e auxiliarão a população sobre o uso desta cactácea, fornecendo melhorias no aproveitamento e valorização desta espécie.

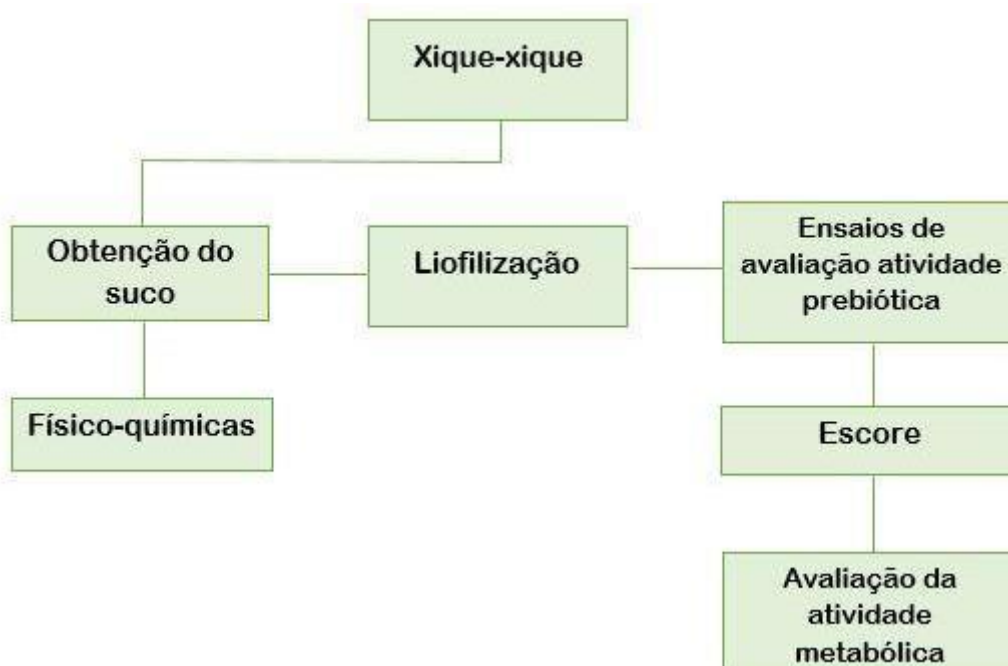
3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Tecnologia de Alimentos– Centro de Tecnologia, no Laboratório de Técnica Dietética, Laboratório de Bromatologia, no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de alimentos, do Departamento de Nutrição do CCS, da Universidade Federal da Paraíba, *Campus I*, João Pessoa – PB; no Laboratório Experimental de Alimentos (LEA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Petrolina- PE.

3.1 MATÉRIA-PRIMA

A coleta dos cladódios de xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) foi realizada em uma área de cultivo particular, localizada no município de Boa Vista/PB – Brasil com coordenadas de 07° 15' 32" S 36° 14' 24" O. A planta foi identificada pelo Profº. Drº. Leonardo Person Felix do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba - (CCA/UFPB) e a espécie certificada (15437) foi depositada no Herbário Profº. Jaime Coelho Moraes (CCA/UFPB). As amostras de xique-xique seguiram para as análises conforme fluxograma apresentado na figura 3.

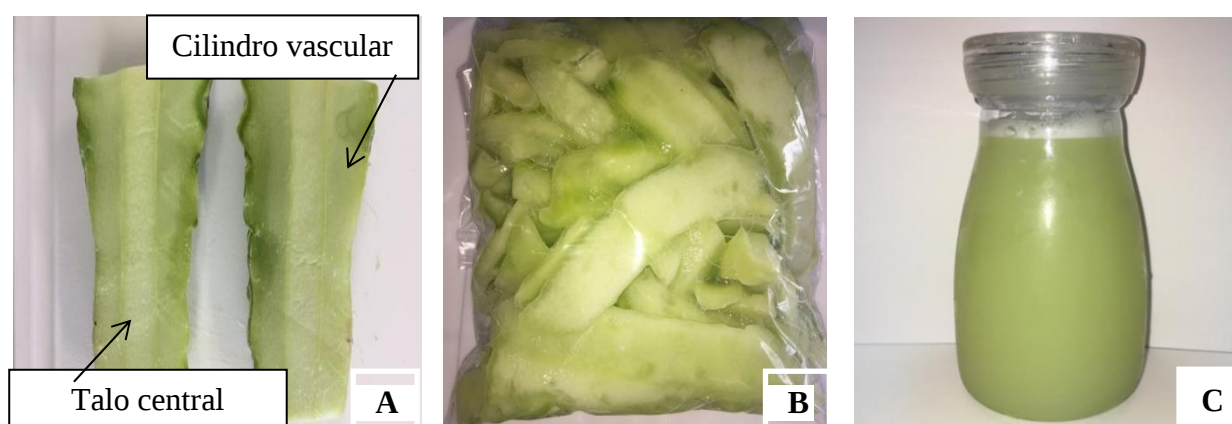
Figura 3 – Fluxograma do delineamento experimental.



3.2 OBTENÇÃO DO SUCO DE XIQUE-XIQUE

Os cladódios de xique-xique foram higienizados com água corrente e sanitizados com imersão em água clorada a 10 ppm por 15 minutos, para posterior remoção de suas cascas. Para obtenção do suco foi retirado o talo central e utilizado o cladódio do xique-xique e, então, levado a despulpadeira horizontal da marca MecVal[®] (Paraíba, Brasil), constituída de aço inoxidável, com capacidade de extração de 50 Kg/hora, em seguida, foi filtrado em peneira (20 mesh) e armazenado em garrafas de vidros estéreis a -20 °C para posterior utilização (Figura 4). Para a realização dos ensaios de atividade prebiótica uma parte do suco produzido foi liofilizado em liofilizador (LIOBRAS[®] L101- São Paulo, Brasil), onde permaneceram em processo de secagem por 24 horas, em temperatura de condensador média de -49 °C, a vácuo, até obtenção das amostras livres de umidade aparente. O pó obtido (SX - Suco de xique-xique), foi embalado em frascos de polipropileno e armazenado a -20 °C. A figura 5 ilustra o fluxograma do processo do suco de xique-xique.

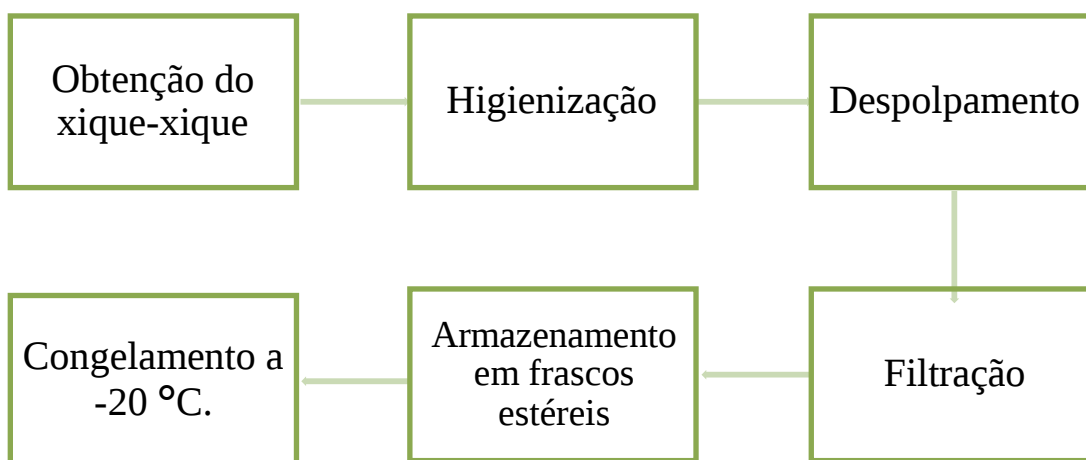
Figura 4 – Cladódio do xique-xique utilizado para obtenção do suco in natura.



(A) Exposição do Talo central e Cilindro vascular; (B) Cilindro vascular (polpa); (C) Suco de Xique-xique.

FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 5 – Fluxograma de processamento do suco de xique xique.



3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

O suco foi submetido a análises para determinação das características físico-químicas, de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2016). Para tanto, foram realizados os seguintes ensaios: determinação da acidez molar por meio de titulação; umidade e extrato seco total por meio de secagem em estufa estabilizada a 105 °C até obtenção de peso constante; teor de cinzas, quantificado por meio de carbonização, seguida de incineração em forno mufla estabilizado a 550 °C; a quantificação do teor de proteína foi realizada pelo método Kjeldahl; na determinação dos teores de fibra solúvel e insolúvel, foi utilizado o método enzimático-gravimétrico; a determinação de lipídeos foi realizada pelo método de extração à frio (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957). Os açúcares foram determinados conforme a descrição apresentada no item 3.4.5.

3.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE PREBIÓTICA

3.4.1 Microrganismos e preparação do inóculo

Diferentes cepas de *Lactobacillus* com propriedades probióticas foram utilizadas neste estudo, como segue: *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 e *L. paracasei* L-10 (SÁNCHEZ-ZAPATA et al., 2013; SOUZA et al., 2015). Estas cepas foram obtidas da Coleção de Microorganismos da Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica do Porto (Porto, Portugal). As culturas estoque foram mantidas em caldo de Mann, Rogosa e Sharpe (CMRS; Himedia, Índia) contendo glicerol (15 g/100 mL) a - 20 °C. Para a utilização nos ensaios, cada

cepa foi inicialmente cultivada em CMRS a 37 °C durante 20 - 24 h (fase estacionária de crescimento), colhidas por meio de centrifugação (4500 g, 15 min, 4 °C), lavadas duas vezes em solução salina estéril (8,5 g/L) e ressuspensas em solução salina estéril para obter suspensões de células em que a leitura da densidade óptica a 625 nm (OD 625) foi de aproximadamente 0,1 correspondendo a uma contagem de 10^6 UFC/mL.

As cepas *Escherichia coli* ATCC 11303 e *E. coli* ATCC 25922, foram fornecidas pela Coleção de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil), sendo constituídas pelo inóculo entérico misturado utilizado em ensaios para determinação de escores de atividade prebiótica. As culturas em estoque foram mantidas em caldo M9 (HiMedia) contendo glicerol (150 g/L) a -20°C. Antes da preparação do inóculo, essas cepas foram cultivadas no caldo M9 (HiMedia) a 37°C por 18-20 h. Cada cultura foi então centrifugada a $4500 \times g$ por 15 min a 4 °C, lavada duas vezes em solução salina estéril (NaCl 8,5 g/L) e ressuspensa em solução salina estéril para obtenção de suspensão celular com OD625 de 0,1 (10^5 UFC/ML). O inóculo da mistura entérica foi obtido misturando as duas diferentes suspensões de *E. coli* na proporção de 1: 1.

3.4.2 Meio de cultura e condições de crescimento

O caldo MRS com modificações na sua composição em relação à fonte de carbono foi utilizado como meio basal para avaliar o efeito prebiótico do SX (SÁNCHEZ-ZAPATA et al., 2013; SOUSA et al., 2015). A composição dos diferentes meios de cultivo foi a seguinte: triptona 10 g/L, extrato de carne 8 g/L, extrato de levedura 4 g/L, fosfato de di-potássio de hidrogênio 2 g/L, Tween 80 g/L, acetato de sódio 5 g/L, citrato de amônio tribásico 2 g/L, sulfato de magnésio 0,2 g/L, sulfato de manganês 0,04 g/L, e a sua respectiva fonte de carbono de 10 ou 20 g/L. Para monitorar o crescimento das estirpes probióticas, foram preparados cinco caldos diferentes: CMRS sem fonte de carbono, CMRS contendo glicose 20 g/L (CMRS original), CMRS contendo fruto-oligossacarídeos (FOS: um ingrediente prebiótico bem conhecido - TUOHY et al., 2003; GIBSON et al., 2017) 20 g/L, CMRS contendo X (1%) 10 g/L e CMRS contendo XJ (2%) 20 g/L. Além disso, foi monitorado o crescimento bacteriano em água destilada estéril contendo apenas o suco a 10 ou 20 g/L.. Todos os ingredientes utilizados na formulação do CMRS foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), com a exceção de FOS, que foi obtido a partir da Roval Ltda (Paraíba, Brasil).

3.4.3 Monitoramento do crescimento bacteriano

A fim de verificar a capacidade das cepas de *Lactobacillus* em utilizar o suco de xique-xique como única fonte de carbono, bem como para selecionar a concentração do suco a ser utilizada em ensaios posteriores, o crescimento bacteriano foi avaliado primeiramente utilizando-se um ensaio de monitoramento do crescimento bacteriano em microplaca (SÁNCHEZ-ZAPATA et al., 2013; SOUSA et al., 2015). Para isso, o inóculo de cada uma das cepas testadas foi distribuído (2%, v/v) em uma microplaca de 96 poços contendo 200 µL do respectivo meio de cultivo. Logo após, a microplaca foi incubada a 37 °C em leitor/incubador de microplacas (EON, Biotek, EUA), para avaliação do crescimento bacteriano (absorbância - DO 655 nm) em diferentes intervalos de tempo de incubação (0 - logo após a homogeneização, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 h).

3.3.4 Avaliação da viabilidade celular bacteriana

A viabilidade celular das cepas de *Lactobacillus* nos diferentes meios de cultura foi avaliada utilizando-se o procedimento de contagem de células viáveis. Para tanto, alíquota de suspensões das cepas teste foram inoculadas (2%, v/v) em frascos estéreis contendo 10 mL dos diferentes meios de cultivo. As misturas foram suavemente agitadas manualmente durante 30 s, e subsequentemente incubadas de forma estática sob condições de aerobiose a 37 °C. Em diferentes intervalos de tempo de incubação (0 - apenas depois da homogeneização, 6, 12, 18, 24 e 48 h de pós-incubação), alíquotas de 100 µL de cada mistura foram diluídas seriadamente em solução salina estéril, e, subsequentemente, alíquotas de 10 µL de cada diluição foram adicionadas ao ágar MRS, utilizando-se uma técnica de inoculação de microgotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001), para contagem de células viáveis. As placas foram incubadas aerobicamente a 37° C durante 24 - 48 h, e os resultados foram expressos como log UFC/mL.

3.4.5 Parâmetros da atividade metabólica dos probióticos

A atividade metabólica das cepas de *Lactobacillus* foi avaliada através da determinação dos valores de pH, açúcares e ácidos orgânicos nos meios de cultivo em diferentes intervalos de tempo (0 - logo após a homogeneização e 6, 12, 18, 24 e 48 h pós-incubação). Os valores de pH foram medidos usando um potenciômetro digital (modelo Q400A5, Quimis, São Paulo-SP) seguindo um procedimento padrão (AOAC, 2012). Açúcares (glicose, frutose e maltose) e ácidos orgânicos (acético, succínico, lático e málico) foram

medidos simultaneamente por HPLC usando um cromatógrafo Agilent (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, EUA), uma bomba de solvente quaternário (modelo G1311C), desgaseificador, compartimento da coluna termostática (modelo G1316A) e amostrador automático (modelo G1329B), acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) (modelo G1315D) e Detector de Índice de Refração (RID) (modelo G1362A). As demais condições analíticas foram as seguintes: uma coluna Agilent Hi-Plex H ($7,7 \times 300$ mm, 8μ); fase móvel H_2SO_4 4 mM/L em água ultrapura; e taxa de fluxo 0,7 mL/min. Os dados foram processados utilizando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies). Os picos da amostra de HPLC foram identificados comparando os seus tempos de retenção com os dos padrões de ácidos orgânicos e açúcares. As amostras foram filtradas em membranas de 0,45 micras e injetadas duplicadamente, e as áreas médias dos picos foram usadas para quantificação (BALL et al., 2011). Os padrões de glicose e frutose foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA); a maltose foi obtida da Chem Service (West Chester, EUA); e os ácidos succínico, acético, lático e málico foram obtidos da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), todos com pureza $\geq 99\%$. A água ultrapura foi obtida a partir de um sistema MilliQ® (EMD Millipore, EUA) e o ácido sulfúrico foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.4.6 Escore de atividade prebiótica

Para a determinação dos escores de atividade prebiótica, o inóculo de cada uma das cepas de *Lactobacillus* testadas (2%, v/v) foi dispensado em frascos estéreis contendo 4 mL de CMRS basal incluindo glicose, SX 1%, SX 2% ou FOS. Em paralelo, foram adicionadas suspensões de inóculo da mistura entérica (*Escherichia coli* ATCC 11303 e *E. coli* ATCC 25922 a uma proporção de 2%, v/v) ao caldo M9 (Sigma-Aldrich) contendo glicose, SX 1%, SX 2% ou FOS. As misturas foram suavemente agitadas manualmente durante 30 s e subsequentemente incubadas estaticamente sob condições aeróbicas a 37°C , em dois intervalos de tempo diferentes [0 (isto é, logo após homogeneização) e 48 h após a incubação], as alíquotas de 100 μL de cada mistura foram diluídas em série em solução salina estéril e, posteriormente alíquotas de 10 μL de cada diluição, foram inoculadas utilizando a técnica da microgota, em ágar MRS ou EMB para as cepas de *Lactobacillus* e a mistura entérica, respectivamente. As placas foram incubadas aerobicamente a 37°C durante 48 h. Após o período de incubação, as células viáveis foram contadas (log UFC/mL). O índice de atividade prebiótica do SX em relação a cada estirpe de *Lactobacillus* foi determinado usando a seguinte equação:

$$E = \frac{(\log \text{ de prob UFC/mL no preb a 48 h} - \log \text{ prob UFC/mL no preb a 0 h})}{(\log \text{ prob UFC/mL em G às 48 h} - \log \text{ prob UFC/mL na G a 0 h})} - \frac{(\log \text{ ent UFC/mL no preb às 48 h} - \log \text{ ent UFC/mL em pre a 0 h})}{(\log \text{ ent UFC/mL em G às 48 h} - \log \text{ ent UFC/mL em G a 0 h})}$$

Onde:

E: escore de atividade prebiótica; Prob: probiótico; Preb: prebiótico; G: glicose; Ent: entérico.

Uma pontuação positiva da atividade prebiótica é obtida se a cepa probiótica testada cresce melhor (com base na contagem de células viáveis) no prebiótico do que na glicose e/ou se o prebiótico tem um maior crescimento que a mistura entérica. Isso indica que o ingrediente é metabolizado tão bem quanto, ou melhor que a glicose pelo probiótico e é metabolizado seletivamente pelo probiótico, mas não por outras bactérias intestinais.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicata, em três experimentos distintos, e os resultados foram expressos como médias, desvio e erro-padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, utilizando um $p < 0,05$. Para isso, foi utilizado o software Graphpad Prism 7.0.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Comissões tecnocientíficas de assessoramento em alimentos funcionais e novos alimentos.** Recomendações da comissão já aprovadas pela diretoria de alimentos em toxicologia. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alimentos/comissões/tecno.htm>> Acesso em: 01 fev. 2018.
- AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- ALMEIDA, C. A. et al. Características físicas e químicas da polpa do xique-xique. **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n. 4, p. 440-443, 2007.
- AL-SHERAJI, S. H. et al. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1542- 1553, 2013.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 19 th ed, Washington D.C USA, 2016.
- AURELI, P. et al. Probiotics and health: An evidence-based review. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 5, p. 366–376, 2011.
- BALL, S. et al. Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids by ion-exchange chromatography. In *Agilent Hi-Plex Columns Applications Compendium*, **Agilent Technologies Inc.**, 2011.
- BARBOSA, H. P. **Tabela de composição de alimentos do Estado da Paraíba: setor agropecuário**. 2. ed. João Pessoa: UFPB, 1998.
- BEZERRIL, F. F. **Caracterização nutricional do xique-xique (*Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex. K. Wchum.) Bly. ex Rowl.) e sua utilização no processamento de geleia**. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, 2017.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 2002. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 2002.
- CHAVES, E. M. F.; ALBUQUERQUE, U.; BARROS, R. F. M. Práticas nutricionais populares com uso de *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) Byles & G.D. Rowley no Piauí, Nordeste do Brasil. **Magistra**, v. 25, s/n, p. 2108-2112, 2014.
- CHAVES, E. M. F.; BARROS, R. F. M. Cactáceas: Recurso alimentar emergencial no semiárido, Nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, v. 9, p. 129-135, 2015.

DAVET, A. et al . Atividade antibacteriana de *Cereus jamacaru* DC, Cactaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 561-564, 2009.

DELGADO, G. T. C.; TAMASHIRO, W. M. S. C. Role prebiotics in regulation of microbiota and prevention of obesity. **Food Research International**, v. 113, p. 183-188, 2018.

DÍAZ, P. J. et al. Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. **Nutrients**, v.9, n. 6, p. 555, 2017.

DRUMOND MA, et al. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. In: Seminário para avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga; 2000; Petrolina. Petrolina: EMBRAPA:CPATSA:UFPE: Conservation International do Brasil, 2000.

FAO/WHO. **Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario, Canada (2002).

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

FLOCH, H. M. The role of prebiotics and probiotics in gastrointestinal disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.47, n.1, p. 179-191, 2018.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. H: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 226, p. 497-509, 1957.

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

GIBSON, R. G. et al. The international Scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews-Gastroenterology & Hepatology**, v.1, p. 1-12, 2017.

GULLÓN, B. et al. Structural features and assessment of prebiotic activity of refined arabinoxyloligosaccharides from wheat bran. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 438-449, 2014.

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.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, T. et al. Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae), **American Journal Botany**, v. 98, p. 44–61, 2011.

HORWITZ, W; LATIMER JR; GEORGE W. (Ed.). *Official Methods of analysis of the Association of official Analytical Chemists* 18 th ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. chapter 45, met 985.29, p. 101-102.

KAKELAR, M. H. et al. Isolation and molecular identification of *Lactobacillus* with probiotic potencial from abomasums driven rennet. **Food Chemistry**, v. 272, p. 709-714, 2019.

KUMAR, H. et al. Novel probiotics and prebiotics: road to the market. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 99-103, 2015.

LICHT, T.R; EBERSBACH, T; FRØKIÆR, H. Prebiotics for prevention of gut infections. **Trends in Food Science & Technology**, v.23, n. 2, p. 70-82, 2012.

LILLY, D.M., STILLWELL, R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n.2, p. 747-748, 1965.

LÓPEZ-VARGAS, J. H. et al. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var.flavicarpa) co-products. **Food Research International**, v. 51, p. 756–763, 2013.

LUCENA, C. M. et al. Use and knowledge of Cactaceae in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, p. 1-11, 2013.

LUCENA, C. M. et al. Conhecimento botânico tradicional sobre cactáceas no semiárido do Brasil. **Gaia Scientia**, v. 9, n. 2, p. 77-90, 2015.

MACIEL, J. K. S. et al. New Alcamide ant Anti-oxidant Activity of *Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Bly. Ex Rowl. (Cactaceas). **Molecules**. v. 21, 2016.

MARTINS, L.S.T., Germinação de sementes de *Pilosocereus arrabidaei* (Lem.) Byl. & Row (Cactaceae) de Arraial do Cabo. Research Institute Botanical Garden, Rio de Janeiro, Brazil, 2007.

MCCONN, M. M., NAKATA, P. A. Oxalate reduces calcium availability in the pads of the prickly pear cactus through formation of calcium oxalate crystals. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1371–1374, 2004.

MEIADO, M. V. et al Seed germination responses of *Cereus jamacaru* DC. ssp. jamacaru (Cactaceae) to environmental factors. **Plant Species Biology**, v. 25, n. 2, p. 120-128, 2010.

MÉNDEZ, L. P. et al. Physicochemical characterization of cactus pads from *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica*. **Food Chemistry**, v. 188, p. 393–398, 2015.

MORALES, P. et al. Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C.Weber ex Diguet and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. **Food Research International**, v. 46, p. 279–285, 2012.

MONTEIRO, E. R.; MANGOLIN, C. A.; NEVES, A. F.; ORASMO, G. R.; SILVA, J. G. M.; MACHADO, M. F. P. S. Genetic structure of *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) as revealed by AFLP marker tp guide proposals for improvement and restoration of degraded

areas in Caatinga biome. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 16966-16974, 2015.

NASCIMENTO, V. T. et al. Knowledge and use of wild food plants in areas of dry seasonal forests in Brazil. **Ecology of Food and Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 317-343, 2013.

NASCIMENTO, V. T. et al. Famine foods of Brazil's seasonal dry forests: Ethnobotanical and Nutritional Aspects. **Economic Botany**, v. 66, n. 1, p. 22-34, 2012.

NECCHI, R. M. M. et al. In vitro antimicrobial activity, total polyphenols and flavonoids contents of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (Cactaceae). **Journal of Research Pharmacy**, v. 2, p. 1-7, 2012.

NUNES, A. T. et al. Local knowledge about fodder plants in the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.11, s/n, p. 1-12, 2015.

OSORIO-ESQUIVEL, O. et al. Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. **Food Research International**, v. 44, p. 2160–2168, 2011.

PEREIRA, M. C. et al. Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p. 19–24, 2013.

PINTO, N. C. C.; SCIO, E. The biological activities and chemical composition of *Pereskia* species (Cactaceae) - a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 3, p. 189-195, 2014.

QUIGLEY, M. M. E. Prebiotics and probiotics in digestive health. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, p. 333-344, 2019.

RAMÍREZ-MORENO, E. et al. In vitro calcium bioaccessibility in raw and cooked cladodes of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). **Food Science and Technology**, v. 44, n. 7, p. 1611-1615, 2011.

RASTALL, B; GIBSON, G. **Prebiotics: Development and application**. Wiley, 2006.

RINALDI, E. et al. Gut microbiota and probiotics: novel immune system modulators in myasthenia gravis? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2018.

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

RODRÍGUEZ, R. et al. Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3-15, 2006.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

- RUBEL, I. A. et al. In vitro prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*. **Food Research International**, v.62, p. 59-65, 2014.
- SAAD, N. A. et al. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1 – 16, 2012.
- SAARELA, H. M. Safety aspects of next generation probiotics. **Current Opinion in Food Science**, v. 30, p. 8-13, 2019.
- SALEHI, E. et al. Opuntia ficus indica fruit gum: Extraction, characterization, antioxidante activity and functional properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, p. 656-572, 2019.
- SÁNCHEZ-ZAPATA, E. et al. In vitro evaluation of “horchata” co-products as carbono source for probiotic bacteria growth. **Food and Bioproducts Processing**, n. 91, p. 279 – 286, 2013.
- SILVA, A. S. et al. Avaliação da composição físico-química da coroa de- frade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.5, n.2, p.1-8, 2005.
- SILVA, C. C.A; BORGES, S. K. P. Sensory characteristics, brand and probiotic claim on the overall liking of commercial probiotic fermented milks: Which one is more relevant?. **Food Research International**, v.116, p. 184-189, 2019.
- SILVA, V. A. Diversidade de uso das cactáceas no Nordeste do Brasil: uma revisão. **Gaia Scientia**, v. 9, n. 2, p. 137-154, 2015.
- SOUSA, A. G. et al. Gastroprotective effect of ethanol extracts of cladodes and roots of *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl (Cactaceae) on experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 218, p. 100-108, 2018.
- SOUSA, S. et al. M. In vitro evaluation of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour prebiotic potential. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 96-105, 2015.
- TAYLOR N. et al. Cactaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB1562>. Acesso em: 06 Mar, 2018.
- TURKMEN, N.; AKAL, C.; ÖZER, B. Probiotic dairy-based beverages: A review. **Journal of Functional Foods**, v.53, p. 62-75, 2019.
- URNAU D, C. A. et al. Isolamento, identificação e caracterização quanto à resistência ao pH ácido e presença de sais biliares de cepas probióticas de leites fermentados comerciais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n.384, p. 5-10, 2012.
- WANG, L. et al. In vitro digestibility and prebiotic potencial of a novel polysaccharide from Rosa roxburghii Tratt fruit,. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 408-417, 2019.

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.

YANG, Y. et al. Efficacy of probiotics to prevent and/or alleviate childhood rotavirus infections. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 90-99, 2019.

ZAPPI, D. C. *Pilosocereus* (Cactaceae). The genus in Brazil. **Succulent Plant Research**. v. 3, p. 1-160, 1994.

4 RESULTADOS

Os resultados e discussão da presente dissertação estão apresentados na forma de artigo científico, original intitulado: In vitro evaluation of potential prebiotic effects of a freeze-dried juice from *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum. Bly. Ex Rowl) cladodes, an unconventional edible plant from Caatinga biome.

O referido artigo encontra-se publicado e formatado de acordo com as normas do periódico 3 Biotech.



In vitro evaluation of potential prebiotic effects of a freeze-dried juice from *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum. Bly. Ex Rowl) cladodes, an unconventional edible plant from Caatinga biome

Thais Santana Ribeiro¹ · Karoliny Brito Sampaio² · Francisca Nayara Dantas Duarte Menezes² · Paloma Oliveira Antonino de Assis¹ · Marcos dos Santos Lima³ · Maria Elieidy Gomes de Oliveira¹ · Evandro Leite de Souza^{2,4} · Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga¹

Received: 13 June 2020 / Accepted: 15 September 2020 / Published online: 24 September 2020
© King Abdulaziz City for Science and Technology 2020

Abstract

This study evaluated in vitro the potential prebiotic effects of a freeze-dried juice extracted from cladodes of *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl, an unconventional edible plant from Brazilian Caatinga biome and popularly known as xique-xique. Prebiotic effects of freeze-dried xique-xique cladode juice (XCJ, 20 g/L) were evaluated by measurements of prebiotic activity scores and stimulatory effects on growth and metabolic activities of probiotic *Lactobacillus acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 and *L. paracasei* L-10, which are beneficial species found as part of human gut microbiota. XCJ showed positive prebiotic activity scores on all examined probiotics, indicating a selective stimulatory effect on these microorganisms in detriment to enteric pathogens. Examined probiotics had high viable counts ($> 8 \log \text{CFU/mL}$) after 48 h of cultivation in media with XCJ (20 g/L), representing an increase of $> 2 \log \text{CFU/mL}$ when compared to viable counts found on time zero. Cultivation of probiotics in media with XCJ resulted in decreased pH during the 48 h-incubation. Contents of fructose and glucose decreased in media with XCJ inoculated with *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 or *L. paracasei* L-10 during the 48 h-cultivation, in parallel with an increase in contents of acetic and lactic acids. Measured effects of XCJ on probiotics were overall similar to those exerted by fructooligosaccharides (20 g/L), a proven prebiotic ingredient. These results showed that XCJ could exert selective stimulatory effects on different *Lactobacillus* species, which are indicative of potential prebiotic properties.

Keywords Cactaceae · Prebiotic · Probiotic · Metabolic activity · Valorization

Introduction

Interest in rational exploitation of plant biodiversity as a natural source of sustainable food products and health promoting bioactive compounds has been growing due to its abundance, safety and impacts in local economy (Maciel et al. 2019). *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl, Cactaceae, popularly known as “xique-xique”, is an endemic plant species from Brazilian Caatinga biome and considered an unconventional and sub-utilized edible plant (de Assis et al. 2019; Monteiro et al. 2015). In semi-arid region of northeast Brazil, xique-xique has been traditionally consumed by local population using uncommon processing methods to formulate a variety of products, such as juices, jellies, cake, flour and couscous, some of them commercialized in small scale (de Almeida et al. 2007; de Assis et al. 2019). Increased consumption of xique-xique has stimulated

✉ Evandro Leite de Souza
evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

¹ Laboratory of Bromatology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

² Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

³ Department of Food Technology, Federal Institute of Sertão de Pernambuco, Petrolina, Petrolina, Brazil

⁴ Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

investigations on its nutritional composition, bioactive compounds and health-promoting properties (Monteiro et al. 2015; Sousa et al. 2018).

Early investigations on biological properties of xique-xique have shown gastroprotective effects of ethanol extracts from stem and roots (Sousa et al. 2018), antipyretic activity of cladode saline extract (de Oliveira et al. 2018) and intestinal anti-inflammatory and antioxidant effects of xique-xique cladode juice in in vivo animal models (de Assis et al. 2019). These biological effects have been primarily linked to presence of a variety of phenolics and/or high amounts of dietary fiber, especially of soluble fibers, in xique-xique edible parts (de Assis et al. 2019; Sousa et al. 2018).

Soluble fibers and phenolics have been associated with prebiotic effects of plant-derived products (Danneskiold-Samsøe et al. 2019; de Albuquerque et al. 2020). Prebiotics are substrates selectively utilized by microorganisms forming the gut microbiota, causing a range of benefits to host health primarily associated with their modulatory effects on intestinal microbiota (Chlebowska-Smigiel et al. 2017; Gibson et al. 2017; Massa et al. 2020). Criteria considered for selection of prebiotics include non-absorbability and fermentability by beneficial intestinal microorganisms, besides to ability to stimulate the growth and metabolism of probiotics in large intestine (Gibson et al. 2017; Mohanty et al. 2018). *Lactobacillus* has been the most common genera studied for probiotic use and found as part of human intestinal microbiota (Chlebowska-Smigiel et al. 2017; Das et al. 2020), in addition to be ordinarily selected as test microorganisms in in vitro investigations to evaluate prebiotic properties of foods (de Albuquerque et al. 2020; Gómez et al. 2019; Massa et al. 2020).

This study aimed to evaluate the potential prebiotic effects of a juice extracted from xique-xique cladodes through measurements of stimulatory effects on growth and metabolic activities of different probiotic *Lactobacillus* isolates using in vitro experimental models.

Materials and methods

Xique-xique collection and freeze-dried juice preparation

Xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) cladodes were collected in a private cultivation area located at the municipality of Boa Vista (coordinates 07° 15' 32" S 36° 14' 24" O, Paraíba, Brazil). The plant was identified by Prof. Dr. Leonardo Person Felix (Center of Agricultural Sciences, Federal

University of Paraíba, Bananeiras, Paraíba, Brazil) and a certified voucher specimen (number 15437) was deposited in Herbarium Prof. Jaime Coelho Moraes (Center of Agricultural Sciences, Federal University of Paraíba, Areia, Paraíba, Brazil).

For juice extraction, xique-xique cladodes were washed with running tap water and sanitized by immersion in 150 ppm chlorinated water for 15 min. Peel and central stem were removed and remaining flesh was mashed in a pulping machine (MecVal®, Gambolo, Italy), sieved (20 mesh), portioned in sterile screw-capped glass flasks and frozen (-18 ± 1 °C). Prior to use in assays to evaluate the potential prebiotic effects, frozen juice was lyophilized using a bench top liophilizer (L-101 model, Liotop, São Carlos, São Paulo, Brazil) for approximately 48 h (average condenser temperature: -49 ± 2 °C, vacuum pressure: <138 µHg, freeze-drying speed: 1 mm/h). Freeze-dried xique-xique cladode juice (XCJ) was packaged in polypropylene bags and stored at -20 °C.

Physicochemical characteristics of XCJ

Physicochemical characteristics of XCJ were determined using standard procedures (AOAC 2016), to cite: molar acidity measured by titration; moisture, ash and total dry extract measured by drying up to reaching a constant weight; and protein content measured by Kjeldahl method. Lipid content was measured with a cold extraction method (Folch et al. 1957). An enzymatic–gravimetric method was used to measure soluble and insoluble fiber contents (Horwitz et al. 2005; Prosky et al. 1992). Sugar and organic acid contents were measured using procedures described in "Measurements of pH, organic acids and sugars in cultivation media".

Prebiotic activity assays

Microorganisms and inoculum preparation

Three isolates of different *Lactobacillus* species with well-known probiotic properties were used, to cite: *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 and *L. paracasei* L-10 (Menezes et al. 2017; Sánchez-Zapata et al. 2013; Sousa et al. 2015). These *Lactobacillus* species have been commonly reported as part of human intestinal microbiota (David et al., 2014; de Albuquerque et al. 2020; Sun et al., 2018). Stocks were kept in de Mann, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) with glycerol (Sigma Aldrich, St. Louis, MA, USA; 15 mL/100 mL) at -20 °C. Before use in assays, each isolate was grown in MRS broth at 37 °C during 20–24 h, collected by centrifugation ($4500 \times g$, 15 min, 4 °C), washed twice and re-suspended in sterile saline (0.85 g/100 mL) to obtain a

cell suspension with an optical density reading at 625 nm (OD₆₂₅) of approximately 0.8. Each isolate was tested separately in experiments (Duarte et al. 2017; Massa et al. 2020).

Escherichia coli ATCC 11,303 and *E. coli* ATCC 25,922 were used to prepare an enteric inoculum to determine the prebiotic activity scores. Stocks were kept on Muller-Hinton (MH) agar (MHA; HiMedia) with glycerol (15 mL/100 mL, Sigma Aldrich) at -20 °C. Before use in assays, each isolate was cultivated in Brain Heart Infusion (BHI) broth (HiMedia) at 37 °C for 18–20 h. Each culture was collected by centrifugation (4500 × *g*, 15 min, 4 °C), washed twice and re-suspended in sterile saline to obtain a cell suspension with OD₆₂₅ of approximately 0.1. The enteric inoculum was obtained by mixing the two different *E. coli* suspensions in a rate of 1:1 (Duarte et al. 2017; Massa et al. 2020).

Measurements of prebiotic activity scores

A 0.2 mL-aliquot of examined probiotic suspension was homogenized with 10 mL of MRS broth with glucose, FOS or X CJ (20 g/L). In parallel, a 0.2 mL-aliquot of the mixed enteric inoculum was homogenized with 10 mL of M9 broth (Sigma-Aldrich) with glucose, FOS or X CJ (20 g/L). On time zero (just after homogenization) and after 48 h of incubation (37 °C), a 1 mL-aliquot of each cultivation medium was diluted (1:9) in sterile saline solution and a 100-μL aliquot of each dilution was plated on MRS agar (HiMedia) or eosin methylene blue agar (HiMedia) for probiotic and enteric mixture enumeration, respectively, and incubated at 37 °C for 24 h. The viable counts (Log CFU/mL) were enumerated at the end of the incubation period and prebiotic activity score was determined with the formula:

$$\text{Prebiotic activity score} = \frac{\text{probiotic log } \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \text{ on prebiotic at 48 h} - \text{probiotic log } \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \text{ on prebiotic at 0 h}}{\text{probiotic log } \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \text{ on glucose at 48 h} - \text{probiotic log } \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \text{ on glucose at 0 h}} - \frac{\text{enteric log } \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \text{ on prebiotic at 48 h} - \text{enteric log } \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \text{ on prebiotic at 0 h}}{\text{enteric log } \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \text{ on glucose at 48 h} - \text{enteric log } \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \text{ on glucose at 0 h}} \quad (1)$$

Cultivation media

A MRS broth modified in relation to the sole carbon source was used as a basal medium to evaluate the growth and metabolic activity of examined probiotic isolates (Sánchez-Zapata et al. 2013; Sousa et al. 2015). Composition of different cultivation media used in experiments was: tryptone 10 g/L, meat extract 8 g/L, yeast extract 4 g/L, hydrogen di-potassium phosphate 2 g/L, Tween 80 g/L, sodium acetate 5 g/L, tribasic ammonium citrate 2 g/L, magnesium sulphate 0.2 g/L, manganese sulphate 0.04 g/L and respective carbon source 20 g/L. To measure the probiotic growth and parameters indicative of metabolic activities, three different media were formulated: MRS broth with 20 g/L glucose (standard MRS broth), MRS broth with 20 g/L fructooligosaccharides (FOS, a proven prebiotic ingredient) (de Albuquerque et al. 2020; Gibson et al. 2017) and MRS broth with 20 g/L X CJ. All ingredients used to formulate the cultivation media were obtained from Sigma-Aldrich, with the exception of FOS obtained from Galena Industrial (Campinas, São Paulo, Brazil).

A positive prebiotic activity score indicates that examined cultivation media ingredient is metabolized as well as or better than glucose by inoculated probiotic, besides to the occurrence of selective stimulatory effects on examined probiotic growth in detriment to the enteric mixture, which is characteristic of potential prebiotic activity (Duarte et al. 2017; Zhang et al. 2018).

Measurements of probiotic viable counts

The inoculum of examined probiotic isolate was dispensed (2 mL/100 mL) in sterile flasks with the respective cultivation media (100 mL; final viable counts of approximately 6.5 log CFU/mL). The mixtures were gently hand-shaken for 30 s and incubated at 37 °C. At different incubation times (0—just after homogenization and after 6, 12, 18, 24 and 48 h), a 100 μL-aliquot of each mixture was diluted (1:9) in sterile saline solution, and, subsequently, a 20 μL-aliquot of each dilution was plated on MRS agar. Plates were incubated at 37 °C for 24 h and results were expressed as log CFU/mL (de Albuquerque et al. 2020).

Measurements of pH, organic acids and sugars in cultivation media

Metabolic activity of probiotics was evaluated by measuring the pH values and contents of sugars and organic acids in cultivation media at different incubation time intervals. pH values were measured (time zero—immediately after homogenization and after 6, 12, 18, 24 and 48 h) with a digital potentiometer following standard procedures (AOAC 2016). Contents of sugars (glucose and fructose) and organic acids (acetic and lactic acids) were simultaneously measured (after 12, 24 and 48 h) with HPLC—diode array detector (DAD)—refractive index detector (RID) using an Agilent chromatograph (model 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, St. Clara, CA, USA) equipped with a quaternary solvent pump (G1311C model), degasser, thermostatic column compartment (G1316A model) and automatic auto-sampler (G1329B model), coupled with a DAD (G1315D model) and RID (G1362A model) according to a previously described method for simultaneous sugar and organic acid detection (Coelho et al. 2018). The other analytical conditions were: an Agilent Hi-Plex H column (8 μ m, 7.7 $\times$ 300 mm); mobile phase H₂SO₄ 4 mM/L in ultrapure water; flow rate 0.7 mL/min; separation temperature 70 °C; and sample injection volume 10 μ L. Organic acids were detected by DAD at 210 nm and sugars were detected by RID. Data were processed with OpenLAB CDS ChemStation Edition™ software (Agilent Technologies). HPLC sample peaks were identified by comparing their retention times with those of organic acid and sugar standards. Samples were filtered in 0.45 micron membranes and double injected. Mean peak areas were used for quantification. Glucose and fructose standards were obtained from Sigma-Aldrich; acetic and lactic acid standards were obtained from Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil).

Statistical analysis

Experiments were done in triplicate in three different occasions. Results were expressed as average $\pm$ standard deviation. Data were submitted to Student's *t* test or analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, using $p \leq 0.05$. Statistical analyses were done with Graphpad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Results of physicochemical parameters of X CJ showed a low acidic pH and high contents of ash (30.10 ± 0.03 g/100 g) and soluble fibers (14.4 ± 0.02 g/100 g). X CJ had low contents of proteins (7.59 ± 0.06 g/100 g) and fat

(2.35 ± 0.01 g/100 g). Glucose (0.28 ± 0.05 g/100 g) and fructose (0.21 ± 0.06 g/100 g) were found in X CJ (Table 1).

X CJ showed positive prebiotic activity scores (0.9 ± 0.2 – 1.1 ± 0.3) on *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 and *L. paracasei* L-10. Prebiotic activity scores found for X CJ on examined probiotics were similar ($p > 0.05$) to those found for FOS (0.9 ± 0.3 – 1.3 ± 0.2). X CJ showed similar prebiotic activity scores ($p > 0.05$) on three examined probiotics (Table 2).

L. acidophilus LA-05, *L. casei* L-26 and *L. paracasei* L-10 had high viable counts (> 8 log CFU/mL) after 48 h of cultivation in media with X CJ, glucose or FOS. Viable counts of examined probiotics had an increase of > 2 log CFU/mL in media with X CJ, glucose or FOS after 48 h of cultivation when compared to viable counts found on time zero. Examined probiotics had overall increased viable counts up to 12 or 18 h of cultivation, followed for steady viable counts up to 48 h of cultivation regardless of the carbon source in media. *L. acidophilus* LA-05 and *L. casei* L-26 had similar viable counts ($p > 0.05$) after 48 h of cultivation

Table 1 Physicochemical parameters (mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$) of juices extracted from xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) cladodes. Results are expressed under a dry matter basis

Parameters	Values
Glucose (g/100 g)	0.28 ± 0.05
Fructose (g/100 g)	0.21 ± 0.06
Maltose (g/100 g)	0.05 ± 0.02
Rhamnose (g/100 g)	< LOD
Total dietary fiber (g/100 g)	16.23 ± 0.03
Soluble fiber (g/100 g)	14.40 ± 0.02
Insoluble fiber (g/100 g)	1.83 ± 0.02
Ash (g/100 g)	30.10 ± 0.03
Protein (g/100 g)	7.59 ± 0.06
Lipid (g/100 g)	2.35 ± 0.01
pH	5.02 ± 0.02

< LOD: below the limit of detection

Table 2 Prebiotic activity scores (mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$) of freeze-dried xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) cladode juice (X CJ, 20 g/L) and fructooligosaccharides (FOS, 20 g/L) on different probiotic *Lactobacillus* isolates

Probiotics	X CJ	FOS
<i>L. acidophilus</i> LA-05	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2
<i>L. casei</i> L-26	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.3
<i>L. paracasei</i> L-10	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.2

No significant difference ($p > 0.05$) among values found for X CJ or FOS on different probiotic isolates, as well as for X CJ and FOS on a same probiotic isolate, based on Tukey's test and Students' *t* test, respectively

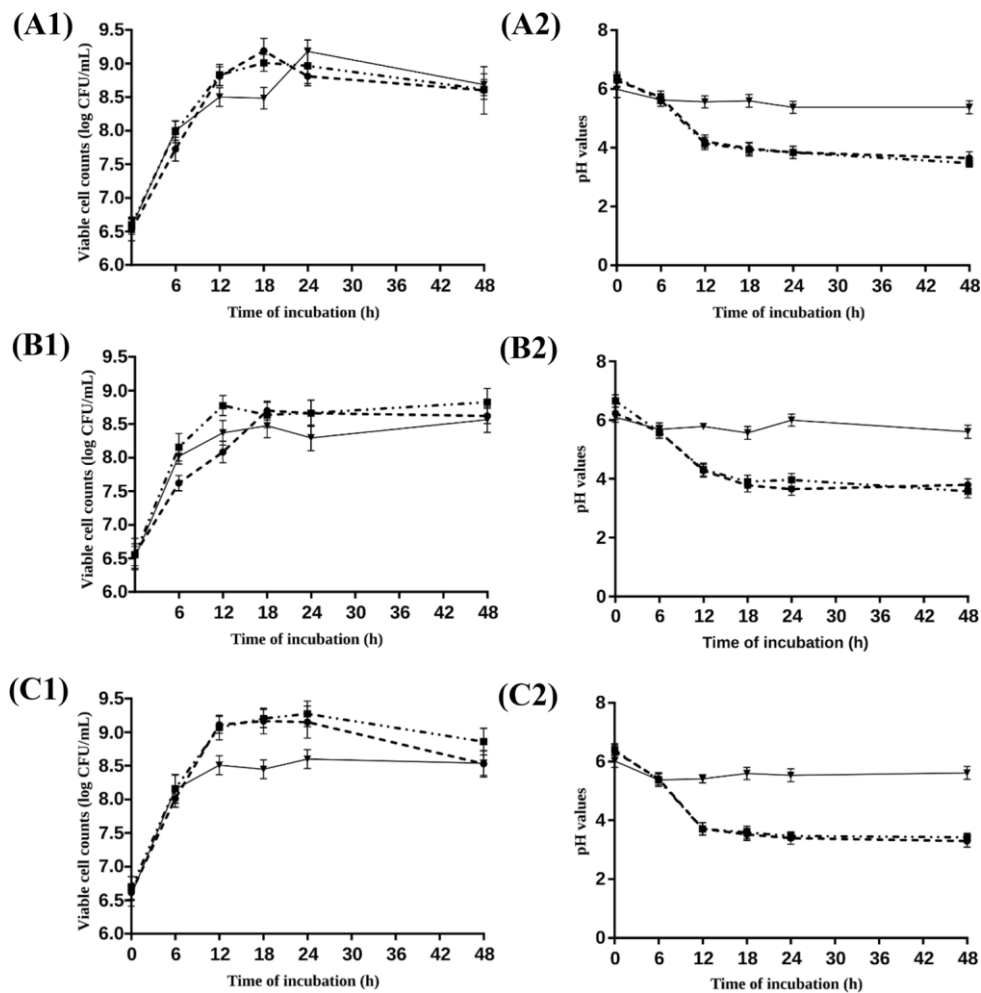


Fig. 1 Viable counts (1) of *L. acidophilus* LA-05 (a), *L. casei* L-26 (b) and *L. paracasei* L-10 (c) and pH values (2) in media with glucose (20 g/L, $\bullet$), fructooligosaccharides (20 g/L, $\blacksquare$) and

freeze-dried xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) cladode juice (XCJ, 20 g/L, $\blacktriangledown$) during a 48 h-cultivation (37 °C) ($n=3$)

in media with XCJ, FOS or glucose, while *L. paracasei* L-10 had higher viable counts ($p \leq 0.05$) in media with FOS, followed by media with glucose or XCJ. *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 and *L. paracasei* L-10 had similar viable counts ($p > 0.05$) after 48 h of cultivation in media with a same carbon source (Fig. 1a1–c1).

Cultivation of probiotics in media with XCJ, glucose or FOS resulted in lower pH after 48 h when compared to time zero ($p \leq 0.05$). Lowest pH values of cultivation media were reached after 18 or 24 h of incubation, which did not change ($p > 0.05$) up to 48 h. Cultivation media with glucose or FOS had lower pH after 48 h (pH of approximately 4) when compared to cultivation medium with XCJ (pH of approximately 5) regardless of the inoculated probiotic. No difference ($p > 0.05$) in pH was found after 48 h of cultivation of a same probiotic in media with XCJ, glucose or FOS (Fig. 1a2–c2).

Contents of glucose and/or fructose decreased ($p \leq 0.05$) in media with XCJ, glucose or FOS inoculated with *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 or *L. paracasei* L-10 during the 48 h-cultivation. Glucose was the sugar found at the highest contents after 12 h of cultivation in media with XJ regardless of the inoculated probiotic, being rapidly depleted already after 24 h of cultivation. Contents of acetic and lactic acid increased ($p \leq 0.05$) during the 48 h-cultivation in media with XCJ regardless of the inoculated probiotic. Acetic acid was found at higher contents than lactic acid during the 48 h-cultivation in media with XCJ regardless of the inoculated probiotic. In most cases, contents of acetic and lactic acid increased ($p \leq 0.05$) during the 48 h-cultivation in media with glucose or FOS inoculated with examined probiotics. Contents of lactic acid were higher in media with glucose or FOS when compared to media with XCJ during the measured cultivation period regardless of the inoculated probiotic. Contents

Table 3 Contents of sugars and organic acids (g/L, $n = 3$) in media with glucose (20 g/L), fructooligosaccharides (FOS, 20 g/L) or freeze-dried xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) cladode juice (XCJ, 20 g/L) inoculated with *Lactobacillus acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 or *L. paracasei* L-10 during a 48 h-cultivation (37 °C)

Parameters	Time (h)	<i>L. acidophilus</i> LA-05			<i>L. casei</i> L-26			<i>L. paracasei</i> L-10		
		Glucose	FOS	XXJ	Glucose	FOS	XXJ	Glucose	FOS	XXJ
Sugars										
Glucose	12	7.87 ± 0.07 ^{Aa}	0.68 ± 0.05 ^{Ab}	0.29 ± 0.03 ^c	7.81 ± 0.07 ^{Aa}	0.54 ± 0.05 ^{Ab}	0.19 ± 0.02 ^c	4.46 ± 0.07 ^{Aa}	0.30 ± 0.05 ^{Ab}	0.24 ± 0.03 ^b
	24	3.21 ± 0.06 ^{Ba}	0.57 ± 0.05 ^{Ab}	< LOD	3.50 ± 0.06 ^{Ba}	0.42 ± 0.05 ^{Ab}	< LOD	0.89 ± 0.06 ^{Ba}	0.29 ± 0.01 ^{Ab}	< LOD
	48	0.03 ± 0.01 ^{Ca}	0.03 ± 0.01 ^{Ba}	< LOD	0.06 ± 0.01 ^{Cb}	0.39 ± 0.01 ^{Aa}	< LOD	0.50 ± 0.01 ^{Ca}	0.25 ± 0.05 ^{Ab}	< LOD
Fructose	12	Nd	5.52 ± 0.07 ^{Aa}	0.04 ± 0.03 ^{Ab}	Nd	3.61 ± 0.06 ^{Aa}	0.02 ± 0.01 ^{Ab}	Nd	6.45 ± 0.07 ^{Aa}	0.05 ± 0.01 ^{Ab}
	24	Nd	2.28 ± 0.06 ^{Ba}	0.03 ± 0.01 ^{Ab}	Nd	2.18 ± 0.05 ^{Ba}	0.03 ± 0.02 ^{Ab}	Nd	0.60 ± 0.03 ^{Ba}	0.03 ± 0.02 ^{Ab}
	48	Nd	0.08 ± 0.01 ^C	< LOD	Nd	0.45 ± 0.02 ^{Ca}	0.04 ± 0.03 ^{Ab}	Nd	0.24 ± 0.02 ^C	< LOD
Organic acids										
Lactic acid	12	11.43 ± 0.07 ^{Ca}	8.43 ± 0.05 ^{Cb}	2.19 ± 0.03 ^{Bc}	9.75 ± 0.07 ^{Ca}	6.06 ± 0.05 ^{Cb}	2.01 ± 0.03 ^{Ac}	10.04 ± 0.06 ^{Ca}	9.99 ± 0.05 ^{Ca}	1.55 ± 0.03 ^{Cb}
	24	12.76 ± 0.06 ^{Bb}	14.40 ± 0.05 ^{Ba}	2.83 ± 0.03 ^{Ac}	14.75 ± 0.06 ^{Ba}	14.11 ± 0.05 ^{Bb}	1.96 ± 0.03 ^{Bc}	18.35 ± 0.07 ^{Ba}	11.04 ± 0.05 ^{Bb}	2.50 ± 0.03 ^{Bc}
	48	18.34 ± 0.01 ^{Aa}	16.52 ± 0.07 ^{Ab}	2.46 ± 0.03 ^{Cc}	22.17 ± 0.01 ^{Aa}	14.80 ± 0.05 ^{Ab}	1.86 ± 0.03 ^{Cc}	22.22 ± 0.07 ^{Aa}	21.58 ± 0.07 ^{Ab}	3.40 ± 0.03 ^{Ac}
Acetic acid	12	2.44 ± 0.06 ^{Bb}	1.92 ± 0.05 ^{Bc}	3.30 ± 0.03 ^{Ba}	1.98 ± 0.03 ^{Bb}	1.42 ± 0.07 ^{Cc}	2.46 ± 0.03 ^{Ca}	3.02 ± 0.04 ^{Bc}	3.31 ± 0.04 ^{Aa}	3.20 ± 0.03 ^{Bb}
	24	1.82 ± 0.03 ^{Cb}	1.89 ± 0.06 ^{Bb}	3.46 ± 0.02 ^{Ca}	1.93 ± 0.03 ^{Bb}	1.92 ± 0.06 ^{Bb}	2.68 ± 0.03 ^{Ba}	3.24 ± 0.04 ^{Aa}	2.01 ± 0.06 ^{Cb}	3.28 ± 0.03 ^{Ba}
	48	3.20 ± 0.03 ^{Aa}	3.21 ± 0.03 ^{Aa}	3.95 ± 0.04 ^{Ab}	2.37 ± 0.03 ^{Ab}	2.23 ± 0.01 ^{Ac}	3.18 ± 0.04 ^{Aa}	2.58 ± 0.04 ^{Cb}	2.57 ± 0.01 ^{Bb}	3.63 ± 0.03 ^{Aa}

A–C: different superscript capital letters in the same column for the same sugar/organic acid at different cultivation time for each tested isolated denote differences ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test; a–c: different superscript small letters in the same row and different measured sugars/organic acids for each isolate among media with glucose, FOS and XCJ denote difference, based on Tukey's test ($p \leq 0.05$)

Nd not determined

of acetic acid were higher in media with XXJ after 24 and 48 h of cultivation when compared to media with glucose or FOS (Table 3).

Discussion

Positive prebiotic activity scores found for X CJ indicate its capability of stimulating selectively *Lactobacillus* species in detriment to enteric pathogens (de Albuquerque et al. 2020; Duarte et al. 2017; Zhang et al. 2018). This selective stimulatory effect is an important characteristic for a prebiotic food because it could impose a competitive advantage of *Lactobacillus* species on enteric pathogens co-existing in intestinal environment (de Albuquerque et al. 2020; Massa et al. 2020). Examined *Lactobacillus* isolates had overall similar ability to increase their populations and reduce the pH over time in cultivation media with X CJ or FOS, the main prebiotic ingredient in use by food industry (de Paulo Farias et al. 2019; Gibson et al. 2017), which are indicative of intense stimulatory effects on *Lactobacillus* growth and metabolism (Duarte et al. 2017; Massa et al. 2020).

These stimulatory effects could be related to a range of nutrients available in X CJ for use as fermentable substrates by *Lactobacillus*, particularly the contents of soluble fibers. Specifically, soluble fibers are resistant to digestion and absorption in human small intestine, reaching the colon where they are selectively fermented, being characterized as important energy sources for beneficial bacteria part of intestinal microbiota (Franco-Robles and López 2015; Wang et al. 2019). Sugars (e.g., glucose and fructose) found in X CJ could be also fermentable substrates for examined *Lactobacillus* (Massa et al. 2020).

An early study identified different phenolics in X CJ (e.g., catechin, epicatechin, quercetin 3-glucoside, rutin, kaempferol 3-glucoside, gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid and hesperidin) (de Assis et al. 2019), many of which have been reported to exert stimulatory effects on probiotic *Lactobacillus* (de Souza et al. 2019). Phenolics found in X CJ have been reported to be metabolized in human colon by some *Lactobacillus* species with production of secondary metabolites with high bioactivity and bioavailability (de Sousa et al. 2018; Filannino et al. 2016; Shen et al., 2018). A previous study found that fermentation of a cactus (*Opuntia ficus-indica* L., Cactaceae) cladode pulp with *Lactobacillus* species caused alteration in phenolic profile, which was directly linked to enhanced in vitro bioactive properties found in fermented pulp (Di Cagno et al. 2016).

Our results indicated that X CJ was metabolized by examined *Lactobacillus* isolates with fast consumption of glucose and fructose to promote high viable counts and production of acetic and lactic acids during the measured cultivation

period, which are positive results in investigations with candidates to be used as prebiotics (Gibson et al. 2017; Sanders et al. 2019). Acetic and lactic acids were produced in cultivation media with X CJ regardless of the inoculated *Lactobacillus* isolate. Acetic acid is an important metabolite produced by lactic acid bacteria during fermentation of carbohydrates in the colon, being a natural energy source for host organism. Lactic acid is one of the most important end-products of glucose and fructose fermentation by lactic acid bacteria, being the majority organic acid produced by metabolism of carbohydrates by homofermentative *Lactobacillus* species (Chlebowska-Śmigiel et al. 2017; Gibson et al. 2017). The intense metabolic activity of examined probiotics found in media with X CJ are important results because the beneficial effects of prebiotics on host health (e.g., increased nutrient bioavailability and improved immunological and inflammatory responses) have been linked to increased population of beneficial microorganisms, decreased pH and increased production of organic acids in colon (Gibson et al. 2017; Saarela 2019). An early investigation found that consumption of dehydrated cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica* L.) induced beneficial alterations in gut microbiota (including an increase in population *Lactobacillus* species populations) of rats fed a high fat and sucrose diet, which could support the use of cactus cladodes as a prebiotic food (Sánchez-Tapia et al. 2017).

It is noteworthy to cite that results obtained with in vitro experiments revealing the potential prebiotic effects of X CJ, as indicated by its selective stimulatory effects on probiotic *Lactobacillus* isolates, should have limitations to be extrapolated to achievement of prebiotic effects under in vivo conditions and outcomes on host health (de Albuquerque et al. 2020). Nevertheless, results of in vitro experiments, as those found in this study, have been considered valuable evidence of prebiotic properties in conventional and non-conventional foods (Duarte et al. 2017; Massa et al. 2020; Gómez et al. 2019; Huang et al. 2019; Martinez-Gutierrez et al. 2017; Zhang et al. 2018). Additionally, although few reports on available literature have focused on bioactive compounds and biological activities (e.g., anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial and anti-hypertensive) of underutilized edible plants from Brazilian biomes (de Almeida et al. 2007; de Assis et al. 2019; Gadioli et al. 2018; Maciel et al. 2019; Vieira et al. 2019), investigations on their potential prebiotic properties are still scarce.

In conclusion, the results of this study showed that X CJ could induce stimulatory effects on growth and metabolism of different *Lactobacillus* isolates, which were indicated by high viable counts, decreased pH values and increased sugar consumption and organic acid production in media during cultivation. Furthermore, these effects were similar to those induced by FOS, a well-known prebiotic ingredient. These results show that X CJ has potential prebiotic properties and,



consequently, capability of exerting benefits to consumers. Finally, these results should help to promote the valorization of an unconventional and still few exploited edible plant from Caatinga biome, which could be rationally exploited as source of health-related bioactive compounds by food and pharmaceutical industry.

References

- AOAC—Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (2016), 20th edn. Association of Official Analytical Chemist, Rockville
- Chlebowska-Smigiel A, Gniewosz M, Kieliszek M, Bzducha-Wrobel A (2017) The effect of pullulan on the growth and acidifying activity of selected stool microflora of human. *Curr Pharm Biotechnol* 18:121–126. <https://doi.org/10.2174/1389201017666161229154324>
- Chlebowska-Smigiel A, Kycia K, Neffe-Skocińska K, Kieliszek M, Gniewosz M, Kolożyn-Krajewska D (2017) Effect of pullulan on physicochemical, microbiological, and sensory quality of yogurts. *Curr Pharm Biotechnol* 20:489–496
- Coelho EM, Padilha CVS, Miskinis GA, Sá AGB, Pereira GE, Azevêdo LC, Lima MS (2018) Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: method validation and characterization of products from northeast Brazil. *J Food Compos Anal* 66:160–167. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>
- Danneskiold-Samsøe NB, Barros HDFQ, Santos R, Bicas JL, Cazarin CBB, Madsen L, Kristiansen K, Pastore GM, Brix S, Maróstica Júnior MR (2019) Interplay between food and gut microbiota in health and disease. *Food Res Int* 115:23–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.043>
- Das DJ, Shankar A, Johnson JB, Thomas S (2020) Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*. *Nutrition* 69:110567. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110567>
- David LA, Maurice CF, Button JE, Turnbaugh PJ (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505:559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- de Albuquerque TMR, Borges CWP, Cavalcanti MT, dos Santos LM, Magnani M, de Souza EL (2020) Potential prebiotic properties of flours from different varieties of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) roots cultivated in Northeastern Brazil. *Food Biosci* 36:100614. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100614>
- de Almeida CA, de Figueiredo RM, Queiroz AJM, de Oliveira FM (2007) Physical and chemical characteristics of xiquexique pulps. *Rev Ciênc Agron* 38:440
- de Assis POA, Guerra GCB, de Souza Araújo DF, de Araújo AA, de Araújo RF, de Carvalho TG, de Souza MFV, Borges GSC, Lima MS, Rolim FRL, Rodrigues RAV, Queiroga RCRE (2019) Intestinal anti-inflammatory activity of xique-xique (*Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Bly. Ex Rowl) juice on acetic acid-induced colitis in rats. *Food Funct* 10:7275–7290. <https://doi.org/10.1039/C9FO00920E>
- de Oliveira AM, de Luna Freire MO, da Silva WAV, Ferreira MRA, Paiva PMG, Soares LAL, Medeiros PL, Carvalho BM, Napoleão TH (2018) Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. *Regul Toxicol Pharm* 95:289–297. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.04.004>
- de Paulo Farias D, de Araújo FF, Neri-Numa IA, Pastore GM (2019) Prebiotics: trends in food, health and technological applications. *Trends Food Sci Technol* 93:23–35. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.004>
- de Souza EL, de Albuquerque TMR, dos Santos AS, Massa NML, de Brito Alves JL (2019) Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities—a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59:1645–1659. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425285>
- Duarte FND, Rodrigues JB, da Costa LM, Lima MDS, Pacheco MTB, Pintado MME, Aquino JS, de Souza EL (2017) Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. *J Sci Food Agric* 97:3712–3719. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8232>
- Filannino P, Cavoski I, Thlien N, Vincentini O, De Angelis M, Silano M, Gobetti M, Di Cagno R (2016) Lactic acid fermentation of cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica* L.) generates flavonoid derivatives with antioxidant and anti-inflammatory properties. *PLoS ONE* 29:e0152575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152575>
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509
- Franco-Robles E, López MG (2015) Implication of fructans in health: immunomodulatory and antioxidant mechanisms. *Sci World J* 2015:289267. <https://doi.org/10.1155/2015/289267>
- Gadioli IL, da Cunha MSB, de Carvalho MVO, Costa AM, Pineli LLO (2018) A systematic review on phenolic compounds in *Passiflora* plants: exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. *Crit Rev Food Sci Nutr* 24:785–807. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1224805>
- Gibson GR, Hutkins RW, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G (2017) The international Scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 1:1–12. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gómez B, Peláez C, Martínez-Cuesta MC, Parajó JC, Alonso JL, Requena T (2019) Emerging prebiotics obtained from lemon and sugar beet byproducts: evaluation of their in vitro fermentability by probiotic bacteria. *LWT Food Sci Technol* 109:17–25. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.008>
- Horwitz W, Latimer J, George W (2005) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 18th edn. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland, pp 101–102. <https://doi.org/10.2174/1389201020666190416151129>
- Huang F, Liu Y, Zhang R, Bai Y, Dong L, Liu L, Jia X, Wang G, Zhang M (2019) Structural characterization and in vitro gastrointestinal digestion and fermentation of litchi polysaccharide. *Int J Biol Macromol* 140:965–972. <https://doi.org/10.1016/j.ijbmac.2019.08.170>
- Maciel VB, Yoshida CMP, Goycoolea FM (2019) Agronomic cultivation, chemical composition, functional activities and applications of *Pereskia* species—a mini review. *Curr Med Chem* 26:4573–4584. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180926151615>
- Martinez-Gutierrez F, Ratering S, Juárez-Flores B, Godínez-Hernández C, Geissler-Plaum R, Prell F, Zorn H, Czermak P, Schnell S (2017) Potential use of *Agave salmiana* as a prebiotic that stimulates the growth of probiotic bacteria. *LWT Food Sci Technol* 84:151–159. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.044>
- Massa NLM, Duarte de Menezes FND, Albuquerque TMR, de Oliveira SPA, Lima MS, Magnani M, de Souza EL (2020) Effects of digested jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg.) by-product on growth and metabolism of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* indicate prebiotic properties. *LWT Food Sci Technol* 131:109766. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109766>
- Mohanty D, Misra S, Mohapatra S, Sahu PS (2018) Prebiotics and synbiotics: recent concepts in nutrition. *Food Biosci* 26:152–160. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.008>

- Monteiro ER, Mangolin CA, Neves AF, Orasmo GR, Silva JGM, Machado MFPS (2015) Genetic structure of *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) as revealed by AFLP marker to guide proposals for improvement and restoration of degraded areas in Caatinga biome. *Genet Mol Res* 14:16966–16974. <https://doi.org/10.4238/2015>
- Prosky L, Asp NG, Schweizer TF, Devries JW, Furda I (1992) Determination of insoluble and soluble dietary fibers in foods and food products. *J Assoc Anal Chem* 2:360–367. <https://doi.org/10.1093/jaoac/75.2.360>
- Saarela MH (2019) Safety aspects of next generation probiotics. *Curr Opin Food Sci* 30:8–13. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.09.001>
- Sánchez-Tapia M, Aguilar-López P-C, Pichardo-Ontiveros E, Wang M, Donovan SM, Tovar AR, Torres N (2017) Nopal (*Opuntia ficus indica*) protects from metabolic endotoxemia by modifying gut microbiota in obese rats fed high fat/sucrose diet. *Sci Rep* 5:4716. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05096-4>
- Sánchez-Zapata E, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA, Soares J, Sousa S, Gomes AM, Pintado MM (2013) *In vitro* evaluation of “horchata” co-products as carbon source for probiotic bacteria growth. *Food Bioprod Process* 91:279–286. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.11.003>
- Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA (2019) Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16:605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Shen Y, Sun H, Zeng H, Prinyawiwatkul W, Xu W, Xu Z (2018) Increases of phenolics, fatty acids, phytosterols, and anticancer activity of sweet potato after fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J Agric Food Chem* 66:2735–2741. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05414>
- Sousa GA, Oliveira IS, Silva-Freitas FV, Viana AFS, Neto BP, Cunha FVM, Fernandes PD, Maciel JKS, da Silva TMS, Souza MFV, Oliveira FA (2018) Gastroprotective effect of ethanol extracts of cladodes and roots of *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl (Cactaceae) on experimental ulcer models. *J Ethnopharmacol* 218:100–108. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.009>
- Sousa S, Pinto J, Pereira C, Malcata FX, Pacheco MTB, Gomes AM, Pintado M (2015) *In vitro* evaluation of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour prebiotic potential. *Food Bioprod Process* 95:96–105. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.04.003>
- Sun H, Chen Y, Cheng M, Zhang X, Zheng X, Zhang Z (2018) The modulatory effect of polyphenols from green tea, oolong tea and black tea on human intestinal microbiota *in vitro*. *J Food Sci Technol* 55:399–407. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2951-7>
- Vieira CR, da Silva BP, da Carmo MAV, Azevedo L, Nogueira DA, Martino HSD, Silva RR (2019) Effect of *Pereskia aculeata* Mill. *in vitro* and in overweight humans: a randomized controlled trial. *J Food Biochem* 43:e-12903. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12903>
- Wang M, Wichienchot S, He X, Fu X, Huang Q, Zhang B (2019) *In vitro* colonic fermentation of dietary fibers: fermentation rate, short-chain fatty acid production and changes in microbiota. *Trends Food Sci Technol* 88:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.005>
- Zhang S, Hu H, Wang L, Liu F, Pan S (2018) Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin. *Food Chem* 244:232–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.071>