

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

SABRINA RADAMES FERREIRA DA SILVA

POTENCIAL PREBIÓTICO DO LIOFILIZADO DA POLPA DE XIQUE-XIQUE
(Pilosocereus gounellei (F.A.C. Weber) Byles & Rowley) **SOBRE A MICROBIOTA**
COLÔNICA HUMANA

JOÃO PESSOA

2024

SABRINA RADAMES FERREIRA DA SILVA

POTENCIAL PREBIÓTICO DO LIOFILIZADO DA POLPA DE XIQUE-XIQUE
(Pilosocereus gounellei (F.A.C. Weber) Byles & Rowley) **SOBRE A MICROBIOTA**
COLÔNICA HUMANA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza.

JOÃO PESSOA

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586p Silva, Sabrina Radames Ferreira da.
Potencial prebiótico do liofilizado da polpa de
xique-xique (*Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber)
Byles & Rowley) sobre a microbiota colônica humana /
Sabrina Radames Ferreira da Silva. - João Pessoa, 2024.
100 f. : il.

Orientação: Evandro Leite de Souza.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Cactáceas. 2. Compostos fenólicos. 3. Microbioma
intestinal. 4. Atividade antioxidante. 5. Fermentação
colônica. I. Souza, Evandro Leite de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 582.661.56(043)

SABRINA RADAMES FERREIRA DA SILVA

**POTENCIAL PREBIÓTICO DO LIOFILIZADO DA POLPA DE XIQUE-
XIQUE (*Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber) Byles & Rowley) SOBRE A
MICROBIOTA COLÔNICA HUMANA**

Dissertação aprovada em 13 de março de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **EVANDRO LEITE DE SOUZA**
Data: 08/04/2024 15:23:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **ESTEFANIA FERNANDES GARCIA**
Data: 09/04/2024 09:38:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dra. Estefânia Fernandes Garcia
Examinadora Interna (DG/CTDR/UFPB)

Documento assinado digitalmente
 **MARIANA COSTA MONTEIRO**
Data: 09/04/2024 10:45:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dra. Mariana Costa Monteiro
Examinadora Externa (DNBE/CCS/UFRJ)

A Deus e à minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela bondade e misericórdia a cada dia, em minha vida, e permissão de contemplar saúde e ânimo para desenvolver as atribuições pertinentes ao desenvolvimento dessa pesquisa, em meio a tantos desafios.

Aos meus maiores exemplos, meus amores Salismar e Edilce (*in memorian*), que me deram toda base de caráter e formação pessoal, mostrando, através do testemunho de suas vidas, que o amor, a verdade e a honestidade, somados à fé, são capazes de nos levar a alçar voos altos e conseguir, através deles, as nossas realizações.

Ao meu filho, Abner Radames, minha força para buscar, todos os dias, a minha melhor versão. Obrigada por me permitir ser a mamãe mais feliz e realizada desse mundo, pelo carinho e cuidado para comigo, por cada olhar que me fortalece e por deixar mamãe ir pro “seu laboratório, trabalhar”. Meu amor, tudo isso é para construção do seu futuro! Você é luz!

À minha família, que sempre esteve comigo com incentivo, apoio e confiança. Não existem palavras suficientes para agradecer a cada auxílio, cada um ao seu modo, com seu jeito. Vocês foram essenciais nessa jornada!

Aos meus amigos que caminharam comigo nesse percurso desafiador.

À minha dupla (de centavos), Sara Rocha, por partilhar a bancada nos experimentos, além das risadas, tornando o processo menos árduo e mais gratificante.

À Jaielison Yandro, pela partilha de conhecimento, assim como os grandes mestres fazem, sem poupar esforços. Sua colaboração foi de grande valia para que as análises fossem realizadas com sucesso. Obrigada por todo suporte, sorriso, abraço e treinamento. Você é incrível!

À galera do LMBA, que tornam os dias mais agradáveis. Obrigada pelo suporte, paciência e cafés.

A todos os professores envolvidos no processo, em especial a Dra. Elieidy Oliveira, Dra. Thatyane Albuquerque e Dra. Viviane Barros, pelas contribuições para que essa pesquisa fosse realizada com êxito.

Ao meu orientador, professor Doutor Evandro Leite de Souza, pela acreditar, confiar e apoiar meu trabalho. Obrigada pela paciência e suporte durante o percorrer do Mestrado. Orgulho tenho em poder ser orientada por um pesquisador renomado, por mérito, e por suas contribuições para minha formação profissional (desde a graduação). Obrigada por ceder espaço para que eu pudesse desenvolver as atividades em meio a sua equipe espetacular.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir para a melhoria desse trabalho.

A Universidade Federal da Paraíba, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, por abrir portas para o ensino e apoio ao desenvolvimento dessa pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), a quem agradeço pela concessão de bolsa de estudos durante a realização do mestrado.

RESUMO

Pilosocereus gounellei (F.A.C. Weber), espécie vegetal popularmente conhecida como xique-xique, é uma cactácea caracterizada como planta alimentícia não convencional (PANC) nativa do bioma Caatinga, a qual vem sendo estudada em relação a suas propriedades nutricionais e como fonte de compostos bioativos, incluindo aqueles com propriedades prebióticas. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial prebiótico do liofilizado da polpa do xique-xique sobre a microbiota colônica humana de indivíduos saudáveis. Para isso, foi elaborado um pó liofilizado a partir da polpa do xique-xique (FDPg) e foram realizadas análises para determinação de sua composição nutricional e parâmetros físico-químicos, seguido por digestão gastrointestinal *in vitro*. O FDPg digerido foi submetido a ensaio de fermentação com inóculo fecal humano e realizadas análises de metagenômica (sequenciamento 16S RNAr) e monitoramento de indicadores de atividade metabólica (pH, açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e metabolômica) e atividade antioxidante. As análises foram realizadas na amostra bruta liofilizada e no meio fermentado ao longo do tempo durante 48 horas de fermentação colônica *in vitro*. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. O FDPg apresentou pH ácido, alto teor de fibra alimentar, principalmente fibras insolúveis, açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos em sua composição, além de capacidade antioxidante. Ao longo da fermentação colônica, o FDPg causou, de forma geral, mudanças desejáveis nos grupos bacterianos formadores da microbiota intestinal humana, com aumento da abundância relativa de bactérias benéficas à saúde intestinal, como *Mitsuokella*, *Bacteroides*, *Megasphaera* e *Acidaminococcus*, e diminuição da abundância relativa de bactérias considerada não benéficas, como *Succinivibrio*, *Citrobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Faecalibacterium* e *Blautia*. Ainda, FDPg estimulou a atividade metabólica da microbiota intestinal ao longo da fermentação colônica, refletida por meio da redução dos valores do pH, produção de ácidos graxos de cadeia curta, produção de compostos fenólicos (ex., epicatequina, epigallocatequina e procianidina B2) e manutenção de atividade antioxidante. Assim, o FDPg pode ser caracterizado como ingrediente com propriedades prebióticas podendo ser utilizado para a elaboração de produtos inovadores com propriedades funcionais e de alto valor agregado.

Palavras-chave: Cactáceas. Compostos fenólicos. Microbioma intestinal. Atividade antioxidante. Fermentação.

ABSTRACT

Pilosocereus gounellei (F.A.C. Weber), a plant specie popularly known as xique-xique, is a cactaceae characterized as an unconventional food plant (PANC) native to the Caatinga biome, which has been studied in relation to its nutritional properties and as a source of bioactive compounds, including those with prebiotic properties. The aim of this study was to evaluate the prebiotic potential of freeze-dried xique-xique pulp on the human colonic microbiota of healthy individuals. To this end, a freeze-dried powder was prepared from the xique-xique pulp (FDPg), and analyses were carried out to determine its nutritional composition and physicochemical parameters, followed by *in vitro* gastrointestinal digestion. The FDPg digested was subjected to a fermentation test with human fecal inoculum and metagenomic analyses (16S rRNA sequencing) and monitoring of metabolic activity indicators (pH, sugars, organic acids, phenolic compounds, and metabolomics) and antioxidant activity were carried out. The analyses were carried out on the freeze-dried raw sample and on the fermented medium over time during 48 h of *in vitro* colonic fermentation. The experiments were carried out in triplicate, and the results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. The FDPg had an acidic pH, a high content of dietary fiber, mainly insoluble fiber, sugars, organic acids, and phenolic compounds in its composition, with antioxidant capacity. Throughout colonic fermentation, the FDPg generally caused desirable changes in the bacterial groups that make up the human intestinal microbiota, with an increase in the relative abundance of bacteria beneficial to intestinal health, such as *Mitsuokella*, *Bacteroides*, *Megasphaera* and *Acidaminococcus*, and a decrease in the relative abundance of bacteria considered to be non-beneficial, such as *Succinivibrio*, *Citrobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Faecalibacterium* and *Blautia*. In addition, FDPg stimulated the metabolic activity of the intestinal microbiota throughout colonic fermentation, reflected by a reduction in the pH values, production of short-chain fatty acids, production of phenolic compounds (e.g., epicatechin, epigallocatechin, and procyanidin B2) and maintenance of antioxidant capacity. This way, FDPg can be characterized as an ingredient with prebiotic properties that can be used to produce innovative products with functional properties and high added value.

Keywords: Cactaceae. Phenolic compounds. Intestinal microbiome. Antioxidant activity. Fermentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÕES DA DISSERTAÇÃO

Figura 1:	Área ocupada pela Caatinga no Nordeste.....	15
Figura 2:	Xique-xique (<i>Pilosocereus gounellei</i>)	17
Figura 3:	Fatores que afetam a composição e função da microbiota intestinal.....	20
Figura 4:	Esquema gráfico da distinção de substâncias possuidoras ou não de propriedades prebióticas.....	24
Figura 5:	Etapas de processamento para obtenção do liofilizado a partir do cilindro vascular de xique-xique.....	28
Figura 6:	Fluxograma do desenho experimental do estudo.....	29
Quadro 1:	Características físico-químicas e nutricionais do xique-xique.....	18

ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

Figure 1:	Microbial diversity (Shanon index) and richness (Chao 1 index) and Firmicutes to Bacteroidetes ratio (F/B ratio) in media with freeze-dried <i>Pilosocereus gounellei</i> cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC - no added fermentable substrate) at time zero (T0) and 48 h (T48) of <i>in vitro</i> colonic fermentation.....	84
Figure 2:	Relative abundance of different bacterial phyla (A) and genera (B) identified in media with freeze-dried <i>Pilosocereus gounellei</i> cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC - no added fermentable substrate) at time zero (T0) and 48 h (T48) of <i>in vitro</i> colonic fermentation.....	85
Figure 3:	Representative ¹ H NMR spectra of the media with freeze-dried <i>Pilosocereus gounellei</i> cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC - no added fermentable substrate) at 48 h (T48) of <i>in vitro</i> colonic fermentation.....	86
Figure S1:	Xique-xique (<i>Pilosocereus gounellei</i>) in the nature.....	89

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO ARTIGO

Table 1:	Physicochemical and nutritional characteristics and antioxidant capacity of freeze-dried <i>Pilosocereus gounellei</i> cladodes.....	87
Table 2:	Antioxidant capacity in media with freeze-dried <i>Pilosocereus gounellei</i> cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC) at time zero, 24, and 48 h of <i>in vitro</i> colonic fermentation.....	88
Table S1:	pH values in media with freeze-dried <i>Pilosocereus gounellei</i> cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC) at time zero, 24, and 48 h of <i>in vitro</i> colonic fermentation.....	90
Table S2:	Contents of phenolic compounds and antioxidant capacity in media with freeze-dried <i>Pilosocereus gounellei</i> cladodes (FDPg) at time zero, 24, and 48 h of <i>in vitro</i> colonic fermentation.....	91
Table S3:	Relative abundance of different bacterial phyla in media with freeze-dried <i>Pilosocereus gounellei</i> cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC) at time zero 48 h of <i>in vitro</i> colonic fermentation.....	92
Table S4:	Relative abundance of different bacterial genera in media with freeze-dried <i>Pilosocereus gounellei</i> cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC) at time zero 48 h of <i>in vitro</i> colonic fermentation.....	93
Table S5:	Metabolites identified in media with freeze-dried <i>Pilosocereus gounellei</i> cladodes (FDPg) and fructooligosaccharides (FOS) at time zero and 48 h of <i>in vitro</i> colonic fermentation analyzed by ¹ H-NMR.....	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	CAATINGA E PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANC)	14
2.1.1	<i>Pilosocereus gounellei</i> : cultivo e características nutricionais	15
2.2	MICROBIOTA INTESTINAL	18
2.2.1	Prebióticos.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	TIPO DE ESTUDO	26
3.2	LOCAIS DE EXECUÇÃO DA PESQUISA	26
3.3	AQUISIÇÃO E LIOFILIZAÇÃO DO XIQUE-XIQUE	26
3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	28
3.5	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E NUTRICIONAIS	29
3.6	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	30
3.7	QUANTIFICAÇÕES DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS	31
3.8	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	32
3.8.1	Captura do radical DPPH [•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	32
3.8.2	Redução do ferro (Fe ⁺²) (FRAP).....	33
3.8.3	Captura do radical livre ABTS (ABTS ^{•+}).....	34
3.9	DIGESTÃO GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>	35
3.10	ENSAIOS COM SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO COLÔNICA <i>IN VITRO</i>	35
3.10.1	Procedimentos éticos.....	35
3.10.2	Coleta das amostras fecais	36
3.10.3	Preparação das amostras fecais e preparação do meio de fermentação colônica <i>in vitro</i>	37
3.10.4	Monitoramento de indicadores de atividade metabólica	37
3.10.5	Metagenômica: Análise transcriptômica da microbiota fecal – extração do DNA, preparação e sequenciamento do gene 16S rRNA.....	38

3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4	RESULTADOS	41
	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	52
	APÊNCIDE B – ARTIGO.....	54
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	97

1 INTRODUÇÃO

Espécies nativas brasileiras de distintas áreas climáticas e relevos vêm sendo estudadas quanto aos seus constituintes bioativos. Na região Nordeste, o clima semiárido e a vegetação xerófita apresentam-se em aproximadamente 50% de seu território, no qual se encontra a flora característica do bioma Caatinga (Barros *et al.*, 2012).

A espécie *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber) Byles & Rowley, pertencente à família Cactaceae, conhecida popularmente como xique-xique, possui forte adaptação às condições extremas de temperatura e umidade, multiplicando-se regularmente e cobrindo áreas extensas da Caatinga (Carvalho *et al.*, 2021). Essa espécie tem sido mostrada em estudos como fonte alimentar para comunidades do Nordeste brasileiro (Lucena *et al.*, 2012; Silva, 2015), onde o miolo dos cladódios é consumido cozido ou assado, usado na produção de farinhas, biscoitos, bolos e doces, além de ser utilizado na medicina popular em forma de suco para tratamento de gastrite, colite e icterícia (Lucena *et al.*, 2012).

Os aspectos nutricionais do xique-xique têm sido estudados como sugestão para utilização como fonte alimentar e de renda, bem como para estimular o desenvolvimento de uma das regiões mais carentes do Brasil (Pinto; Scio, 2014). Alguns estudos com o suco do xique-xique identificaram nutrientes importantes, como fibras solúveis e insolúveis, e minerais, sugerindo-o como uma alternativa alimentar de importante valor nutricional (Bezerril *et al.*, 2021). Em outro estudo, diversos compostos fenólicos foram identificados no suco do xique-xique, destacando-se os flavonoides (Carvalho *et al.*, 2021). Os cladódios de xique-xique também foram investigados quanto ao perfil de compostos fenólicos, sendo considerados boas fontes de flavonoides e ácidos fenólicos (Araújo *et al.*, 2021; Bezerril *et al.*, 2021). Ainda, foi demonstrado que o liofilizado do suco de xique-xique estimulou o crescimento de cepas de *Lactobacillus*, sugerindo-o como tendo possíveis efeitos prebióticos (Ribeiro *et al.*, 2020).

Os prebióticos são atualmente definidos como “substratos usados seletivamente por microrganismos hospedeiros que conferem um benefício à saúde” (Gibson *et al.*, 2017), de modo que o elevado teor de carboidratos fermentáveis no xique-xique o torna uma potencial fonte de componentes com propriedades prebióticas (Bezerril, 2017). Os carboidratos fermentáveis presentes em alimentos podem induzir mudanças específicas na composição da microbiota do hospedeiro, especialmente no cólon (Wang *et al.*, 2019), como repercussões sobre as funções fisiológicas e sistêmicas do hospedeiro (Collins *et al.*, 2018).

As fibras alimentares e compostos fenólicos, ao longo da passagem pelo trato gastrointestinal interagem com a microbiota residente. Devido esses compostos da dieta

apresentarem baixa biodisponibilidade e serem extensamente metabolizados no intestino grosso pela microbiota intestinal, são capazes de estabelecer uma interação capaz de modular a composição microbiana por estimular a multiplicação de determinadas espécies em detrimento de outras, promovendo o crescimento seletivo de bactérias benéficas formadoras da microbiota intestinal humana (Gibson *et al.*, 2017).

Paralelamente, esses microrganismos, ao utilizarem os compostos fenólicos como substratos, geram uma série de metabólitos secundários, tais como metabólitos fenólicos e ácidos graxos de cadeia curta, como efeitos sistêmicos benéficos à saúde, podendo se enquadrar na classificação de prebióticos (Alves-Santos *et al.*, 2020). Com isso, as interações entre compostos fenólicos e microrganismos benéficos têm sido citadas como eventos biológicos importantes para alcançar os efeitos de promoção da saúde induzidos por esses componentes (Souza *et al.*, 2019).

Sabendo-se da ampla distribuição das cactáceas no Estado da Paraíba, com exploração sazonal e geração de produtos de baixo valor agregado, além da presença de uma variedade de substâncias bioativas nessas espécies vegetais, torna-se necessário a realização de estudos que avaliem e transformem essas matrizes em ingredientes com potencial de aplicabilidade pela indústria alimentícia e farmacêutica, dentre outras aplicações. Considerando a evidência de que o xique-xique compreende uma fonte de fibras dietéticas e compostos fenólicos que podem ser fermentados seletivamente pela microbiota intestinal para promover a produção aumentada de moléculas bioativas, esse estudo teve como objetivo avaliar o potencial prebiótico do liofilizado da polpa do xique-xique sobre a microbiota colônica humana de indivíduos saudáveis utilizando sistema de fermentação colônica *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

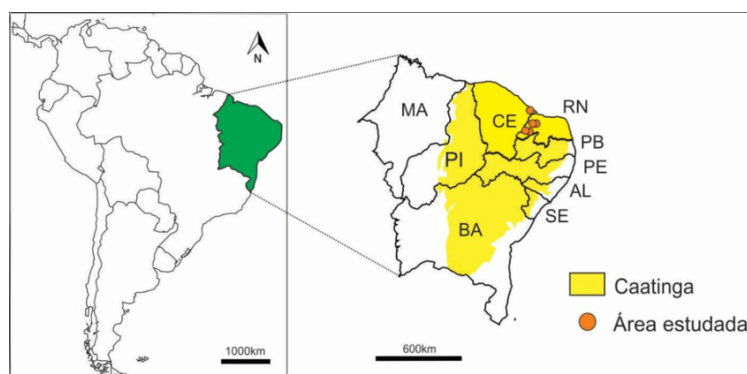
2.1 CAATINGA E PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS

O Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2019), possui seis biomas distintos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa. O bioma Caatinga se destaca na região semiárida do Nordeste, com extensão territorial de aproximadamente 840 km², o equivalente a 11% do território nacional, abrigando diferentes tipos de vegetação e ofertando uma variedade de plantas utilizadas como fontes alimentares e para uso na medicina popular por parte das populações locais (Nascimento *et al.*, 2011; IBGE, 2019)

A Caatinga, também conhecida como floresta branca, ocupa mais de 70% do território do Nordeste brasileiro (Figura 1), e, dentre suas características, apresenta baixa precipitação, temperaturas médias anuais elevadas e estações chuvosas e de estiagem bem definidas, com prevalência do período sem chuva na maior parte do ano (Brasil, 2022).

Com caráter xerófito marcado por florestas secas e vegetação arbustiva, a Caatinga é o único ecossistema exclusivamente brasileiro. Durante os períodos de seca, algumas plantas podem perder suas folhas para minimizar a perda de água, outras como os cactos acumulam água em seus tecidos, enquanto várias outras têm ciclos de vida anuais, as quais florescem e crescem em estações chuvosas (Ricardo *et al.*, 2018). Os estômatos, localizados em seu caule, recolhem-se durante o dia para diminuir a transpiração e as raízes absorvem a água à noite (Lucena *et al.*, 2013).

Figura 1 - Área ocupada pela Caatinga no Nordeste.



Fonte: Ricardo *et al.* (2018).

A Caatinga apresenta alta diversidade de espécies de cactáceas, as quais representam uma fonte alternativa de grande potencial produtivo, sendo utilizadas pela população local para fins medicinais, no uso como combustível ou em materiais de construção, ou, ainda, na alimentação humana e animal, embora esse último uso seja ainda pouco explorado (Lucena *et al.*, 2012; Ribeiro, Meiado, Leal, 2015). Parte dessa diversidade vegetal pode ser comestível, destacando-se as Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), como parte constituinte da riqueza da Caatinga e com potenciais econômicos e nutricionais ainda pouco conhecidos (Tuler *et al.*, 2019).

Diversas espécies de cactáceas são consideradas PANC, destacam-se *Pilosocereus gounellei*, *Napaea cochenilifera*, *Opuntia ficus-indica*, *Pereskia aculeata*, *Cereus hildmannianus*, *Hylocereus lemaire*, *Hylocereus undatus*, entre outras (Kinuppi; Lorenzi, 2014). Além das suas aplicações alimentares, as cactáceas têm sido exploradas em setores industriais, incluindo aplicações tecnológicas, farmacêuticas e químicas (De Azevedo Ribeiro *et al.*, 2015; Nepomuceno *et al.*, 2017; Alvarez-Bayona *et al.*, 2019; Vishnupriya *et al.*, 2020).

As PANC são espécies vegetais cujas partes que podem ser consumidas não são comuns ou convencionalmente conhecidas e que, economicamente, possuem funcionalidades inexploradas e se encontram fora da cadeia atual de produção de alimentos, possuindo potencial alimentar para os seres humanos (Biondo, 2018). Vale ressaltar que uma planta considerada não convencional em uma região, pode ser muito utilizada em outras localidades (Fonseca *et al.*, 2018).

As PANC, de acordo com a espécie, têm seu valor nutricional caracterizado por teores significativos de vitaminas, sais minerais, fibras, carboidratos e proteínas, além de propriedades funcionais relacionadas à promoção da saúde (Brasil, 2010). Segundo Kinupp e Lorenzi (2014), no Brasil existem cerca de 5.000 espécies de PANC. A maioria das PANC se desenvolve espontaneamente sem a necessidade de serem plantadas, podendo ou não ser cultivada, não necessitando de muita atenção de manejo, apenas cuidados básicos em relação aos demais cultivos (Liberato *et al.*, 2019). A não utilização das PANC se deve a fatores como competição no mercado com hortaliças convencionais, mudanças de hábito de alimentação, baixa disponibilidade no mercado, não comercialização e pouca informação sobre as potencialidades nutricionais (Biondo *et al.*, 2018).

2.1.1 *Pilosocereus gounellei*: cultivo e características nutricionais

Pilosocereus gounellei, conhecida popularmente como xique-xique, é uma espécie de planta pertencente à família Cactaceae, subfamília Cactoideae. Essa espécie ocorre somente na região da Caatinga do Nordeste brasileiro e se desenvolve bem em áreas mais secas do semiárido, tendo capacidade de crescer em solos com pouca profundidade, arenosos e rochosos (Monteiro *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2018).

O xique-xique (Figura 2) tem como partes principais o tronco, flor, fruto e raiz. A espécie se apresenta com o tronco ereto com galhos laterais afastados e ampla curvatura direta ao solo, espinhos resistentes, coloração verde-opaca, flores tubulosas, brancas, grandes e noturnas, sendo seu fruto do tipo baga, arredondado e achatado nos polos, com casca avermelhada e interior púrpura e pequenas sementes pretas (Almeida *et al.*, 2007). Seu caule e polpa são utilizados na alimentação de animais e na produção de sucos, biscoitos, bolos e geleias, porém poucos estudos disponibilizam informações sobre suas características físico-químicas (Quadro 1), o que poderia estimular seu aproveitamento como alimento e fonte de renda, visto sua adaptação ao clima e solo da região da Caatinga (Lucena *et al.*, 2012).

Figura 2 - Xique-xique (*Pilosocereus gounellei*).



Fonte: Imagem do autor (2022).

O xique-xique vem sendo estudado quanto a seus aspectos nutricionais e sua utilização como fonte alimentar e de renda visando estimular o desenvolvimento nas regiões onde é cultivado (Pinto; Scio, 2014). Estudos mostram que o xique-xique é uma boa opção como alternativa alimentar por conter nutrientes importantes como fibras dietéticas e minerais (Bezerril *et al.*, 2021) além de compostos bioativos (Maciel *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2021).

Quadro 1 - Características físico-químicas e nutricionais do xique-xique.

COMPOSIÇÃO (a cada 100g)	ESTUDOS E QUANTIDADES				
	Ribeiro <i>et al</i> (2020) Xique-xique lioofilizado	Carvalho <i>et al</i> (2020) Suco do xique-xique	Machado <i>et al</i> (2021) Cookies com farinhas de xique-xique	Bezerril <i>et al</i> (2021) Cladódios do xique-xique (cilindro vascular - cilindro central)	Bezerril <i>et al</i> (2021) Geléia de xique-xique
Umidade (%)	SR	97,42	2,63 – 3,65	94,16 - 87,13	29,02
Proteína (g)	7,59	0,29	0,94 – 1,36	0,49 - 0,76	0,28
Lipídeos (g)	2,35	0,09	25,52 – 29,33	0,28 - 0,77	SR
Cinzas (g)	30,10	1,15	2,47 – 2,74	1,99 - 1,59	0,83
Fibras totais (g)	16,23	0,62	4,41 – 8,10	2,7 - 6,54	2,60
Fibras solúveis (g)	14,40	0,55	0,08 – 1,07	0,87 - 1/37	0,89
Fibras insolúveis (g)	1,83	0,07	4,33 – 7,03	1,83 - 5,18	1,71
pH	5,02	5,23	SR	4,77 – 4,87	4,61
Atividade de água	SR	0,93	0,32 – 0,43	0,97 – 0,97	0,85
Acidez	SR	0,07	SR	0,07 – 0,09	0,14
°Brix	SR	1,85	SR	SR	63,08

Fonte: Adaptado de Ribeiro *et al* (2020), Carvalho *et al* (2020), Machado *et al* (2021), Bezerril *et al* (2021), Bezerril *et al* (2021). SR: sem registro.

Lucena *et al.* (2013) apontaram a utilização da polpa (miolo) do xique-xique na produção de farinha pela população do cariri paraibano, além de sua utilização no tratamento de infecções e inflamações (Maciel *et al.*, 2016). Os estudos *in vitro* que demonstraram a presença de componentes bioativos nessa planta, como os compostos fenólicos e flavonoides, também demonstraram atividade antioxidante proveniente, principalmente, de extratos do fruto do xique-xique (Maciel *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018). Estudos *in vivo* também já foram realizados, sendo reportada atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e antipirética dos extratos salinos do caule do xique-xique em ratos, com potencial hipoglicêmico e hipolipídico, sem apresentar efeitos tóxicos (Oliveira *et al.*, 2018).

Em estudo realizado por Dias *et al.* (2015), foi observado que o extrato bruto etanólico do caule do xique-xique (25 mg/kg) mostrou atividade anti-inflamatória e baixa toxicidade quando avaliado em edema de pata de rato induzido por carragenina. Sousa *et al.* (2018)

observaram, em estudo com modelos animais, que o extrato etanólico da raiz e do caule do xique-xique (200 mg/kg) apresentou importante efeito gastroprotetor. Por sua vez, Ribeiro *et al.* (2020) relataram que o liofilizado do suco de xique-xique possui potencial prebiótico, visto que estimulou o crescimento e metabolismo de cepas probióticas de lactobacilos, sendo tais efeitos associados como o conteúdo de fibras solúveis e açúcares (glicose e frutose) encontrados no material testado.

Sabendo-se que o xique-xique é uma matriz amplamente conhecida e disponível na região Nordeste do Brasil, com importância nutricional, econômica, ambiental e medicinal para a população da região semiárida, e, valendo-se do interesse dos consumidores por alimentos que possuam benefícios à saúde, a investigação acerca da caracterização das propriedades físico-químicas e funcionais do xique-xique se torna uma temática de interesse atual, principalmente sobre sua capacidade de exercer efeitos moduladores da composição e atividade metabólica da microbiota intestinal humana, podendo repercutir em maior valorização da cultura de cactáceas.

2.2 MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

A microbiota intestinal humana é constituída por um ecossistema bastante complexo, tendo, em sua composição, bactérias, fungos, arqueias, vírus e protozoários responsáveis por promoverem interações com o hospedeiro, incluindo a digestão e a absorção de nutrientes provenientes da dieta (Peredo-Lovillo; Romero-Luna; Jiménez-Fernández, 2020). A microbiota intestinal humana é considerada um “órgão” metabolicamente ativo devido tais ações exercidas pelos seus constituintes (Holscher, 2017), bem como agente protetor da saúde intestinal e sistêmica do hospedeiro (Cosme; Inês; Vilela, 2022).

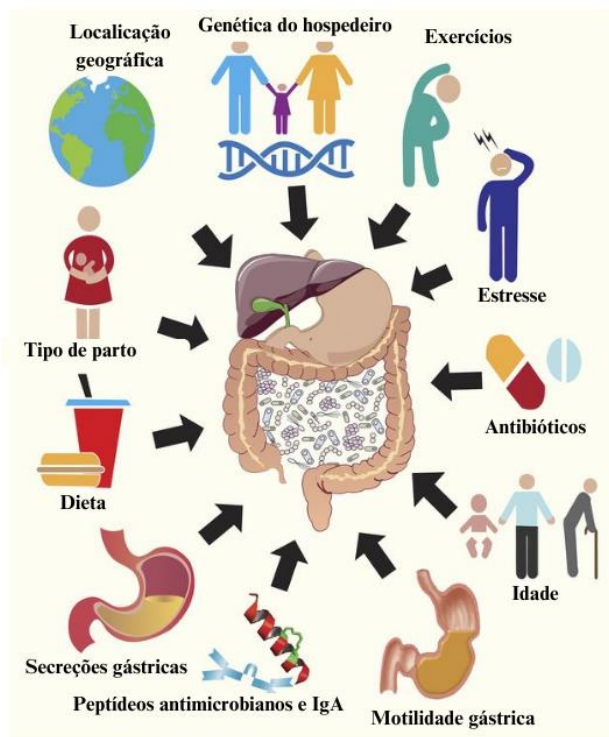
A composição da microbiota intestinal humana é variável e novos estudos têm mostrado a presença de bactérias na placenta, cavidade amniótica, cordão umbilical e mecônio, sugerindo que o processo de colonização microbiana no intestino possa iniciar ainda intra-utero (Collado *et al.*, 2016; Younge *et al.*, 2019). Com o avanço das fases da vida, a diversidade de espécies na microbiota aumenta continuamente depois dos seis meses de vida, conforme inicia-se a introdução de alimentos sólidos na alimentação (Carvalho-Ramos *et al.*, 2018). Além da idade, modulam a composição microbiana diversos fatores externos, como o consumo alimentar, o uso de medicamentos/antibióticos, tratamentos quimioterápicos e radioterápicos, localização geográfica, influxo e efluxo de microrganismos externos (Clemente *et al.*, 2012), índice de massa corporal (IMC), estilo de vida, frequência de exercícios, etnia, hábitos alimentares e

culturais (Nagpal *et al.*, 2018; Rinninella *et al.*, 2019; Clarke *et al.*, 2019), conforme disposto na Figura 4.

As técnicas convencionais dependentes de cultivo microbiano não conseguiam identificar cerca de 60% a 80% dos microrganismos presentes no corpo humano, sendo acreditado a sua condição de não cultivabilidade (Fraher; O'toole; Quigley, 2012). Porém, novas técnicas moleculares foram desenvolvidas permitindo a identificação e quantificação de boa parte dessas bactérias consideradas, anteriormente, como não cultiváveis (Sarangi; Goel; Aggarwal, 2019).

O surgimento de técnicas moleculares avançadas, como o sequenciamento de alto rendimento, assim como o desenvolvimento de ferramentas computacionais para análise de dados de alta complexidade, possibilitaram melhor entendimento das interações entre o metabolismo microbiano e o desenvolvimento no hospedeiro (Rooks; Garrett, 2016) e da caracterização filogenética (Sarangi; Goel; Aggarwal, 2019). Dentre as técnicas mais utilizadas atualmente, destacam-se aquelas que são baseadas na extração de DNA e amplificação do gene 16S do RNA ribossomal (RNAr) (Fraher; O'toole; Quigley, 2012). O gene 16S RNAr é constituído de regiões hiper-variáveis que são suficientes para diferenciar diversas espécies bacterianas (Sommer; Bäckhed, 2013), bem como possuem regiões conservadas, sendo atualmente o marcador taxonômico mais utilizado para identificação das espécies bacterianas (Minot *et al.*, 2023).

Figura 3 - Fatores que afetam a composição e função da microbiota intestinal.



Fonte: Adaptado de Clarke *et al.* (2019).

Os indivíduos adultos saudáveis possuem uma microbiota com predominância dos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, e Proteobacteria, sendo *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Peptostreptococcus* e *Akkermansia* os gêneros bacterianos predominantes (Jian, *et al.*, 2023; Dixit *et al.*, 2021; Gomaa, 2020; Collado *et al.*, 2007). Para caracterizar uma microbiota intestinal saudável, deve haver predominância de bactérias anaeróbias obrigatórias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, pois podem impedir a expansão da população de aeróbios facultativos e membros potencialmente patogênicos da família Enterobacteriaceae pertencentes ao filo Proteobacteria (Kriss *et al.*, 2018). Já em um cenário de desequilíbrio da microbiota intestinal, pode haver redução na proporção de Bacteroidetes, aumento na proporção de Firmicutes (*Micrococcaceae*), Proteobacteria (Enterobacteriaceae) e Fusobacteria (Tsai *et al.*, 2019).

O trato gastrointestinal (TGI) vem sendo considerado a maior superfície de colonização microbiana dos mamíferos (Clemente *et al.*, 2012), onde é estabelecida uma relação simbiótica entre o hospedeiro e os microrganismos (Rooks; Garrett, 2016). O TGI possui uma rede complexa de mecanismos imunológicos e não imunológicos, sendo essa chamada “barreira da mucosa gastrointestinal”, referindo-se à interação entre vários componentes do TGI, incluindo células epiteliais, células imunes e células especializadas do epitélio intestinal, estruturas

proteicas (junções de oclusão), substâncias liberadas pelas células do TGI (citocinas, bacteriocinas e muco) e outros metabólitos ativos, como ácidos graxos de cadeia curta (Machado *et al.*, 2015). No TGI, há uma composição microbiana variável em aspectos taxonômicos e funcionais (Rinninella *et al.*, 2019).

A microbiota participa do desenvolvimento e maturação do TGI, vascularização intestinal, regeneração tecidual, homeostase óssea, metabolismo de nutrientes e xenobióticos e no processo de imunomodulação (Jandhyala, 2015). Os microrganismos que habitam o intestino podem estar envolvidos na homeostase corporal (Stojanov *et al.*, 2020), comportamento e funções neurológicas (Zhang *et al.*, 2020), síntese de glicoproteínas, hormônios, neurotransmissores e moléculas inflamatórias e na fisiopatologia de muitas doenças (Gibiino *et al.*, 2018).

A alimentação possui um papel importante na iniciação, formação e modulação do perfil populacional dos membros da microbiota intestinal, pois fornece os nutrientes indispensáveis ao metabolismo de diversos grupos de bactérias, atuando como substrato direto por meio de nutrientes não digeridos e, de forma indireta, com os subprodutos resultantes da digestão (Özgün; Umu; Diep, 2017). As bactérias colonizadoras transformam os componentes dietéticos e produzem metabólitos envolvidos na modulação do sistema imunológico e nas respostas metabólicas do hospedeiro. Logo, a dieta modula a composição e a capacidade funcional da microbiota intestinal, influenciando nos processos bioquímicos do hospedeiro e estabelecendo um sistema de interação e interdependência mútua (Danneskiold-Samsoe *et al.*, 2019).

O desequilíbrio da microbiota intestinal é chamado de disbiose e pode estar relacionado com a redução de organismos benéficos, crescimento excessivo de organismos patobiontes e perda de diversidade microbiana (Gholizadeh *et al.*, 2019). Uma microbiota em disbiose tem sua produção de enzimas alterada, com diminuição da capacidade de absorção dos nutrientes (Brenchley; Douek, 2012), e associação com inflamação crônica e rompimentos na barreira epitelial (Zhao *et al.*, 2023). Esse desequilíbrio tem sido associado com o desenvolvimento de muitas doenças humanas relacionadas ao sistema imunológico, embora em muitos casos ainda não foi estabelecido se a disbiose é uma causa ou consequência da doença (Levy *et al.*, 2017). As alterações na diversidade microbiana podem aumentar o risco de desenvolver doenças crônicas e inflamação sistêmica (Wilkins; Monga; Miller, 2019), câncer, gota, artrite (Ding *et al.*, 2019) e pode estar associada com distúrbios intestinais e extraintestinais (Carding *et al.*, 2015; Das; Nair, 2019).

Sendo assim, estratégias para restaurar ou manter um equilíbrio favorável para o hospedeiro abrange, além das modificações dietéticas, a ingestão de microrganismos benéficos

vivos, estimulação do crescimento seletivo de microrganismos intestinais nativos e/ou a aplicação combinada de ambas as estratégias, que, resumidamente, se faz por meio do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos, respectivamente (Kim; Keogh; Clifton, 2018), como também a realização de transplante de microbiota fecal em situações específicas (doenças inflamatórias intestinais, síndrome metabólica, alguns cânceres entre outros) (Coman; Vodnar, 2020). Neste sentido, a administração de probióticos, prebióticos ou simbióticos de consumo oral sinalizam abordagens mais comuns para manutenção ou restauração do equilíbrio da microbiota nas diferentes fases da vida (Fagnant *et al.*, 2023).

2.2.1 Prebióticos

O estudo dos prebióticos é relativamente recente. Por volta de 1995, foram definidos como “ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e/ou a atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon” (Gibson; Roberfroid, 1995). Posteriormente, em 2004, essa definição foi alterada para “ingrediente seletivamente fermentado que proporciona mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal e que conferem benefícios ao bem-estar e saúde do hospedeiro” (Gibson *et al.*, 2004). Conforme houve mudança na definição, três características principais de um prebiótico foram ressaltadas e essenciais para classificá-los: Resistir à acidez gástrica, à hidrólise de enzimas digestivas e à absorção intestinal; ser fermentável por gêneros/espécies da microbiota intestinal; e ter efeito seletivo no crescimento e/ou atividade da microbiota intestinal relacionada à saúde e ao bem-estar do hospedeiro (Gibson *et al.*, 2004).

Por muito tempo, o termo “seletivamente” foi interpretado como referindo-se, principalmente, a lactobacilos e bifidobactérias, onde restringia o efeito prebiótico à ação bifidogênica. Ou seja, acreditava-se ser necessário a estimulação específica de bifidobactérias (bifidogênese) para ser considerado “efeito prebiótico”. Com o passar dos anos e o desenvolvimento de novas técnicas avançadas de base molecular para identificação de gêneros bacterianos na microbiota intestinal, foi estabelecido que outros gêneros podem ser capazes de utilizar alguns substratos prebióticos por fermentação e outras vias metabólicas, permitindo reconhecer os efeitos dos prebióticos além da ação de bifidobactérias e dos lactobacilos, sendo necessária uma avaliação de toda a diversidade microbiana (Gibson *et al.*, 2017).

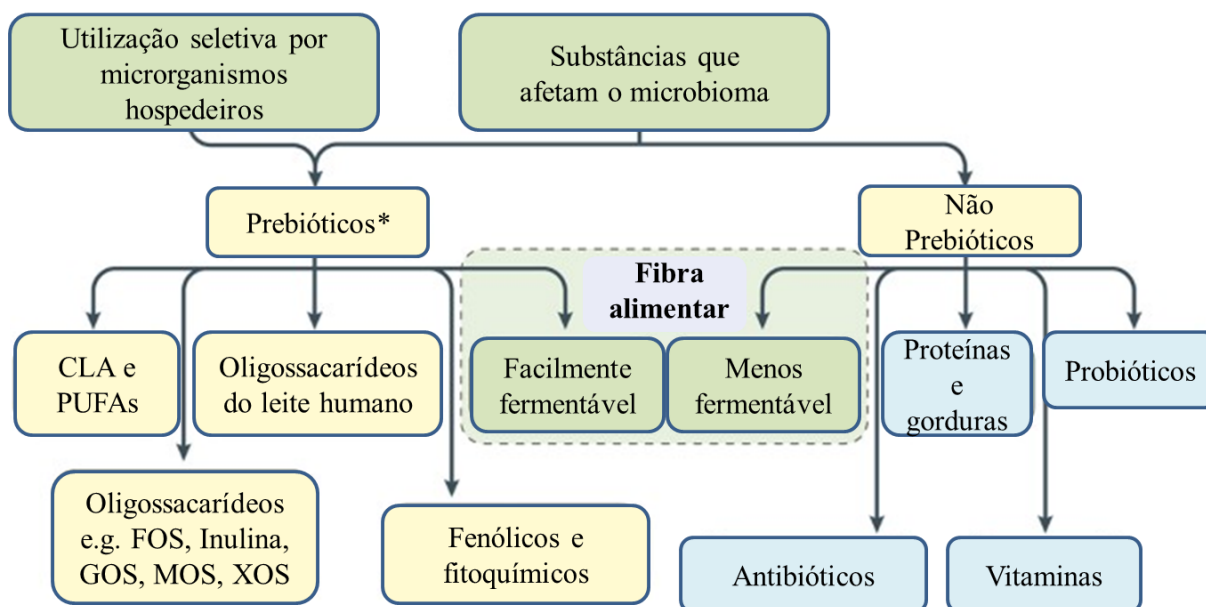
Assim, um acordo recente de um painel de especialistas da Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos aperfeiçoou a definição de prebióticos para

“substrato utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros conferindo benefícios à saúde” (Gibson *et al.*, 2017). Os prebióticos não são os únicos componentes a afetar a microbiota, mas são os únicos capazes de promover a seletividade sobre os microrganismos. Os substratos prebióticos podem ser utilizados por outros microrganismos do intestino que podem promover efeitos benéficos à saúde, seja por fermentação ou por meio de outras vias metabólicas, sendo que esses microrganismos podem variar de acordo com o hospedeiro (Gibson *et al.*, 2017). O efeito inclui algumas espécies microbianas, com exceção aos patogênicos, podendo-se incluir espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, e ainda *Faecalibacterium prausnitzii*, *Anaerostipes* spp, *Akkermansia muciniphila*, *Ruminococcus* spp. e *Roseburia* spp. (Hutkins *et al.*, 2016; Espín *et al.*, 2017; Gibson *et al.*, 2017).

Dessa forma, o novo conceito permitiu incluir outros microrganismos e outros componentes alimentares que possam promover o crescimento microbiano seletivo (Espín *et al.*, 2017) (Figura 5). Os prebióticos já bem respaldados são formados por carboidratos, a exemplo de alguns oligossacarídeos, como frutoligossacarídeos (FOS) e galactoligossacarídeos (GOS); oligossacarídeos resistentes, como oligossacarídeos do leite humano (HMO); mananoligossacarídeos; lactulose; polidextrose e inulina (Saad *et al.*, 2013; Bruno-Barcena; Azcarate-Peril, 2014; Nascimento; Junior, 2021; Rezende; Lima; Naves, 2021).

Ainda existem outras substâncias, incluindo alguns peptídeos e proteínas (Duda-Chodak *et al.*, 2015; Martinez-Gutierrez *et al.*, 2017), compostos fenólicos, xilo-oligossacarídeos (Cunningham *et al.*, 2021) e os ácidos graxos poli-insaturados, convertidos nos respectivos ácidos graxos conjugados, que podem se enquadrar na definição de prebióticos, desde que sua eficácia seja aprovada em testes *in vitro* e *in vivo* (Saad *et al.*, 2013; Gibson *et al.*, 2017).

Figura 4 – Esquema gráfico da distinção de substâncias possuidoras ou não de propriedades prebióticas.



Fonte: adaptado de Gibson *et al.* (2017). Os prebióticos dietéticos não devem ser degradados pelas enzimas alvo do hospedeiro. *A figura mostra os prebióticos candidatos e também os aceitos, visto que os níveis de evidência variam atualmente, sendo o FOS e o GOS os prebióticos mais pesquisados. CLA, ácido linoléico conjugado; PUFA, ácido graxo poliinsaturado; FOS, frutooligossacarídeos; GOS, galactooligossacarídeos; MOS, mananoligossacarídeo; XOS, xilooligossacarídeo.

Os efeitos benéficos advindos dos prebióticos dependem da influência na microbiota intestinal e dos metabólitos produzidos, uma vez que são fontes de energia no processo de fermentação e promovem o crescimento de microrganismos específicos, proporcionando uma microbiota mais saudável (Holscher, 2017). O consumo regular de prebióticos tem sido associado com a modulação da resposta imunológica, atuando na melhora da função intestinal, aumentando a absorção de vitaminas e minerais, trazendo efeitos positivos no metabolismo energético, e reduzindo o risco de infecções intestinais. Logo, os prebióticos mostram impacto direto na composição da microbiota intestinal e síntese de metabólitos derivados (Sanders *et al.*, 2019; Farias *et al.*, 2019).

Compostos que apresentam efeitos prebióticos podem ser administrados de forma isolada em suplementos alimentares ou estar presentes em vários alimentos, como iogurtes, pães, tomate, mel, cebola, aspargos, chicória e leite humano, além de serem encontrados também para comercialização na forma de pó ou xarope, que podem ainda ser incorporados ao preparo de outros alimentos (Gibson *et al.*, 2017; Mollakhalili-Meybodi *et al.*, 2021), como produtos lácteos (Dantas *et al.*, 2021), sorvete (Silva *et al.*, 2020), kefir e iogurte (Yo *et al.*, 2021), massas, xaropes e sucos de frutas (Cunningham *et al.*, 2021).

A fermentabilidade de prebióticos pela microbiota colônica depende de características estruturais dos substratos prebióticos, como grau de polimerização, comprimento da cadeia, composição e tipo de ligação glicosídica (Tian *et al.*, 2017; Ferreira-Lazarte *et al.*, 2019). Durante o processo de fermentação, os microrganismos produzem gases (como dióxido de carbono e hidrogênio), ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (como o acético, butírico e propiônico), que podem promover melhoras na saúde local e sistêmica (Rastall; Gibson, 2015; Patcharatrakul; Gonlachanvit, 2016). Dentre as funções biológicas dos AGCC incluem a manutenção da integridade do epitélio intestinal, regulação do pH colônico, síntese de muco, fornecimento de energia para os colonócitos e melhora do metabolismo da glicose (Snelson, Kellow, Coughlan, 2019), da função imunológica, do estresse oxidativo (Liu *et al.*, 2021) e da resistência contra a invasão por patógenos (Blaack *et al.*, 2021).

Novas evidências sugerem que compostos fenólicos, incluindo flavonoides e não flavonoides, abundantes em alimentos podem atuar como importantes moduladores da microbiota intestinal (Sayers; Wijeyesekera; Gibson, 2021), caracterizando-os como potenciais prebióticos, visto que influenciam positivamente na adesão, crescimento, sobrevivência e funcionalidade de microrganismos probióticos (Souza *et al.*, 2019; Sanders *et al.*, 2019; Moorthy *et al.*, 2020). Os compostos fenólicos são encontrados em matrizes alimentares na forma livre ou ligados a outros compostos, como a matriz da fibra dietética (Jackson; Jewell, 2017), sendo sugestão de que as fibras presentes nos vegetais podem facilitar o transporte dos compostos fenólicos até alcançar o colón humano (Sayers; Wijeyesekera; Gibson, 2021).

Devido à falta de estudos em humanos para confirmar os achados obtidos previamente em estudos *in vitro* e *in vivo*, as evidências encontradas indicam os compostos fenólicos como possíveis prebióticos, embora já seja consenso que tais compostos estimulam o crescimento de microrganismos alvos de prebióticos e aumentam a produção de AGCC (Mosele; Macià; Motilva, 2015; Cueva *et al.*, 2020). Sendo assim, a presença de fibras e compostos fenólicos no xique-xique, bem como seus potenciais impactos na composição da microbiota intestinal, o colocam como um possível substrato para obtenção de novas substâncias prebióticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo caracteriza-se como investigação experimental em laboratório. Estudos *in vitro* são realizados buscando simular condições biológicas reais em laboratório de modo a fornecendo princípios para realização de estudos posteriores (Freire & Pattussi, 2018).

3.2 LOCAIS DE EXECUÇÃO DA PESQUISA

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (Universidade Federal da Paraíba - UFPB); Laboratório de Bromatologia (UFPB); Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (UFPB); Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (Instituto Federal de Pernambuco-IFPE), Laboratório de Alimentos Funcionais (Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ); Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos-IPeFarm - UFPB) e Neoprospecta (Florianópolis - Santa Catarina).

3.3 AQUISIÇÃO E LIOFILIZAÇÃO DO XIQUE-XIQUE

O xique-xique foi adquirido de uma plantação de cultivo privado regional (Boa Vista, PB, Brasil; 07°15'32" S 36°14'24" W), em agosto de 2022, selecionado mediante sua integridade física e transportado devidamente acondicionado em caixas de poliestireno sob temperatura fria (10 ± 1 °C) até o Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA), Departamento de Nutrição (DN), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (João Pessoa – PB), onde foi processado para a realização dos experimentos.

O material foi identificado botanicamente pelo Prof. Leonardo Person Felix (Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, Brasil) e a espécie foi depositada no Herbário Prof. Jaime Coelho Morais (Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba) sob número de acesso 17.562. A coleção de material vegetal foi registrada no Sistema de Informação e Biodiversidade do Brasil (SISBIO; número 62681),

bem como no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SISGEN; número AA17429).

Da matéria adquirida, foram retirados os espinhos e selecionados os cladódios mediante sua integridade física, o quais foram higienizados em água potável corrente e sanitizados por imersão em água clorada (100 ppm) por 15 minutos, com posterior enxágue em água potável corrente. De cada cladódio, foi separado o cilindro vascular do talo central. O talo central foi descartado e apenas o cilindro vascular foi processado, uma vez que a polpa apresenta maior quantidade de mucilagem composta por carboidratos complexos (Sáenz; Sepúlveda; Matsuhirô, 2004). As amostras do cilindro central do xique-xique foram separadas em sacos hermeticamente fechados (Figura 6), envolvidas em papel alumínio e armazenadas sob congelamento ($-18 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

O material congelado foi levado para liofilização em liofilizador de bancada (modelo L-101, Liotop®, São Carlos, SP, Brasil) sob temperatura $-56 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 27 horas (pressão de vácuo $<138 \text{ }\mu\text{Hg}$, velocidade de liofilização 1 mm/h). O material liofilizado foi macerado e peneirado em malha fina (tamanho de partícula $<1 \text{ mm}$) e acondicionado em frascos de vidro esterilizados envolvidos em papel alumínio e armazenado sob refrigeração (temperatura $4 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) (Massa *et al.*, 2020).

Figura 5 – Etapas de processamento para obtenção do liofilizado a partir do cilindro vascular de xique-xique

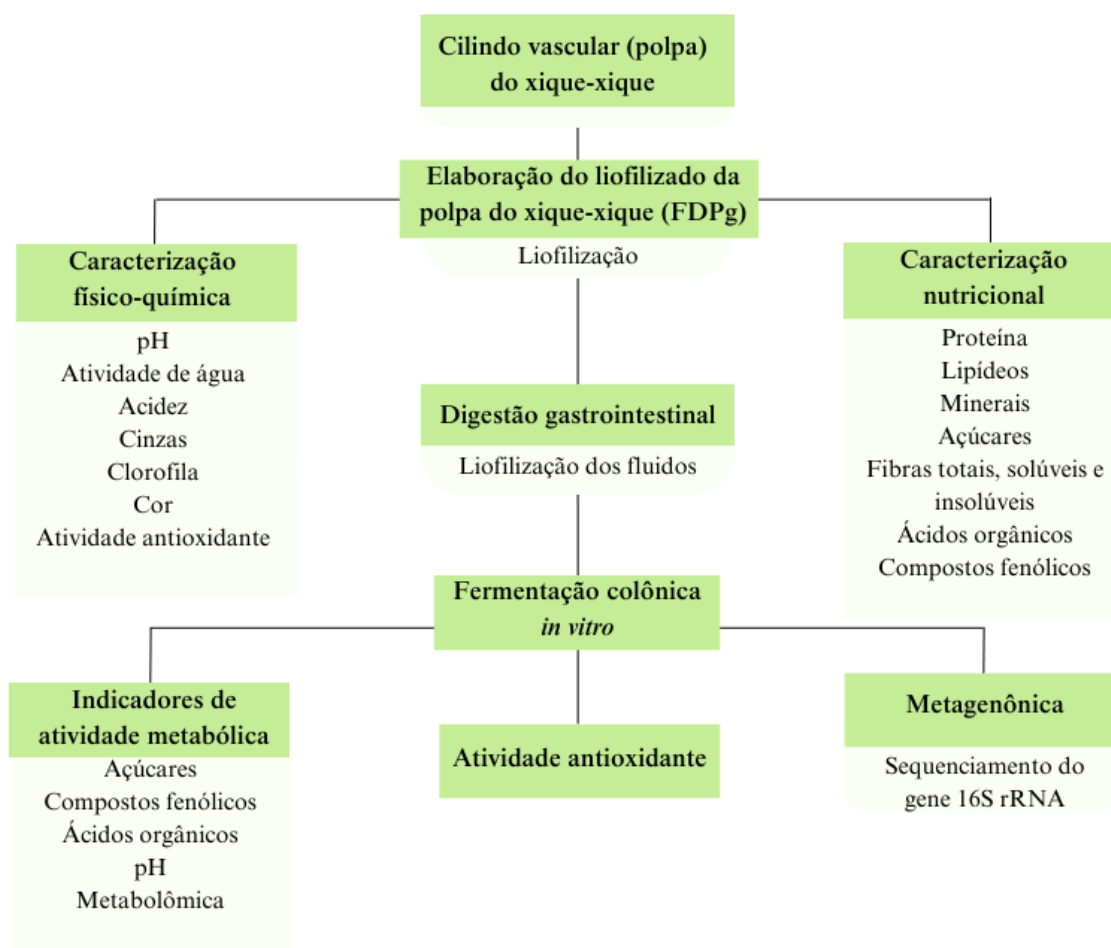


Fonte: Imagem do autor (2023).

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após a obtenção do liofilizado da polpa do xique-xique (FDPg) foram realizadas análises para determinação de sua composição nutricional e parâmetros físico-químicos, seguido por uma digestão gastrointestinal *in vitro*. O FDPg foi submetido a ensaios de fermentação com inóculo fecal humano e realizadas análises de metagenômica (sequenciamento 16S RNAr) e monitoramento de indicadores de atividade metabólica (pH, açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e metabolômica) e atividade antioxidante. As análises foram realizadas na amostra bruta liofilizada e no meio fermentado ao longo do tempo (zero, 24 e 48 h de fermentação). O desenho experimental do estudo é apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Fluxograma do desenho experimental do estudo.



Fonte: Imagem do autor (2023).

3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E NUTRICIONAIS

O FDPg foi submetido às análises de determinação de pH, atividade de água, acidez total titulável, cinzas, clorofila e cor. Além disso, foram realizadas análises para caracterização nutricional do FDPg, com quantificação de proteínas, lipídeos, fibras solúveis e insolúveis, minerais, açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, além de determinação da atividade antioxidante. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O pH foi determinado com uso de pHmetro digital (Quimis®, Q400AS, São Paulo, SP, Brasil), onde o eletrodo de vidro foi inserido diretamente em alíquotas da amostra diluída em água destilada, sendo as medidas realizadas a $25 \pm 0,5$ °C. A atividade de água (a_a) foi determinada sob temperatura de 25 ± 2 °C utilizando-se equipamento AquaLab® (Modelo 4TEV, Meter®, São José dos Campos, SP, Brasil) por meio da disposição do FDPg (média de 1 g) até preencher o suporte de leitura do equipamento. A acidez total titulável foi baseada na neutralização da amostra com solução padrão de NaOH 0,1N, sendo determinada por titulometria, utilizando fenoftaleína como indicador (aproximadamente 3 gotas). O teor de cinzas foi determinado por meio de incineração em mufla a 550°C até alcançar peso constante (AOAC, 2019).

Para determinação de clorofila, foi utilizado o método descrito por Lichtenthaler (1987), onde foram pesados 2 g da amostra, acrescido 25 mL de acetona 80% e filtrado para balão de 25 mL, tendo seu volume completado com o próprio solvente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (SpectraMax M2) nos comprimentos de onda de 647 nm e 663 nm para clorofila, utilizando os valores encontrados para quantificar Clorofila *a* e Clorofila *b*. Para o branco, utilizou-se apenas acetona 80%.

Para análise de cor, utilizou-se colorímetro Minolta CR-2000 (Minolta Limited, Milton Keynes, Reino Unido) e as leituras de cor foram efetuadas para cada amostra após homogeneização, utilizando os valores a^* (vermelho-verde) e b^* (amarelo-azul) para calcular o valor do ângulo de tonalidade e luminosidade (L^* = zero – preto e L^* = 100 – branco), conforme CIE (1986).

Para determinação de proteínas, foi utilizado o método Kjeldhal utilizando o fator 5,75 recomendado para material de origem vegetal, como descrito pela AOAC (2019). O teor de lipídios foi determinado de acordo com técnica descrita por Folch, Less e Stoane-Stanley (1957), com extração em solução de clorofórmio-metanol (2:1). Para determinação de fibra total, solúvel e insolúvel seguiu-se a metodologia descrita pela AOAC (1995), com uso de kit de ensaio enzimático-gravimétrico (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA).

Para as análises de minerais (potássio, cálcio, magnésio, sódio, manganês, fósforo, ferro, zinco, cobre e cobalto), foi realizada a digestão das amostras, em triplicata, conforme AOAC (2000), onde as amostras foram carbonizadas em placa aquecedora, colocadas em mufla a 450 °C por 6 horas, sendo as cinzas umedecidas com água Milli-Q e adicionado 1 mL de ácido nítrico concentrado, aquecendo em placa até completa secagem e repetindo a adição de ácido até a obtenção de cinzas claras. As cinzas foram dissolvidas com solução de 10% de ácido nítrico ultrapuro em água Milli-Q.

A quantificação dos minerais foi realizada utilizando a técnica analítica de Espectrometria de Emissão Ótica com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) (Horiba Jobin Yvon, Ultima 2, Longjumeau, França), sequencial, com visão radial, equipado com câmara de nebulização ciclônica, nebulizador do tipo MiraMist (Mira Mist CE, Burgener Research Inc., Ontario, Canadá), amostrador automático modelo AS 421. Para análise de dados, foi utilizado o software operacional Analyst 5.4. As condições de operação do ICP-OES foram 1200 W de potência de radiofrequência, 12 L/min de fluxo de gás do plasma, 0,2 L/min de fluxo de gás auxiliar, 1,0 bar de pressão do nebulizador, 1,0 mL/min de vazão de introdução da amostra, e 1 s de tempo de integração. Foi realizada a interpolação utilizando curva analítica com quatro soluções-padrão para a calibração, preparadas a partir da diluição de solução-padrão estoque SpecSol de concentração 1.000 ou 10.000 mg L⁻¹ (Quimlab Química & Metrologia®, Jardim Califórnia, Jacareí, São Paulo, Brasil) até a obtenção das concentrações desejadas, conforme assemelhamento de matriz.

3.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada segundo a metodologia validada por Padilha *et al.* (2017) para quantificação de procianidina B1, procianidina B2, quercetina 3-glicosídeo, kaempferol 3-glicosídeo, epicatequina galato, epigallocatequina galato, epicatequina, catequina e miricetina.

Para a análise, inicialmente foi realizada uma extração metanólica em duplicata, onde aproximadamente 2 g do FDPg foram acidificados com 0,1 M HCl (Neon, São Paulo, SP, Brasil) para atingir pH 2 e misturados com 20 mL de metanol, seguido por tratamento com ultrassom (60 min, 37 kHz, 30 °C) (Ultrasonic, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). As soluções foram centrifugadas (4000 x g, 15 min, 4 °C) e os sobrenadantes foram filtrados com filtros PTFE de tamanho de poro de 0,45 µm (Whatman®).

Para separação e quantificação dos compostos fenólicos, foi empregado método de detecção por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por meio de um cromatógrafo líquido Agilent 1260 Infinity LC System (Agilent Technologies, Santa Clara - USA) equipado com bomba quaternária de solventes, desgaseificador, compartimento termostático da coluna e amostrador automático, juntamente com detector de matriz de diodos (DAD).

As outras condições analíticas foram as seguintes: coluna de fase reversa Hydro-RP C18 (150 x 4.6 mm, 4 micrômetros, Phenomenex®); fase móvel com gradiente de ácido fórmico aquoso a 0,3% (eluente A), metanol (eluente B) e acetonitrila (eluente C), a uma vazão de 1,0 mL/min. Os compostos fenólicos foram monitorados de 190 a 370 nm. Os dados foram processados usando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies). Foi realizada a identificação e quantificação por comparação com padrões externos, comparando seus tempos de retenção com aqueles encontrados para os padrões de compostos fenólicos (Sigma Aldrich) e espectro de absorção do respectivo padrão. Foram realizadas injeções duplicadas e as áreas médias dos picos foram usadas para quantificação dos compostos fenólicos identificados (Coelho *et al.*, 2018; Padilha *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2019).

3.7 QUANTIFICAÇÕES DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS

Para a determinação de açúcares e ácidos orgânicos foi empregado métodos de detecção por CLAE (Ball *et al.*, 2011), utilizando-se um cromatógrafo LC 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA) equipado com bomba de solvente quaternário (modelo G1311C), desgaseificador, compartimento de coluna termostato e amostrador automático acoplado a detector de matriz de diodo (DAD) (para açúcares) e detector de índice de refração (RID) (para ácidos orgânicos).

Para determinação do conteúdo de açúcares (glicose, frutose, maltose e ramnose) e conteúdos de ácido cítrico, fórmico, málico e succínico, foi preparado um extrato aquoso do FDPg. Inicialmente, 1 g do FDPg foi homogeneizado com 20 mL de água ultrapurificada (1:20) (Sistema de Purificação de Água Integral Milli-Q®, EMD Millipore, Billerica, MA, EUA) por 10 minutos com aparelho Turrax (Tecnal). A suspensão foi centrifugada em centrífuga refrigerada (centrífuga refrigerada MPW® 351R, Varsóvia, Polônia; rotor 11457; RCF 10732 x g; raio 9,6 cm; ângulo 30°; 4000 rpm) (1696 x g, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante foi filtrado com um filtro PTFE de 0,45 µm (Whatman®, GE Healthcare, Chicago, IL, EUA).

Durante a análise, as condições analíticas foram: coluna Agilent Hi-Plex H (300 x 7,7 mm) com tamanho de partícula de 8,0 µm e coluna de guarda PL Hi-Plex H (5 x 3 mm) (Agilent

Technologies) mantidas a 50 °C com volume de injeção foi 10 µL, vazão de 0,5 mL/min, fase móvel 4 mM H₂SO₄ em água ultrapura e corrida de 20 minutos. Os dados foram processados com o software OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies), sendo utilizados os picos e as áreas médias de pico para quantificação dos compostos através da comparação dos seus tempos de retenção com os respectivos padrões para açúcares e ácidos orgânicos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (Batista *et al.*, 2018; Coelho *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; Padilha *et al.*, 2017).

Para realização dessas análises, os padrões de glicose e frutose foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, EUA); os padrões de maltose foram obtidos da Chem Service (West Chester, EUA); e os padrões de ácidos cítrico, fórmico, málico e succínico foram obtidos da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil); todos com uma pureza de ≥99%, a água ultrapura foi obtida de sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q® MilliQ®) e o ácido sulfúrico foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A capacidade antioxidante foi avaliada por meio da capacidade antioxidante equivalente a trolox por meio da captura do radical 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}) conforme Silva *et al.* (2023) com pequenas modificações; da eliminação do radical DPPH (2,2-difenil-1picril-hidrazil) conforme Silva *et al.* (2023); e do poder antioxidante para a redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe³⁺ no ensaio de FRAP conforme Silva *et al.* (2023), com pequenas modificações.

A obtenção do extrato se deu conforme metodologia adaptada de Silva *et al.* (2023), utilizando 2 g do FDPg diluídos em solução aquosa de metanol a 80% (20:80, p/v). O tubo foi envolto em papel alumínio, armazenado sob refrigeração (4 ± 0,5 °C) por 24 horas e centrifugado em centrífuga refrigerada (MPW®, rotor 11456; RCF 3996 x g; raio 14,3 cm; ângulo 30°; 4500 rpm) (1696 x g, 10 minutos, 4 °C). Utilizou-se o sobrenadante para as análises posteriores.

3.8.1 Captura do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1picrilhidrazila)

A atividade antioxidante foi determinada por meio da avaliação da capacidade de desativar o radical DPPH[•], segundo do método de Silva *et al.* (2023), com adaptações. Uma

solução de DPPH (0,06 mmol/L em metanol 80%) foi preparada e armazenada em vidro ambar a 20 °C até o uso. Uma curva padrão de Trolox foi preparada.

Foram elaboradas diferentes diluições do extrato e acrescentados à solução de trabalho de DPPH•. A mistura foi mantida sob repouso por 30 minutos em temperatura ambiente (25 ± 0,5 °C) no escuro. Para o controle negativo, foi utilizada a mistura da solução extratora (50 µL) e solução de trabalho de DPPH• (250 µL), e para a solução “branca” foi utilizada apenas a solução extratora (metanol 80%) (300 µL). Das diferentes diluições elaboradas, foram transferidas 50 µL para uma microplaca de 96 poços e realizada a leitura em comprimento de onda de 515 nm usando espectrofotômetro (BioTek Eon, Winooski, VT, USA).

A atividade antioxidante foi calculada usando uma curva padrão de Trolox a 2 mM (50-2000 µM) e os percentuais de inibição foram determinados utilizando a Equação 1:

$$\% \text{ inibição DPPH} = \frac{\text{ABSc} - (\text{ABSa} - \text{ABSb})}{\text{ABSc}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo, “ABSc” a absorbância do controle, “ABSa” a absorbância da amostra e “ABSb” a absorbância do branco. Os resultados foram expressos em µM trolox/g de amostra (µmol Trolox/g).

3.8.2 Redução do ferro (Fe⁺²) (FRAP)

O potencial antioxidante pelo método FRAP foi realizado utilizando a metodologia descrita por Silva *et al.* (2023), com adaptações. Foram elaboradas diferentes diluições do extrato e acrescentados o reagente FRAP. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, sendo utilizado uma mistura de tampão acetato (0,3M, pH 3,6), solução TPTZ (10 mM em HCl a 40 mM) e solução aquosa de cloreto férrico a 20 mM em água destilada, na proporção 100:10:10 (v/v).

Para a análise foram elaboradas diferentes diluições do extrato e, então, foram retirados 45 µL de cada diluição e acrescentados 135 µL de água destilada. Em seguida, ocorreu a adição de 1,35 mL do reagente FRAP e seguiu-se para homogeneização em agitador de tubos tipo Vortex (Tecnal). A mistura foi incubada em banho ultratermostatizado (Splabor®) a 37 ± 0,5 °C por 30 minutos no escuro. Foram transferidos 250 µL da mistura para uma microplaca de 96 poços e realizada a leitura em comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro

(BioTek Eon), para medir a redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} . Para o “branco” foi apenas o reagente FRAP (300 μL).

A atividade antioxidante foi calculada usando uma curva de sulfato ferroso a 2 mM (em 50 mL de água destilada) como referência (50 - 2000 μM). Os resultados foram expressos em μmol de equivalentes de sulfato ferroso por g de amostra ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$).

3.8.3 Captura do radical livre ABTS ($\text{ABTS}^{\bullet+}$)

O potencial antioxidante pelo método $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi realizado utilizando a metodologia descrito por Silva *et al.* (2023), com modificações. O radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi feito por meio da reação da solução ABTS^+ a 7 mM com a solução de persulfato de potássio a 140 mM, incubados em temperatura de 25 ± 1 °C, no escuro, durante 16 horas. Em seguida, foi realizada a diluição em álcool etílico absoluto até obter o valor de absorbância de $0,70 \pm 0,05$ nm a 734 nm.

Diferentes diluições do extrato foram elaboradas e foram transferidos 50 μL de cada diluição para uma microplaca de 96 poços e acrescentados 250 μL do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Para o controle negativo foi feito uma mistura da solução extratora (50 μL) e o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (250 μL). Para a solução “branca”, foi utilizada apenas a solução extratora (300 μL). As amostras foram mantidas no escuro por 6 minutos e, em seguida, foi realizada a leitura da absorbância em comprimento de onda de 734 nm, usando espectrofotômetro (BioTek Eon) para medir a diminuição na concentração do radical livre $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

A atividade antioxidante foi calculada usando uma curva padrão de Trolox a 2 mM (50-2000 μM) e os percentuais de inibição foram calculados por meio da Equação 2:

$$\% \text{ inibição ABTS} = \frac{\text{ABSc} - (\text{ABSa} - \text{ABSb})}{\text{ABSc}} \times 100 \quad (2)$$

Sendo “ABSc” a absorbância do controle, “ABSa” a absorbância da amostra e “ABSb” a absorbância do branco. Os resultados foram expressos em μM Trolox/g de amostra (μmol Trolox/g).

3.9 DIGESTÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

O FDPg foi submetido a uma digestão gastrointestinal *in vitro* logo após a liofilização, a fim de ser transformado em material com características similares às aquelas quando atingem o cólon humano (Guergoletto *et al.*, 2016). Inicialmente, 5 g do FDPg foram reidratados com 25 mL (1:5, p/v) de água destilada esterilizada sob temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) e homogeneizados por 15 minutos em frascos de vidro previamente esterilizados em autoclave. Os movimentos peristálticos foram simulados por meio de agitação mecânica em incubadora com agitação orbital e temperatura controlada (TE-424, Tecnal) a $37 \pm 0,5$ °C.

Para simular a condição oral, foram adicionadas 1,2 mL de α -amilase (100 U/mL de α -amilase diluída em 1 mM de CaCl_2) e, em seguida, foi ajustado o pH para 6,9, adicionando solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 1 M, e exposto a agitação manual por 2 minutos. Após esta etapa, ocorreu a simulação da condição estomacal, onde o pH da mistura foi ajustado para 2,0 utilizando-se HCl a 1 M, adicionado de pepsina (25 mg de pepsina diluída em 1 mL de 0,1 M HCl) e mantido a $37 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ durante 60 minutos sob agitação (2 x g, 60 min). Para simular as condições duodenais e de íleo, foi adicionado solução intestinal (2 g de pancreatina / L de 0,1 M NaHCO_3 e 12 g de sais biliares bovinos/L de 0,1 M NaHCO_3 e pH ajustado para 6,5 com NaHCO_3 a 1M, sendo a mistura incubada a $37 \text{ °C} \pm 0,5$ por 90 minutos sob agitação mecânica (0,3 x g, 90 min) (Sampaio *et al.*, 2022). Todas as enzimas e reagentes usados para digestão gastrointestinal *in vitro* foram adquiridos na Sigma-Aldrich.

O fluido resultante da digestão simulada passou pelo processo de diálise para a retirada de produtos digestivos de baixo peso molecular (monossacarídeos livres), onde a mistura foi transferida para um tubo de diálise de celulose regenerada de 1 kDa de peso molecular (Spectra/Por_ 6, Spectrum Europe, Holanda) e dialisada com NaCl 0,01M a $5 \pm 0,5$ °C por 18 horas. Após esse período, os fluidos de diálise foram substituídos e o processo continuado por um período adicional de 2 horas a $5 \pm 0,5$ °C (Sampaio *et al.*, 2022). Por fim, as amostras pré-digeridas dialisadas foram liofilizadas por, aproximadamente, 32 horas e armazenadas sob refrigeração ($5 \pm 0,5$ °C) por, no máximo, 1 semana, até a sua utilização nos experimentos da fermentação colônica.

3.10 ENSAIO COM SISTEMA DE FERMENTAÇÃO COLÔNICA *IN VITRO*

3.10.1 Procedimentos éticos

Mediante as exigências do Conselho Nacional de Saúde, esta pesquisa foi submetida à análise pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da

Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS/UFPB, para aprovação da sua execução.

Este procedimento está baseado na Resolução 466/12 (CNS-MS, 2012), que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos e estabelece que "toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa". O projeto foi submetido, via plataforma Brasil, e aprovado (Anexo A) pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPB sob o número do parecer 5.906.607 (CAAE: 66834523.7.0000.5188).

Os indivíduos que participaram voluntariamente desta pesquisa foram esclarecidos sobre a temática e importância da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) concordando com a participação na pesquisa.

3.10.2 Coleta das amostras fecais

As amostras fecais frescas foram doadas por seis voluntários adultos saudáveis, sendo três homens e três mulheres, entre 19 e 40 anos de idade. Os indivíduos receberam informações prévias sobre o estudo, como forma de pré-seleção, para fins de concordância ou não acerca da participação nesta pesquisa e foram conduzidos ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB, onde foram submetidos a uma triagem a fim de avaliar se atendiam aos critérios de inclusão necessários à participação na pesquisa.

Como critérios de inclusão, os doadores deveriam seguir dieta onívora; sem antecedentes de doença no intestino grosso; sem uso de alimentos probióticos ou prebióticos concentrados há, no mínimo, seis meses antes do período de coleta; além do não uso de antibióticos, inibidores de bomba de próton ou qualquer outro medicamento de uso controlado por, pelo menos, seis meses antes da coleta, não consumir álcool regularmente, não serem fumantes e possuírem IMC eutrófico.

Um kit para coleta foi disponibilizado para cada doador, contendo frascos coletores esterilizados, luvas, prato descartável, espátula descartável e álcool a 70%. Os participantes foram instruídos quanto ao manuseio asséptico do material. As amostras foram coletadas em até 30 minutos após a excreção, sendo transportadas em jarra de anaerobiose e utilizadas imediatamente (Albuquerque *et al.*, 2021; Menezes *et al.*, 2021).

3.10.3 Preparação das amostras fecais e preparação do meio de fermentação colônica *in vitro*

As amostras fecais frescas coletadas de cada doador foram misturadas em igual quantidade (1:1:1:1:1), diluídas (1:10 p/v) em tampão fosfato alcalino reduzido constituído de 0,5 g/L de cisteína e 8,5 g/L de NaCl e homogeneizadas por 2 minutos sob agitação manual. A mistura fecal/inóculo fecal (100 g) foi filtrada com o uso de camada tripla de gases esterilizadas para remoção de partículas grandes e utilizado, ainda fresco, após a filtração (Albuquerque *et al.*, 2021; Menezes *et al.*, 2021).

Para o processo de fermentação, foi formulado 1 L de meio de crescimento, com a seguinte composição: 4,5 g de NaCl, 4,5 g de KCl, 1,5 g de NaHCO₃, 0,69 g de MgSO₄, 0,8 g de L-cisteína, 0,5 g de KH₂PO₄, 0,5 g de K₂HPO₄, 0,4 g de sal biliar, 0,08 g CaCl₂, 0,005 g de FeSO₄, 1 mL de Tween 80 e 4 mL de solução de resazurina (0,025%, v/v) como indicador anaeróbio, diluído em água destilada e esterilizado por autoclavagem (121 °C, 1 atm, 15 min) (Sampaio *et al.*, 2022). O FDPg digerido e dialisado foi submetido à fermentação com o inóculo fecal fresco previamente preparado.

O volume final do sistema de fermentação foi de 40% de meio de fermentação (v/v), 40% da pré-cultura do inóculo fecal humano (v/v) e 20% do FDPg digerido e liofilizado (p/v). Todos os meios de fermentação foram incubados sob anaerobiose (*AnaeroGen*®) por 48 h a 37 °C (Albuquerque *et al.*, 2021; Menezes *et al.*, 2021). Também foi preparado um meio fermentativo contendo FOS (20% p/v, ingrediente prebiótico padrão) (Gibson *et al.*, 2017; Sanders *et al.*, 2019) para ser utilizado como controle positivo, e outro meio sem adição de substrato fermentável para ser utilizado como controle negativo (Guergoletto *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2016). Os ingredientes utilizados para formular os meios de pré-cultura e fermentação foram obtidos da Sigma Aldrich (Rodrigues *et al.*, 2016).

3.10.4 Monitoramento de indicadores de atividade metabólica

Nos tempos zero, 24 e 48 horas de fermentação colônica foram retiradas alíquotas do sistema de fermentação descrito no tópico 3.10 para análises do pH, açúcares e ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Os valores de pH foram mensurados conforme descrito no tópico 3.5. Para a determinação de compostos fenólicos, seguiram-se procedimentos descritos conforme o tópico 3.6. Para a determinação de açúcares e ácidos orgânicos, foi realizado o procedimento descrito no tópico 3.7. Para a análise do potencial antioxidante, retirou-se 2 mL para o preparo

do extrato utilizando os ensaios de ABTS^{•+}, DPPH[•] e FRAP como descrito nos tópicos 3.8.1, 3.8.2 e 3.8.3, respectivamente.

Para a determinação do perfil metabolômico global (*global metabolite profiling*) utilizou-se a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), conforme metodologia descrita por Sampaio *et al.*, (2022). Alíquotas de 2 mL de cada tempo avaliado (0 e 48 horas) em cada sistema de fermentação colônica foram diluídas em solução com metanol padrão HPLC (CH₃OH) e água deuterada (D₂O) (1:1:1, v/v), centrifugadas (MPW[®], 1696 x g, 10 minutos, 4° C) e filtradas através de uma membrana de éster de celulose de 0,45 µm (Millipore[®]). Da solução resultante, 550 µL foram transferidos em um tubo quantitativo (5 mm × 177,8 mm). Os experimentos de RMN foram realizados em equipamento Bruker Ascend 400, operando a 400 MHz para ¹H RMN e 100 MHz para ¹³C RMN (Bruker, Billerica, MA, EUA). A matriz de dados das amostras consistiu em espectros formados por linhas e colunas (picos) variando conforme a intensidade de sinais nas diferentes regiões avaliadas. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz, e as multiplicidades de RMN de ¹H indicadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dl (dubleto largo), dd (duplo dubleto), t (triplete), q (quarteto) e m (multiplete) (HU *et al.*, 2019). Os espectros foram processados usando o software Bruker TopSpin 4.1.1. As intensidades das regiões foram utilizadas para quantificação relativa dos metabólitos no material analisado durante a fermentação. A região referente ao CH₃OH e D₂O foram suprimidas da análise.

3.10.5 Metagenômica: Análise transcriptômica da microbiota fecal – extração do DNA, preparação e sequenciamento do gene 16S rRNA

A análise da composição da microbiota colônica foi realizada por meio do sequenciamento do gene 16S RNAr região V3/V4 usando os primers 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) utilizando Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, SC, Brasil). As bibliotecas de 16S rRNA foram sequenciadas usando o sistema de sequenciamento MiSeq (Illumina Inc., EUA) com os primers Illumina padrão fornecido no kit, empregando 300 ciclos para sequenciamento emparelhado com 200 pb.

Alíquotas do sistema de fermentação colônica foram coletadas nos tempos zero e 48 h, homogeneizadas, fracionadas em microtubos e realizada a extração do DNA genômico usando o kit QIAamp DNA Stool Mini (QIAGEN, Hildren, Alemanha) de acordo com o protocolo do

fabricante, sendo a composição da microbiota intestinal analisada na plataforma MiSeq (Illumina) (Illumina, San Diego, CA, EUA). A análise das sequências e a identificação das unidades taxonômicas foram avaliadas conforme as metodologias propostas por Giongo *et al.* (2010); Hong *et al.* (2006).

A amplificação da região 16S RNAr foi realizada com a técnica de Real Time Quantitative PCR (qPCR), e para identificar os grupos de bactérias intestinais foram utilizados primers específicos para o gene 16S RNAr, iniciadores e os amplicons purificados, quantificados e sequenciados usando o sistema Illumina MiSeq para produzir a sequência de 2 x 300 pb. As reações de qPCR foram realizadas em duplicata, em placa de 96 poços com o reagente SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™). Cada reação foi composta por 5 µL de Master Mix Green SYBR™ Green, 0,4 µL de cada um dos primers específicos na concentração de 10 µmol/L, e 2 µL de DNA molde (concentração fixa de 2 ng/µL de DNA), com volume final de 10 µL. As amostras foram processadas em termociclador Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA), sendo desnaturadas por 3 minutos a 95 °C, seguidas de 30 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 30 segundos a 60 °C, seguidos por uma curva de melting padrão do equipamento (15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60° C, 15 segundos a 95 °C). Uma curva padrão foi construída para cada experimento usando a diluição seriada.

A filtragem de qualidade inicial das leituras foi realizada com o Illumina Software a fim de serem produzidos, em média, 148.370 leituras do filtro de passagem por amostra. Os índices de qualidade foram visualizados e as leituras ajustadas para 240 pb. As leituras foram mescladas com o aplicativo Merge-Illumina-pairs. Para amostras com > 100.000 leituras mescladas, um subconjunto de 100.000 leituras foi selecionado, aleatoriamente, usando Mothur 1.32.1, evitando grandes disparidades no número de sequências. Após, usou-se o pipeline UPARSE implementado no USEARCH v7.0.1001 para processar ainda mais as sequências. Quimeras putativas foram identificadas no banco de dados de referência Gold e removidas. O agrupamento foi realizado com um ponto de corte de 98% de similaridade para designar as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e as sequências não quiméricas também foram submetidas à classificação taxonômica usando o RDP MultiClassifier 1.1 do Ribosomal Database Project para o filo na caracterização de gênero do microbioma fecal. Os filotipos foram calculados como proporções percentuais com base no número total de sequências em cada amostra. A diversidade alfa foi calculada usando o índice Chao1 e índice Shannon com QIIME (V1.7.0) e exibido com software R (V2.15.3). A diversidade beta foi medida usando métricas de distância unfrac ponderadas e não ponderadas pelo software QIIME (V1 7.0). O tamanho do efeito LDA foi calculado e plotado usando LEfSe.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em dois experimentos independentes e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi realizado para avaliar se os dados obtidos possuíam distribuição normal. Para a determinação da diferença entre os dados obtidos, foi considerado o nível de 5% de significância ($p < 0,05$) com o teste t de Student ou Análise de Variância (ANOVA) one-way ou two-way seguido pelo teste de Tukey. Para o tratamento estatístico, foi utilizado o *software* SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, CA, USA).

4 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em forma de artigo intitulado “Investigação dos potenciais impactos dos cladódios de *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum. Bly. Ex Rowl) na composição e atividade metabólica da microbiota intestinal humana” (Apêndice B).

O FDPg apresentou baixa acidez, pH neutro e baixa atividade de água, além de uma variedade de minerais, destacando-se os conteúdos de potássio, cálcio, magnésio, sódio e manganês. O FDPg apresentou cor verde-amarelada escura sendo relacionada à presença de clorofila no produto. Foram encontrados elevados conteúdos de fibras totais no FDPg, além da identificação de flavonoides (epigallocatequina galato, procianidina B2 e catequina), e presença de açúcares em sua composição, sendo um indicativo de disponibilidade de substratos passíveis de fermentação por microrganismos que compõem a microbiota intestinal humana. O FDPg também apresentou capacidade antioxidante.

Após 48 h de fermentação colônica, o meio com FDPg teve redução do pH, produção de ácidos orgânicos e produtos absorvíveis, a exemplo de metabólitos fenólicos e ácidos graxos de cadeia curta (AGGC), e consumo de compostos fenólicos, além de manutenção da capacidade antioxidante ao longo da fermentação colônica.

O meio contendo FDPg apresentou, também, aumento de *Firmicutes*, com aumento da abundância relativa de grupos bacterianos benéficos à saúde intestinal, a exemplo de *Mitsuokella*, *Bacteroides*, *Megasphaera* e *Acidaminococcus*, além de redução de grupos bacterianos considerados não benéficos, como *Succinivibrio*, *Citrobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Faecalibacterium* e *Blautia*.

De forma geral, ao longo da fermentação colônica, o meio contendo FDPg apresentou mudanças positivas na composição da microbiota intestinal humana, com aumento da população de grupos bacterianos benéficos, diminuição da abundância relativa de grupos bacterianos considerados não benéficos e produção de metabólitos que favorecem a saúde intestinal e sistêmica do hospedeiro.

Diante dos resultados encontrados nesse estudo, o FDPg se mostra como uma matriz com potencial prebiótico e antioxidante, podendo ser explorado em formulações de produtos inovadores com propriedades funcionais.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. M. R. *et al.* Effects of digested flours from four different sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) root varieties on the composition and metabolic activity of human colonic microbiota *in vitro*. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 8, p. 3707-3719, 2021.
- ALMEIDA, C. A. *et al.* Características físicas e químicas da polpa de xique-xique. **Revista de Ciências Agronômicas**, v. 38, n. 4, p. 440-443, 2007.
- ALVAREZ-BAYONA, R. A. *et al.* Green synthesis approximation of Au/Li nanoparticles with *Opuntia ficus-indica* extract. **Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures**. p. 169–173. 2019.
- ALVES-SANTOS, A. M *et al.* Prebiotic effect of dietary polyphenols: A systematic review. **Journal of Functional Foods**, v. 74, p. 104 – 169. 2020.
- ARAÚJO D. F. S. *et al.* **Food Plants in the Caatinga**. In: Jacob M. C. M., Albuquerque U. P. (eds). Local Food Plants of Brazil. Ethnobiology. Springer, Cham. 2021.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 21th ed. Gaithersburg, 2019. 3390 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 20th ed. United States, 2016.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS– AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17. ed. Gaithersburg, 2000.
- 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.
- BARROS, A. H. C. *et al.* **Climatologia do Estado de Alagoas. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. 32 p. Recife: Embrapa Solos, 2012.
- BATISTA, K.S *et al.* Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. **British Journal of Nutrition**, v. 119, p. 30–41, 2018.
- BEZERRIL, F.F. *et al.* *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) jam is source of fibers and mineral and improves the nutritional value and the technological properties of goat milk yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 139, p. 110512. 2021.
- BIONDO, E.; FLECK, M.; KOLCHINSKY, E.M.; SANT’ANNA, V. Diversidade e potencial de utilização de plantas alimentícias não convencionais ocorrentes no Vale do Taquari, RS. **Revista Eletrônica Científica**. UERGS, v. 4, n. 1, p. 61-90, 2018.
- BRASIL. Manual de Hortaliças Não-Convencionais. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Brasília DF: MAPA/ACS, 92p. 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente: **Bioma Caatinga**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/Caatinga>> Acesso em: 23 nov 2022.

BRENCHLEY, J. M.; DOUEK, D. C. Microbial Translocation Across the GI Tract. **Annual Reviews of Immunology**, v. 30, p. 149–173, 2012.

BRUNO-BARCENA, J. M.; AZCARATE-PERIL, M. A. Galacto-oligosaccharides and colorectal cancer: Feeding our intestinal probiome. **Journal of functional foods**, v. 12, p. 92-108, 2014.

CARDING, S. *et al.* Dysbiosis of the gut microbiota in disease. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, 2015.

CARVALHO-RAMOS, *et al.* Aleitamento aumenta a resiliência da comunidade microbiana. **Jornal de Pediatria**, v. 94, n. 3, p. 258-267, 2018.

CARVALHO *et al.* Nutritional potential and bioactive compounds of xique-xique juice: An unconventional food plant from Semiarid Brazilian. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45: e15265, 2021.

CLARKE, G.; *et al.* Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions. **Pharmacological Reviews**; v. 71, p.198-224, 2019.

CLEMENTE, J. C.; URSELL, L. K.; PARFREY, L. W.; KNIGHT, R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1258–1270, Mar. 2012. DOI 10.1016/j.cell.2012.01.035.

CHUANG, C. C.; MCINTOSH, M. K. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. **Annual Review of Nutrition**, v. 31, p. 155–176. 2011.

COELHO, E. M. *et al.* Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160-167, 2018.

COLLADO, M. C., *et al.* Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 23, p. 7767–7770, 2007.

COLLADO, M. C. *et al.* Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 23129, 2016.

COLLINS, S. L. *et al.* Promising prebiotic candidate established by evaluation of lactitol, lactulose, raffinose, and oligofructose for maintenance of a lactobacillus-dominated vaginal microbiota, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 5, p. 1–15, 2018.

COMAN, V.; VODNAR, D. C. Gut microbiota and old age: modulating factors and interventions for healthy longevity. **Experimental Gerontology**, v. 141, p. 1-18, 2020

COMISSION INTERNACIONALE DE L'ECLAIRAGE (CIE). **Colorimetry**. 2. ed. Viena: Central Bureau of the CIE, 1986. 78 p.

COSME, F.; INÊS, A.; VILELA, A. Consumer's acceptability and health consciousness of probiotic and prebiotic of non-dairy products. **Food Research International**, v. 151, n. 110842, p. 1–20, 2022.

CUEVA, C. *et al.* Interplay between dietary polyphenols and oral and gut microbiota in the development of colorectal cancer. **Nutrients**, v. 12, n. 625, p.1–19, 2020.

CUNNINGHAM, M., AZCARATE-PERIL, A. M., BARNARD, A. Shaping the future of probiotics and prebiotics. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 667-685, 2021.

DANTAS, A. *et al.* Current knowledge about physical properties of innovative probiotic spray-dried powders produced with lactose-free milk and prebiotics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 151, n. 112175, p. 1 –11, 2021.

DAS, B.; NAIR, G. B. Homeostasis and dysbiosis of the gut microbiome in health and disease. **Journal of Biosciences**, v. 44, n. 5, p. 1–8, 2019.

DE AZEVEDO RIBEIRO, R. C. *et al.* (2015). Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill extract as moisturizing agent. **Molecules**, 20(2), 2492–2509.

DIAS, G. E. N. *et al.* Acute Oral toxicity and anti-inflammatory activity of ethanolic Eextract from *Pilosocereus gounellei* (Fac Weber) in rats. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 7, n. 5, p. 1-6, 2015.

DING, R. *et al.* Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, p. 623 – 631, 2019.

DIXIT, K. *et al.* Restoration of dysbiotic human gut microbiome for homeostasis. **Life Sciences**, v. 278, p. 1-12, 2021.

DUDA-CHODAK, A. *et al.* Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. **European Journal of Nutrition**, v. 54, p. 325-341, 2015.

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

FAGNANT, H. S. *et al.* “Orally Ingested Probiotic, Prebiotic, and Synbiotic Interventions as Countermeasures for Gastrointestinal Tract Infections in Nonelderly Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis.” **Advances in nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 14, n. 3, p. 539-554, 2023.

FARIAS, P. D *et al.* Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 93, p. 23–35, 2019.

FERREIRA-LAZARTE, A. *et al.* *In vitro* digestibility of galactooligosaccharides: effect of the structural features on their intestinal degradation. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 67, p. 4662–4670, 2019.

FRAHER, M. H.; O'TOOLE, P. W.; QUIGLEY, E. M. M. Techniques used to characterize the gut microbiota: A guide for the clinician. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, vol. 9, n. 6, p. 312–322, 2012.

FREIRE, M.C.M.; PATTUSSI M.P. Tipos de estudos. IN: ESTRELA, C. Metodologia científica. Ciência, ensino e pesquisa. 3ª ed. Porto Alegre: **Artes Médicas**. P.109-127, 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, n. 1, p. 497-509, 1957.

GHOLIZADEH, P. *et al.* Microbial balance in the intestinal microbiota and its association with diabetes, obesity and allergic disease. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, p. 48-55, 2019.

GIBIINO, G. *et. Al.* Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals. **Digestive and Liver Disease**, vol. 50, n. 7, p. 635–639, 2018.

GIBSON, G. R. *et al.* Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, p. 259–275, 2004.

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

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401–1412, 1995.

GIONGO, A. *et al.* TaxCollector: Modifying current 16S rRNA databases for the rapid classification at six taxonomic levels. **Diversity**, v. 2, n. 7, p. 1015–1025, 2010.

GOMAA, E. Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 113, n. 12, p. 2019-2040, 2020.

GUERGOLETTTO, K. B. *et al.* *In vitro* fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, v. 196, p. 251-258, 2016.

HOLSCHER, H. D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. **Gut Microbes**, v. 8, n. 2, p. 172-184, 2017.

HONG, S. H. *et al.* Predicting microbial species richness. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 1, p. 117–122, 2006.

HU, X. *et al.* Stability of resveratrol esters with caprylic acid during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 276, p. 675-679, 2019.

HUTKINS, R. W. *et al.* Prebiotics: why definitions matter. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 1 – 7, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Biomass e sistema costeiro-marinho do Brasil: compatível com a escala 1:250.000**. Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. São Paulo, 168 p. (Relatórios metodológicos, v. 45).

JACKSON, M. I., JEWELL, M. I. Impact of fiber-bound polyphenols on gut microbiome metabolism is influenced by background diet. **The FASEB Journal**, v. 31, p. 792–23, 2017.

JANDHYALA, S. M. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8787, 2015.

JIAN, H., *et al.* *Akkermansia muciniphila* as a Next-Generation Probiotic in Modulating Human Metabolic Homeostasis and Disease Progression: A Role Mediated by Gut-Liver-Brain Axes? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3900, 2023.

KIM, Y. A.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity. *Nutrition Research Reviews*, v. 31, n. 1, p. 35-51, 2018.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. Plantas Alimentícias Não-Convencionais (PANC) no Brasil: Guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. **Instituto Platarum de Estudos da Flora**, 2014.

LIBERATO, P. S.; LIMA, D. V. T.; SILVA, G. M. B. PANCs - Plantas Alimentícias Não Convencionais e seus benefícios nutricionais. **Environmental Smoke**. ISSN: 2595-5527. V. 2, n. 2, p. 102-111, 2019.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

LIMA, R. S. *et al.* May the superfruit red guava and its processing waste be a potential ingredient in functional foods? **Food Research International**, v. 115, p. 451-459, 2019.

LIU, P. *et al.* The role of short-chain fatty acids in intestinal barrier function, inflammation, oxidative stress, and colonic carcinogenesis. **Pharmacological Research**, v. 165, n. 105420, p. 1–11, 2021.

LLANO, D. G. I. *et al.* Reciprocal beneficial effects between wine polyphenols and probiotics: an exploratory study. **European Food Research and Technology**, v. 243, p. 531–538, 2017.

LUCENA, C. M. *et al.* Conhecimento local sobre cactáceas em comunidades rurais na mesorregião do sertão da Paraíba (Nordeste, Brasil). **Biotemas**, v. 25, p. 279-291, 2012.

LUCENA, C. M. *et al.* Use and knowledge of Cactaceae in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, p. 1-23, 2013.

MACHADO, A. *et al.* **Microbiota Intestinal** – Evidências de sua influência na saúde e na doença. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Rubio. 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, n. 1, 2016.

MARTINEZ-GUTIERREZ, F. *et al.* Potential use of *Agave salmiana* as a prebiotic that simulates the growth of probiotic bacteria. **LWT – Food Science and Technology**, v.84, p.151-159, 2017.

MASSA, N. M. L. et al. Effects of digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg) by-product on growth and metabolism of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* indicate prebiotic properties. **LWT – Food Science and Technology**, v. 131, p. 1-8, 2020.

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

MINOT, S. et al. MaLiAmPi enables generalizable and taxonomy-independent microbiome features from technically diverse 16S-based microbiome studies. **Cell reports methods**, v. 3, n. 11, p. 100639, 2023.

MONTEIRO, E. R. et al. Genetic diversity and structure of populations in *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) (Cactaceae) in the Caatinga biome as revealed by heterologous microsatellite primers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 58, p. 86-96, 2015.

MOORTHY, M. et al. Prebiotic potential of polyphenols, its effect on gut microbiota and anthropometric/clinical markers: A systematic review of randomized controlled trials. **Trends in Food Science & Technology**, v. 99, p. 634–649, 2020.

MOSELE, J. I., MACIÀ, A., MOTILVA, M. J. Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: a review. **Molecules**, v. 20, p. 17429–17468, 2015.

NAGPAL, R. et al. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. **Nutrition and Healthy Aging**, v. 4, n. 4, p. 267–285, 2018.

NASCIMENTO, P. R., JUNIOR, M. R. M. Probiotics and Prebiotics in Foods. **Challenges, Innovations, and Advances**, v. 94, p. 13–46, 2021.

NASCIMENTO, V. T. et al. Chemical characterization of native wild plants of dry seasonal forests of the semi-arid region of northeastern Brazil. **Food Research International**, v.44, p. 2112-2119, 2011.

NEPOMUCENO, N. C. et al. Extraction and characterization of cellulose nanowhiskers from Mandacaru (*Cereus jamacaru* DC.) spines. **Cellulose**, v. 24, n. 1, p. 119–129, 2017.

OLIVEIRA, A. M. et al. Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 289-297, 2018.

PADILHA, C. V. S. et al. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, v. 228, p. 106-115, 2017.

PATCHARATRAKUL, T.; GONLACHANVIT, S. Chili peppers, Curcumins, and Prebiotics in Gastrointestinal Health and Disease. **Current Gastroenterology Reports**, v. 18, n.19, 2016.

PEREDO-LOVILLO, A.; ROMERO-LUNA, H. E.; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, M. Health promoting microbial metabolites produced by gut microbiota after prebiotics metabolism. **Food Research International**, v. 136, p. 109473, 2020.

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.

RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 42-46, 2015.

REZENDE, E. S. V.; LIMA, G. C.; NAVES, M. M. V. Dietary fibers as beneficial microbiota modulators: A proposal classification by prebiotic categories. **Nutrition**, v. 89, n. 111217, p. 1–9, 2021.

RIBEIRO, T. S. *et al.* *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. **3 Biotech**, v. 10, n. 10, p. 1-9, 2020.

RIBEIRO, E. M. S.; MEIADO, M. V.; LEAL, I. R. The role of clonal and sexual spread in cacti species dominance at the Brazilian Caatinga. **Gaia Scientia**, v. 9, n. 2, p. 27-33, 2015.

RICARDO *et al.* Reference collection of plant phytoliths from the Caatinga biome, Northeast Brazil. **Flora**, v. 249, p. 1-8, 2018.

RINNINELLA, E. *et al.* What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 14, 2019.

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.

RODRIGUES, D. R. *et al.* Phenotypic, genetic and symbiotic characterization of *Erythrina velutina* rhizobia from Caatinga dry forest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 503–512, 2018.

ROOKS, M. G.; GARRETT, W. S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 6, p. 341–352, 2016.

SAAD, N. *et al.* An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p. 1-16, 2013.

SÁENZ, C.; SEPÚLVEDA, E.; MATSUHIROB, B. *Opuntia* spp mucilage's: a functional componente with industrial perspectives. **Journal of Arid Environments**, v. 57, p. 275–290, 2004.

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

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

SARANGI, A. N.; GOEL, A.; AGGARWAL, R. Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 9, n. 1, p. 62–73, 2019.

SAYERS, B., WIJESEKERA, A., GIBSON, G. Exploring the potential of prebiotic and polyphenol-based dietary interventions for the alleviation of cognitive and gastrointestinal perturbations associated with military specific stressors. **Journal of Functional Foods**, v. 87, n. 104753, p. 1–15, 2021.

SILVA, V. A. Diversidade de uso das cactáceas no Nordeste do Brasil: uma revisão. **Gaia Scientia**, v. 9, n. 2, p. 137-154, 2015.

SILVA, A. A. *et al.* Physical and physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.)) fruit. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 5, p. 1969-1980, 2018.

SILVA, J. M. *et al.* Passion fruit-flavored ice cream processed with water-soluble extract of rice byproduct: What is the impact of the addition of different prebiotic components? **LWT - Food Science and Technology**, v. 128, n. 109472, p. 1–8, 2020.

SILVA, J. Y. P. *et al.* Revealing the Potential Impacts of Nutraceuticals Formulated with Freeze-Dried Jabuticaba Peel and *Limosilactobacillus fermentum* Strains Candidates for Probiotic Use on Human Intestinal Microbiota. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-17, 2023.

SNELSON, M., KELLOW, N. J., COUGHLAN, M. T. Modulation of the gut microbiota by resistant starch as a treatment of chronic kidney diseases: evidence of efficacy and mechanistic insights. **Advances in Nutrition**, v. 10, p. 303–320, 2019.

SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota-masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 227–238, 2013.

SOUZA, E. L. *et al.* Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health promoting properties and food functionalities – A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1645–1659, 2019.

STOJANOV, S. *et al.* The influence of probiotics on the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1715, 2020.

TIAN, T. *et al.* Chemical characterization of potentially prebiotic oligosaccharides in brewed coffee and spent coffee grounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 2784–2792, 2017.

TSAI, Y. L. *et al.* Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 1, p. 3, 2019.

TULER, A. C. *et al.* Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs) na comunidade rural de São José da Figueira, Durandé, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 70, 2019.

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.

WILKINS, L. J.; MONGA, M.; MILLER, A. W. Defining Dysbiosis for a Cluster of Chronic Diseases. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019. .

YO, D. *et al.* Influence of prebiotic biopolymers on physicochemical and sensory characteristics of yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 115, n. 104915, 2021.

YOUNGE, N. *et al.* Fetal exposure to the maternal microbiota in humans and mice. **JCI Insight**, v. 4, n. 19, 2019.

WU, Q. *et al.* Potential effects of antibiotic-induced gut microbiome alteration on blood–brain barrier permeability compromise in rhesus monkeys. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1470, n. 1, p. 14-24, 2020.

ZHAO, M. *et al.* Immunological mechanisms of inflammatory diseases caused by gut microbiota dysbiosis: A review. **Biomed Pharmacotherapy**, v. 164, n. 114985, 2023.

APÊNDICE

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor(a)

Você está sendo convidado(a) a participar, voluntariamente do estudo “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREBIÓTICO DO LIOFILIZADO DE XIQUE-XIQUE (*Pisolocereus gounellei*) EM SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO *IN VITRO*”.

Trata-se de um estudo em nível de mestrado vinculado a uma pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal da Paraíba. O estudo tem por objetivo avaliar o efeito prebiótico de um pó liofilizado da polpa do xique-xique, assim como seus efeitos sobre o conteúdo de compostos fenólicos, açúcares e produção de ácidos orgânicos. O estudo está sendo desenvolvido pela aluna mestranda Sabrina Radames Ferreira da Silva, sob orientação do professor Doutor Evandro Leite de Souza. Os resultados obtidos nessa pesquisa servirão de base para definir os efeitos prebióticos do pó liofilizado da polpa do xique-xique.

Solicitamos a sua colaboração para realizar a doação de material fecal, o qual será colhido no referido dia e armazenado em frasco anaeróbio cedido pelos envolvidos na pesquisa, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e, eventualmente, publicação em revista científica. Informamos que jamais divulgaremos seu nome e que essa pesquisa não oferece riscos previsíveis para a sua saúde. Seus dados serão manuseados somente pelos pesquisadores e não será permitido o acesso a outras pessoas.

Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Esclarecemos que sua participação é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelos pesquisadores. Caso decida não participar do estudo ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, o(a) senhor(a) não sofrerá nenhum dano. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

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

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura da Testemunha

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para a pesquisadora responsável pela pesquisa: Sabrina Radames Ferreira da Silva - (83) 998308252.

Endereço (Setor de Pesquisa): Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I - Cidade Universitária - CEP 58051-900 - João Pessoa - PB Telefone: (83) 3216- 7807.

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba Campus I - Cidade Universitária - 1º Andar – CEP 58051-900 – João Pessoa/PB (83) 3216-7791 – E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

APÊNDICE B – ARTIGO

Freeze-dried *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum. Bly. Ex Rowl) cladodes acting as a potential prebiotic to enhance the composition and metabolic activity of human intestinal microbiota

Abstract

Pilosocereus gounellei A. Weber ex K. Schum. Bly. Ex Rowl, popularly known as xique-xique, is a cactus native to the Brazilian Caatinga biome and is considered a non-conventional food plant. This study evaluated the physicochemical, nutritional, antioxidant capacity, and potential prebiotic effects on human intestinal microbiota of freeze-dried *P. gounellei* cladodes (FDPg) during 48 h of *in vitro* colonic fermentation using a pooled human fecal inoculum. FDPg had a high nutritional value, the presence of bioactive compounds, such as dietary fibers, chlorophyll, and phenolic compounds, and antioxidant capacity. The colonic fermentation of FDPg promoted an increase in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, higher bacterial diversity, and an increase in the relative abundance of bacterial groups considered beneficial, such as *Mitsuokella*, *Bacteroides*, *Megasphaera*, and *Acidaminococcus*, and a decrease in the relative abundance of bacterial groups considered non-beneficial, such as *Succinivibrio*, *Citrobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Faecalibacterium*, and *Blautia*. Still, the colonic fermentation of FDPg induced the production of various metabolites related to host health promotion, including short-chain fatty acids, branched-chain fatty acids, organic acids, and amino acids, besides maintaining antioxidant capacity. The effects induced by FDPg on the composition and metabolic activity of the intestinal microbiota during colonic fermentation indicate prebiotic properties. The results characterize FDPg as an ingredient from Caatinga biome with potential prebiotic properties on human intestinal microbiota, which can be used to develop innovative products with functional and added-value properties. More *in vitro* and *in vivo* studies are needed to evaluate safety and effective doses, to improve the use of this ingredient in the prevention and treatment of diseases.

Keywords: Cactaceae, xique-xique, intestinal microbiota, antioxidant activity, colonic fermentation.

1. Introduction

The Caatinga is an exclusive biome from Brazil and is characterized by a hot and dry climate, with a great diversity of plant species adapted to low water availability, including cacti (Lucena et al., 2012; Ribeiro et al., 2015). Several cacti species are recognized as unconventional food plants, such as *Pilosocereus gounellei*, *Napalea cochenilifera*, *Opuntia ficus-indica*, *Pereskia aculeata*, *Cereus hildmannianus*, *Hylocereus lemaire*, and *Hylocereus undatus* (Kinuppi; Lorenzi, 2014). *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum. Bly. Ex Rowl), cactaceae, popularly known as xique-xique, is a species native to the Caatinga biome, which has been studied for its nutritional characteristics (Bezerril et al., 2021), presence of bioactive compounds (Maciel et al., 2016; Silva et al., 2018; Carvalho et al., 2021), and antioxidant capacity (Maciel et al., 2016; Silva et al., 2018). Additionally, it has been reported to possess antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic effects (Oliveira et al., 2018). Early studies have also demonstrated that *P. gounellei* supplementation is safe and reduces insulin resistance, inflammation, oxidative stress, and cardio-metabolic risk in rodents (Assis et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Oliveira et al., 2020).

Prebiotics are defined as "substrates selectively utilized by host microorganisms conferring health benefits" (Gibson et al., 2017). Prebiotics are not the only dietary components capable of affecting the intestinal microbiota but are the only components capable of promoting selective effects on specific beneficial microbial groups forming the intestinal microbiota (Holscher, 2017). A previous study demonstrated that a freeze-dried juice from *P. gounellei* cladodes exerted selective stimulatory effects on the growth of probiotic strains in a laboratory medium, suggesting a putative potential prebiotic effect mainly related to its content of dietary fibers and phenolic compounds (Ribeiro et al., 2020). However, investigations on the prebiotic effects of *P. gounellei* on human intestinal microbiota are still scarce or nonexistent.

Dietary fibers and phenolic compounds present in the diet have low bioavailability and reach the colon to interact with the resident microbiota, being extensively metabolized in the large intestine. The interaction with dietary fibers and phenolic compounds can direct important modulatory effects on the composition and metabolic activity of the intestinal microbiota (Gibson et al., 2017), with the production of various absorbable metabolites, such as phenolic metabolites and short-chain fatty acids, linked to beneficial local and systemic health effects (Alves-Santos et al., 2020).

This study aimed to evaluate the physicochemical and nutritional characteristics, antioxidant capacity, and potential prebiotic effects of freeze-dried *P. gounellei* cladodes through measurements of its impacts on the composition and metabolic activity of human

intestinal microbiota during an *in vitro* colonic fermentation using a pooled human fecal inoculum.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material

The xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) (supplementary material, Fig. S1) was collected from a privately owned regional cultivation area (Boa Vista, PB, Brazil; 07°15'32" S 36°14'24" W). The plant material was botanically identified by Prof. Leonardo Person Felix (Center for Agricultural Sciences, Federal University of Paraíba, Areia, PB, Brazil), and a specimen was deposited in the Jaime Coelho Morais Herbarium (Center for Agricultural Sciences, Federal University of Paraíba) under accession number 17,562. The collection of the plant material was recorded in the Brazilian Biodiversity Information System (SISBIO; number 62681), as well as in the National System for Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SISGEN; number AA17429).

Initially, the spines were manually removed from the cladodes, and those showing physical integrity and absence of visible signs of infection were selected. The selected cladodes were washed in potable running water and sanitized by immersion in chlorinated water (150 ppm, 15 min), followed by rinsing in potable running water. From each cladode, the vascular cylinder was separated from the central stem. The central stems were discarded, and the vascular cylinders were separated into hermetically sealed bags, wrapped in aluminum foil, and stored under freezing (-20 ± 1 °C). The frozen material was freeze-dried using a benchtop freeze-dried (Liotop, São Carlos, SP, Brazil; temperature -55 ± 2 °C, vacuum pressure < 138 µHg, lyophilization speed 1 mm/h, approximately 27 h), sieved with a fine mesh (particle size < 1 mm), and stored in sterilized glass jars wrapped in aluminum foil under refrigeration (4 ± 0.5 °C) for a maximum period of 15 days until use in the experiments.

2.2 Determination of physicochemical and nutritional parameters of freeze-dried *P. gounellei* cladodes

The physicochemical parameters of freeze-dried *P. gounellei* (FDPg) were determined using standard procedures (AOAC, 2019), to cite: pH using a pHmeter (Quimis®, Q400AS, São Paulo, SP, Brazil); water activity (a_w) using an AquaLab® instrument (Model 4TEV, Meter®, São José dos Campos, SP, Brazil); total titratable acidity by titration using phenolphthalein as an indicator; and ash content by incineration in a muffle furnace at 550 °C until constant weight. Mineral determination was performed using an atomic emission

spectrometer with inductively coupled plasma (AOAC, 2019). Chlorophyll determination was carried out according to a previously described method (Lichtenthaler, 1987), where 2 g of the sample were weighed and added to 25 mL of 80% acetone, followed by filtration into a 25 mL flask and volume completion with the same solvent. Readings were taken on a spectrophotometer (SpectraMax M2) at wavelengths of 647 nm and 663 nm for chlorophyll, using the values obtained to quantify chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, respectively. Only 80% acetone was used for the blank. Color analysis was performed using a Minolta CR-2000 colorimeter (Minolta Limited, Milton Keynes, United Kingdom) (CIE, 1986). Protein content was determined by the Kjeldahl method, with a conversion factor of 5.75 for vegetable samples. Lipid content was determined by cold extraction with chloroform-methanol solution (2:1) (Folch, Less & Stanley, 1957). Total, soluble, and insoluble fiber determination was carried with an enzymatic-gravimetric assay kit (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) (AOAC, (1995).

The determination of sugars (maltose, glucose, and fructose) and organic acids (citric acid, formic acid, malic acid, and succinic acid) was performed using the high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. Initially, an aqueous extract was prepared with 1 g of FDPg homogenized with 20 mL of ultrapure water (Milli-Q® Integral Water Purification System, EMD Millipore, Billerica, MA, USA) for 10 min using a Turratrec apparatus (Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil). The mixture was centrifuged (MPW® 351R refrigerated centrifuge, Warsaw, Poland; rotor 11457; RCF 10732 x g; radius 9.6 cm; angle 30°; 4000 rpm) (1696 x g, 15 min, 4 °C), and the supernatant was filtered with a 0.45 µm filter (Whatman®, GE Healthcare, Chicago, IL, USA). An LC 1260 Infinity chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) operating under previously described analytical conditions was used for the separation and quantification of sugars (Padilha et al., 2017). The results were expressed as g/100g.

The identification of phenolic compounds was performed using the HPLC technique. Initially, a methanolic extraction was carried out, where approximately 2 g of FDPg were acidified with 0.1 M HCl (Neon, São Paulo, SP, Brazil) to reach pH 2 and mixed with 20 mL of methanol, followed by treatment with ultrasound (60 min, 37 kHz, 30 °C) (Ultrasonic, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil). The solutions were centrifuged (4000 x g, 15 min, 4 °C), and the supernatants were filtered with 0.45 µm pore size filters (Whatman®). An Agilent 1260 Infinity LC System liquid chromatograph operating under previously described analytical conditions was used for the separation and quantification of phenolic compounds (Padilha et al., 2017). The results were expressed as mg/100g.

2.3 Determination of the antioxidant capacity of FDPg

The antioxidant capacity was evaluated through the scavenging of the DPPH[•] radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Silva et al., 2023), trolox equivalent antioxidant capacity by capturing the ABTS^{•+} radical (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) (Silva et al., 2023), and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for the reduction of the TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) complex with Fe³⁺ (Silva et al., 2023). To obtain the sample extract, 2 g of FDPg were diluted in 20 mL of 80% methanol extraction solution. The tube was wrapped in aluminum foil, stored under refrigeration (4 ± 0.5 °C) for 24 h, centrifuged ($1696 \times g$, 10 min, 4 °C), and the supernatant was used for antioxidant capacity determination.

The antioxidant capacity determined using the DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals was estimated using a Trolox standard curve (50 - 2000 μ M), and the results were expressed in Trolox equivalent micromoles per gram of sample (μ mol/g). The antioxidant capacity determined with the FRAP method was estimated using a ferrous sulfate standard curve (50 - 2000 μ M), and the results were expressed in micromoles of ferrous sulfate per gram of sample (μ mol FeSO₄/g). Absorbance measurements for the DPPH[•], ABTS^{•+}, and FRAP methods were performed using a microplate spectrophotometer (BioTek Eon, Winooski, VT, USA) at 734 nm, 517 nm, and 595 nm, respectively (Sampaio et al., 2022).

2.4 Simulated gastrointestinal digestion of FDPg

The FDPg was subjected to simulated gastrointestinal digestion conditions immediately after freeze-drying. Initially, 5 g of FDPg were rehydrated with 25 mL of sterilized distilled water (25 ± 0.5 °C) and homogenized for 15 min. To simulate the oral condition, α -amylase (100 U/mL of α -amylase diluted in 1 mM CaCl₂) was added, and the pH was adjusted to 6.9 with sodium bicarbonate (NaHCO₃, 1 M) under manual agitation for 2 min. To simulate the gastric condition, the pH was adjusted to 2.0 using 1 M HCl, and pepsin (25 mg of pepsin diluted in 1 mL of 0.1 M HCl) was added and maintained at 37 ± 0.5 °C for 60 min under agitation ($2 \times g$, 60 min). The duodenal and ileal conditions were simulated by adding intestinal solution (2 g of pancreatin/L of 0.1 M NaHCO₃ and 12 g of bovine bile salts/L of 0.1 M NaHCO₃) with pH adjusted to 6.5 with 1M NaHCO₃ and incubated at 37 ± 0.5 °C for 90 min under mechanical agitation ($0.3 \times g$, 90 min) (Sampaio et al., 2022). All enzymes and reagents used for *in vitro* gastrointestinal digestion were acquired from Sigma-Aldrich.

The resulting fluid from digestion was placed in a regenerated cellulose dialysis tube (molecular weight cutoff of 1 kDa, *Spectra/Por* 6, *Spectrum Europe*, Netherlands) and dialyzed with 0.01 M NaCl (5 ± 0.5 °C) for 18 h. The pre-digested dialyzed samples were freeze-dried

and stored under refrigeration (5 ± 0.5 °C) for a maximum period of one week until use in *in vitro* colonic fermentation assays.

2.5 *In vitro* colonic fermentation of FDPg

The experimental procedures for colonic fermentation were approved by a Human Research Ethics Committee (Health Sciences Center, Federal University of Paraíba; protocol 5,906,607; CAAE: 66834523.7.0000.5188). Fresh fecal samples were donated by six healthy adult volunteers [three men and three women, aged between 19 and 40 years, with a normal body mass index (≤ 18.5 - >25 kg/m²)] who declared, for inclusion criteria, to follow an omnivorous diet without using concentrated probiotic or prebiotic foods for at least six months, not to have pathologies in the large intestine, not to have used antibiotics, proton pump inhibitors, or any other controlled medication in the last six months; not to consume alcohol regularly, and not to be a smoker. Fecal samples were collected within 30 min after excretion and mixed in equal amounts of feces from each volunteer (1:1:1:1:1:1 w/w), diluted in sterile phosphate-buffered saline solution (PBS; 0.1 M; pH 7.4), and homogenized for 2 min with manual agitation. The mixture was filtered through a triple layer of sterilized gauze to remove large particles (Albuquerque et al., 2021; Menezes et al., 2021).

The culture medium (1 L) used in the fermentation was composed of 4.5 g NaCl, 4.5 g KCl, 1.5 g NaHCO₃, 0.69 g MgSO₄, 0.8 g L-cysteine, 0.5 g KH₂PO₄, 0.4 g bile salt, 0.08 g CaCl₂, 0.005 g FeSO₄, 1 mL Tween 80, and 4 mL resazurin solution (0.025%, v/v) as an anaerobic indicator, which were diluted in distilled water and sterilized by autoclaving (121 °C, 1 atm, 15 min) (Sampaio et al., 2022). The final volume of the fermentation was composed of 40% sterilized fermentation medium (v/v), 40% fecal inoculum (v/v), and 20% pre-digested FDPg (w/v). The fermentation occurred under anaerobic conditions (AnaeroGen®) for 48 h at 37 ± 0.5 °C (Albuquerque et al., 2021; Menezes et al., 2021). A medium with FOS (20% w/v, standard prebiotic ingredient) (Gibson et al., 2017; Sanders et al., 2019) was prepared as a positive control, and another medium without fermentable substrate was used as a negative control (Guergoletto et al., 2016; Rodrigues et al., 2016). The ingredients used to formulate the pre-culture and fermentation media were obtained from Sigma-Aldrich.

2.6 *Monitoring of microbial metabolic activity and changes in antioxidant capacity during in vitro colonic fermentation*

At zero, 24, and 48 h of *in vitro* colonic fermentation, aliquots of the medium were taken for pH measurement, following the procedure described in section 2.2. At the same

fermentation times, the antioxidant capacity of the fermentation media was determined using the ABTS^{•+}, DPPH[•], and FRAP assays, as described in section 2.3.

At zero and 48 h of *in vitro* colonic fermentation, the global metabolite profiling was determined using the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) technique. Aliquots (2 mL) of the fermentation medium were withdrawn, diluted in a solution with standard HPLC methanol (CH₃OH) and deuterated water (D₂O) (1:1:1, v/v), centrifuged (MPW®, 1696 × g, 10 min, 4°C), and filtered with a cellulose ester membrane (0.45 µm, Millipore®). From the resulting solution, an aliquot (550 µL) was transferred to a quantitative tube (5 mm × 177.8 mm) and analyzed using a Bruker Ascend 400 instrument, operating at 400 MHz for ¹H NMR and 100 MHz for ¹³C NMR (Bruker, Billerica, MA, USA). The parameters used to obtain the spectrum sequence were: lc1pngpf2, temperature 26 °C, number of scans 64, Dummer sweep 4, receiver gain 36, and acquisition time 2.04 s. The intensities of the regions were used for relative quantification of metabolites. The spectra were processed using Bruker TopSpin 4.1.1 software. The regions corresponding to CH₃OH and D₂O were suppressed from the analysis (Hu et al., 2019).

2.7 Monitoring of changes in intestinal microbiota during *in vitro* colonic fermentation

At zero and 48 h of *in vitro* colonic fermentation, aliquots of the distinct media were taken for determination of bacterial diversity with high-throughput sequencing of the 16S rRNA V3/V4 region using 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG) and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) primers. The 16S rRNA libraries were sequenced using the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) with the standard Illumina primers provided in the kit, employing 300 cycles for paired-end sequencing with 200 bp. Following sequencing, FASTQ files underwent quality filtering, including the removal of truncated and low-quality reads (Phred score < 20) using the Trimmomatic tool. Subsequently, sense and antisense paired reads were merged into contigs, and singletons and chimeras were discarded. Taxonomic Operational Units (OTUs) were delineated using Uchime v. 4.2.40 and Vsearch v 2.22.1 (97% identity), and taxonomic assignments were made by aligning the sequences against the SILVA database with 97% similarity. All 16S rRNA Illumina amplicon sequencing data from this study are publicly available in the Sequence Read Archive (SRA) of The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (accession number PRJNA1076928).

2.8 Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate on three independent experiments. Results were expressed as average $\pm$ standard deviation. The Kolmogorov-Smirnov test was conducted to assess the normal distribution of the data. Student's *t*-test, one-way or two-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's test was used to assess differences among the data obtained, considering a *p*-value of < 0.05 . Statistical analysis was performed using SigmaStat 3.5 software (Jandel Scientific Software, San Jose, CA, USA).

3 Results

3.1 Physicochemical and nutritional characteristics and antioxidant capacity of FDPg

The FDPg had a neutral pH (6.90 ± 0.15) and low a_w (0.32 ± 0.01), with ash content (0.24%) and acidity (2.23%) being low. FDPg had a higher content of chlorophyll *a* (6.04 ± 0.05 $\mu\text{g/g}$) compared to chlorophyll *b* (3.22 ± 0.14 $\mu\text{g/g}$), a dark green-yellowish color (L^* : 45.87 a^* : -3.10, b^* : 8.25), a high protein content (7.64 ± 0.33 g/100g) as a plant-based product, and a higher content of insoluble fiber (29.96 ± 0.58 g/100g) than soluble fiber (13.45 ± 0.42 g/100g) (Table 1).

Regarding the mineral profile, FDPg had higher contents of potassium (3575.63 ± 115.26 mg/100g), calcium (3196.16 ± 39.67 mg/100g), and magnesium (1737.26 ± 41.76 mg/100g), along with the presence of sodium (359.73 ± 11.48 mg/100g), manganese (144.28 ± 0.75 mg/100g), phosphorus (72.18 ± 3.14 mg/100g), iron (16.38 ± 0.16 mg/100g), zinc (16.18 ± 0.44 mg/100g), copper (1.79 ± 0.01 mg/100g), and cobalt (0.30 ± 0.01 mg/100g) (Table 1).

Two monosaccharides (glucose and fructose) and one disaccharide (maltose) were detected in FDPg, with maltose (200.76 ± 0.08 g/100g) being the predominant sugar. Citric, formic, malic, and succinic acids were detected in FDPg, with citric acid found with the highest contents (1512.18 ± 0.23 g/100g). Among the flavonoids detected in FDPg (epigallocatechin gallate, procyanidin B2, and catechin), epigallocatechin gallate was found in the highest contents (1782.54 ± 0.71 mg/100g). FDPg exhibited antioxidant capacity when measured by either DPPH $^{\bullet}$, ABTS $^{+\bullet}$, or FRAP method (Table 1).

3.2 Changes in pH, content of phenolic compounds, and antioxidant capacity during in vitro colonic fermentation

The medium containing FDPg and FOS had a reduction in pH values at 24 h of colonic fermentation ($p < 0.05$), followed by no change at 48 h of colonic fermentation ($p \geq 0.05$). On the other hand, there was no pH alteration in NC over 48 h of colonic fermentation. The pH values in the medium containing FDPg were lower than those found in the medium containing

FOS and NC at 24 and 48 h of colonic fermentation ($p < 0.05$) (Supplementary material data, Table S1).

The contents of catechin, epigallocatechin gallate, procyanidin B2, myricetin, and kaempferol-3-glucoside decreased in the medium containing FDPg over 48 h of colonic fermentation ($p < 0.05$). Only the content of epicatechin increased during colonic fermentation ($p < 0.05$) (Supplementary material data, Table S2). Overall, the antioxidant capacity was higher in the medium containing FDPg compared to the medium containing FOS and NC during colonic fermentation when assessed with the FRAP method ($p < 0.05$), while it did not differ when measured with the ABTS^{•+} method ($p \geq 0.05$). The antioxidant capacity of the medium containing FDPg increased during colonic fermentation measured with the FRAP method ($p < 0.05$). The antioxidant capacity in the medium containing FOS was not altered during colonic fermentation when measured with ABTS^{•+} and DPPH[•] methods ($p \geq 0.05$) (Table 2).

3.3 Changes in the intestinal microbiota during *in vitro* colonic fermentation

The medium containing FOS had a reduced microbial diversity (Shannon index) after 48 h of colonic fermentation compared to the medium containing FDPg and NC ($p < 0.05$), which did not change microbial diversity during colonic fermentation ($p \geq 0.05$). The medium with FDPg had higher microbial diversity than the medium containing FOS and NC after 48 h of colonic fermentation ($p < 0.05$). Additionally, the medium containing FDPg had a reduced microbial richness (Chao1 index) compared to the medium with FOS and NC after 48 h of colonic fermentation ($p < 0.05$). The *Firmicutes* to *Bacteroidetes* ratio (F/B ratio) increased in the medium containing FOS and NC after 48 h of colonic fermentation ($p < 0.05$), while did not change in the medium containing FDPg ($p \geq 0.05$).

The changes in the composition of the microbial community in the media containing FDPg, FOS, and NC at zero and 48 h of colonic fermentation were determined considering phyla [Fig. 2A and Supplementary material data (Table S3)] and bacterial genera [Fig. 2B and Supplementary material data (Table S4)]. The relative abundance of bacterial phyla and genera varied among the media and colonic fermentation times evaluated. The dominant phyla in all fermentation media were *Proteobacteria* (20.25 - 71.46%), *Firmicutes* (31.80 - 60.88%), *Bacteroidetes* (2.69 - 37.75%), *Fusobacteriota* (0.01 - 4.19%), *Desulfobacterota* (0.16 - 4.59%), *Actinobacteriota* (0.34 - 1.27%), *Verrucomicrobiota* (0.11 - 1.04%), and *Elusimicrobiota* (0.03 - 0.11%), representing >95% of the total relative abundance. There was an increase in the relative abundance of the phyla *Proteobacteria* in all media during colonic fermentation (zero vs. 48 h) ($p < 0.05$), especially in the media containing FDPg (29.58 vs.

33.50%) and FOS (20.25% vs. 71.46%). NC had the lowest relative abundance of *Proteobacteria* at 48 h of colonic fermentation. The relative abundance of the phyla *Firmicutes* increased in the medium containing FDPg at 48 h of colonic fermentation ($p < 0.05$), while it decreased in the medium containing FOS ($p < 0.05$).

The relative abundance of phyla *Bacteroidetes* decreased in all media at 48 h of colonic fermentation ($p < 0.05$), with the greatest decrease in the medium containing FDPg. The relative abundance of phyla *Fusobacteriota* was not altered in the medium containing FDPg and NC during colonic fermentation ($p \geq 0.05$), while it increased in the medium containing FOS ($p < 0.05$). The relative abundance of the phyla *Desulfobacterota* increased in NC after 48 h of colonic fermentation ($p < 0.05$) and was not altered in the media containing FDPg and FOS ($p \geq 0.05$). The relative abundance of the phyla *Actinobacteriota*, *Verrucomicrobiota*, and *Elusimicrobiota* was not altered during colonic fermentation regardless of the media ($p \geq 0.05$).

The analysis of the relative abundance of bacterial taxonomic groups showed that the genus *Pseudomonas* had a higher relative abundance in the medium containing FOS (45.08%) compared to the medium containing FDPg (0.03%) and NC (0.37%) after 48 h of colonic fermentation ($p < 0.05$). On the other hand, the relative abundance of the genus *Mitsuokella* (34.81%) increased in the medium containing FDPg after 48 h of colonic fermentation, decreased in NC ($p < 0.05$), and was not altered in the medium containing FOS ($p \geq 0.05$). The genus *Prevotella_9* was more abundant (24.58%) in the medium containing FDPg after 48 h of colonic fermentation compared to the medium containing FOS (0.87%) and NC (0.41%) ($p < 0.05$).

The relative abundance of the genus *Succinivibrio* decreased in all media after 48 h of colonic fermentation ($p < 0.05$); however, the greatest decrease occurred in the medium containing FOS. NC had a higher relative abundance of the genera *Citrobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Faecalibacterium*, and *Blautia* after 48 h of colonic fermentation compared to the media containing FDPg and FOS ($p < 0.05$), where the relative abundance of these genera were reduced ($p < 0.05$). The greatest reductions in the relative abundance of *Escherichia-Shigella*, *Faecalibacterium*, and *Blautia* occurred in the medium containing FDPg.

The relative abundance of the genus *Clostridium sensu stricto 1* (0.91% - 6.28%) was higher in NC after 48 h of colonic fermentation compared to the media containing FOS (2.80% - 3.77%) and FDPg (0.67% - 0.04%) ($p < 0.05$), where the relative abundance of this genus was not altered ($p \geq 0.05$). The medium containing FDPg had a lower relative abundance of *Clostridium sensu stricto 1* and the highest relative abundance of *Bacteroides* (17.27% vs.

3.87%), *Megasphaera* (7.07% vs 0.03%), and *Acidaminococcus* (2.67% vs. 0.08%) after 48 h of colonic fermentation compared to the medium with FOS ($p < 0.05$).

The relative abundance of the genus *Dialister* decreased only in the medium containing FDPg after 48 h of colonic fermentation ($p < 0.05$), while the relative abundance of the genus *Agathobacter* was reduced in the media containing FDPg and FOS ($p < 0.05$). Overall, the lowest relative abundances were found for the genera *Ruminococcus*, *Barnesiella*, *Subdoligranulum*, *Fusicatenibacter*, *Christensenellaceae R-7 group*, *Prevotella*, *Alistipes*, and [*Ruminococcus*] *torques group*, which were not altered in the different media evaluated during colonic fermentation ($p \geq 0.05$).

After 48 h of colonic fermentation, the genera *Mitsuokella*, *Prevotella_9*, *Succinivibrio*, *Bacteroides*, and *Acidaminococcus* were the most abundant in the medium containing FDPg, while the genera *Pseudomonas*, *Fusobacterium*, [*Eubacterium*] *ventriosum group*, *Romboutsia*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Escherichia-Shigella*, and *Faecalibacterium* were the most abundant in the medium containing FOS.

3.4 Changes in the global metabolic profile during in vitro colonic fermentation

The global metabolic profile in the media containing FDPg and FOS was evaluated at time zero and 48 h of colonic fermentation (Supplementary material data, Table S5). Fifty-seven different chemical constituents were identified, including short-chain fatty acids (propionate, isobutyrate, valerate, 3-hydroxybutyrate, and acetate), branched-chain fatty acids (n-butyrate, caprylate, isocaproate, isovalerate, and ketoisovalerate), organic acids (lactate, citrate, malonate, hydroxyisovalerate, succinate, and formate), sugars (fructose, α -xylose, β -xylose, β -glucose, α -glucose, D-galactose, and UDP-glucuronate), and amino acids (leucine, isoleucine, valine, 3-methyl-2-oxoisovalerate, 2-oxoisovalerate, threonine, alanine, lysine, ornithine, proline, glutamate, methionine, methylalanine, aspartate, asparagine, trimethylamine, glycine, tyrosine, phenylalanine, uracil, and tryptophan). Other classes of metabolites were also identified, such as total lipids, gamma-aminobutyric acid (GABA), bile acids, ethanol, acetone, putrescine, dihydroxyacetone, 5-aminosalicylate, N-acetyl-5-aminosalicylate, 2-methylbutyrate, phenylacetate, and hypoxanthine. The selection of ^1H NMR spectra identified in the media containing FDPg and FOS at 48 h of colonic fermentation is shown in Fig. 3.

Thirteen compounds were detected only in the medium containing FDPg (i.e., 3-hydroxybutyrate, threonine, asparagine, trimethylamine, putrescine, malonate, glycine, fructose, dihydroxyacetone, α -xylose, β -xylose, 3-hydroxyisovalerate, and gamma-

aminobutyric acid - GABA), which maintained the spectral signal during colonic fermentation (zero and 48 h). On the other hand, methylamine, methionine, citric acid, and aspartate were detected at 48 h of colonic fermentation only in the medium containing FDPg, while proline, glutamate, UDP-glucuronate, and total lipids were detected only in the medium containing FOS.

The amino acid alanine and total lipids were detected in the medium containing FOS at zero and 48 h of colonic fermentation and were not detected in the medium containing FDPg. The amino acids proline and glutamate were detected in the medium containing FOS at zero and 48 h of colonic fermentation and in the medium containing FDPg only at 48 h of colonic fermentation. Succinate and tyrosine were detected at zero and 48 h of colonic fermentation in the medium containing FDPg, while were detected only at zero time in the medium containing FOS. The other compounds were detected in the medium containing FDPg at zero and 48 h of colonic fermentation.

4 Discussion

The use of freeze-drying is one of the most effective drying techniques for preserving the nutritional characteristics and bioactive compounds in materials sensitive to high temperatures or oxygen exposure, besides contributing to the stability of the dehydrated material (Ciurzyńska et al., 2022). In the case of FDPg, its low acidity, neutral pH, and low a_w is noteworthy, with a_w values close to that previously reported for *P. gounellei* cladode flour (0.31 - 0.33) (Dourado et al., 2021). Low a_w values, typical of freeze-dried materials, are associated with enhanced microbiological and chemical stability in food products (Feitosa et al., 2018).

The ash content in FDPg was lower than that previously reported for *P. gounellei* jelly (2.6%) and juice (1.15%) (Bezerril et al., 2021; Carvalho et al., 2021). Ash content in foods directly reflects the presence of minerals (Bakari et al., 2017). FDPg had a variety of minerals, with notable contents of potassium, calcium, magnesium, sodium, and manganese. Based on the Dietary Reference Intakes (DRI) recommendations (Institute of Medicine, 2006), a 2 g portion of FDPg meets the daily manganese intake recommendation (2.3 mg for men and 1.8 mg for women), while a 25 g portion of FDPg meets the daily magnesium intake recommendation (420 mg for men and 320 mg for women).

FDPg had a higher content of chlorophyll *a* compared to chlorophyll *b*. Chlorophyll *a* is found in organisms performing oxygenic photosynthesis, while chlorophyll *b* is found in higher plants, green algae, and some bacteria, being classified as an accessory pigment resulting

from the oxidation of the methyl group of chlorophyll *a* to an aldehyde group (Khaleghi et al., 2012). The presence of chlorophyll in FDPg is an important finding since this pigment possesses various biological activities, particularly antioxidant and anti-inflammatory properties (Kang et al., 2018). The dark green-yellowish color of FDPg may be attributed to the presence of chlorophyll in the product (Carvalho et al., 2021).

FDPg had a high total dietary fiber content, such that 50 g of FDPg meets the daily recommendation for total fiber dietary fiber intake (25 g) (Institute of Medicine, 2006). The total dietary fiber values found in FDPg were higher than those reported for *P. gounellei* cladode flour (18.59 - 29.81 g/100g) (Machado et al., 2021). The presence of dietary fibers in FDPg is important since these components can modulate the composition and metabolic activity of the intestinal microbiota, which are effects associated with prebiotic properties (Gibson et al., 2017). Maltose and glucose were the prevalent carbohydrates in FDPg, while fructose was detected in lower content. The presence of sugars in FDPg indicates the availability of fermentable substrates for microorganisms, including those composing the human intestinal microbiota (Costa et al., 2019).

Three flavonoids (epigallocatechin gallate, procyanidin B2, and catechin) were identified in FDPg, with epigallocatechin gallate being the most prevalent. These results are consistent with a previous study that identified epigallocatechin and procyanidin B2 in *P. gounellei* cladode flour (Dantas et al., 2022). Catechin is a polyphenol, and its derivatives are widely distributed in vegetables and fruits, with reported antioxidant, antibacterial (Agrawal et al., 2018), and antiviral activity activities (Xu et al., 2017). The use of different methods is recommended to assess the antioxidant capacity of foods since there is no single method fully suitable for accurately determining the antioxidant capacity of all compounds present in these matrices (Shahidi; Zhong, 2015). The main differences between the different methods used to evaluate antioxidant capacity are related to their principles and experimental conditions, including concentration, reactivity, distribution, and interaction of radicals with other compounds (Shahidi; Zhong, 2015; Yeddes et al., 2013). FDPg showed superior antioxidant capacity when evaluated with the FRAP method compared to the DPPH[•] and ABTS^{•+} methods, which may be associated with the ferric content and specific phenolic compound profile of the matrix (Carvalho et al., 2021).

The *in vitro* colonic fermentation of FDPg resulted in a decrease in the pH of the medium, indicating the promotion of the intestinal microbiota metabolic activity, with the production of organic acids from available fermentable substrates, such as sugars, dietary fibers, and phenolic compounds (Albuquerque et al., 2021). The colonic fermentation of phenolic

compounds can generate absorbable products, such as phenolic metabolites and short-chain fatty acids (SCFAs), with beneficial effects on host health (Alves-Santos et al., 2020), suggesting phenolic compounds at the same biological level as prebiotics in relation to their effects on human intestinal microbiota (Llano et al., 2017; Souza et al., 2019).

The presence of FDPg decreased the richness of the intestinal microbiota during 48 h of colonic fermentation, as measured by the Chao1 index. Sample bacterial richness estimators are strongly influenced by the rarest taxa that are certainly the species with less knowledge (Kim et al., 2017, Jeliaskov et al., 2022), which could be reinforced by the low relative abundance of other genera comprising the intestinal microbiota during FDPg colonic fermentation. Although the Shannon index can capture microbiota richness, it is much more sensitive to changes in evenness (Hill et al., 2003). The higher values for the bacterial diversity (Shannon index) in the medium with FDPg after 48 h of colonic fermentation could suggest that higher evenness taxa may have improved this feature, which is considered a primary indicative of intestinal health and linked to improvements in host metabolic markers (Kim et al., 2017).

The intestinal microbiota of an adult is composed of approximately 90% Firmicutes and Bacteroidetes phyla. The F/B ratio increased in the medium with FOS and NC after 48 h of colonic fermentation, while it remained unchanged in the medium with FDPg, indicating that the relative abundance of the phyla Bacteroidetes and Firmicutes remained in a similar ratio during colonic fermentation. Although the F/B ratio is a controversial disease biomarker (Grigor'eva, 2020), a higher F/B ratio has been associated with intestinal microbiota imbalance (Stojanov et al., 2020), obesity, metabolic diseases, and increased systemic inflammatory response (Magne et al., 2020).

The Firmicutes phylum was the most dominant in the medium containing FDPg during colonic fermentation, suggesting a high abundance of butyrate-producing species and an environment with high variability in bacterial species (Chen et al., 2021). The composition of the intestinal microbiota in the medium containing FDPg differed overall from the medium containing FOS and NC during colonic fermentation. The relative abundance of *Prevotella_9* increased in the medium containing FDPg during colonic fermentation. *Prevotella_9* has been associated with the production of short-chain fatty acids (SCFA), especially butyrate and acetate, providing energy and playing an important role in intestinal health (Feng et al., 2023; Xu et al., 2020).

Bacteroides species have a diversity of enzymes (CAZymes) involved in the metabolism of various glycosides (Zeybek, Rastall, Buyukkileci, 2020). The medium containing FDPg

promoted an increase in the relative abundance of the genus *Bacteroides* during colonic fermentation, considered the main SCFA producer in the intestine. The increase in the *Bacteroides* population has been considered beneficial for intestinal mucosal barrier function and the improvement of systemic inflammation (Gurung et al., 2020). The increase in the relative abundance of the genus *Bacteroides* in the intestine has been associated with the consumption of dietary fibers (Zheng et al., 2023), suggesting that the high content of dietary fibers in FDPg may have induced the increase in the population of this genus during colonic fermentation.

Bacteroides break down complex carbohydrates into monosaccharides that serve as substrates for the growth of tertiary species, such as *Bifidobacterium* spp. (Chng et al., 2020). Results from preclinical studies have suggested some *Bacteroides* species as candidates for use as next-generation probiotics; however, the safety of their use in the prevention and/or treatment of intestinal dysbiosis still requires further investigation (Tan, Zhai, Chen, 2019). The medium containing FDPg promoted a higher relative abundance of *Megasphaera* after 48 h of colonic fermentation compared to the medium containing FOS. This bacterial genus is considered important for the synthesis of SCFA, especially butyrate, in the intestinal environment (Fu et al., 2019).

The medium containing FDPg also increased the relative abundance of *Mitsuokella* and *Acidaminococcus* (phylum *Firmicutes*) during colonic fermentation. The genus *Mitsuokella* has been reported to inhibit the growth and invasion of intestinal pathogens (e.g., *Salmonella* spp.) (Levine et al., 2012). The increase in the relative abundance of *Acidaminococcus* in the intestinal microbiota has been associated with anti-inflammatory effects, as well as a positive correlation with body mass index (Fu et al., 2019), and the production of SCFA, with positive impacts on the host endocrine metabolism (Zhong et al., 2021).

The lower relative abundance of *Fusobacterium*, *Escherichia-Shigella*, *Romboutsia*, and *Clostridium sensu stricto 1* in the medium containing FDPg during colonic fermentation could be considered a significant result. High populations of *Fusobacterium* in the intestinal microbiota have been associated with bile metabolism alterations and intestinal inflammation (Mullish et al., 2019). Similarly, high populations of *Escherichia-Shigella* have been linked to inhibited peristaltic contraction, intestinal constipation (Chen et al., 2022), and activation of the NLRP3 inflammasome complex involved in pancreatic damage and systemic inflammation (Li et al., 2020). Furthermore, high populations of *Romboutsia* and *Clostridium sensu stricto 1* have been associated with modifications in cognitive (Gao et al., 2019) and neurological functions (Gong et al., 2020), as well as increased severity of dementia symptoms (Kim et al., 2023).

The phylogenetic analysis showed that medium with FDPg was enriched in *Mitsuokella* and *Megasphaera* (Firmicutes phylum) and *Prevotella* 9 (Bacteroidota phylum) after 48 h of colonic fermentation. *Prevotella* 9 is a moderately saccharolytic and carbohydrate-fermenting bacterium. The main products of glucose fermentation by *Prevotella* 9 are succinate and acetate (Tett et al., 2021). Similarly, *Mitsuokella* and *Megasphaera* produce acetate, propionate, butyrate, lactate, valerate, and succinate from glucose fermentation (Marchandin et al., 2003). The main sugars of FDPg are maltose and glucose and the metabolites β -glucose and α -glucose were not detected in medium with FDPg after 48 h of colonic fermentation, whereas acetate, succinate, and lactate were detected. It suggests that maintaining a high abundance of *Prevotella* 9 and *Mitsuokella* could be important for the fermentation of sugars available in FDPg to produce SCFA. Early evidence has shown that *Prevotella* species are depleted in the gut microbiota of Westernized populations (Tett et al., 2021). *Mitsuokella* produces high phytase activity, improving nutrient absorption and growth (Tang et al., 2020). Furthermore, intestinal microbiota enriched with *Megasphaera* increased the survival of Chinese patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (Huang et al., 2022).

The colonic fermentation of FDPg resulted in the production of a variety of metabolites, most of which are commonly found in human fecal samples. The results showed the presence of SCFA (e.g., acetate, formate, and propionate), indicating the ability of human intestinal microbiota to produce these compounds from FDPg fermentation (Yang et al., 2019). Fifty-seven different chemical constituents were identified in the medium containing FDPg during colonic fermentation, including isovalerate, isocaproate, and caprylate, which have several physiological functions, such as providing energy to intestinal epithelial cells, participating in the maturation of gastrointestinal epithelial tissue, aiding in intestinal barrier function, and exhibiting anti-inflammatory activity (Yuan et al., 2022). Lactate, propionate, and butyrate were also identified in the medium containing FDPg during colonic fermentation. These SCFA exert modulatory effects on the immune response and enhance resistance against intestinal pathogens (Tejada-Ortigoza et al., 2022). SCFA are the main metabolites produced by the intestinal microbiota from dietary fiber degradation (Canfora et al., 2019). It has been estimated that 50-70% of the intestinal microbiota produces acetate, while 10-20%, especially the Firmicutes phylum, produces propionate, and only a few *Clostridium* species produce butyrate (Lavelle et al., 2020).

Bile acids were also detected in the medium containing FDPg during colonic fermentation. Primary bile acids are organic compounds produced from hepatic cholesterol and secreted into the intestine, where can be converted into secondary bile acids by the intestinal

microbiota. Bile acids and SCFA can improve glucose metabolism and insulin sensitivity through interaction with various pathways, favoring human health (Zhang et al., 2021). The presence of amino acids (isoleucine, valine, lysine, ornithine, proline, aspartate, and asparagine) in the medium containing FDPg during colonic fermentation indicates the possible utilization of these amino acids by bacteria forming the intestinal microbiota, which can act as precursors in cell replication metabolic pathways and in the regulation of intestinal inflammation through direct or indirect action on pro/anti-inflammatory cytokines (Li et al., 2021). The presence of GABA in the medium containing FDPg during colonic fermentation indicates the utilization of this metabolite by the intestinal for amino acid synthesis, which has been associated with increased expression of genes involved in maintaining epithelial barrier integrity (Li et al., 2021).

The presence of hypoxanthine in the medium containing FDPg after 48 h of colonic fermentation suggests an increase in antioxidant effect through the improvement of the free radical scavenging capacity attributed to this metabolite (Wang et al., 2019). Furthermore, the loss of uracil signal in the medium containing FDPg after 48 h of colonic fermentation can be considered a positive result. Uracil is an allosteric regulator involved in various biological reactions, and the decrease in its concentration in the colonic environment has been associated with more efficient action of intestinal bacteria on local inflammation, with lower production of reactive oxygen species and possible actions in repairing intestinal damage induced by pathogens (Khan, Kojour, & Han, 2023).

The medium containing FDPg maintained antioxidant capacity during colonic fermentation, being superior to the antioxidant capacity found in the medium containing FOS when measured with the ABTS^{•+}, DPPH[•], and FRAP methods. Specifically, the antioxidant capacity in the medium containing FDPg increased during colonic fermentation when measured with the FRAP method. The ferric-reducing antioxidant power (FRAP) indicated that FDPg could react with electron-deficient radicals more easily and stabilize them (Singh et al., 2014). Several components found in FDPg may contribute to the maintenance of antioxidant capacity in the colonic environment, especially phenolic compounds, organic acids, chlorophyll, and dietary fibers. Maintaining the antioxidant capacity of FDPg is a particularly important result, suggesting the regulation of intestinal inflammation by protecting the body against oxidative stress (Caponio et al., 2022). Furthermore, it indicates maintenance of the content of bioactive compounds in FDPg during passage through the gastrointestinal tract until reaching the colon, allowing beneficial impacts on the intestinal microbiota (Sampaio et al., 2022). Altogether, the

results of this study show for the first time that FDPg could modulate the intestinal microbiota by increasing microbial genera, phenolic compounds, and the production of several metabolites.

5 Conclusion

FDPg had characteristics indicating its high nutritional value and the presence of bioactive compounds associated with health-promoting properties, particularly highlighting its antioxidant properties and potential beneficial effects on the human intestinal microbiota. Colonic fermentation of FDPg induced overall positive changes in intestinal microbiota composition, with an increase in the relative abundance of beneficial bacterial populations and a decrease in the relative abundance of non-beneficial bacterial populations, while maintaining antioxidant capacity in the simulated colonic environment. Additionally, the colonic fermentation of FDPg promoted the production of various metabolites with properties that promote intestinal and systemic health. The effects induced by FDPg on the composition and metabolic activity of the intestinal microbiota during colonic fermentation are indicative of prebiotic properties. FDPg is characterized as a novel ingredient from the Caatinga biome with prebiotic properties that can be utilized for the development of innovative products with functional properties and high-added value. The understanding of the effects of intestinal microbiota modulation promoted by FDPg in health and disease warrants future investigations in a translational approach. More *in vitro* and *in vivo* studies are needed to evaluate safety and effective doses, in order to improve the use of this ingredient in the prevention and treatment of diseases.

References

- Agrawal, M., Dubey, S.K., Khan, J.A., Siddique, S., Ajazuddin, Saraf, S., Saraf, S.K., & Alexander, A. (2020). Extraction of catechins from green tea using supercritical carbon dioxide. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, 41-66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817388-6.00003-9>
- Albuquerque, T. M. R., Magnani, M., Lima, M. D. S., Castellano, L. R. C., & de Souza, E. L. (2021). Effects of digested flours from four different sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) root varieties on the composition and metabolic activity of human colonic microbiota *in vitro*. *Journal of Food Science*, 86(8), 3707–3719. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15852>
- Alvarez-Bayona, R., Cortez-Valadez, M., Martinez, F., Cruz-Rivera, J., & Flores-Acosta, M.. (2018). Green synthesis approximation of Au/Li nanoparticles with *Opuntia ficus-indica*

- extract. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 108, 169-173.
<https://doi.org/10.1016/j.physe.2018.12.008>.
- Alves-Santos, A.M., Sugizaki, C.S., Lima, G.C., & Naves, M.M. (2020). Prebiotic effect of dietary polyphenols: a systematic review. *Journal of Functional Foods*, 74, 104169.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104753>
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. (1995). Official Methods of analysis of the AOAC International. 16th Edition. Arlington, USA.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. (2019). Official methods of analysis of AOAC international. 21th. ed. Gaithersburg, 3390 p.
- Assis, P. O. A., Guerra, G. C. B., Araújo, D. F. S., de Andrade, L. F. L. I., de Araújo, A. A., de Araújo, R. F., Júnior, de Carvalho, T. G., de Souza, M. F. V., Borges, G. D. S. C., Lima, M. D. S., Rolim, F. R. L., Rodrigues, R. A. V., & Queiroga, R. C. R. D. E. (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 & Function*, 10(11), 7275–7290. <https://doi.org/10.1039/c9fo00920e>
- Bakari, S., Daoud, A., Felhi, S., Smaoui, S., Gharsallah, N., & Kadri, A. (2017). Proximate analysis, mineral composition, phytochemical contents, antioxidant and antimicrobial activities and GC-MS investigation of various solvent extracts of cactus cladode. *Food Science and Technology International*, 37, 286-293. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.20116>
- Bezerril, F. F., Magnani, M., Pacheco, M. T. B., de Souza, M. D. F. V., Figueiredo, R. M. F., dos Santos Lima, M., Borges G.S.C., Oliveira M.E.G., & do Egypto, R. D. C. R.. (2021). *Pilosocereus gounlei* (xique-xique) jelly is a source of fiber and minerals and improves the nutritional value and technological properties of goat's milk yogurt. *LWT – Food Science and Technology*, 139, 110512. [doi: 10.1016/j.lwt.2020.110512](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110512).
- Canfora, E. E., Meex, R. C. R., Venema, K., & Blaak, E. E. (2019). Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nature Reviews. Endocrinology*, 15(5), 261–273.
<https://doi.org/10.1038/s41574-019-0156-z>
- Caponio, G. R., Lippolis, T., Tutino, V., Gigante, I., De Nunzio, V., Milella, R. A., Gasparro, M., & Notarnicola, M. (2022). Nutraceuticals: focus on anti-inflammatory, anti-cancer, antioxidant properties in gastrointestinal tract. *Antioxidants*, 11(7), 1274.
<https://doi.org/10.3390/antiox11071274>
- Carvalho, P. O. A. A., Guerra, G. C. B., Da Silva, Borges, G., Bezerril, F.F., Sampaio, K. B., Ribeiro, T.S., Pacheco, M. T. B., Milani, R.F., Goldbeck, R., Ávila, P. F., Dos Santos

- Lima, M., Souza, M. F. V. & do Egypto, R. D. C. R. (2021). Nutritional potential and bioactive compounds of xique-xique juice: an unconventional food plant from Semiarid Brazilian. *Journal of Food Processing and Preservation*, e15265, 1-10.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.15265>
- Chen, Y., Zhou, J., & Wang, L. (2021). Role and mechanism of gut microbiota in human disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 86.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.625913>
- Chen, X., Qiu, T. T., Wang, Y., Xu, L. Y., Sun, J., Jiang, Z. H., Zhao, W., Tao, T., Zhou, Y. W., Wei, L. S., Li, Y. Q., Zheng, Y. Y., Zhou, G. H., Chen, H. Q., Zhang, J., Feng, X. B., Wang, F. Y., Li, N., Zhang, X. N., Jiang, J., ... & Zhu, M. S. (2022). A *Shigella* species variant is causally linked to intractable functional constipation. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(14), e150097. <https://doi.org/10.1172/JCI150097>
- Chng, K. R., Ghosh, T. S., Tan, Y. H., Nandi, T., Lee, I. R., Ng, A. H. Q., Li, C., Ravikrishnan, A., Lim, K. M., Lye, D., Barkham, T., Raman, K., Chen, S. L., Chai, L., Young, B., Gan, Y. H., & Nagarajan, N. (2020). Metagenome-wide association analysis identifies microbial determinants of post-antibiotic ecological recovery in the gut. *Nature Ecology & Evolution*, 4(9), 1256–1267. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1236-0>
- Ciurzyńska, A., Galus, S., Karwacka, M., & Janowicz, M. (2022). The sorption, structure and shrinkage properties of freeze-dried multi-vegetable snack bars in the aspect of water environmental activity. *LWT-Food Science and Technology*, 171, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114090>
- Comission Internationale de l'éclairage (CIE). (1986). *Colorimetry*. 2. ed. Viena: Central Bureau of the CIE, 78.
- Costa, M.F., Pimentel, T.C., Guimarães, J.D., Balthazar, C.F., Rocha, R.D., Cavalcanti, R.N., Esmerino, E.A., Freitas, M.Q., Raices, R.S., Silva, M.C., & Cruz, A.G. (2019). Impact of prebiotics on the rheological characteristics and volatile compounds of Greek yogurt. *LWT – Food Science and Technology*, 105, 371 - 376.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.007>
- Dantas, D. L. da S., Viera, V. B., Soares, J. K. B., dos Santos, K. M. O., Egito, A. S. do, Figueirêdo, R. M. F. de, Lima, M. dos S., Machado, N. A. F., Souza, M. de F. V. de, Conceição, M. L. da, Queiroga, R. de C. R. do E., & Oliveira, M. E. G. (2022). *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) flour: Improving the nutritional, bioactive, and technological properties of probiotic goat-milk yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, 158, 113165. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113165>

- Dourado, G. M. T. A., Pacheco, M. T. B., do Egypto Queiroga, R. C. R., Cavalcante, L. M., Bezerril, F. F., Ormenese, R. C. S. C., Garcia, A. O., Nabeshima, E. H., Pintado, M. M. E., & de Oliveira, M. E. G. (2021). Nutritional, physicochemical and sensorial acceptance of functional cookies enriched with xiquexique (*Pilosocereus gounellei*) flour. *PloS one*, 16(8), e0255287. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255287>
- Feitosa, B. E. S., Cunha, F. T., Félix, J. P. S., Aguiar, F. S., Fonseca-Júnior, E. M., Correa, M. L. P., Otani, F. S. (2018). Humidity, ash and water activity in Avium sold in Santarém, Pará. *Agroecosystems*, 10(1), 115-130. <https://doi.org/10.18542/ragros.v10i1.5177>
- Feng, L., Luo, Z., Wang, J., Wu, K., Wang, W., Li, J., Ma, X., & Tan, Bi. (2023). Fermentation characteristics of different sources of dietary fiber *in vitro* and impacts on growth performance, nutrient digestibility and blood parameters of piglets. *Journal of Functional Foods*, 108(1), 105761. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105761>.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H.. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Fu, X., Liu, Z., Zhu, C., Mou, H., & Kong, Q. (2019). Nondigestible carbohydrates, butyrate, and butyrate-producing bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(sup1), S130–S152. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1542587>
- Gao, H., Jiang, Q., Ji, H., Ning, J., Li, C., & Zheng, H. (2019). Type 1 diabetes induces cognitive dysfunction in rats associated with alterations of the gut microbiome and metabolomes in serum and hippocampus. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular basis of disease*, 1865(12), 165541. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165541>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gong, X., Liu, X., Chen, C., Lin, J., Li, A., Guo, K., An, D., Zhou, D., & Hong, Z. (2020). Alteration of gut microbiota in patients with epilepsy and the potential index as a biomarker. *Frontiers in Microbiology*, 11, 517797. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.517797>

- Guergoletto, K. B., Costabile, A., Flores, G., Garcia, S., & Gibson, G. R. (2016). *In vitro* fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. *Food Chemistry*, 196, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.048>
- Grigor'eva I. N. (2020). Gallstone disease, obesity and the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio as a possible biomarker of gut dysbiosis. *Journal of personalized medicine*, 11(1), 13. <https://doi.org/10.3390/jpm11010013>
- Gurung, M., Li, Z., You, H., Rodrigues, R., Jump, D. B., Morgun, A., & Shulzhenko, N. (2020). Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine*, 51, 102590. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.051>
- Hill, T. C., Walsh, K. A., Harris, J. A., & Moffett, B. F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS microbiology ecology*, 43(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01040.x>
- Holscher H. D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*, 8(2), 172–184. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756>
- Hu, X. P., Yin, F. W., Zhou, D. Y., Xie, H. K., Zhu, B. W., Ma, X. C., Tian, X. G., Wang, C., & Shahidi, F. (2019). Stability of resveratrol esters with caprylic acid during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 276, 675–679. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.062>
- Huang, Y., Zhu, N., Zheng, X., Liu, Y., Lu, H., Yin, X., Hao, H., Tan, Y., Wang, D., Hu, H., Liang, Y., Li, X., Hu, Z., & Yin, Y. (2022). Intratumor microbiome analysis identifies positive association between *Megasphaera* and survival of chinese patients with pancreatic ductal adenocarcinomas. *Frontiers in Immunology*, 13, 785422. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.785422>
- Institute of Medicine. 2006. Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/11537>.
- Jeliazkov, A., Gavish, Y., Marsh, C. J., Geschke, J., Brummitt, N., Rocchini, D., Haase, P., Kunin, W. E., & Henle, K. (2022). Sampling and modelling rare species: Conceptual guidelines for the neglected majority. *Global Change Biology*, 28(12), 3754–3777. <https://doi.org/10.1111/gcb.16114>
- Khaleghi, E., Arzani, K., Moallemi, N., & Barzegar, M. (2012). Evaluation of Chlorophyll Content and Chlorophyll Fluorescence Parameters and Relationships between Chlorophyll a, b and Chlorophyll Content Index under Water Stress in *Olea europaea* cv. Dezful. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal*

- of *Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 6, 636-639. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1082211>
- Khan, S. A., Kojour, M. A. M., & Han, Y. S. (2023). Recent trends in insect gut immunity. *Frontiers in immunology*, 14, 1272143. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1272143>
- Kang, Y. R., Park, J., Jung, S. K., & Chang, Y. H. (2018). Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. *Food Chemistry*, 245, 943-950. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.079>
- Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Lee, J. H., Kim, H. B., & Isaacson, R. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Kim, E. J., Kim, J. S., Park, S. E., Seo, S. H., Cho, K. M., Kwon, S. J., Lee, M. H., Kim, J. H., & Son, H. S. (2023). Association between mild cognitive impairment and gut microbiota in elderly Korean patients. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(10), 1376–1383. <https://doi.org/10.4014/jmb.2305.05009>
- Kinupp, V.F.; Lorenzi, H. (2014). Non-conventional food plants (PANCs) in Brazil: Identification guide, nutritional aspects and illustrated recipes. São Paulo: *Plantarum*, 768 p.
- Lavelle, A., & Sokol, H. (2020). Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 17(4), 223–237. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0258-z>
- Levine, U. Y., Bearson, S. M., & Stanton, T. B. (2012). *Mitsuokella jalaludinii* inhibits growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Veterinary Microbiology*, 159(1-2), 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.027>
- Li, X., He, C., Li, N., Ding, L., Chen, H., Wan, J., Yang, X., Xia, L., He, W., Xiong, H., Shu, X., Zhu, Y., & Lu, N. (2020). The interplay between the gut microbiota and NLRP3 activation affects the severity of acute pancreatitis in mice. *Gut Microbes*, 11(6), 1774–1789. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1770042>
- Li, X., Zhang, Z. H., Zayed, H. M., Yun, J., Zhang, G., & Qi, X. (2021). An insight into the roles of dietary tryptophan and its metabolites in intestinal inflammation and inflammatory bowel disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 65(5), e2000461. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000461>

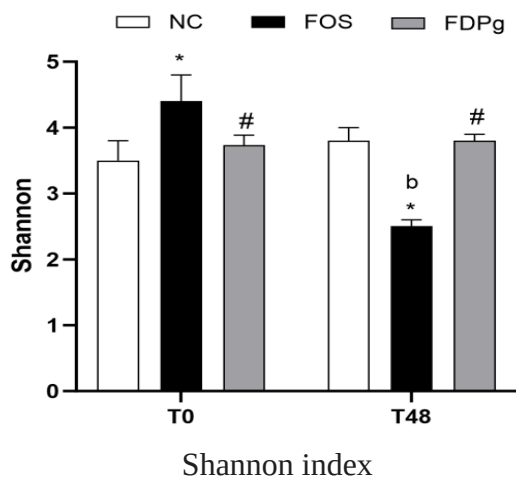
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Llano, D., Sánchez, I., Esteban-Fernández, A., Ramos-Pineda, A., Fernández-Díaz, M., Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolomé, B. (2016). Reciprocal beneficial effects between wine polyphenols and probiotics: an exploratory study. *European Food Research and Technology*. 243, 531 - 538. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2770-5>.
- Lucena, C. M., Costa, G. M., Sousa, R. F., Carvalho, T. K. N., Marreiros, N. A., Alvez, C. A. B., Pereira, D. D., & Lucena, R. F. P. (2012). Local knowledge about cacti in rural communities in the mesoregion of the Sertão of Paraíba (Northeast, Brazil). *Biothemes*, 25, 279-291. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2012v25n3p281>
- Maciel, J. K., Chaves, O. S., Brito Filho, S. G., Teles, Y. C., Fernandes, M. G., Assis, T. S., Fernandes, P. D., de Andrade, A. P., Felix, L. P., Silva, T. M., Ramos, N. S., Silva, G. R., & de Souza, M.F. (2015). New alcamide and anti-oxidant activity of *Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Bly. ex Rowl. (Cactaceae). *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(1), E11. <https://doi.org/10.3390/molecules21010011>
- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pesoa, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020). The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients*, 12(5), 1474. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>
- Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Gay, B., Teyssier, C., Jean-Pierre, H., Siméon de Buochberg, M., ... & Carlier, J. P. (2003). Phylogenetic analysis of some *Sporomusa* sub-branch members isolated from human clinical specimens: description of *Megasphaera micronuciformis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), 547-553. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02378-0>
- Menezes, F. N. D. D., da Cruz Almeida, É. T., da Silva Vieira, A. R., de Souza Aquino, J., Dos Santos Lima, M., Magnani, M., & de Souza, E. L. (2021). Impact of xashew (*Anacardium occidentale* L.) by-product on composition and metabolic activity of human colonic microbiota *in vitro* indicates prebiotic properties. *Current Microbiology*, 78(6), 2264–2274. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02502-z>
- Mullish, B. H., McDonald, J. A. K., Pechlivanis, A., Allegretti, J. R., Kao, D., Barker, G. F., Kapila, D., Petrof, E. O., Joyce, S. A., Gahan, C. G. M., Glegola-Madejska, I., Williams, H. R. T., Holmes, E., Clarke, T. B., Thursz, M. R., & Marchesi, J. R. (2019). Microbial bile salt hydrolases mediate the efficacy of faecal microbiota transplant in the treatment

- of recurrent *Clostridioides difficile* infection. *Gut*, 68(10), 1791–1800.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317842>
- Oliveira, A. M., de Freitas, A. F. S., Paiva, P. M. G., & Napoleão, T. H. (2020). Genotoxicity assessment of saline extract from *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) and its chemopreventive effect against cyclophosphamide-induced DNA damage. *Heliyon*, 6(4), e03811. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03811>
- Oliveira, A. M., de Freitas, A. F. S., Costa, M. D. S., Torres, M. K. D. S., Castro, Y. A. A., Almeida, A. M. R., Paiva, P. M. G., Carvalho, B. M., & Napoleão, T. H. (2021). *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) stem extract decreases insulin resistance, inflammation, oxidative stress, and cardio-metabolic risk in diet-induced obese mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113327. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113327>
- Oliveira, A. M., da Silva, W. A. V., Ferreira, M. R. A., Paiva, P. M. G., de Medeiros, P. L., Soares, L. A. L., Carvalho, B. M., & Napoleão, T. H. (2019). Assessment of 28-day oral toxicity and antipyretic activity of the saline extract from *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) stem in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 234, 96–105.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.036>
- Oliveira, A. M., de Luna Freire, M. O., da Silva, W. A. V., Ferreira, M. R. A., Paiva, P. M. G., Soares, L. A. L., de Medeiros, P. L., de Melo Carvalho, B., & Napoleão, T. H. (2018). Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 95, 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.04.004>
- Padilha, C. V. da S., Miskinis, G. A., de Souza, M. E. A. O., Pereira, G. E., de Oliveira, D., Bordignon-Luiz, M. T., & Lima, M. dos S. (2017). Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chemistry*, 228, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>
- Ribeiro, E., Meiado, M., & Leal, I. (2015). The role of clonal and sexual spread in cacti species dominance at the Brazilian caatinga. *Gaia Scientia*, 9, 27–33.
- Ribeiro, T. S., Sampaio, K. B., Menezes, F. N. D. D., de Assis, P. O. A., dos Santos Lima, M., de Oliveira, M. E. G., de Souza, E. L., & do Egypto Queiroga, R. C. R. (2020). *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. *3 Biotech*, 10(10), 448. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02442-8>

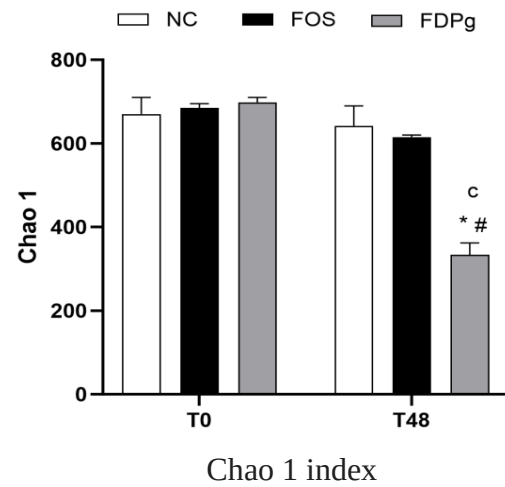
- Rodrigues, D., Walton, G., Sousa, S., Rocha-Santos, T. A. P., Duarte, A. C., Freitas, A. C., & Gomes, A. M. P. (2016). *In vitro* fermentation and prebiotic potential of selected extracts from seaweeds and mushrooms. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.004>
- Sampaio, K. B., Luiz de Brito Alves, J., Manguiera do Nascimento, Y., Fachine Tavares, J., Sobral da Silva, M., Dos Santos Nascimento, D., Dos Santos Lima, M., Priscila de Araújo Rodrigues, N., Fernandes Garcia, E., & Leite de Souza, E. (2022). Nutraceutical formulations combining *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin, and or resveratrol with beneficial impacts on the abundance of intestinal bacterial populations, metabolite production, and antioxidant capacity during colonic fermentation. *Food Research International*, 161, 111800. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111800>
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Shahidi, F. & Zhong, Y. (2015) Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Silva, A., Dantas, R., Vêras, C., Alves, R., & Silva, S. (2018). Physical and physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.)) fruit. *Semina: Ciencias Agrarias*. 39. 1969-1980. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n5p1969>.
- Silva, J. Y. P., do Nascimento, H. M. A., de Albuquerque, T. M. R., Sampaio, K. B., Dos Santos Lima, M., Monteiro, M., Leite, I. B., da Silva, E. F., do Nascimento, Y. M., da Silva, M. S., Tavares, J. F., de Brito Alves, J. L., de Oliveira, M. E. G., & de Souza, E. L. (2023). Revealing the potential impacts of nutraceuticals formulated with freeze-dried jabuticaba peel and *Limosilactobacillus fermentum* strains candidates for probiotic use on human intestinal microbiota. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. Ahead of print. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10134-x>
- Singh, D., Mukhija, M., Singh, S., Aggarwal, A., & Sundriyal, A. (2014). Anti-diabetic effect of hydroalcoholic extract of *Ficus palmata* Forsk leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Green Pharmacy*, 8, 276–282. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.142699>
- Souza, E. L., de Albuquerque, T. M. R., dos Santos, A. S., Massa, N. M. L., & de Brito Alves, J. L. (2019). Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual

- boosting of their health-promoting properties and food functionalities - A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(10), 1645–1659.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425285>
- Stojanov, S., Berlec, A., & Štrukelj, B. (2020). The influence of probiotics on the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*, 8(11), 1715. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111715>.
- Tan, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2019). Investigations of *Bacteroides* spp. towards next-generation probiotics. *Food Research International*. 116, 637 - 644.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.088>.
- Tang, H. C., Siew, C. C., Abdullah, N., Chong, C. W., Gan, H. M., Mohd Asrore, M. S., Yong, C. Y., Omar, A. R., & Ho, Y. W. (2020). Effects of supplementing freeze-dried *Mitsuokella jalaludinii* phytase on the growth performance and gut microbial diversity of broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(1), 116–125.
<https://doi.org/10.1111/jpn.13208>
- Tejada-Ortigoza, V., Garcia-Amezquita, L., Campanella, O., Hamaker, B., & Welte-Chanes, J.. (2021). Extrusion effect on *In vitro* fecal fermentation of fruit peels used as dietary fiber sources. *LWT - Food Science and Technology*, 153, 112569.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112569>.
- Tett, A., Pasolli, E., Masetti, G., Ercolini, D., & Segata, N. (2021). *Prevotella* diversity, niches and interactions with the human host. *Nature Reviews Microbiology*, 19(9), 585–599. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00559-y>
- Wang, Y., Deng, M., Deng, B., Ye, L., Fei, X., & Huang, Z. (2019). Study on the diagnosis of gout with xanthine and hypoxanthine. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 33(5), e22868. <https://doi.org/10.1002/jcla.22868>
- Yang, Y., Zhang, Y., Xu, Y., Luo, T., Ge, Y., Jiang, Y., Shi, Y., Sun, J., & Le, G. (2019). Dietary methionine restriction improves the gut microbiota and reduces intestinal permeability and inflammation in high-fat-fed mice. *Food & Function*, 10(9), 5952–5968. <https://doi.org/10.1039/c9fo00766k>
- Yeddes, N., Chérif, J. K., Guyot, S., Sotin, H., & Ayadi, M. T. (2013). Comparative study of antioxidant power, polyphenols, flavonoids and betacyanins of the peel and pulp of three Tunisian *Opuntia* forms. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2(2), 37–51.
<https://doi.org/10.3390/antiox2020037>

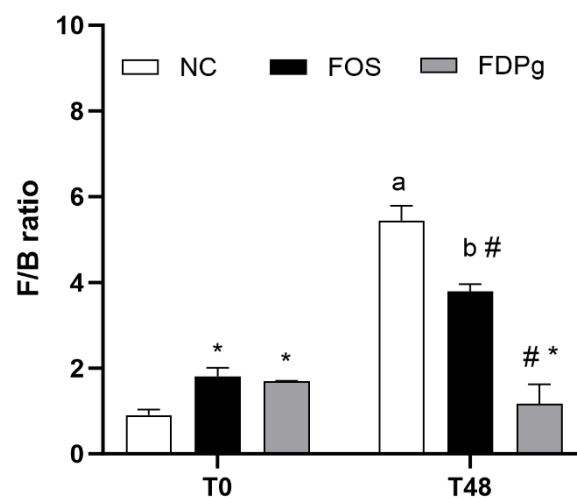
- Yuan, T., Wang, L., Jin, J., Mi, L., Pang, J., Liu, Z., Gong, J., Sun, C., Li, J., Wei, W., Jin, Q., & Wang, X. (2022). Role of medium-chain fatty acids in the lipid metabolism of infants. *Frontiers in Nutrition*, 9, 804880. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.804880>
- Xu, J., Xu, Z., & Zheng, W. (2017). A review of the antiviral role of green tea catechins. *Molecules*, 22(8), 1337. <https://doi.org/10.3390/molecules22081337>
- Xu, Y., Zhu, Y., Li, X., & Sun, B. (2020). Dynamic balancing of intestinal short-chain fatty acids: The crucial role of bacterial metabolism. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 118-130. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.026>
- Zeybek, N., Rastall, R. A., & Buyukkileci, A. O. (2020). Utilization of xylan-type polysaccharides in co-culture fermentations of *Bifidobacterium* and *Bacteroides* species. *Carbohydrate Polymers*, 236, 116076. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116076>
- Zhang, L., Chu, J., Hao, W., Zhang, J., Li, H., Yang, C., Yang, J., Chen, X., & Wang, H. (2021). Gut microbiota and type 2 Diabetes Mellitus: Association, mechanism, and translational applications. *Mediators of Inflammation*, 17, 5110276. <https://doi.org/10.1155/2021/5110276>
- Zheng, W., Jia, J., Tang, S., Song, S., & Ai, C. (2023). *Undaria pinnatifida* fucoidan contributes to anti-inflammation activity of *Bacteroides* in fiber-deficient mice via modulation of gut microbiota and protection of intestinal barrier integrity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 252, 126256. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126256>
- Zhong, F., Wen, X., Yang, M., Lai, H. Y., Momma, H., Cheng, L., Sun, X., Nagatomi, R., & Huang, C. (2021). Effect of an 8-week exercise training on gut microbiota in physically inactive older women. *International Journal of Sports Medicine*, 42(7), 610–623. <https://doi.org/10.1055/a-1301-7011>



* FOS T0 vs. FOS T48; [#] FDPg T0 vs. FDPg T48; ^bFOS T48 vs. FDPg T48 and NC T48 differs based on Two-way ANOVA followed by Tukey test ($p < 0.05$).



^cFDPg T48 vs. FDPg T0; ^{*}FDPg T48 vs. NC T48 and FOS T48 differs based on Two-way ANOVA followed by Tukey test ($p < 0.05$).



^a NC T48 vs. NC T0; ^b FOS T48 vs FOS T0; *FOS T0 vs NC T0; [#]FOS T48 and FDPg T48 vs. NC T48 differs based on Two-way ANOVA followed by Tukey test ($p < 0.05$).

Figure 1. Microbial diversity (Shanon index) and richness (Chao 1 index) and *Firmicutes* to *Bacteroidetes* ratio (F/B ratio) in media with freeze-dried *Pilosocereus gounellei* cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC - no added fermentable substrate) at time zero (T0) and 48 h (T48) of *in vitro* colonic fermentation.

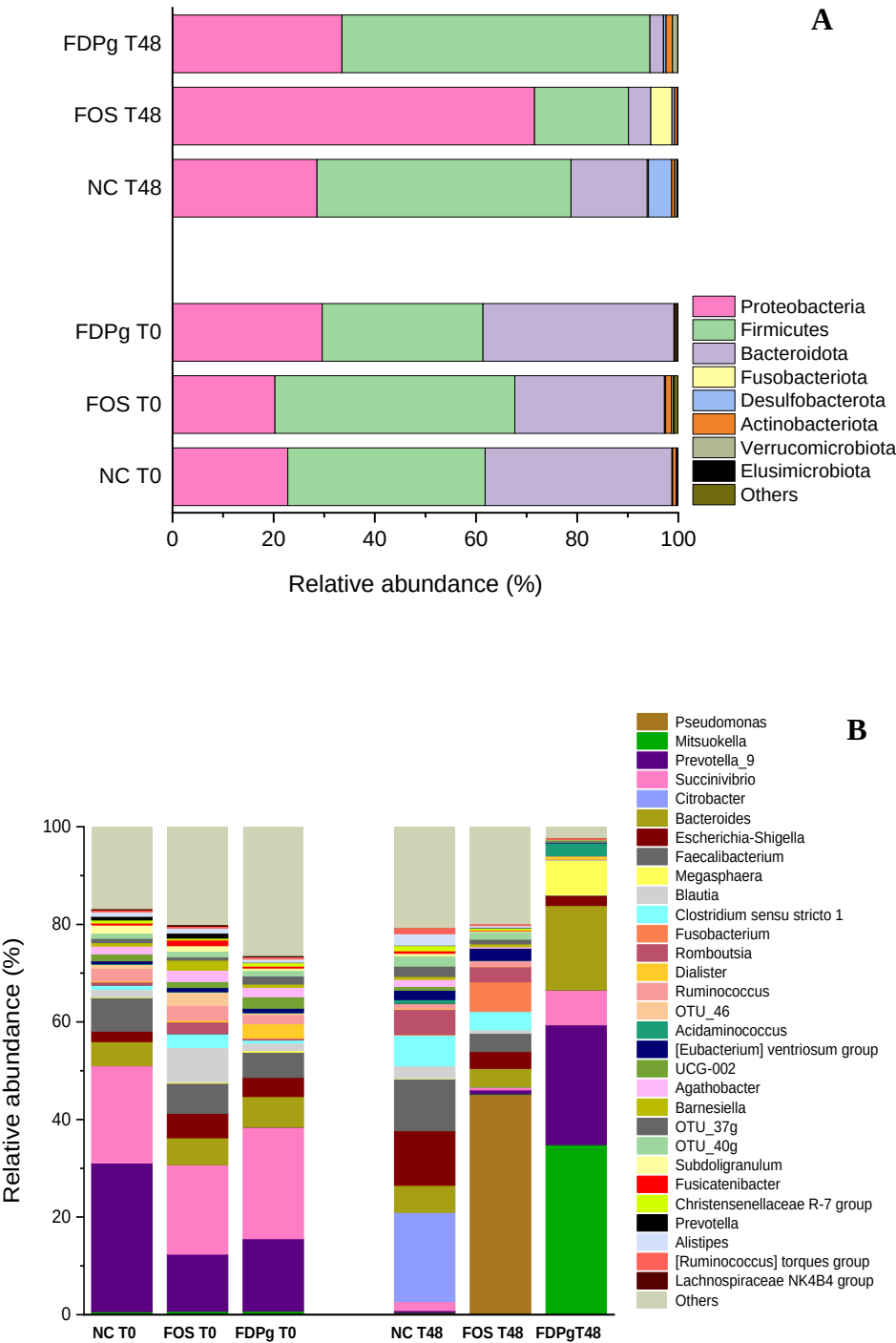


Figure 2. Relative abundance of different bacterial phyla (A) and genera (B) identified in media with freeze-dried *Pilosocereus gounellei* cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC - no added fermentable substrate) at time zero (T0) and 48 h (T48) of *in vitro* colonic fermentation.

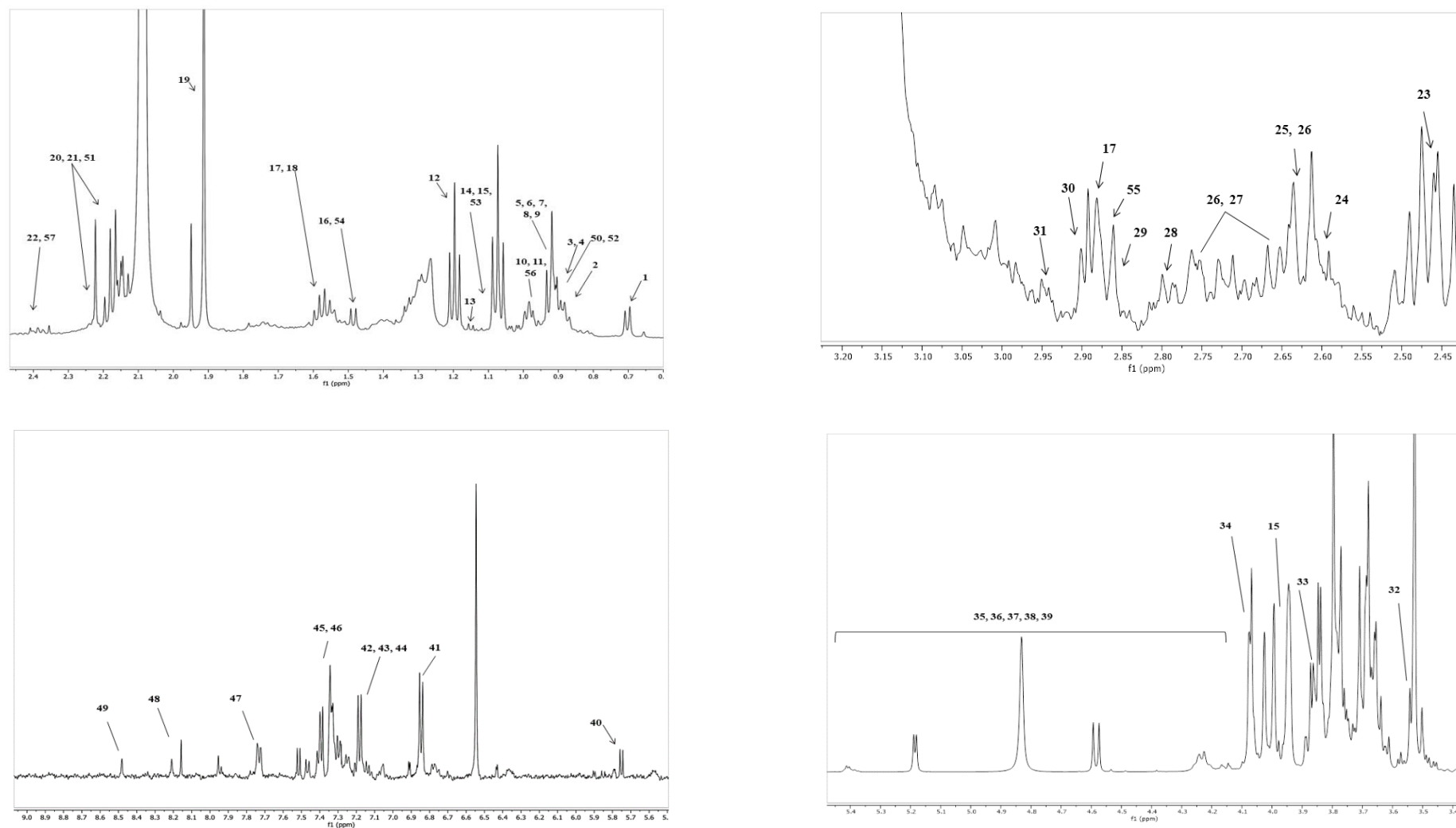


Figure 3. Representative ^1H NMR spectra of the media with freeze-dried *Pilosocereus gounellei* cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC - no added fermentable substrate) at 48 h (T48) of *in vitro* colonic fermentation.

Table 1. Physicochemical and nutritional characteristics and antioxidant capacity of freeze-dried *Pilosocereus gounellei* cladodes.

Parameters	Contents
pH	6.90 ± 0.15
a _w	0.32 ± 0.01
Acidity (%)	2.23 ± 0.20
Ash (%)	0.24 ± 0.0001
Minerals (mg/100g)	
Potassium	3575.63 ± 115.26
Calcium	3196.16 ± 39.67
Magnesium	1737.26 ± 41.76
Sodium	359.73 ± 11.48
Manganese	144.28 ± 0.75
Phosphor	72.18 ± 3.14
Iron	16.38 ± 0.16
Zinc	16.18 ± 0.44
Copper	1.79 ± 0.01
Cobalt	0.30 ± 0.01
Chlorophyll (mg/100g)	Chlorophyll a: 604 ± 0.05 Chlorophyll b: 322 ± 0.14
Color	L* = 45.87 a* = -3.10 b* = 8.25
Proteins (g/100g)	7.64 ± 0.33
Lipids (g/100g)	1.50 ± 0.06
Dietary fiber (g/100 g)	
Soluble fiber	13.45 ± 0.42
Insoluble fiber	29.96 ± 0.58
Total dietary fiber	43.41 ± 0.45
Sugars (g/100g)	
Maltose	200.76 ± 0.08
Glucose	168.96 ± 0.7
Fructose	2.08 ± 0.02
Organic acids (g/100g)	
Citric acid	1512.18 ± 0.23
Formic acid	57.62 ± 0.48
Malic acid	3.40 ± 0.03
Succinic acid	2.30 ± 0.02
Phenolic compounds (mg/100g)	
Epigallocatechin gallate	1782.54 ± 0.71
Procyanidin B2	75.90 ± 0.49
Catechin	2.30 ± 0.04
Antioxidant capacity	
ABTS ^{•+} (μmol Trolox/g)	0.08 ± 0.01
DPPH [•] (μmol Trolox/g)	0.04 ± 0.01
FRAP (μmol FeSO ₄ /g)	0.26 ± 0.01

Data reported as mean ± standard deviation, n = 3 repetitions. Abbreviations: a_w, water activity; ABTS^{•+} cation-2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-tiazoline)-6-sulfonic acid; DPPH[•], 1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl; FRAP, ferric-reducing ability of plasma; FeSO₄, ferrous sulphate.

Table 2. Antioxidant capacity in media with freeze-dried *Pilosocereus gounellei* cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC) at time zero, 24, and 48 h of *in vitro* colonic fermentation.

Parameters (g/L)	Samples	Time of colonic fermentation		
		Zero	24 h	48 h
ABTS ^{•+} (μmol Trolox/g)	NC	0.09 ± 0.01 ^{Ab}	0.08 ± 0.01 ^{Ac}	0.05 ± 0.02 ^{Bc}
	FOS	0.19 ± 0.02 ^{Aa}	0.15 ± 0.02 ^{Ab}	0.13 ± 0.02 ^{Ab}
	FDPg	0.21 ± 0.03 ^{Aa}	0.25 ± 0.02 ^{Aa}	0.25 ± 0.03 ^{Aa}
DPPH [•] (μmol Trolox/g)	NC	0.06 ± 0.01 ^{Ac}	0.06 ± 0.01 ^{Ac}	0.05 ± 0.02 ^{Ab}
	FOS	0.12 ± 0.02 ^{Ab}	0.13 ± 0.01 ^{Ab}	0.14 ± 0.02 ^{Aa}
	FDPg	0.18 ± 0.02 ^{Aa}	0.17 ± 0.01 ^{ABa}	0.15 ± 0.01 ^{Ba}
FRAP (μmol FeSO ₄ /g)	NC	0.55 ± 0.05 ^{Ac}	0.54 ± 0.06 ^{Ac}	0.51 ± 0.06 ^{Ac}
	FOS	0.83 ± 0.05 ^{Ab}	0.79 ± 0.05 ^{Ab}	0.65 ± 0.04 ^{Bb}
	FDPg	1.20 ± 0.04 ^{Ca}	1.55 ± 0.06 ^{Ba}	2.21 ± 0.07 ^{Aa}

Data reported as mean ± standard deviation, n = 3 repetitions. Abbreviation: ABTS^{•+} cation-2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-tiazoline)-6-sulfonic acid; DPPH[•], 1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl; FRAP, ferric-reducing ability of plasma; FeSO₄, ferrous sulfate. A–C: Different superscript capital letters in the same row for the same cultivation media denote differences (p < 0.05), based on One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test a–c: different superscript small letters in the same column at the same time interval denote difference (p < 0.05) among cultivation media, based on One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test.



Figure S1. Xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) in the nature.

Source: Authors's image.

Table S1. pH values in media with freeze-dried *Pilosocereus gounellei* cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC) at time zero, 24, and 48 h of *in vitro* colonic fermentation.

Parameters	Samples	Time of colonic fermentation		
		Zero	24 h	48 h
pH	NC	6.85 ± 0.06 ^{Aa}	6.14 ± 0.03 ^{Cb}	6.18 ± 0.03 ^{Ba}
	FOS	6.85 ± 0.03 ^{Aa}	5.88 ± 0.05 ^{Ba}	6.24 ± 0.06 ^{Ba}
	FDPg	6.77 ± 0.05 ^{Aa}	4.16 ± 0.05 ^{Bc}	4.22 ± 0.04 ^{Bb}

Data reported as mean ± standard deviation, n = 3 repetitions. Abbreviation: A–C: Different superscript capital letters in the same row for the same cultivation media denote differences ($p < 0.05$), based on One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test. a–c: different superscript small letters in the same column at the same time interval denote difference ($p < 0.05$) among cultivation media, based on One-way ANOVA with post-hoc Tukey's test.

Table S2. Contents of phenolic compounds and antioxidant capacity in media with freeze-dried *Pilosocereus gounellei* cladodes (FDPg) at time zero, 24, and 48 h of *in vitro* colonic fermentation.

Parameters (mg/L)	Time of colonic fermentation	
	Zero	48 h
Catechin	9.19 ± 0.03 ^A	3.66 ± 0.42 ^B
Epigallocatechin gallate	758.03 ± 0.15 ^A	690.92 ± 0.41 ^B
Procyanidin B2	58.17 ± 1.01 ^A	25.92 ± 0.58 ^B
Epicatechin	22.32 ± 0.39 ^B	37.82 ± 0.66 ^A
Myricetin	43.23 ± 0.30 ^A	24.74 ± 0.14 ^B
Kaempferol 3-glucoside	27.90 ± 0.60 ^B	22.32 ± 0.49 ^C

Data reported as average ± standard deviation, n = 3. A–C: Different superscript capital letters in the same row for the same cultivation media denote differences (p < 0.05), based on the Student's paired t-test.

Table S3. Relative abundance of different bacterial phyla in media with freeze-dried *Pilosocereus gounellei* cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC) at time zero 48 h of *in vitro* colonic fermentation.

Phylum	Fermentation medium	Time of colonic fermentation/ relative abundance (%)	
		Zero	48 h
<i>Proteobacteria</i>	NC	22.79±0.31 ^{Bb}	28.58±2.33 ^{Ab}
	FOS	20.25±2.65 ^{Bc}	71.46±1.74 ^{Aa}
	FDPg	29.58±3.17 ^{Ba}	33.50±1.16 ^{Ab}
<i>Firmicutes</i>	NC	39.00±1.02 ^{Bb}	50.21±2.28 ^{Ab}
	FOS	47.42±0.37 ^{Aa}	18.59±0.97 ^{Bc}
	FDPg	31.80±0.19 ^{Bc}	60.88±0.62 ^{Aa}
<i>Bacteroidota</i>	NC	36.94±0.92 ^{Ab}	15.08±0.19 ^{Bb}
	FOS	26.59±2.98 ^{Ac}	4.40±0.18 ^{Bc}
	FDPg	37.75±2.82 ^{Aa}	2.69±0.16 ^{Ba}
<i>Fusobacteriota</i>	NC	0.00±0.00 ^{Aa}	0.22±0.02 ^{Ab}
	FOS	0.00±0.00 ^{Ba}	4.19±0.76 ^{Aa}
	FDPg	0.01±0.00 ^{Aa}	0.01±0.00 ^{Ab}
<i>Desulfobacterota</i>	NC	0.14±0.01 ^{Ba}	4.59±0.13 ^{Aa}
	FOS	0.21±0.03 ^{Aa}	0.52±0.07 ^{Ab}
	FDPg	0.16±0.01 ^{Aa}	0.49±0.14 ^{Ab}
<i>Actinobacteriota</i>	NC	0.70±0.16 ^{Aa}	0.60±0.02 ^{Aa}
	FOS	1.07±0.03 ^{Aa}	0.56±0.11 ^{Aa}
	FDPg	0.34±0.13 ^{Aa}	1.27±0.21 ^{Aa}
<i>Verrucomicrobiota</i>	NC	0.25±0.03 ^{Aa}	0.40±0.01 ^{Aa}
	FOS	0.46±0.05 ^{Aa}	0.11±0.00 ^{Aa}
	FDPg	0.25±0.01 ^{Aa}	1.04±0.02 ^{Aa}
<i>Elusimicrobiota</i>	NC	0.05±0.02 ^{Aa}	0.11±0.01 ^{Aa}
	FOS	0.03±0.00 ^{Aa}	0.01±0.00 ^{Aa}
	FDPg	0.03±0.00 ^{Aa}	0.00±0.00 ^{Aa}

Results are shown as average ± standard deviation, n = 3. Different superscript capital letters (A–B) in the same row for the same cultivation media and different superscript small letters in the same column (at the same time interval) denote differences ($p < 0.05$), based on Two-way ANOVA with post-hoc Tukey's test.

Table S4 Relative abundance of different bacterial genera in media with freeze-dried *Pilosocereus gounellei* cladodes (FDPg), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC) at time zero 48 h of *in vitro* colonic fermentation.

Genus	Fermentation medium	Time of colonic fermentation/(relative abundance %)	
		Zero	48 h
<i>Pseudomonas</i>	NC	0.00±0.01 ^{Aa}	0.37±0.15 ^{Ab}
	FOS	0.01±0.01 ^{Ba}	45.08±1.60 ^{Aa}
	FDPg	0.12±0.01 ^{Aa}	0.03±0.02 ^{Ab}
<i>Mitsuokella</i>	NC	0.61±0.08 ^{Aa}	0.06±0.01 ^{Bb}
	FOS	0.68±0.04 ^{Aa}	0.09±0.03 ^{Ab}
	FDPg	0.61±0.10 ^{Ba}	34.81±6.80 ^{Aa}
<i>Prevotella_9</i>	NC	30.14±1.76 ^{Aa}	0.41±0.07 ^{Bc}
	FOS	11.56±1.52 ^{Ac}	0.87±0.13 ^{Bb}
	FDPg	14.71±0.68 ^{Bb}	24.58±4.43 ^{Aa}
<i>Succinivibrio</i>	NC	19.72±0.41 ^{Ab}	1.88±0.20 ^{Bb}
	FOS	18.08±0.99 ^{Ab}	0.52±0.03 ^{Bc}
	FDPg	22.60±0.52 ^{Aa}	7.16±0.31 ^{Ba}
<i>Citrobacter</i>	NC	0.00±0.00 ^{Ba}	18.06±2.92 ^{Aa}
	FOS	0.00±0.00 ^{Aa}	0.01±0.00 ^{Ab}
	FDPg	0.01±0.00 ^{Aa}	0.01±0.00 ^{Ab}
<i>Bacteroides</i>	NC	4.89±0.43 ^{Aa}	5.48±0.08 ^{Ab}
	FOS	5.48±0.48 ^{Aa}	3.87±0.37 ^{Ac}
	FDPg	6.22±0.10 ^{Ba}	17.27±2.95 ^{Aa}
<i>Escherichia-Shigella</i>	NC	2.11±0.27 ^{Bb}	11.09±1.02 ^{Aa}
	FOS	4.96±0.41 ^{Aa}	3.44±0.29 ^{Ab}
	FDPg	3.85±0.57 ^{Aa}	2.03±0.49 ^{Ac}
<i>Faecalibacterium</i>	NC	6.79±0.17 ^{Ba}	10.59±2.45 ^{Aa}
	FOS	6.10±0.24 ^{Aa}	3.69±0.54 ^{Bb}
	FDPg	5.11±0.74 ^{Aa}	0.15±0.01 ^{Bc}
<i>Megasphaera</i>	NC	0.15±0.05 ^{Aa}	0.01±0.00 ^{Ab}
	FOS	0.21±0.02 ^{Aa}	0.03±0.00 ^{Ab}
	FDPg	0.33±0.07 ^{Ba}	7.07±2.66 ^{Aa}
<i>Blautia</i>	NC	1.51±0.39 ^{Bb}	2.36±0.38 ^{Aa}
	FOS	7.01±1.06 ^{Aa}	0.71±0.03 ^{Bb}
	FDPg	1.51±0.30 ^{Ab}	0.05±0.00 ^{Bc}
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	NC	0.91±0.19 ^{Bb}	6.28±2.08 ^{Aa}
	FOS	2.80±0.02 ^{Aa}	3.77±0.05 ^{Ab}
	FDPg	0.67±0.22 ^{Ab}	0.04±0.01 ^{Ac}
<i>Fusobacterium</i>	NC	0.00±0.00 ^{Aa}	0.11±0.01 ^{Ab}
	FOS	0.00±0.00 ^{Ba}	6.05±1.30 ^{Aa}
	FDPg	0.00±0.00 ^{Aa}	0.12±0.04 ^{Ab}
<i>Romboutsia</i>	NC	0.64±0.06 ^{Bb}	5.10±1.82 ^{Aa}
	FOS	2.37±0.64 ^{Aa}	3.16±0.64 ^{Ab}
	FDPg	0.31±0.10 ^{Ab}	0.04±0.00 ^{Ac}
<i>Dialister</i>	NC	0.22±0.03 ^{Ab}	0.12±0.02 ^{Ab}
	FOS	0.32±0.02 ^{Ab}	0.04±0.01 ^{Ab}
	FDPg	2.97±0.17 ^{Aa}	0.67±0.22 ^{Ba}
<i>Ruminococcus</i>	NC	2.56±0.24 ^{Aa}	1.08±0.02 ^{Aa}
	FOS	2.96±0.04 ^{Aa}	1.17±0.02 ^{Aa}
	FDPg	1.86±0.14 ^{Aa}	0.01±0.00 ^{Aa}
<i>OTU_46</i>	NC	0.77±0.03 ^{Ab}	0.02±0.00 ^{Aa}
	FOS	2.82±0.23 ^{Aa}	0.02±0.01 ^{Ba}
	FDPg	0.39±0.02 ^{Ab}	0.00±0.00 ^{Aa}
<i>Acidaminococcus</i>	NC	0.13±0.01 ^{Aa}	0.73±0.17 ^{Ab}
	FOS	0.02±0.01 ^{Aa}	0.08±0.01 ^{Ab}
	FDPg	0.03±0.01 ^{Ba}	2.67±1.17 ^{Aa}

<i>[Eubacterium] ventriosum</i> group	NC	0.61±0.10 ^{Aa}	1.91±0.15 ^{Aa}
	FOS	0.87±0.12 ^{Aa}	2.48±0.10 ^{Aa}
	FDPg	0.87±0.07 ^{Aa}	0.21±0.02 ^{Ab}
UCG-002	NC	1.41±0.05 ^{Aa}	0.77±0.19 ^{Aa}
	FOS	1.19±0.05 ^{Aa}	0.37±0.02 ^{Aa}
	FDPg	2.35±0.14 ^{Aa}	0.04±0.00 ^{Ba}
<i>Agathobacter</i>	NC	1.56±0.03 ^{Ab}	1.43±0.13 ^{Aa}
	FOS	2.31±0.11 ^{Aa}	0.27±0.01 ^{Bb}
	FDPg	1.89±0.17 ^{Ab}	0.03±0.00 ^{Bb}
<i>Barnesiella</i>	NC	0.72±0.09 ^{Aa}	0.61±0.11 ^{Aa}
	FOS	2.03±0.15 ^{Aa}	0.57±0.04 ^{Aa}
	FDPg	0.64±0.04 ^{Aa}	0.09±0.01 ^{Aa}
OTU_37g	NC	0.87±0.07 ^{Ab}	2.09±0.04 ^{Aa}
	FOS	0.67±0.06 ^{Ab}	0.96±0.04 ^{Ab}
	FDPg	1.66±0.08 ^{Ab}	0.10±0.00 ^{Ab}
OTU_40g	NC	1.06±0.02 ^{Aa}	2.11±0.49 ^{Aa}
	FOS	1.15±0.09 ^{Aa}	1.57±0.24 ^{Ab}
	FDPg	1.11±0.03 ^{Aa}	0.08±0.02 ^{Ab}
<i>Subdoligranulum</i>	NC	1.62±0.00 ^{Aa}	0.50±0.06 ^{Aa}
	FOS	1.10±0.10 ^{Aa}	0.18±0.00 ^{Aa}
	FDPg	0.50±0.05 ^{Aa}	0.04±0.00 ^{Aa}
<i>Fusicatenibacter</i>	NC	0.43±0.06 ^{Aa}	0.52±0.10 ^{Aa}
	FOS	1.17±0.23 ^{Aa}	0.12±0.02 ^{Aa}
	FDPg	0.38±0.08 ^{Aa}	0.01±0.00 ^{Aa}
<i>Christensenellaceae R-7</i> group	NC	0.63±0.01 ^{Aa}	1.06±0.28 ^{Aa}
	FOS	0.35±0.02 ^{Aa}	0.40±0.03 ^{Aa}
	FDPg	0.71±0.05 ^{Aa}	0.03±0.01 ^{Aa}
<i>Prevotella</i>	NC	0.70±0.01 ^{Aa}	0.07±0.03 ^{Aa}
	FOS	1.03±0.04 ^{Aa}	0.07±0.01 ^{Ba}
	FDPg	0.09±0.01 ^{Aa}	0.00±0.00 ^{Aa}
<i>Alistipes</i>	NC	0.89±0.10 ^{Aa}	2.36±0.66 ^{Aa}
	FOS	1.03±0.07 ^{Aa}	0.44±0.02 ^{Ab}
	FDPg	0.66±0.03 ^{Aa}	0.14±0.00 ^{Ab}
<i>[Ruminococcus] torques</i> group	NC	0.41±0.06 ^{Aa}	1.01±0.30 ^{Aa}
	FOS	0.40±0.00 ^{Aa}	0.15±0.02 ^{Aa}
	FDPg	0.46±0.00 ^{Aa}	0.03±0.01 ^{Aa}

Results are shown as average ± standard deviation, n = 3. Different superscript capital letters (A–B) in the same row for the same cultivation media and different superscript small letters in the same column (at the same time interval) denote differences ($p < 0.05$) based on Two-way ANOVA with post-hoc Tukey's test.

Table S5. Metabolites identified in media with freeze-dried *Pilosocereus gounellei* cladodes (FDPg) and fructooligosaccharides (FOS) at time zero and 48 h of *in vitro* colonic fermentation analyzed by ¹H-NMR.

Number	Chemical constituents	Fermentation medium/Time of colonic fermentation			
		FOS		FDPg	
		Zero	48 h	Zero	48 h
1	Biliary salts	x	x	x	x
2	2-Methylbutyrate	x	x	x	x
3	Valerate	x	x	x	x
4	N-butyrate	x	x	x	x
5	Leucine	x	x	x	x
6	Isoleucine	x	x	x	x
7	Valine	x	x	x	x
8	Propionate/propionic acid	x	x	x	x
9	Isobutyrate/butyric acid	x	x	x	x
10	3-methyl-2-oxoisovalerate	x	x	x	x
11	2-Oxoisovalerate	x	x	x	x
12	Ethanol	x	x	x	x
13	3-hydroxybutyrate			x	x
14	Threonine			x	x
15	Lactate/lactic acid	x	x	x	x
16	Alanine	x	x		
17	Lysine	x	x	x	x
18	Ornithine	x	x	x	x
19	Acetate/acetic acid	x	x	x	x
20	Proline	x	x		x
21	Glutamate	x	x		x
22	5-Aminopentanoate	x			
23	Succinate/succinic acid	x		x	x
24	Methylamine				x
25	Methionine				x
26	Citrate/citric acid				x
27	Aspartate				x
28	Asparagine			x	x
29	Trimethylamine			x	x
30	Putrescine			x	x
31	Malonate			x	x
32	Glycine			x	x
33	Fructose			x	x
34	Dihydroxyacetone			x	x
35	α -Xylose				x

36	β -Xylose				x
37	β -Glucose		x	x	
38	α -Glucose		x	x	
39	D-galactose		x	x	
40	UDP-glucuronate	x	x	x	
41	Tyrosine	x		x	x
42	5-Aminosalicylate	x	x	x	x
43	Phenylalanine		x	x	
44	Uracil		x	x	
45	N-acetyl-5-aminosalicylate	x	x	x	x
46	Phenylacetate	x	x	x	x
47	Tryptophan	x	x	x	x
48	Hypoxanthine	x			x
49	Formate/formic acid	x	x	x	x
50	Caprylate	x	x	x	x
51	Isocaproate	x	x	x	x
52	Isovalerate	x	x	x	x
53	3-Hydroxyisovalerate			x	x
54	Total lipids	x	x		
55	Gamma-aminobutyric acid (GABA)			x	x
56	Ketoisovalerate	x	x	x	x
57	Acetone	x			

Note: "x" represents the presence of the metabolite.

ANEXO

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: BIOPROSPECÇÃO DE COMPONENTES BIOATIVOS COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E PREBIÓTICAS DE FARINHAS DE CACTÁCEAS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO

Pesquisador: MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 66834523.7.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE APOIO A PESQUISA DO ESTADO DA PARAIBA - FAPES

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.906.607

Apresentação do Projeto:

Trata-se de analisar o projeto de pesquisa dos professores Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira e Dr. Evandro Leite de Souza, docentes do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal da Paraíba, intitulada "BIOPROSPECÇÃO DE COMPONENTES BIOATIVOS COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E PREBIÓTICAS DE FARINHAS DE CACTÁCEAS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO".

Objetivo da Pesquisa:

Esta pesquisa tem por objetivo investigar diferentes espécies de cactáceas do semiárido nordestino como matérias-primas para obtenção de ingredientes com propriedades antioxidantes e prebióticas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: essa pesquisa não oferece riscos previsíveis para a sua saúde. Talvez, possa sentir-se desconfortável com a coleta da amostra, mas será minimizado por meio da coleta em local reservado, com instruções disponibilizadas de forma escrita e verbal.

Benefícios: essa pesquisa isso trará informações importantes para o meio científico, colaborando com a elaboração de uma farinha que poderá ser potencialmente benéfica para saúde dos consumidores, além de valorizar e incentivar o cultivo de cactáceas.

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

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



Continuação do Parecer: 5.906.607

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

No presente estudo serão utilizados os cladódios das cactáceas *Cereus jamacaru* DC. (mandacaru), *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. ex Rowl. (xiquexique), *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill e *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (espécies de palmas) e *Pilosocereus pachycladus* F. Ritter (facheiro). As farinhas serão preparadas de acordo com o método descrito por Machado (2019), com modificações. As análises de

caracterização física e físico-químicas constarão na determinação do pH, da acidez molar, umidade, extrato seco total, cinzas, proteínas, lipídeos, fibras solúvel e insolúvel, perfil de minerais, açúcares, ácidos orgânicos, teor de fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante (DPPH, FRAP e ABTS). A avaliação do efeito prebiótico e protetor das farinhas de diferentes cactáceas sobre cepas de bactérias probióticas será feita com base na avaliação da utilização das farinhas de cactáceas como fonte de carbono por cepas autóctones de BAL com potencial probiótico; na determinação do efeito seletivo de estimulação do crescimento de cepas autóctones de BAL com potencial probiótico; na avaliação da atividade metabólica; na avaliação do efeito protetor das farinhas de cactáceas sobre cepas probióticas durante a exposição às condições gastrintestinais simuladas. Ainda será feita a avaliação dos efeitos prebióticos das farinhas de cactáceas sobre a composição e atividade metabólica da microbiota colônica humana, e, para tanto, amostras das farinhas de cactáceas submetidas ao processo de digestão gastrointestinal simulado serão liofilizadas e armazenadas sob refrigeração em sacos de polietileno hermeticamente fechados.

Amostras fecais frescas serão doadas por seis voluntários adultos saudáveis, seguindo critérios de inclusão previamente estabelecidos. As amostras fecais frescas coletadas de cada doador serão misturadas em igual quantidade, diluídas em tampão fosfato salino e filtradas para remoção de partículas grandes e armazenadas sob condições anaeróbicas. Para o processo de fermentação será utilizado meio de crescimento com composição e modo de preparo previamente estabelecidos (ALBUQUERQUE et al., 2021; HU et al., 2013; MENEZES et al., 2021). As farinhas de cactáceas digeridas serão submetidas à fermentação sob anaerobiose com o inóculo fecal previamente preparado. A técnica de fluorescência de hibridização in situ (FISH) combinada com citometria de fluxo será utilizada para avaliar a capacidade das farinhas de cactáceas de induzir mudanças na abundância de grupos bacterianos formadores da microbiota intestinal humana. No tempo zero e após 24 e 48 horas de fermentação, amostras dos sistemas de fermentação serão submetidas aos processos de fixação e hibridização com as sondas de oligonucleotídeos e análise em citômetro de fluxo. Os resultados serão expressos

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

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



Continuação do Parecer: 5.906.607

como abundância de células hibridizadas com cada sonda específica em relação ao total de bactérias enumeradas com SYBR Green. Após o cálculo da abundância relativa dos grupos bacterianos enumerados, o índice prebiótico será

calculado de acordo com equação previamente descrita. Ainda serão determinados o pH, teor de açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos nos meios de cultivo fermentados pela microbiota colônica humana.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

Recomenda-se manter a metodologia proposta.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendência.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	CartadeAnueenciaatualizada.pdf	23/02/2023 08:30:39	Eliane Marques Duarte de Sousa	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2074735.pdf	13/01/2023 12:49:05		Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	13/01/2023 12:43:37	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_de_divulgacao_dos_resultadosassinado.pdf	13/01/2023 12:42:39	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB - 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

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



Continuação do Parecer: 5.906.607

Outros	Termo_de_compromisso_dos_pesquisadoresassinado.pdf	13/01/2023 12:41:19	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Cartas_de_Anuencia.pdf	13/01/2023 12:39:45	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	12/01/2023 20:46:56	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	12/01/2023 20:46:23	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	CERTIDAO_APROVACAO_PROJETO.pdf	12/01/2023 20:45:42	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	12/01/2023 20:43:27	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	12/01/2023 20:23:43	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 23 de Fevereiro de 2023

Assinado por:
Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador(a))

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br