



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

SARA DE SOUSA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E NUTRICIONAL E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL PREBIÓTICO E ANTIOXIDANTE DO LIOFILIZADO DE
CLADÓDIOS DE PALMA [*Opuntia dillenii* (Ker Gawl). Haw.]**

JOÃO PESSOA

2024

SARA DE SOUSA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E NUTRICIONAL E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL PREBIÓTICO E ANTIOXIDANTE DO LIOFILIZADO DE
CLADÓDIOS DE PALMA [*Opuntia dillenii* (Ker Gawl). Haw.]**

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

Linha de pesquisa: Segurança, qualidade e funcionalidade de alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

JOÃO PESSOA

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R672c Rocha, Sara de Sousa.

Caracterização físico-química e nutricional e avaliação do potencial prebiótico e antioxidante do liofilizado de cladódios de palma [Opuntia dillenii (Ker Gawl). Haw.] / Sara de Sousa Rocha. - João Pessoa, 2024.

117 f. : il.

Orientação: Evandro Leite de Souza.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Alimento vegetal - Cactácea. 2. Cactácea - Alimento funcional. 3. Palma (O. dillenii). 4. Palma - Compostos fenólicos. 5. Palma - Antioxidante. 6. Liofilizado de cladódios de O. dillenii (LCP). 7. Microbiota intestinal. I. de Souza, Evandro Leite. II. Título.

UFPB/BC

CDU 613.26:633.39(043)

SARA DE SOUSA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E NUTRICIONAL E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL PREBIÓTICO E ANTIOXIDANTE DO LIOFILIZADO DE
CLADÓDIOS DE PALMA [*Opuntia dillenii* (Ker Gawl). Haw.]**

Dissertação aprovada em 25 de março de 2024.

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente

EVANDRO LEITE DE SOUZA

Data: 24/04/2024 14:55:31-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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



Documento assinado digitalmente

MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA

Data: 25/04/2024 09:40:50-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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



Documento assinado digitalmente

KAROLINY BRITO SAMPAIO

Data: 25/04/2024 08:36:55-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Karoliny Brito Sampaio
Examinadora externa (DTA/CTDR/UFPB)

À minha família, em especial, aos meus pais,
por serem minha base sólida durante toda a caminhada, dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela dádiva da vida, por ter plantado em mim este sonho e me dado a força necessária em todos os momentos para que eu pudesse realizá-lo.

Aos meus pais, **Rosa Pereira e Pedro Rocha**, por se fazerem presentes mesmo na ausência física, me dando todo o suporte emocional, vocês foram essenciais!

À minha doce avó materna, **Zilda Pereira**, que mesmo não mais consciente de toda essa jornada, sempre me deu sua bênção a cada despedida, me desejando força e fé para continuar.

À minha querida irmã, **Samara Rocha**, pela presença e apoio constante em cada etapa, tornando a jornada menos árdua com sua parceria, obrigada por sempre acreditar em mim!

Ao meu grande amigo, **Edson Pontes**, meu irmão de coração, que muito contribuiu com seu conhecimento acadêmico na construção deste trabalho. Nossos momentos de risadas e brincadeiras tornaram tudo mais leve!

Ao querido **Jaielson Yandro**, que muito contribuiu com seu conhecimento e dom de repassá-lo com tanta dedicação e excelência. Você foi fundamental na realização das análises e tabulação dos dados.

À minha dupla e parceira na realização das análises durante toda a pesquisa, **Sabrina Radames**, sua parceria foi fundamental na concretização deste trabalho.

Ao meu querido professor orientador **Dr. Evandro Leite de Souza**, que me deu a oportunidade de encarar o desafio de realizar um trabalho para o qual eu não tinha vasta experiência, sempre se mostrando presente e me dando o apoio necessário ao longo desses dois anos, contribuindo com seu imensurável conhecimento durante a orientação. És inspiração!

À professora **Dra. Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque** pelo auxílio em grande parte da pesquisa, contribuindo com seu conhecimento e considerações valiosas sobre a escrita deste trabalho.

À professora **Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira**, por sua ajuda desde a realização dos experimentos iniciais, até as contribuições valiosíssimas na construção deste trabalho. Grata pela empatia e paciência em cada orientação dada.

Aos técnicos dos laboratórios nos quais realizei a maioria das análises deste trabalho, **Heloísa Almeida, Sônia de Paula e Guilherme Costa**, por suas incontáveis contribuições na realização dos experimentos ao longo da pesquisa. Obrigada por toda a partilha!

À **Dra. Viviane de Medeiros**, por todas as contribuições e conhecimentos repassados na reta final deste estudo.

Ao querido colaborador de laboratório da Universidade Federal de Campina Grande, campus Cuité-PB, **Jaciel**, por ter disponibilizado a matéria-prima provinda da sua comunidade rural, que foi essencial para a realização de todo o trabalho. Obrigada pela disponibilidade e paciência!

Ao botânico e professor **Valdeci Fontes de Sousa**, por ter contribuído com seu vasto conhecimento na identificação da espécie de palma utilizada neste trabalho, e à técnica do laboratório da UFCG, Campus Cuité-PB, **Mônica Andrade**, que facilitou os trâmites para a geração da exsicata depositada no herbário do Centro de Educação e Saúde (CES, Cuité, PB).

A todos os **mestres e doutores** de instituições e laboratórios parceiros que contribuíram para a realização de análises essenciais, em especial ao professor **Dr. José Luiz de Brito Alves**, que muito auxiliou na geração e tabulação dos dados da análise de 16S rRNA. Gratidão pela paciência e conhecimentos repassados.

Aos **membros da banca examinadora**, pela disponibilidade de valiosas contribuições para a melhoria deste trabalho, vocês foram fundamentais!

À **Universidade Federal da Paraíba**, em especial aos professores do **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição (PPGCN)**, pela partilha de todo o conhecimento e ensinamentos ao longo desse mestrado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão de bolsa de estudos durante a realização da pesquisa.

Ao presidente **Luís Inácio Lula da Silva** por possibilitar a inserção de jovens estudantes na pesquisa, e por acreditar no poder da Ciência e Educação no Brasil.

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro”.

Fernando Sabino

RESUMO

A palma [*Opuntia dillenii* (Ker Gawl). Haw.] é uma cactácea considerada como Planta Alimentícia Não Convencional (PANC) pertencente ao bioma Caatinga e encontrada principalmente nas regiões semiáridas do Nordeste brasileiro. *O. dillenii* se destaca por conter diversos compostos bioativos com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, de modo que seus cladódios são avaliados como auxiliares no tratamento de doenças como gastrite, diabetes e dislipidemia, embora ainda sejam escassos os estudos que buscam elucidar a sua composição nutricional e potencial funcional enquanto vegetal para consumo humano. Este estudo teve como objetivo investigar parâmetros físico-químicos e o potencial antioxidante e prebiótico do liofilizado de cladódios de *O. dillenii* (LCP) em sistema de fermentação *in vitro*. Para tanto, após a elaboração do produto liofilizado, foram realizadas análises para a determinação de parâmetros físico-químicos e de indicadores de atividade prebiótica e capacidade antioxidante em sistema de fermentação *in vitro* utilizando inóculo fecal humano. De acordo com os resultados obtidos, o LCP apresentou elevados teores de fibras totais (52,63 g/100 g), fibras solúveis (33,36 g/100g) e fibras insolúveis (19,00 g/100 g), proteínas (16,84 g/100 g) e lipídios (4,98 g/100 g). Foram observadas altas quantidades de clorofila total (912,00 mg/100 g), clorofila a (565,00 mg/100 g) e clorofila b (349,00 mg/100 g), além da presença de nove minerais, com destaque para macromelementos como potássio (4415,49 mg/100 g), cálcio (1593,25 mg/100 g), sódio (1010,52 mg/100 g) e magnésio (853,55 ± 10,69 mg/100 g), e microelementos como manganês (8,92 mg/100 g), zinco (5,95 mg/100 g) e ferro (3,72 mg/100 g). Foram identificados 16 compostos fenólicos, com maior prevalência de miricetina (785 mg/100 g), ácido caftarico (265 mg/100 g) e hesperidina (135 mg/100 g). Dentre os ácidos orgânicos detectados no LCP, apresentaram maiores quantidades os ácidos málico (16,84 g/L), cítrico (4,43 g/L) e succínico (3,26 g/L). A fermentação colônica de LCP por 48 h promoveu redução ($p \leq 0,05$) nos valores de compostos fenólicos, como catequina, miricetina, isorhamnetina e rutina, assim como de ácidos orgânicos, como os ácidos málico, fórmico e acético, indicando a ocorrência de transformações bioquímicas e a metabolização desses compostos por microrganismos formadores da microbiota fecal. Houve aumento da atividade antioxidante no meio de fermentação contendo o LCP quando avaliada pelos métodos de ABTS^{•+} e FRAP, e redução ($p \leq 0,05$) quando avaliada pelo método de DPPH[•]. Após 48 h de fermentação colônica, o meio contendo LCP apresentou maior diversidade bacteriana e maior relação Firmicutes:Bacteroidetes (F:B) quando comparado ao controle positivo (meio contendo frutooligossacarídeos). Ademais, foram verificadas alterações na composição da microbiota intestinal no meio contendo LCP, com destaque para o aumento da abundância relativa de *Ligilactobacillus* e *Lactiplantibacillus*, em detrimento do decréscimo de *Prevotella* e *Succinivibrio*. Diversos metabólitos foram detectados através da técnica de ressonância magnética nuclear no meio contendo LCP, incluindo acetato, propionato e butirato, além de aminoácidos, como leucina, valina e isoleucina. Os resultados indicam que o LCP possui elevado teor de fibras dietéticas, clorofila, minerais, ácidos orgânicos e compostos fenólicos, além de capacidade antioxidante, podendo assim, exercer efeitos benéficos sobre a composição e atividade metabólica da microbiota intestinal humana através de propriedades prebióticas, caracterizando-se como um potencial ingrediente para formulação de alimentos funcionais e nutracêuticos.

Palavras-chave: Cactácea. Alimento funcional. Compostos fenólicos. Antioxidante. Microbiota intestinal. Metabólitos.

ABSTRACT

The palm [*Opuntia dillenii* (Ker Gawl). Haw.] is a cactus considered as a non-conventional food plant (NCFP) belonging to the Caatinga biome and found mainly in the semiarid regions of the Brazilian Northeast. *O. dillenii* stands out for containing several bioactive compounds with anti-inflammatory and antioxidant properties, so its cladodes are evaluated as aids in the treatment of diseases such as gastritis, diabetes and dyslipidemia, although studies seeking to elucidate its composition are still scarce. nutritional and functional potential as a vegetable for human consumption. This study aimed to investigate physicochemical parameters and the antioxidant and prebiotic potential of *O. dillenii* cladode freeze-dried (LCP) in an in vitro fermentation system. To this end, after preparing the freeze-dried product, analyzes were carried out to determine physical-chemical parameters and indicators of prebiotic activity and antioxidant capacity in an in vitro fermentation system using human fecal inoculum. According to the results obtained, the LCP presented high levels of total fiber (52.63 g/100 g), soluble fibers (33.36 g/100g) and insoluble fibers (19.00 g/100 g), proteins (16.84 g/100 g) and lipids (4.98 g/100 g). High amounts of total chlorophyll (912.00 mg/100 g), chlorophyll a (565.00 mg/100 g) and chlorophyll b (349.00 mg/100 g) were observed, in addition to the presence of nine minerals, notably for macroelements such as potassium (4415.49 mg/100 g), calcium (1593.25 mg/100 g), sodium (1010.52 mg/100 g) and magnesium (853.55 ± 10.69 mg/100 g), and microelements such as manganese (8.92 mg/100 g), zinc (5.95 mg/100 g) and iron (3.72 mg/100 g). Sixteen phenolic compounds were identified, with the highest prevalence being myricetin (785 mg/100 g), caftaric acid (265 mg/100 g) and hesperidin (135 mg/100 g). Among the organic acids detected in the LCP, the highest quantities were malic (16.84 g/L), citric (4.43 g/L) and succinic (3.26 g/L). Fecal fermentation of LCP for 48 h promoted a reduction ($p \leq 0.05$) in the values of phenolic compounds, such as catechin, myricetin, isorhamnetin and rutin, as well as organic acids, such as malic, formic and acetic acids, indicating the occurrence of biochemical transformations and the metabolization of these compounds by microorganisms that form the fecal microbiota. There was an increase in antioxidant activity in the fermentation medium containing LCP when evaluated by the ABTS⁺ and FRAP methods, and a reduction ($p \leq 0.05$) when evaluated by the DPPH[•] method. After 48 h of fecal fermentation, the medium containing LCP showed greater bacterial diversity and a higher Firmicutes:Bacteroidetes (F:B) ratio when compared to the positive control (medium containing fructooligosaccharides). Furthermore, changes were observed in the composition of the intestinal microbiota in the medium containing LCP, with emphasis on the increase in the relative abundance of *Ligilactobacillus* and *Lactiplantibacillus*, to the detriment of the decrease in *Prevotella* and *Succinivibrio*. Several metabolites were detected using the nuclear magnetic resonance technique in the medium containing LCP, including acetate, propionate and butyrate, in addition to amino acids, such as leucine, valine and isoleucine. The results indicate that LCP has a high content of dietary fiber, chlorophyll, minerals, organic acids and phenolic compounds, in addition to antioxidant capacity, thus being able to exert beneficial effects on the composition and metabolic activity of the human intestinal microbiota through prebiotic properties, characterizing It is a potential ingredient for the formulation of functional foods and nutraceuticals.

Keywords: Cactaceae. Functional food. Fenolic compounds. Antioxidant. Gut microbiota. Metabolites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÕES DA DISSERTAÇÃO

Figura 1:	Paisagem de uma região representante da Caatinga em períodos chuvosos (a) e secos (b) do ano.....	15
Figura 2:	Palma <i>Opuntia dillenii</i> em meio à plantação nos períodos de frutificação (a) e floração (b), Cuité, Paraíba.....	18
Figura 3:	Impactos da dieta na resposta da microbiota intestinal.....	22
Figura 4:	Diagrama representativo das respostas autoimunes induzidas pela disbiose e síndrome do intestino irritável (SIP).....	23
Figura 5:	Etapas de higienização e pré-preparo para liofilização dos cladódios de palma.....	31
Figura 6:	Etapas do processamento para a obtenção do liofilizado dos cladódios de palma.....	31
Figura 6:	Desenho experimental do estudo	32

ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

Fig. 1.	Microbial diversity and (A), richness (B) and Firmicutes:Bacteroidetes (F:B) ratio (C) in media with freeze-dried <i>Opuntia dillenii</i> cladodes (FDOd), fructooligosaccharides (FOS), and NC (no added fermentable substrate) at time zero (T0) and 48 h (T48) of in vitro fecal fermentation.....	99
Fig. 2.	Relative abundance of the bacterial phyla (A) and the main genera (B) identified in media with freeze-dried <i>Opuntia dillenii</i> cladodes (FDOd), fructooligosaccharides (FOS), and NC (no added fermentable substrate) at time zero (T0) and 48 h (T48) of in vitro fecal fermentation.....	100
Fig. 3.	Representative ¹ H NMR spectra in media with freeze-dried <i>Opuntia dillenii</i> cladodes (FDOd) at 48 h of in vitro fecal fermentation analyzed by ¹ H NMR.....	101

LISTA DE TABELAS

DO ARTIGO:

Table 1.	Physicochemical characteristics and antioxidant capacity of freeze-dried <i>Opuntia dillenii</i> cladodes.....	96
Table 2.	pH values and organic acid contents (g/L) in media with freeze-dried <i>Opuntia dillenii</i> cladodes (FDOd), fructooligosaccharides (FOS), and NC (no added fermentable substrate) at time zero, 24, and 48 h of <i>in vitro</i> fecal fermentation.....	97
Table 3.	Phenolic compounds and antioxidant capacity in media with freeze-dried <i>Opuntia dillenii</i> cladodes (FDOd) at time zero, 24, and 48 h of <i>in vitro</i> fecal fermentation.....	98

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	BIOMA CAATINGA	15
2.2	PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANC).	16
2.2.1	Cactáceas	17
2.3	<i>Opuntia dillenii</i> (Ker Gawl.) Haw	17
2.4	MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA.....	20
2.5	PREBIÓTICOS	24
2.6	SISTEMA DE FERMENTAÇÃO FECAL <i>in vitro</i> E A TÉCNICA DE LIOFILIZAÇÃO.....	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	29
3.2	LOCAIS DE EXECUÇÃO DA PESQUISA	29
3.3	AQUISIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	29
3.4	DESENHO DO ESTUDO	31
3.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LIOFILIZADO DOS CLADÓDIOS DE PALMA.....	33
3.5.1	Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>.....	35
3.5.1.1	Obtenção do extrato.....	36
3.5.1.2	Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> - Método ABTS.....	36
3.5.1.3	Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> - Método DPPH.....	37
3.5.1.4	Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> - Método FRAP.....	37
3.6	DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA.....	38
3.7	FERMENTAÇÃO FECAL <i>in vitro</i>	39
3.7.1	Procedimentos éticos.....	39
3.7.2	Coleta das amostras fecais.....	39
3.7.3	Preparo das amostras fecais.....	40
3.7.4	Preparo do meio de crescimento e do sistema de fermentação fecal <i>in vitro</i>.....	40
3.7.5	Análise transcriptômica da microbiota fecal pela técnica de 16S rRNA	41
3.8	MONITORAMENTO DE INDICADORES DE ATIVIDADE METABÓLICA.....	42
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43

4	RESULTADOS	44
	REFERÊNCIAS.....	46
	APÊNDICES	55
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	56
	APÊNDICE B - ARTIGO	58
	APÊNDICE C – DADOS MATERIAIS SUPLEMENTARES	102
	ANEXOS	111
	ANEXO A – EXSICATA DE [<i>Opuntia Dillenii</i> (Ker Gawl). Haw.]	112
	ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	113

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a preocupação com a segurança alimentar e nutricional tem aumentado em todo o mundo (Farooq *et al.*, 2020), de modo que tem sido dada maior atenção à necessidade de diversificação das espécies de plantas consumidas, buscando ampliar as fontes de nutrientes à disposição das populações. As Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) atendem a esse conceito e podem ser consideradas essenciais para a consolidação de práticas alimentares que promovam a soberania e a segurança alimentar (Tuler; Peixoto; Silva, 2019).

O termo PANC foi citado inicialmente por Kinupp e Lorenzi (2014) para descrever espécies comestíveis nativas, exóticas ou naturalizadas, que muitas vezes são descartadas, e que possuem uma ou mais partes possíveis de uso na alimentação e/ou produção de substâncias condimentares ou aromáticas. Grande parte dessas plantas concentra-se em regiões da Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro, caracterizado por uma grande biodiversidade de espécies vegetais adaptadas às condições climáticas locais, como a escassez de água e de nutrientes do solo (Brand, 2017).

A família Cactaceae é uma das mais importantes famílias de plantas xerófitas encontradas na Caatinga, que abriga o terceiro maior centro de diversidade de cactáceas do mundo, com aproximadamente 77 espécies localizadas em regiões semiáridas (Fernandes *et al.*, 2020). *Opuntia dillenii* (Ker Gawl). Haw., popularmente conhecida como palma, apresenta-se entre as espécies de cactáceas mais estudadas atualmente, embora não tenha sido muito explorada para o consumo humano. Essa espécie vegetal possui diversas propriedades bioativas benéficas já relatadas, incluindo efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, antioxidantes, imunomoduladores e hipoglicemiantes, se caracterizando, portanto, como potencial alimento funcional (Shirazinia *et al.*, 2019).

Entende-se por alimento funcional aquele que, além de apresentar características nutricionais e tecnológicas adequadas, exerce impactos positivos na saúde e no desempenho físico de um indivíduo, além de auxiliar no aprimoramento dos mecanismos de defesa biológica, na prevenção de doenças específicas, no controle de distúrbios físicos e mentais e/ou na desaceleração do processo de envelhecimento (Nataraj *et al.*, 2020). Dentre os ingredientes alimentares funcionais amplamente estudados atualmente, destacam-se os prebióticos, os quais são caracterizados como substratos que, ao serem utilizados seletivamente por microrganismos do hospedeiro, induzem benefícios à saúde do indivíduo (Gibson *et al.*, 2017).

A microbiota intestinal, também referida como microflora intestinal, abriga aproximadamente 10^{13} células bacterianas, sendo um sistema dinâmico que se modifica ao longo de toda a vida (Ndoul; Paradis; Veilleux, 2020). A definição de microbiota saudável ou “eubiose” ainda é variável, podendo ser considerada o equilíbrio da população bacteriana intestinal, com prevalência de espécies benéficas. Por sua vez, a disbiose representa um ecossistema onde as populações bacterianas se encontram em desequilíbrio, havendo uma maior proporção de bactérias potencialmente patogênicas (Zhang *et al.*, 2015).

Embora *O. dillenii* possua nutrientes que se destacam em sua composição, essa espécie ainda não está devidamente caracterizada como vegetal para consumo humano, nem quanto ao seu potencial prebiótico e antioxidante, o que torna relevante o seu estudo mais aprofundado (Pawar; Killedar; Dhuri, 2017; Santos, 2014). Os cladódios de *O. dillenii* são considerados boas fontes de fibras alimentares, o que tem sido associado a efeitos hipoglicemiantes e hipolipidêmicos (Díaz *et al.*, 2017). Ainda, apresentam aminoácidos, vitaminas, minerais e substâncias bioativas, a exemplo de compostos fenólicos, que podem atuar como antioxidantes, o que confere potenciais efeitos prebióticos e antioxidantes, podendo repercutir em ação moduladora sobre a microbiota intestinal (Pawar; Killedar; Dhuri, 2017).

A utilização de fibras e prebióticos representa uma abordagem dietética eficiente para modular o microbioma intestinal humano (Maccaferri *et al.*, 2012). No entanto, sua ação pode ser complexa e exige um modelo experimental capaz de considerar diversos parâmetros da ecologia da microbiota do cólon (Nissen *et al.*, 2021). A fermentação fecal *in vitro* é considerada padrão-ouro pela capacidade de avaliar o impacto dos alimentos e/ou nutrientes na microbiota intestinal humana, concentrando-se na mudança dos grupos microbianos e alterações do perfil de produção de metabólitos (Nissen *et al.*, 2020).

A exploração de *O. dillenii* pode possibilitar a geração de produtos derivados de cactáceas como insumos com propriedades bioativas, atendendo à crescente demanda dos consumidores por produtos benéficos à saúde e com base de produção sustentável a partir da biodiversidade regional, auxiliando na melhora dos índices de desenvolvimento social e econômico, principalmente na região Nordeste do Brasil. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi determinar as características físico-químicas do liofilizado de cladódios de *O. dillenii*, bem como os seus efeitos sobre a microbiota intestinal humana em sistema de fermentação *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BIOMA CAATINGA

O Nordeste brasileiro possui diversos biomas, sendo a Caatinga predominante na maior parte da região, particularmente no contexto do clima semiárido. Considerado o único bioma exclusivamente brasileiro e ocupando aproximadamente 10% do território nacional (IBGE, 2019), a Caatinga foi assim chamada pelos índios, pois na estação seca a maioria das plantas tinha suas folhas perdidas, prevalecendo na paisagem a aparência esbranquiçada dos troncos das árvores. O nome Caatinga se origina do tupi (caa: mata e tinga: branca), que significa “mata ou floresta branca”, tendo seu tom esbranquiçado alterado para verde em períodos chuvosos (Figura 1 a e b) (Associação Caatinga, 2022).

Figura 1: Paisagem de uma região representante da Caatinga em períodos chuvosos (a) e secos (b) do ano.



Fonte: Associação Caatinga (2022).

A vegetação da Caatinga é composta, principalmente, por plantas xerófitas, que desenvolveram mecanismos de sobrevivência em ambientes com baixa pluviosidade e umidade. Nesse bioma são comuns plantas espinhosas, nas quais os espinhos são folhas modificadas que diminuem a perda de água pela transpiração, facilitando a sobrevivência às adversidades do ambiente e constituindo uma importante defesa contra animais que poderiam utilizá-las como alimento (Moraes, 2021). As plantas endêmicas mais comuns pertencem principalmente à família Cactaceae, sendo o mandacaru, o xique-xique e a palma as espécies mais conhecidas (Associação Caatinga, 2022).

Apesar de ser um bioma rico em espécies endêmicas vegetais e animais, a Caatinga ainda não possui grande valorização e conservação, sendo o terceiro bioma mais degradado do

Brasil, seguido da Mata Atlântica e do Cerrado (Bezerra *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2017). A Caatinga ainda tem muito a ser explorada em suas potencialidades, representadas pela vasta biodiversidade vegetal e variedade de espécies para uso medicinal e como matérias primas para indústria química, alimentar, cosmética e farmacêutica (Maia *et al.*, 2017).

A valorização dos produtos locais é uma das estratégias mais eficazes para alcançar os objetivos principais de preservação dos recursos da Caatinga e assegurar o bem estar das populações que nela vivem e dela dependem. A elaboração de produtos a partir de sua vegetação nativa garante a incorporação de identidade territorial e cultural, e constitui alternativa de grande potencial no semiárido, proporcionando a expansão do potencial do bioma (Maia *et al.*, 2017).

2.2 PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANC)

As Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) são plantas com crescimento espontâneo e habitualmente cultivadas por meio da agricultura familiar de povos mais tradicionais, com a finalidade de consumo próprio e, na maioria das vezes, sem fins comerciais (Pedrosa *et al.*, 2012). Por seu alto valor nutritivo e baixo custo, a *Food Agriculture Organization* (FAO) as classifica como importante alternativa no combate à insegurança alimentar por serem de fácil cultivo e adaptação, não necessitando de muitos recursos como adubo, água e agrotóxicos (Abreu; Castanheira, 2017; FAO - OPAS, 2017). Entretanto, algum cultivo de espécie vegetal tido como comum em uma região pode não ser em outra, de modo que o termo PANC pode ser utilizado para o que é tido como não convencional em uma determinada região (Kinupp; Lorenzi, 2014).

Aproximadamente 46 097 exemplares de espécies nativas fazem do Brasil o país continental com a maior biodiversidade vegetal do planeta, representando de 15 a 20% de todas as espécies do mundo, sendo cerca de um terço dessas espécies consideradas comestíveis (Fioravanti, 2016). A falta de conhecimento do potencial alimentício dessas plantas ocorre devido à insuficiência de estudos sobre o seu cultivo, disseminação, técnicas de manejo e processamento, bem como sobre as suas características biológicas, reprodutivas e nutricionais (Jesus *et al.*, 2020). Conforme Barbieri *et al.* (2014), a diversidade alimentar brasileira ainda é considerada pobre, visto que a produção agrícola é atualmente padronizada em menos de trinta espécies de plantas diferentes e muitas plantas ainda não têm recebido a devida importância, sendo pouco disponibilizadas no mercado.

A maioria dessas plantas poderia fazer parte do cardápio de consumo diário, porém, a ausência de conhecimento popular leva à sua caracterização como ervas daninhas, podendo ser facilmente encontradas na natureza e ignoradas (Liberato; Lima; Silva, 2019). Segundo Kinupp e Lorenzi (2014), isso acontece porque, com o passar do tempo, o aumento do consumo de alimentos industrializados devido ao estilo de vida acelerado trazido com a globalização, tornou o cultivo e a colheita de PANC algo difícil e pouco explorado, fazendo com que tenham caído em desuso. Dessa forma, o aumento do seu consumo deve ser estimulado, pois pode favorecer a melhora da condição nutricional da população nas áreas urbanas e rurais em diferentes regiões, além de reduzir o desperdício de alimentos, aumentando o combate à fome e ampliando a obtenção de produtos funcionais (Kinupp; Lorenzi, 2014).

2.2.1 Cactáceas

A família Cactaceae é a sexta família com mais espécies encontradas na Caatinga brasileira, sendo a terceira em diversidade (Ribeiro; Meiado; Leal, 2015). As cactáceas são plantas frequentemente encontradas em regiões com temperaturas elevadas, por isso são proeminentes na Caatinga, possuindo mecanismos fisiológicos para o armazenamento de água, de modo a fornecer recursos essenciais para a sua sobrevivência em tempos de seca (Magalhães *et al.*, 2018).

As cactáceas são classificadas como PANC e constituem importante fonte alimentar para a população do semiárido brasileiro, podendo ser destinadas ao consumo próprio ou para forragem animal (Kinupp; Lorenzi, 2014). A não utilização ou subutilização dessas plantas para o consumo humano se deve muitas vezes à falta de informações científicas e conhecimento popular acerca de suas propriedades nutricionais e biológicas (Chaves; Moraes; Barros, 2017). As cactáceas são consideradas fontes de diversos constituintes biofuncionais que conferem atividade antioxidante e prebiótica, proporcionando benefícios à saúde e reduzindo o risco de doenças crônicas e degenerativas, além de apresentar potencial de uso na tecnologia de alimentos, visando a diversidade de formulação de novos produtos como doces, geleias, bebidas e farinhas (Aguilar *et al.*, 2017; Bezerril *et al.*, 2021).

2.3 *Opuntia dillenii* (Ker Gawl.) Haw.

Opuntia dillenii (Ker Gawl.) Haw. é considerada uma das espécies selvagens invasoras do gênero, conhecida popularmente como pera espinhosa ou palma-de-espinho. É nativa do México e atualmente é uma das espécies da família das cactáceas mais utilizadas,

principalmente, para o uso medicinal, e na produção de geleias, sucos, óleos e chás (El-Mostafa, *et al.*, 2014). A espécie pode atingir cerca de 2 - 3 metros de altura e seus cladódios são ramos achatados de cor verde com espinhos amarelados. Suas flores podem variar de amarelas a tons mais alaranjados ou avermelhados, e podem ter entre 7 e 8 cm de comprimento, enquanto seus frutos, conhecidos comumente como figos da Índia, são rosados-avermelhados e comestíveis, pesando geralmente entre 10 e 20 g (Figura 2) (Mossa-Ayoub, 2016; Sanchez, 2022).

Figura 2: *Opuntia dillenii* em meio à plantação nos períodos de frutificação (a) e floração (b), Cuité, Paraíba.



Fonte: Autoria própria (2023).

Por ser uma espécie silvestre, *O. dillenii* costuma ter seus cladódios cobertos de espinhos, além de produzir frutos de tamanho menor que os de outras espécies do gênero, fazendo com que seu uso seja muitas vezes desconsiderado para fins alimentícios ou comerciais (Espinosa *et al.*, 2022). Suas diferentes partes têm sido historicamente utilizadas como alimento para animais de fazenda ou na construção de cercas de pastos devido à sua capacidade de adaptação a condições climáticas extremas, com crescimento rápido em solos considerados inférteis e de baixa necessidade hídrica (Torrero *et al.*, 2017). A FAO reconheceu o potencial da palma e sua importância na contribuição para o crescimento das regiões áridas e semiáridas, especialmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil (Barbera; Inglese; Barrios, 2001; Nobel, 1995).

Estudos relatam que *O. dillenii* contém elevados níveis de compostos bioativos, incluindo polissacarídeos, betalainas, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, lipídios, vitaminas, minerais e aminoácidos, sendo tradicionalmente utilizada em diversos países como

medicamento fitoterápico. O gênero *Opuntia* apresenta altos teores de fósforo (62,2 mg/100 g), sódio (9,1 mg/100 g), cálcio (1,18 a 1,28 mg/100 g), ferro (3,0 a 3,8 mg/100 g), potássio (45 – 47 mg/100 g) e flavonoides (196,7 mg/100 g), podendo ser comparado a outros vegetais tradicionais (Gao *et al.*, 2015; Kunyanga; Vellingiri; Imungi, 2014).

Outrossim, os cladódios da palma são ricos em mucilagem, um polissacarídeo caracterizado por alta viscosidade e capacidade de retenção de água, além de ser um ingrediente natural e de baixo custo, o que os torna fortes candidatos para incorporação na indústria de produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, como agente emulsionante e estabilizante (Dick *et al.*, 2019; Quinzio *et al.*, 2018). Seu fruto tem sido utilizado na produção de sucos, bebidas alcoólicas, geleias e adoçantes naturais, enquanto as suas sementes têm sido investigadas por conter minerais como cálcio, potássio, magnésio e fósforo em altos níveis (Aragona *et al.*, 2018). Suas flores têm sido valorizadas por seu efeito depurativo e diurético, sendo também ricas em minerais como potássio e cálcio e a presença de polifenóis, flavonoides e taninos (Ammar *et al.*, 2015).

A concentração de cada componente nutricional da palma depende de alguns fatores, como o clima, pH, disponibilidade de água, textura e composição do solo onde é cultivada, além do grau de maturação da planta (Mounir *et al.*, 2020). Cladódios mais velhos parecem apresentar melhor perfil de ácidos graxos em relação aos cladódios mais jovens, sendo os ácidos linoleico, oleico e palmítico os mais abundantes. Os teores de açúcares totais e carboidratos também são maiores em cladódios mais maduros, porém, em contrapartida, à medida em que o cladódio amadurece, os teores de proteína tendem a diminuir, indicando que as condições físicas, como a disponibilidade de água, a temperatura e a iluminação do ambiente, influenciam na sua síntese proteica (Coll *et al.*, 2019).

Diversos estudos vêm sendo realizados para comprovar as propriedades e os efeitos benéficos de *Opuntia* spp., que é tradicionalmente utilizada na medicina popular para tratar úlceras, distúrbios gastrointestinais e doenças como Diabetes Mellitus, além de possuir ação cicatrizante em feridas (Babitha *et al.*, 2018), efeito hipotensor (Siddiqui *et al.*, 2016) e eliminação de radicais livres (Betancourt *et al.*, 2017). Sabe-se também que os seus cladódios foram avaliados como auxiliares no tratamento para gastrite, diabetes, aterosclerose, dislipidemia e na regulação imunológica no trato gastrointestinal (El-Mostafa *et al.*, 2014).

Estudo prévio avaliou a composição química de cladódios de *O. dillenii* e encontrou elevados valores de fibras totais e insolúveis (Méndez *et al.*, 2015). Considerando os teores de compostos fenólicos encontrados em cactáceas como a palma, assim como sua capacidade antioxidante, *O. dillenii* destaca-se como alternativa de interesse para a indústria, a exemplo do

desenvolvimento de nutracêuticos, podendo aumentar o seu potencial de mercado (Araújo *et al.*, 2021). Além disso, os constituintes fenólicos presentes em sua composição podem exercer ação prebiótica indireta, com efeitos na microbiota intestinal humana e conferindo benefícios à saúde do indivíduo (Siqueira *et al.*, 2021).

2.4 MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

Entende-se por microbiota intestinal o conjunto de microrganismos que habita o trato gastrointestinal humano, constituído por arqueias, bactérias, fungos e parasitas (Bello *et al.*, 2019). Em um indivíduo adulto saudável, acredita-se que a microbiota seja composta por mais de 10^{14} microrganismos (Thursby; Juge, 2017), sendo o intestino grosso, o órgão que apresenta a maior quantidade de microrganismos, em sua maioria anaeróbios (World Gastroenterology Organization, 2017).

O trato gastrointestinal é colonizado por um conjunto complexo de microrganismos que contribuem significativamente para o metabolismo e o sistema imunológico do hospedeiro (Vos *et al.*, 2022). Devido ao seu grande conteúdo genômico e metabólico, a microbiota intestinal fornece uma diversidade de propriedades benéficas ao hospedeiro, sendo algumas das funções mais importantes a manutenção da integridade da barreira mucosa, o fornecimento de nutrientes, como vitaminas e outros substratos, e a proteção contra patógenos, considerado fator crucial para o funcionamento imunológico adequado (Thursby; Juge, 2017).

Por possuir elevado grau de variabilidade, torna-se difícil a definição de uma microbiota normal ou saudável. No entanto, alguns parâmetros, como a estabilidade, aumento da diversidade, riqueza genética ou a abundância de microrganismos produtores de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), são considerados como características de uma microbiota intestinal saudável (Price; Ali; Huttenhower, 2016). Alternativamente, a resiliência microbiana pode ser usada como um marcador de saúde da microbiota (Fraccascia; Giannoccaro; Albino, 2018), sendo definida como a capacidade de um ecossistema de resistir a mudanças sob estresse ou de se recuperar rápida e totalmente de eventos adversos (Ingrisch; Bahn, 2018). A ausência desta resiliência dificulta o estabelecimento de um novo equilíbrio e pode exercer impacto negativo na saúde do indivíduo (Sommer *et al.*, 2017).

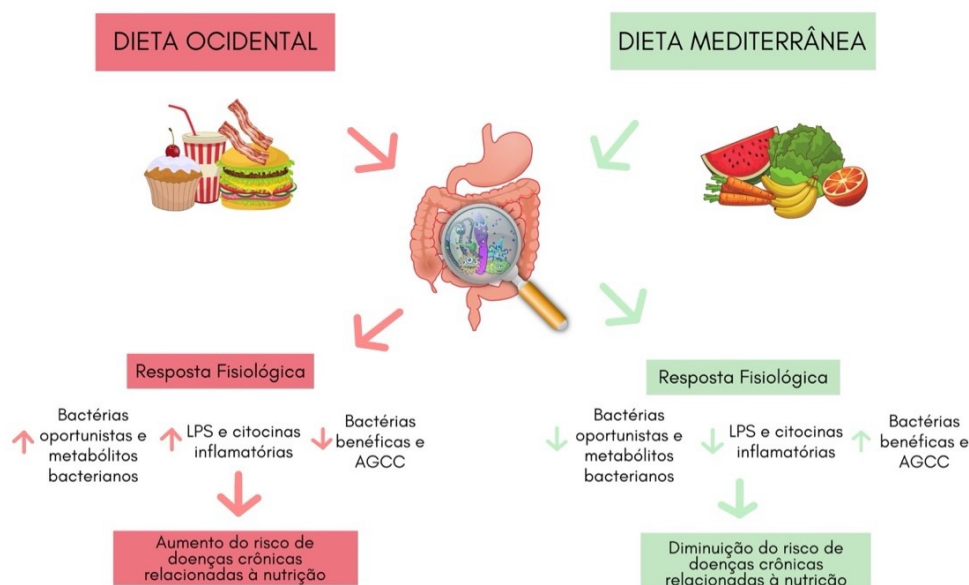
Acredita-se que o desenvolvimento da microbiota humana se inicia desde o nascimento, embora alguns estudos relatem que determinados microrganismos podem ser detectados em tecidos da placenta, ainda no período intrauterino (Aagaard *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2015). A via de parto também parece influenciar na composição da microbiota, sendo a microbiota dos

bebês nascidos por via vaginal abundante em *Lactobacillus* spp. ainda nos primeiros dias de vida, enquanto os nascidos por cesariana parecem possuir uma microbiota com maior colonização de *Clostridium* spp. (Avershina *et al.*, 2014; Jakobsson *et al.*, 2014). Outro fator a se considerar é a importância da amamentação nos primeiros seis meses de vida da criança, o que pôde ser constatado em resultados de uma metanálise, os quais demonstraram que o aleitamento materno exclusivo mais prolongado esteve associado com uma composição bacteriana mais estável nos primeiros meses de vida, com maior abundância relativa de bifidobactérias, enquanto em crianças não amamentadas exclusivamente houve aumento de *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (Ho *et al.*, 2018).

Estudos comprovam que a dieta é outro fator importante na composição da microbiota, sendo um dos principais contribuintes para a diversidade do microbioma intestinal, tanto a curto como a longo prazo, podendo estar ligada a doenças provenientes de inflamação crônica de baixo grau, como o Diabetes tipo II (Karl *et al.*, 2017). A alimentação é fator fundamental para a saúde humana, de modo que a comprovação disso são os seus efeitos no surgimento de doenças crônicas em populações que fazem a transição de uma dieta saudável para uma dieta de estilo ocidental, rica em alimentos altamente industrializados, implicando em alterações na microbiota intestinal (Kopp, 2019).

A típica “dieta ocidental”, composta por alimentos com alto teor de gordura e açúcar, também tem sido associada com inflamação crônica, doenças metabólicas e obesidade. Uma alimentação rica em gorduras animais e saturadas tem o potencial de alterar a microbiota intestinal, aumentando os lipopolissacarídeos (LPS) e o N-óxido de trimetilamina (TMAO), e diminuindo a produção de AGCC (Singh *et al.*, 2017). Já a chamada “dieta mediterrânea”, caracterizada por uma alimentação rica em vegetais, baixo consumo de carnes vermelhas e gorduras saturadas, rica em ômega-3 e elevado teor de fibras, está associada com o aumento da produção de AGCC e tem a capacidade de alterar a composição microbiana intestinal de maneira positiva, mudando o microbioma intestinal (Figura 3) (Filippis *et al.*, 2016).

Figura 3: Impactos da dieta na resposta da microbiota intestinal.



Fonte: Adaptado de Filippis *et al.* (2023). **Legenda:** LPS, lipopolissacarídeos; AGCC, ácidos graxos de cadeia curta.

Alguns fatores ambientais também podem implicar na formação da microbiota intestinal, incluindo a localização geográfica do hospedeiro, procedimentos cirúrgicos já realizados, tabagismo, depressão e condições de moradia (urbana ou rural) (Rodríguez *et al.*, 2015).

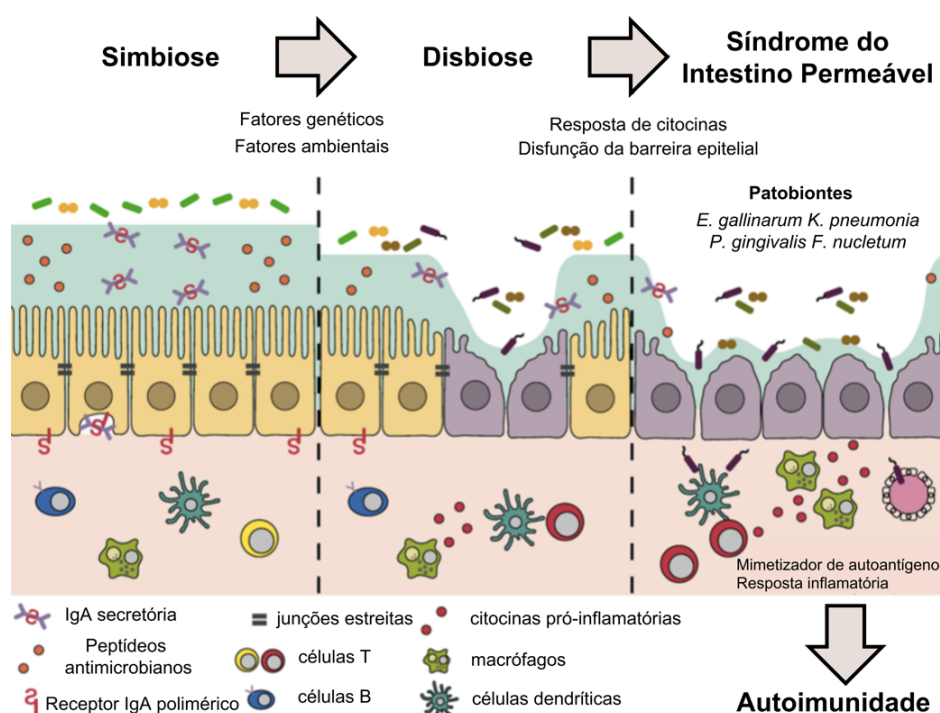
Os desequilíbrios patológicos crônicos na composição da microbiota intestinal, denominados de disbiose, podem implicar na disfunção da barreira mucosa e nas respostas inflamatórias que predispõem o hospedeiro à doenças sistêmicas, como doença inflamatória intestinal, doença celíaca, alergias alimentares, obesidade e doenças autoimunes (Levy *et al.*, 2017). As alterações na composição da microbiota intestinal têm sido estudadas principalmente a nível individual, no entanto, cada vez mais evidências sugerem que as mudanças no estilo de vida e na dieta tendem a alterar a microbiota intestinal a níveis populacionais. Estudos observaram que sociedades rurais e grupos agrários que seguem uma dieta não-ocidental e não usam comumente antibióticos apresentam uma microbiota intestinal mais diversificada, incluindo espécies bacterianas que geralmente estão ausentes na microbiota intestinal de populações de regiões mais desenvolvidas (Clemente *et al.*, 2015; Tito *et al.*, 2015).

A mucosa intestinal é frequentemente exposta a uma variedade de antígenos externos, patógenos de origem alimentar e microrganismos comensais que residem no lúmen

intestinal. Sabe-se que o intestino funciona como um tecido de bloqueio através do qual uma monocamada de células epiteliais estabelece uma barreira físico-química, contribuindo para a manutenção da homeostase biológica ao separar os meios interno e externo, restringindo a infiltração de antígenos externos e o vazamento de substâncias endógenas, mantendo, assim, a homeostase corporal (Kinashi; Hase, 2021; Peterson; Artis, 2014).

Algumas moléculas efetoras, como mucina, peptídeos antimicrobianos e IgA dimérica, constituem uma barreira entre os microrganismos luminais e o epitélio intestinal a fim de evitar a adesão microbiana ao epitélio. A disfunção dessa barreira conduz frequentemente ao aumento da permeabilidade intestinal (Ahmad *et al.*, 2017), podendo conduzir a uma condição denominada Síndrome do Intestino Permeável (SIP) ou *Leaky Gut*, que ocasiona respostas inflamatórias intra e extraintestinal. A translocação de microrganismos comensais também afeta a homeostase imunológica ao induzir inflamação sistêmica. No entanto, a microbiota intestinal é um importante fator modulador do sistema imunológico e digestivo (Figura 4) (Belkaid; Harrison, 2017; Mu *et al.*, 2017).

Figura 4: Diagrama representativo das respostas autoimunes induzidas pela disbiose e síndrome do intestino irritável (SIP)



Fonte: Adaptado de Kinasi *et al.* (2021). **Legenda:** IgA, imunoglobulina A.

Dentre os fatores causais da disbiose, o uso de antibióticos é um dos que mais afeta negativamente a diversidade da microbiota intestinal, de modo que o seu uso repetido dificulta a restauração dessa microbiota. O uso de antibióticos na infância tem sido associado com maior probabilidade de desenvolver doenças inflamatórias intestinais e predisposição para asma e obesidade na vida adulta (Korpela *et al.*, 2016). O tratamento recorrente com antibióticos modifica dramaticamente o equilíbrio microbiano a curto e longo prazo, incluindo diminuições na riqueza e diversidade da comunidade bacteriana do hospedeiro (Thursby; Juge, 2017).

Como alternativa, prebióticos podem estimular o crescimento de microrganismos benéficos que compõem a microbiota intestinal e que promovem a saúde e o bem-estar do hospedeiro (Badilla *et al.*, 2020). A ingestão de prebióticos em combinação com probióticos, conceituados como microrganismos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, podem conferir benefício à saúde, pode proporcionar a recuperação da microbiota intestinal de forma mais efetiva após o uso de antibióticos, sendo, portanto, uma prática de relevante de aplicação em situações de disbiose (Yang *et al.*, 2019).

2.5 PREBIÓTICOS

A definição de prebiótico foi adotada pela primeira vez por Gibson e Roberfroid (1995), sendo conceituado como “um ingrediente alimentar não digerível capaz de conferir benefícios ao hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias no cólon e, assim, melhorando a saúde do hospedeiro”. De acordo com esta definição, apenas alguns compostos do grupo dos carboidratos, como os frutooligosacarídeos (FOS), inulina, lactulose e galactooligosacarídeos (GOS) podiam ser classificados como prebióticos.

Em 2016, a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP – *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*) atualizou a definição de prebiótico, conceituando-o como “um substrato utilizado de forma seletiva por microrganismos hospedeiros para promover benefício à saúde”. Essa definição incluiu substâncias além dos carboidratos, que podem ser encontradas em diversos alimentos, podendo conferir benefícios não apenas ao trato gastrointestinal, mas também a outros microbiomas do hospedeiro (Gibson *et al.*, 2017).

Durante muito tempo, o conceito de seletividade de utilização dos prebióticos pelo microbioma do hospedeiro se restringiu apenas à estimulação de crescimento de espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* no intestino humano. Porém, com os avanços tecnológicos de metodologias de sequenciamento de ácidos nucleicos e da bioinformática, constatou-se que a

alteração da microbiota local por prebióticos se dá por meio da modulação de todo o microbioma do hospedeiro. Assim, o consumo de prebióticos caracteriza-se como estratégia dietética pela qual a microbiota intestinal pode ser modificada para benefício à saúde (Vandeputte *et al.*, 2017).

Para classificar um ingrediente alimentar como prebiótico co-lavo na modulação da microbiota intestinal, alguns critérios precisam ser considerados: (I) deve ser resistente ao pH ácido do estômago, à hidrólise por enzimas e à absorção no trato gastrointestinal; (II) pode ser fermentado pela microbiota intestinal; e (III) deve ser capaz de estimular de forma seletiva o crescimento e/ou a atividade de microrganismos associados à saúde e ao bem-estar do hospedeiro (Gibson *et al.*, 2010).

Fibras dietéticas são definidas pelo *Codex Alimentarius* como polímeros de carboidratos que não são digeridos nem absorvidos no trato gastrointestinal, e que são submetidos à fermentação bacteriana, impactando na composição das comunidades bacterianas e na sua atividade metabólica, incluindo a formação de produtos fermentativos (Howlett *et al.*, 2010). É importante destacar que nem todas as fibras podem ser classificadas como prebióticas, embora grande parte dos prebióticos podem ser classificados como fibras dietéticas (Slavin, 2013).

A baixa ingestão de fibras, característica da dieta ocidental, é considerada um dos fatores responsáveis pelo desequilíbrio da microbiota intestinal humana e pelo subsequente aumento de doenças crônicas não transmissíveis, como a obesidade, doenças cardiovasculares, Diabetes tipo 2 e câncer de cólon (Deehan; Walter, 2016).

O impacto do consumo de fibras na microbiota intestinal varia de acordo com o tipo consumido. Além do grau de polimerização, a solubilidade das fibras dietéticas impacta o local da fermentação no trato gastrointestinal humano. Fibras solúveis, como FOS e pectina, são metabolizadas mais próximo ao íleo e ao cólon ascendente por bactérias do trato gastrointestinal, enquanto fibras insolúveis, como a celulose, podem ser parcialmente fermentadas no cólon distal, onde o tempo de trânsito é mais lento e as densidades bacterianas são mais elevadas (Liu *et al.*, 2016).

A fermentação de prebióticos pela microbiota intestinal produz produtos como os AGCC, sendo os mais importantes o butirato, propionato e acetato (Zhou *et al.*, 2013). Esses compostos podem ser encontrados em concentrações mais altas no cólon proximal e concentrações decrescentes no cólon distal (Vadder *et al.*, 2014) e podem se difundir para a circulação sanguínea através dos enterócitos, beneficiando não apenas o trato gastrointestinal, mas também órgãos mais distantes (Besten *et al.*, 2013).

Além de serem importantes produtos de alimentação cruzada, os AGCC também estão envolvidos na homeostase metabólica, imunológica e na integridade da barreira intestinal, e, por isso, são de interesse para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para uso nas doenças inflamatórias intestinais (Morrison; Preston, 2016; Venegas *et al.*, 2019). Ainda, esses metabólitos exercem diferentes efeitos benéficos no metabolismo energético humano, incluindo o metabolismo da glicose, lipídios e colesterol em vários tipos de tecidos (Besten *et al.*, 2013; Venegas *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos são amplamente encontrados em alimentos como frutas e vegetais, e seus benefícios à saúde são comumente relacionados às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Hossen *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2018). Compostos como os ácidos fenólicos e seus metabólitos podem inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas, ao passo que estimulam o crescimento de bactérias benéficas, incluindo probióticos. Estes compostos podem, portanto, atuar de forma local na saúde do trato gastrointestinal, e, após serem absorvidos, exercer efeitos benéficos a nível sistêmico, prevenindo doenças crônicas, como obesidade, hipertensão, aterosclerose e diabetes (Chen *et al.*, 2020; Cueva *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2018).

A maior parte dos compostos fenólicos é metabolizada no cólon intestinal pela microbiota residente, podendo ser fermentados e biotransformados, resultando no aumento da sua absorção e biodisponibilidade (Rossi *et al.*, 2013). Os mecanismos que proporcionam os benefícios dos compostos fenólicos à saúde têm sido associados com sua capacidade de modular a microbiota intestinal (Mosele; Macià; Motilva, 2015), que desempenha um papel fundamental na sua absorção e metabolização (Ozidal *et al.*, 2016).

As propriedades dos compostos fenólicos dependem não apenas da sua concentração no alimento, mas também da sua bioacessibilidade após a ingestão, que sofre influência da matriz alimentar e de suas interações químicas com carboidratos, lipídios e proteínas (Jakobek, 2015). Estudos *in vitro* constatarem efeitos dos compostos fenólicos na diminuição do estresse oxidativo local, indicando que, além do potencial prebiótico, os fenólicos também podem exercer efeitos antioxidantes e/ou antimicrobianos no intestino através da fermentação desses compostos no cólon (Ribeiro *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2023).

2.6 SISTEMA DE FERMENTAÇÃO FECAL *in vitro* E A TÉCNICA DE LIOFILIZAÇÃO

Embora modelos experimentais *in vivo* e ensaios clínicos permitam o estudo de ambientes fisiológicos altamente complexos, tais abordagens são limitadas quanto à sua

capacidade de estudar os efeitos e possíveis mecanismos de degradação microbiana de ingredientes dietéticos funcionais no cólon, além de possuírem limitações por razões éticas e financeiras (Wang *et al.*, 2019). Nesse contexto, os modelos de fermentação *in vitro* oferecem diversas vantagens, como a simulação aproximada da composição e atividade microbiana no trato gastrointestinal, sendo considerados relativamente simples, com controle eficaz, evitando a interferência de outros componentes e permitindo a amostragem dinâmica ao longo do tempo (Jonathan *et al.*, 2012). Além disso, os modelos de fermentação *in vitro* permitem medições quantitativas de metabólitos produzidos pela microbiota após a fermentação de substratos específicos, o que tem implicações importantes para a saúde do hospedeiro (Wang *et al.*, 2019).

A secagem representa um dos procedimentos de armazenamento mais importantes na indústria alimentar, contribuindo para prolongar a vida útil dos produtos e reduzir os custos associados a embalagem e transporte (Doymaz, 2007). Entretanto, alguns alimentos são altamente sensíveis à aplicação de oxigênio e calor, podendo resultar em alterações na qualidade nutricional quando expostos a elevadas temperaturas (Orak *et al.*, 2012; Gümüşay *et al.*, 2015).

A desidratação por ar frio destaca-se como uma das técnicas mais empregadas na produção de produtos em pó de alta qualidade (Karam *et al.*, 2016), sendo considerada o melhor método para secar alimentos que contenham compostos termossensíveis e suscetíveis à oxidação, tais como compostos fenólicos, carotenoides e vitamina C, por operar em baixas temperaturas e sob elevado vácuo (Bhatta; Janezic; Ratti, 2020; Gümüşay *et al.*, 2015).

A liofilização utiliza o fenômeno da sublimação, ocorrendo em três etapas: (a) congelamento, onde há a diminuição da temperatura; (b) secagem primária, na qual o gelo é sublimado, geralmente sob pressão subatmosférica; e (c) secagem secundária, quando é fornecido calor para que a água restante se converta em vapor por sublimação (Bhatta; Janezic; Ratti, 2020). Ao contrário da liofilização, os processos que utilizam altas temperaturas de desidratação podem causar a ativação de enzimas oxidativas, resultando na perda de conteúdo fenólico, atividade antioxidante e alguns compostos voláteis (Kejing *et al.*, 2016; Bhatta; Janeczic; Ratti, 2020). Apesar do elevado custo e períodos de secagem prolongados, a liofilização é considerada a técnica de secagem padrão ou de referência na maioria dos estudos de pesquisa atualmente, por preservar de forma mais eficaz a capacidade antioxidante de alimentos, como frutas e vegetais (Bhatta; Janezic; Ratti, 2020; Kejing *et al.*, 2016).

Diante do exposto, este estudo apresenta uma abordagem inovadora relacionada a caracterização físico-química do liofilizado de cladódios de uma cactácea amplamente encontrada no semiárido nordestino, de modo a poder caracterizá-la como matéria-prima para a obtenção de ingrediente com potenciais propriedades funcionais (antioxidantes e prebióticas),

de modo a fornecer contribuições científicas e tecnológicas por meio da valorização das potencialidades regionais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo trata-se de uma investigação experimental em laboratório do tipo *in vitro*. Estudos *in vitro* são realizados com o objetivo de simular condições biológicas reais em laboratório, fornecendo princípios a serem estudados posteriormente (Freire; Pattussi, 2018).

3.2 LOCAIS DE EXECUÇÃO DA PESQUISA

As etapas de higienização e preparo da amostra foram realizadas no Laboratório de Técnica Dietética, localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (LATED/DCN/UFPB). O processo de liofilização, assim como as análises físico-químicas do material liofilizado, como pH, acidez, atividade de água, cinzas, proteínas, lipídeos e fibras; e análise tecnológica de cor instrumental, foram realizadas no Laboratório de Bromatologia (CCS/UFPB). Os procedimentos para a quantificação de clorofilas foram realizados no Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas localizado no Centro de Ciências Exatas e da Natureza (LARBIM/CCEN/UFPB), enquanto a análise do perfil de minerais foi realizada no Laboratório de Alimentos Funcionais, do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (INJC/UFRJ).

A digestão gastrointestinal simulada, assim como a fermentação fecal e a avaliação da capacidade antioxidante da amostra foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA/CCS/UFPB). A determinação de ácidos orgânicos e compostos fenólicos ocorreu no Laboratório de Águas e Bebidas, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Campus Petrolina (LAB/DTA/IF Sertão-PE, Petrolina, Pernambuco). O perfil metabólico global foi realizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises/Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (LMCA/IPeFarM/UFPB).

3.3 AQUISIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

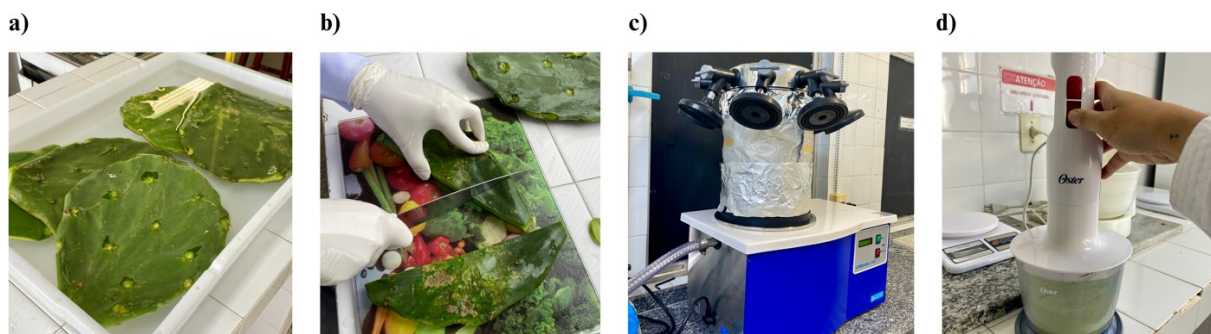
A matéria-prima foi obtida de uma plantação rural de cultivo particular localizada no município de Cuité, Paraíba, Brasil (latitude: 6° 28' 54" Sul, longitude: 36° 8' 59" Oeste) no período de inverno, no mês de julho do ano de 2022. Foram coletados 11 Kg de cladódios jovens de ordem primária, colhidos no período das 05:00 às 07:00 h da manhã, e destes, foi enviado um cladódio contendo espinhos, flores e frutos para a identificação da espécie por um

botânico especialista. Após estes procedimentos, os cladódios foram transportados devidamente acondicionados em caixas de poliestireno em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o Laboratório de Técnica Dietética (LATED/DCN/UFPB) para a seleção, higienização e preparo da amostra. A planta foi identificada pelo Prof. Me. Valdeci Fontes de Sousa, botânico colaborador do Herbário do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande - (HCES/UFCG), onde a espécie foi certificada (3060) e depositada (Anexo A). A coleta do material vegetal foi registrada no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) com número de processo (A1DDB62).

Os cladódios foram previamente selecionados de acordo com a sua integridade física. Posteriormente, foram submetidos aos procedimentos de higienização, que compreendem as etapas de lavagem em água potável corrente para remoção das sujidades e sanitização por imersão em água clorada com hipoclorito de sódio concentrado a 150 ppm por 15min, seguida de enxague com água potável corrente, conforme recomenda a RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004, que dispõe sobre as Boas Práticas para Serviços de Alimentação (BRASIL, 2004).

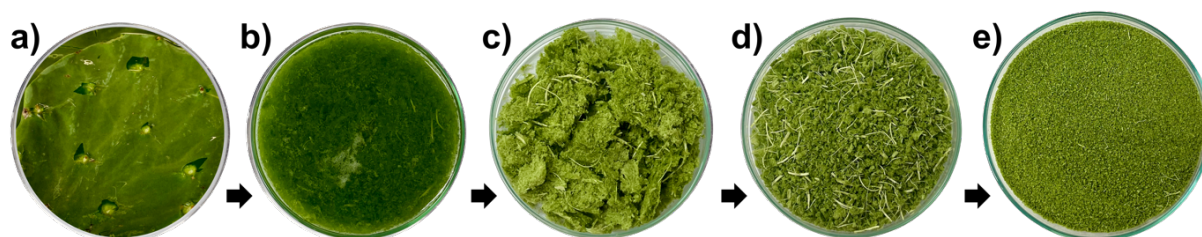
Com o auxílio de luvas e espátula de metal, foram retirados os espinhos e as cascas manualmente, e, em seguida, foram realizados cortes em fatias de aproximadamente 1 cm. Ao final desta etapa, os cladódios foram triturados utilizando liquidificador doméstico (modelo PH900, Philco®, São Paulo, SP, Brasil, velocidade baixa, 3 min), congelados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, secados em liofilizador de bancada (modelo L-101, Liotop®, São Carlos, SP, Brasil, temperatura de $-56 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, pressão de vácuo de $<170\text{ }\mu\text{HG}$, velocidade de liofilização de 1 mm/hora) por aproximadamente 24 h, e triturados utilizando um mixer doméstico (modelo 42MIX2002000 Turbo Chef Vertical Elgin®, 200W, alta velocidade, 2 min). O material triturado foi tamisado em peneira de malha ultrafina (modelo nº 16, Master Frita®, aço inoxidável) para retirar os resíduos fibrosos, até se obter um pó com tamanho médio de partícula menor que 1,0 mm. Por fim, o liofilizado dos cladódios de palma (LCP) foi armazenado em refrigerador a $4 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em frascos de vidro esterilizados que foram envolvidos com papel alumínio até o momento da realização das análises posteriores. O processo até a obtenção do pó liofilizado está ilustrado nas Figuras 5 e 6.

Figura 5: Etapas de higienização e pré-preparo para liofilização dos cladódios de palma.



Fonte: Autoria própria (2023). **Legenda:** a) cladódios de palma *in natura* em processo de higienização; b) cladódios de palma em processo de segmentação; c) amostra em processo de liofilização; d) amostra em processo de trituração.

Figura 6: Etapas do processamento para a obtenção do liofilizado dos cladódios de palma



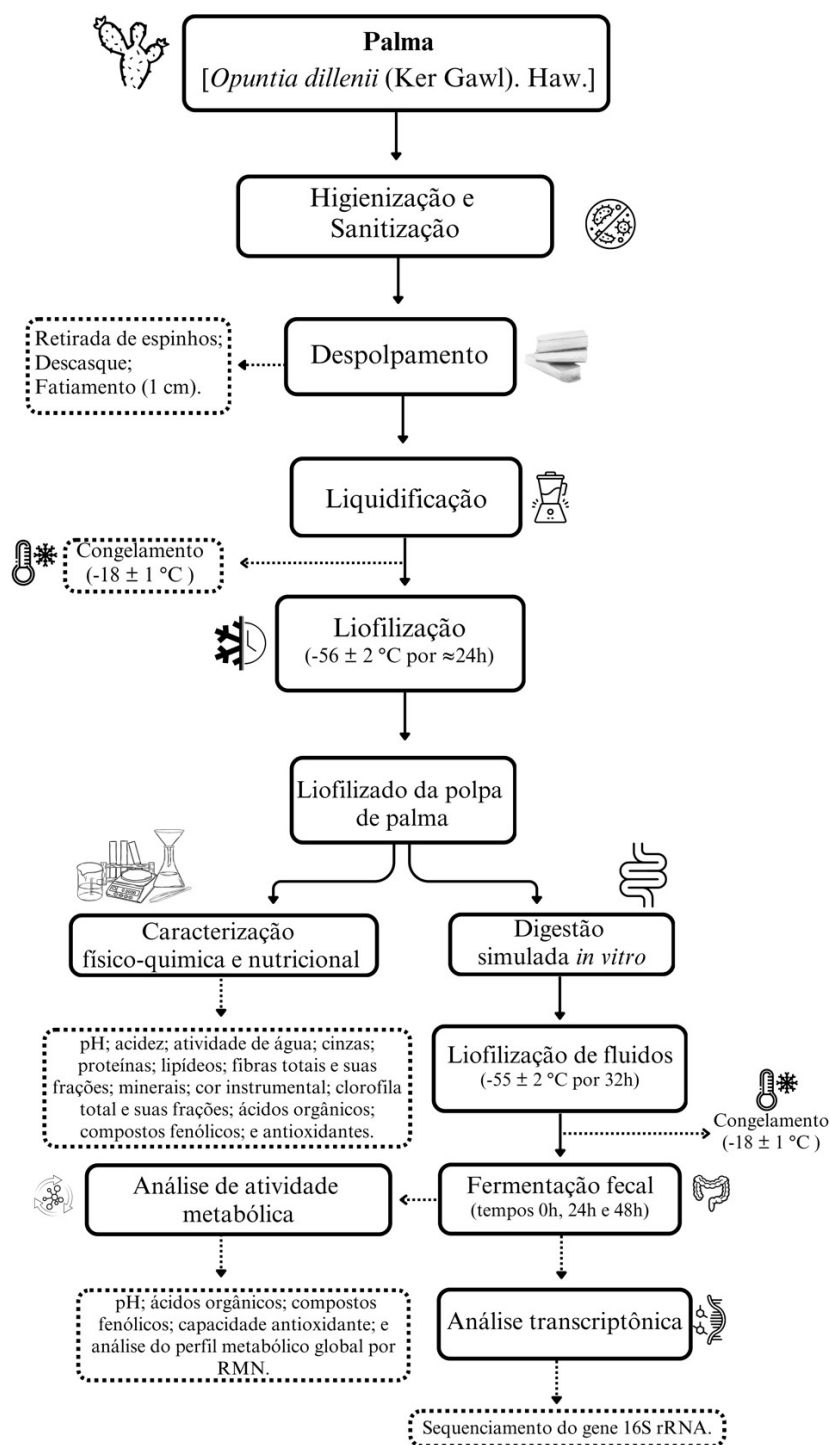
Fonte: Autoria própria (2023). **Legenda:** a) cladódio *in natura* sem espinhos; b) cladódio de palma *in natura* liquidificado; c) cladódio de palma liquidificado e liofilizado; d) material liofilizado e triturado; e) material final liofilizado, triturado e peneirado.

3.4 DESENHO DO ESTUDO

Após a higienização dos cladódios, o material foi liofilizado e foram realizadas as etapas de caracterização físico-química, nutricional e de cor instrumental. Em seguida, os processos de digestão gastrointestinal simulada e diálise foram executados. Os fluidos do processo final da digestão foram congelados e liofilizados para a utilização em sistema de fermentação fecal *in vitro* com inóculo fecal humano. Os processos de separação e quantificação de ácidos orgânicos e compostos fenólicos foram realizados, e os metabólitos foram identificados por meio de ressonância magnética nuclear. As mudanças na atividade metabólica ao longo da

fermentação, incluindo potencial prebiótico e capacidade antioxidante, foram monitoradas. As etapas da execução do estudo estão apresentadas na Figura 7.

Figura 7: Desenho experimental do estudo



Fonte: Autoria própria (2023). **Legenda:** RMN: ressonância magnética nuclear.

3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LIOFILIZADO DOS CLADÓDIOS DE PALMA

O LCP foi submetido às análises de parâmetros físico-químicos e nutricionais. Todas as análises foram realizadas em triplicata, as quais foram: pH; acidez titulável; atividade de água (a_w); cinzas; quantificação do teor de proteína; determinação de lipídios; teores de fibras totais, solúveis e insolúveis; perfil de minerais; quantificação dos teores de clorofila (total, a e b); cor; ácidos orgânicos; compostos fenólicos; e capacidade antioxidante.

Os valores de pH foram determinados pelo método eletrométrico com o uso de potenciômetro de bancada (modelo Q400AS, Quimis®, São Paulo, SP, Brasil), seguindo a metodologia da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2019). A acidez total titulável foi realizada baseada na neutralização da amostra com solução padrão de NaOH 0,1N determinada por titulometria, utilizando fenoftaleína como indicador (AOAC, 2019). A atividade de água (a_w) foi determinada sob temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando-se o equipamento modelo AquaLab®, CX-2, (Decagon, São José dos Campos, SP, Brasil) seguindo metodologia descrita pelo fabricante.

Para a determinação dos teores de proteínas foi utilizado o método Kjeldahl e fator de conversão de 5,75 recomendado para proteínas de origem vegetal, como descrito pela AOAC (2019), enquanto a quantificação dos lipídios foi realizada pelo método de Folch, Lees e Stanley (1957). Os teores de fibras totais, assim como os teores de fibra solúvel e insolúvel, foram determinados utilizando um kit de ensaio enzimático-gravimétrico (TDF 100A, Sigma Aldrich®, St. Louis, MA, EUA), seguindo a metodologia da AOAC (2019).

A digestão das amostras para a análise do perfil de minerais foi realizada de acordo com métodos oficiais da AOAC (2019). As amostras foram carbonizadas em placa aquecedora, e, em seguida, foram colocadas em mufla a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 6 h. Ao final deste período, as cinzas foram umedecidas com água Milli-Q® (Sistema de Purificação Integral de Água, EMD Millipore Corporation, Billerica, EUA) e foi adicionado 1 mL de ácido nítrico concentrado, aquecendo em placa até completa secagem. As amostras foram reaquecidas em mufla a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 elementos foi realizada utilizando a técnica analítica de Espectrometria de Emissão Ótica com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES), sequencial, com visão radial, marca Horiba Jobin Yvon, modelo Ultima 2 (Longjumeau, França), equipado com câmara de nebulização ciclônica, nebulizador do tipo MiraMist (Mira Mist CE, Burgener Research Inc., Ontario, Canadá),

amostrador automático modelo AS 421 e software operacional Analyst 5.4 para aquisição dos dados. 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 segundo de tempo de integração. A quantificação foi realizada por interpolação utilizando curva analítica com quatro soluções-padrão para a calibração. As soluções de calibração foram preparadas a partir da diluição de solução-padrão estoque SpecSol de concentração 1000 ou 10000 mg/L (Quimlab Química & Metrologia®, Jardim Califórnia, Jacareí, SP, Brasil) até a obtenção das concentrações desejadas, utilizando assemelhamento de matriz. Os resultados foram expressos em mg/100 g.

A quantificação dos teores de clorofila (total, a e b) foi realizada utilizando a metodologia preconizada pela AOAC (2019). Aproximadamente 50 mg das amostras foram homogeneizadas com alíquotas de 2,5 mL de acetona 85% (v/v) a 5 °C durante 5 min. Em seguida, outros 10 mL de acetona em concentração de 85% (v/v) a 5 °C foram adicionados, homogeneizados, seguidos de centrifugação (1696 × g, 5 min). Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados, e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro de UV/VIS (Bel, modelo UV-M51, Itália) nos comprimentos de onda de 660 nm e 642,5 nm. Os resultados foram obtidos com o uso das Equações 01, 02 e 03, sendo expressos em mg de clorofila/100 g da amostra.

$\text{Clorofila total} = 7,12 A_{660} + 16,8 A_{642,5}$	(01)
$\text{Clorofila a} = 9,93 A_{660} - 0,777 A_{642,5}$	(02)
$\text{Clorofila b} = 17,6 A_{642,5} - 2,81 A_{660}$	(03)

Para a análise colorimétrica, a cor instrumental do LCP foi determinada com base no sistema CIELAB (L^* , a^* e b^*) (Comissão Internacional em Iluminação Lab) utilizando um colorímetro portátil Konica Minolta (CR/10 - Japão). As cores no LCP foram descritas por luminosidade (L^*) numa escala de variável de 0 = preta a 100 = branca; a^* representando a intensidade de cor com valores variando de $-a^*$ = verde e $+a^*$ = vermelha; b^* com variação de $-b^*$ = azul e $+b^*$ = amarela (Boiteux, 2007).

Para a identificação dos ácidos orgânicos (málico, cítrico, succínico, fórmico e acético) foram preparados extratos aquosos do LCP. Para isso, misturou-se 1 g do LCP com 10 mL de água ultrapurificada (Milli-Q® Sistema de Purificação Integral de Água, EMD Millipore

Corporation, Billerica, EUA) usando um aparelho tipo Turratrec (TE-102, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). A mistura foi centrifugada (centrífuga MPW-351R, MPW Medical Instruments, Warsaw, Poland) ($4000 \times g$, 15 min, 24 °C) e o sobrenadante foi filtrado duas vezes (papel de filtro qualitativo e membrana de celulose regenerada, tamanho de poro de 0,45 μm ; Whatman®, GE Healthcare, Chicago, EUA) (Coelho *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019).

Para a identificação de compostos fenólicos (ácidos fenólicos: ácido caftárico, ácido clorogênico e ácido cafeico; flavanóis: catequina, galato de epicatequina, procianidina B2, galato de epigallocatequina e epicatequina; flavonóis: miricetina, quercetina 3-glicosídeo, kaempferol 3-glicosídeo e isorhamnetina; flavanonas: hesperidina e rutina; e estilbenos: cis-resveratrol e trans-resveratrol) foram preparados extratos metanólicos do LCP. Para isso, misturou-se 1 g do LCP com 10 mL de metanol a 80% a 30 °C durante 60 min com uso de ultrassonicador (Ultrasonic, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil). As misturas foram centrifugadas ($4000 \times g$, 15 min, 24 °C) e os sobrenadantes foram filtrados (membrana de celulose regenerada - hidrofílico, Filtrilo, SRFC-2545, poro de 0,45 μm , diâmetro de 25 mm) (Padilha *et al.*, 2017; Moro *et al.*, 2018).

A identificação de ácidos orgânicos e compostos fenólicos foram realizada por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Agilent (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, St. Clara, EUA) equipado com bomba de solvente quaternário (modelo G1311C), desgaseificador, compartimento da coluna termostática (modelo G1316A) e amostrador automático (modelo G1329B), acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) (modelo G1315D) e detector de índice de refração (DIR) (modelo G1362A). As outras condições analíticas foram as seguintes: coluna Hydro-RP C18 (150 x 4.6 mm, 4 micrômetros); fase móvel H₂SO₄ a 4 mM/L em água ultrapura e taxa de fluxo 0,7 mL/min. Os dados foram processados usando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies, St. Clara, EUA). Os picos da amostra observados na CLAE foram identificados comparando seus tempos de retenção com os respectivos padrões para ácidos orgânicos e compostos fenólicos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O teor de ácidos orgânicos foi expresso em g/100 g e os compostos fenólicos foram expressos em mg/100 g.

3.5.1 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

Para a determinação da capacidade antioxidante equivalente a trolox por meio da captura do radical 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}) e a capacidade antioxidante por meio da eliminação do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), utilizou-se as metodologias de Blois (1958) Re *et al.* (1999), respectivamente, com algumas

modificações, enquanto o poder antioxidante para a redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} no ensaio de FRAP foi avaliado de acordo com a metodologia adaptada de Benzie e Strain (1996).

3.5.1.1 Obtenção do extrato

A obtenção do extrato se deu por meio de hidrólise ácida seguindo metodologia adaptada de Massa *et al.* (2020). Pesaram-se 2 g do LCP, seguido de diluição em 20 mL da solução extratora de metanol a 80% (70:30, v/v) e ajustado o pH em 2 com HCl a 1 M em tubo Falcon de 50 mL. Em seguida, o tubo foi envolto em papel alumínio para proteção da luz e armazenado sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) por 24 h. O conteúdo foi levado para uma centrífuga refrigerada (MPW[®]) e centrifugado ($1696 \times g$, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para as análises.

3.5.1.2 Capacidade antioxidante *in vitro* - Método ABTS^{•+}

O método se baseia na geração do radical monocatión ABTS, que pode ser reduzido (ABTS^{•+}) por meio de compostos antioxidantes presentes nas amostras. É um método amplamente utilizado, com ensaio simples, rápido e sensível, que pode medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica ou lipofílica. À medida que os antioxidantes se ligam ao radical ABTS, a solução inicialmente verde torna-se incolor. A capacidade antioxidante é observada pelo decréscimo da absorbância, ou seja, pela descoloração do ABTS^{•+} (Blois, 1958).

O radical ABTS^{•+} foi formado por meio da reação da solução ABTS a 7 mM com a solução de persulfato de potássio a 140 mM, que foram incubados em temperatura de 25 ± 1 °C no escuro durante 16 h. Após a formação do radical, foi realizada a diluição em álcool etílico absoluto até obter o valor de absorbância de $0,70 \pm 0,05$ nm a 734 nm. Para a análise, foram elaboradas diferentes diluições do extrato, onde transferiram-se 50 µL de cada diluição em uma microplaca de 96 poços e acrescentaram-se 250 µL do radical ABTS^{•+}. O controle foi a mistura da solução extratora (50 µL) e o radical ABTS^{•+} (250 µL). Para o branco, foi utilizada apenas a solução extratora (300 µL). As amostras foram mantidas na ausência de luz por 6 min e feita a leitura da absorbância em comprimento de onda de 734 nm, usando espectrofotômetro BioTek Eon (Winooski, VT, USA) para medir a diminuição na concentração do radical livre ABTS^{•+}. A atividade antioxidante foi calculada usando uma curva padrão de Trolox a 2 mM (50-2000 µM). Os resultados foram expressos em µmol de Trolox por g de amostra – (µmol Trolox/g).

3.5.1.3 Capacidade antioxidante *in vitro* - Método DPPH•

O método baseia-se na capacidade dos antioxidantes das amostras se ligarem ao radical orgânico estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Esse é realizado por meio de um ensaio simples, rápido e sensível. No entanto, não determina agentes pró-antioxidantes, apenas o poder redutor. À medida que os antioxidantes se ligam ao radical livre, a solução inicialmente violeta torna-se amarelada, ou seja, a capacidade antioxidante é observada pelo decréscimo da absorbância, causada pela descoloração do DPPH• (Re *et al.*, 1999).

Elaborou-se uma solução estoque de DPPH• (24 mg diluído em 100 mL de álcool etílico absoluto), da qual foi preparada a solução de trabalho na diluição 1:10 em álcool etílico absoluto. Preparou-se também uma solução padrão de Trolox a 2 mM (25 mg em 50 mL de álcool etílico absoluto) como referência. Para a análise, foram elaboradas diferentes diluições do extrato, onde retiraram-se 50 µL de cada uma e acrescentaram-se 1950 µL da solução de trabalho de DPPH•. Em seguida, realizou-se homogeneização em agitador de tubos tipo Vortex (Technal®, modelo AP-56/1, São Paulo, Piracicaba, Brasil) e a mistura foi mantida sob repouso por 30 min em temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) no escuro. O controle foi a mistura da solução extratora (50 µL) e solução de trabalho de DPPH• (1950 µL). Para o branco foi utilizado apenas a solução extratora (250 µL).

Transferiram-se 250 µL da mistura para uma microplaca de 96 poços e foi feita a leitura em comprimento de onda de 515 nm usando um espectrofotômetro BioTek Eon (Winooski, VT, USA), para medir a diminuição na concentração do radical livre DPPH•. A atividade antioxidante foi calculada usando uma curva padrão de Trolox a 2 mM (50-2000 µM). Os resultados foram expressos em µmol de Trolox por g de amostra – (µmol Trolox/g).

3.5.1.4 Capacidade antioxidante *in vitro* - Método FRAP

Esse método tem por finalidade determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. Pode ser aplicado a uma grande variedade de alimentos, bebidas e substâncias puras. Seus resultados são comparáveis àqueles obtidos com metodologias comumente utilizadas e mais complexas, sendo mais reprodutíveis e com elevada correlação com os teores de grupos fenólicos. À medida que um composto apresenta atividade antioxidante, ocorre a redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} ,

passando de uma coloração azul-claro para azul-escuro. A capacidade antioxidante é observada pelo acréscimo da absorbância (Benzie; Strain, 1996).

O reagente FRAP foi preparado somente no momento da análise utilizando uma mistura de 25 mL de tampão acetato (0,3M, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM em HCl a 40 mM) e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 20 mM em 50 mL de água destilada, na proporção 100:10:10. Para a análise, foram elaboradas diferentes diluições do extrato, onde retiraram-se 45 µL de cada uma e acrescentaram-se 135 µL de água destilada, seguido da adição de 1,35 mL do reagente FRAP. Realizou-se homogeneização em agitador de tubos tipo Vortex (Tecnal®) e a mistura foi incubada em banho ultratermostatizado (Splabor®, SP-152/10, São, Paulo, Brasil) a $37 \pm 0,5$ °C por 30 min no escuro.

A solução controle foi o próprio reagente FRAP. Transferiu-se 250 µL da mistura em uma microplaca de 96 poços e foi feita a leitura em comprimento de onda de 595 nm usando um espectrofotômetro BioTek Eon (Winooski, VT, USA), para medir a redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} . A atividade antioxidante foi calculada usando uma curva de sulfato ferroso a 2 nM (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 (µmol FeSO_4/g).

3.6 DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA

O LCP foi submetido a uma digestão gastrointestinal *in vitro* a fim de se obter materiais com características semelhantes àqueles que alcançam o cólon humano. As simulações foram feitas continuamente em fases que simulam as condições da boca, estômago, duodeno e íleo, conforme adaptações da metodologia descrita por Sampaio *et al.* (2022). Inicialmente, 5 g do LCP foram misturadas a 25 mL de água destilada esterilizada e homogeneizadas por 15 min em frascos de vidro previamente esterilizados em autoclave. Para a simulação da condição oral, foram adicionados 1,2 mL de α -amilase (100 U/mL de α -amilase diluída em 1 mM de CaCl_2), com pH ajustado para 6,9 com solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3 a 1 M), com exposição sob agitação mecânica ($34,04 \times g$, 2 min). Após esta etapa, iniciou-se a simulação da condição estomacal, onde o pH da mistura foi ajustado para 2,0 com NaHCO_3 a 1 M, adicionado de pepsina (25 mg de pepsina diluída em 1 mL de 0,1 M HCl) e mantido a $37 \pm 0,5$ °C em agitação mecânica ($11,08 \times g$, 90 min). As condições duodenais foram simuladas com adição de solução intestinal (2 g de pancreatina/L de NaHCO_3 a 0,1 M e 12 g de sais biliares bovinos/L de NaHCO_3 a 0,1 M), na quantidade de 0,25 mL x volume total da etapa anterior. Em seguida,

o pH foi ajustado para 5,0 com NaHCO_3 a 1 M e a mistura foi incubada a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min sob agitação mecânica ($1,54 \times g$, 30 min). Por fim, as condições do íleo foram simuladas com pH ajustado para 6,5 com solução de NaHCO_3 a 0,1 M, tempo de exposição de 60 min sob mesma agitação da etapa anterior (Sampaio *et al.*, 2022).

Os fluidos resultantes da digestão simulada passaram pelo processo de diálise para a retirada de produtos digestivos de baixo peso molecular (monossacarídeos livres), simulando condições de absorção das células no intestino. Para tanto, os fluídos foram transferidos para um tubo de diálise de celulose regenerada de 1 kDa de peso molecular (Spectra/Por 6, Spectrum Europe, Holanda) e dialisados contra uma solução de NaCl a 0,01 M a $5 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Após 18 h, os fluidos de diálise foram substituídos e o processo continuado por um período adicional de 2 horas (Sampaio *et al.*, 2022). Os fluídos dialisados foram liofilizados novamente (conforme item 3.3) e armazenados sob refrigeração ($5 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$) por até uma semana, até sua utilização na fermentação fecal.

A agitação mecânica foi usada para simular movimentos peristálticos e os experimentos foram realizados em incubadora com agitação orbital e temperatura controlada (TE-424, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, com ajuste de rotação em cada fase.

3.7 FERMENTAÇÃO FECAL *in vitro*

3.7.1 Procedimentos éticos

Considerando as exigências do Conselho Nacional de Saúde, este estudo foi submetido à apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde/UFPB, tendo em vista a utilização de material biológico proveniente de fezes humanas, baseado na Resolução nº 466/12 (Brasil, 2012), que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. O protocolo experimental foi aprovado sob o número 5.906.607, CAAE: 66.834.523.7.0000.5188, de acordo com o parecer consubstanciado (ANEXO B). Para participar, os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) antes do início dos experimentos.

3.7.2 Coleta das amostras fecais

As amostras fecais frescas foram doadas por seis voluntários adultos saudáveis, sendo três do sexo masculino e três do sexo feminino, com idade variando entre 19 e 40 anos de idade.

Os voluntários foram recrutados na UFPB, onde foram informados previamente sobre os procedimentos necessários para a coleta, assim como esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa.

Como critérios de inclusão, os doadores deveriam estar seguindo uma dieta onívora, sem precedentes de doença no intestino grosso, sem uso de probióticos ou prebióticos concentrados, além do não uso de antibióticos ou qualquer outro medicamento de uso controlado por, pelo menos, seis meses antes da coleta. Foram excluídos do estudo aqueles que possuísssem comorbidades que exigissem a utilização de quaisquer substâncias citadas anteriormente, assim como aqueles que por algum motivo não conseguiram realizar a coleta do material fecal conforme previamente combinado.

Um kit para coleta foi disponibilizado para cada doador, contendo frascos coletores esterilizados, luvas, prato e espátula descartável, álcool a 70%, além de serem instruídos quanto ao manuseio asséptico do material. As amostras foram coletadas no domicílio de cada doador em até 60 min após a excreção, sendo transportadas em sistema de anaerobiose (Probac®, AnaeroBac, Brasil) até o laboratório para as posteriores análises (Menezes *et al.*, 2021a). Para o recrutamento dos participantes, foi solicitada Carta de Anuência à coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição/CCS/UFPB, aprovando a realização dessa etapa da pesquisa, assim como solicitada ao participante a assinatura do TCLE.

3.7.3 Preparo das amostras fecais

As amostras fecais frescas coletadas de cada doador foram misturadas em igual quantidade (1:1:1:1:1), diluídas (1:10 p/v) em solução salina com 0,5 g/L de cisteína e 8,5 g/L de NaCl e homogeneizadas sob agitação ($34,04 \times g$, 2 min). O inóculo fecal diluído e homogeneizado foi filtrado em frasco de vidro esterilizado com o uso de camada tripla de gazes esterilizadas para remoção de partículas grandes. Após filtração, o inóculo fecal fresco foi utilizado (Andrade *et al.*, 2020; Menezes *et al.*, 2021b).

3.7.4 Preparo do meio de crescimento e do sistema de fermentação fecal *in vitro*

Para o processo de fermentação fecal *in vitro* foi utilizado 1 L de meio de crescimento esterilizado em autoclave (121 °C, 1 atm, 15 min), com a seguinte composição: cloreto de sódio (NaCl, 4,5 g), cloreto de potássio (KCl, 4,5 g), bicarbonato de sódio (NaHCO₃, 1,5 g), sulfato de magnésio (MgSO₄, 0,69 g), sulfato ferroso (FeSO₄, 0,05 g), cloreto de cálcio (CaCl₂, 0,08),

fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4 , 0,5 g), sal biliar (0,4 g), polissorbato (Tween 80®, 1 mL), L-cisteína (0,8 g) e solução de resazurina (4 mL a 0,025%) como indicador anaeróbico de oxirredução, diluídos em água destilada esterilizada. Em seguida, o LCP foi submetido à fermentação com o inóculo fecal preparado. O volume final da fermentação foi de 40% do meio de fermentação, 40% do inóculo fecal e 20% do LCP digerido e liofilizado novamente, incubados anaerobicamente (AnaeroBac) a 37 °C por 48 h para posteriores análises (Hu *et al.*, 2013; Menezes *et al.*, 2021a). Um meio de fermentação contendo FOS (20%) e sem substrato adicionado (CN) foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente, sendo submetidos aos mesmos procedimentos citados acima. Os ingredientes usados para preparar o meio de fermentação foram obtidos da *Sigma-Aldrich*.

3.7.5 Análise transcriptômica da microbiota fecal pela técnica de 16S rRNA

A análise transcriptômica empregando o sequenciamento do gene 16S rRNA foi realizada utilizando a técnica de *Next-generation Sequencing* (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, SC, Brasil). Alíquotas de 2 mL foram coletadas nos tempos zero e 48 h de fermentação fecal, homogeneizadas, fracionadas em microtubos, e, em seguida, foi realizada a extração do DNA genômico usando o kit QIAamp DNA Stool Mini (QIAGEN, Hildren, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. A composição da microbiota intestinal foi analisada pela 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) e Hong *et al.* (2006).

A amplificação da região 16S rRNA 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 rRNA, 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 triplicata, 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. As amostras foram processadas no termociclador Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA), sendo desnaturadas por 3 min 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 min 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 > 1050.000 leituras mescladas, um subconjunto de 1050.000 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. Os índices de diversidade alfa e beta foram calculados usando o programa QIIME (versão 1.8.0), tamanho do efeito LDA foi calculado e plotado usando a análise LefSe.

3.8 MONITORAMENTO DE INDICADORES DE ATIVIDADE METABÓLICA

Os valores de pH e teores de ácidos orgânicos (málico, cítrico, succínico, fórmico e acético) foram determinados em meios com LCP, FOS (controle positivo) e CN (controle negativo) durante os tempos zero, 24 h e 48 h de fermentação com técnica de CLAE, conforme descrito na seção 3.5. Para a realização da identificação dos ácidos orgânicos foi preparado um extrato aquoso contendo 2 mL de cada sistema de fermentação, diluído em 10 mL de água ultrapurificada (Milli-Q®) por 10 min com triturador (Tecnal). O conteúdo foi centrifugado ($1696 \times g$, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,45 µm (Whatman®). Os picos e as áreas médias de pico foram utilizados para quantificação dos compostos por meio da comparação dos seus tempos de retenção com os padrões de ácidos orgânicos (Coelho *et al.*, 2018; Batista *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; Padilha *et al.*, 2017). Para a realização dessas análises, os padrões de ácidos foram obtidos da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), todos com pureza de $\geq 99\%$. Os resultados foram expressos em g/L.

Para a determinação dos compostos fenólicos majoritários foram retirados 2 mL de cada sistema de fermentação em todos os tempos e seguiram-se procedimentos descritos conforme descrito no item 3.5. Os resultados foram expressos em mg/L. 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 itens 3.5.1.2, 3.5.1.3, e 3.5.1.4, respectivamente.

Além desses ensaios, também foi realizada a determinação do perfil metabolômico global a partir da técnica qualitativa de ressonância magnética (RMN). Trata-se de um método robusto que analisa qualitativamente amostras em nível molecular sem exigir etapas de separação e/ou purificação de amostras. Para tal, uma alíquota de 2 mL de cada amostra fermentada foi diluída em 2 mL de uma solução com metanol e água deuterada filtrada (9:1, v/v) e a solução resultante (600 µL) foi colocada em um tubo de 5 mm de diâmetro para análise de RMN. Os experimentos foram realizados em um equipamento Bruker Avance Neo 500 operando a 500 MHz para ¹H e a 125 MHz para ¹³C (Bruker, Billerica, MA, EUA). Os seguintes parâmetros foram usados para obter a sequência do espectro: *lc1pngpf2*; temperatura: 26 °C; número de varreduras: 64; varredura dummer: 4; ganho do receptor: 36; tempo de aquisição: 3,27 s. Os espectros foram processados usando o *software* Bruker TopSpin versão 4.1.1. (Hatzakis, 2018).

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises foram realizadas em triplicata em três experimentos independentes e os resultados foram expressos como média e desvio padrão. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi usado para determinar a distribuição normal dos dados. 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) seguido pelo teste de Tukey. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o *software* Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS Statistics, versão 22.0).

4 RESULTADOS

De acordo com os resultados obtidos, o LCP apresentou elevados teores de fibras totais ($52,63 \pm 0,16$ g/100g), fibras solúveis ($33,36 \pm 0,12$ g/100g) e fibras insolúveis ($19,00 \pm 0,14$ g/100 g), proteínas ($16,84 \pm 0,37$ g/100 g) e lipídios ($4,98 \pm 0,47$ g/100 g). Além de elevados teores de clorofila total ($912,00 \pm 0,03$ mg/100 g), clorofila a ($565,00 \pm 0,10$ mg/100 g) e clorofila b ($349,00 \pm 0,08$ mg/100 g), apresentando baixa luminosidade (L^* : 32,91) e coloração verde-amarela (a^* : - 3.19; b^* : 5.02). Foram identificados nove minerais no LCP, sendo potássio ($4415,49$ mg/100 g), cálcio ($1593,25$ mg/100 g), sódio ($1010,52$ mg/100 g) e magnésio ($853,55 \pm 10,69$ mg/100 g) os macroelementos mais prevalentes, além de microelementos importantes como o manganês ($8,92 \pm 0,30$ mg/100 g), zinco ($5,95 \pm 0,24$ mg/100 g) e ferro ($3,72 \pm 0,02$ mg/100 g). O LCP apresentou diversos ácidos orgânicos, com prevalência do ácido málico ($16,84 \pm 0,03$ g/L), ácido cítrico ($4,43 \pm 0,08$ g/L) e ácido succínico ($3,26 \pm 0,07$ g/L), além de compostos fenólicos, como miricetina ($785 \pm 0,09$ mg/100 g), ácido caftárico ($265 \pm 0,01$ mg/100 g) e hesperidina ($135 \pm 0,01$ mg/100 g). No decorrer das 48 h de fermentação fecal, houve diminuição no conteúdo de ácidos orgânicos como ácido málico, ácido fórmico e ácido acético. Ao longo da fermentação fecal foram detectados compostos fenólicos como catequina, miricetina, isorhamnetina e rutina, que também foram reduzidos no decorrer do tempo. Quando avaliada por FRAP e ABTS⁺⁺, a capacidade antioxidante do LCP aumentou ao longo das 48 h de fermentação, e diminuiu quando medida por DPPH^{*}. Quando comparado ao controle positivo (FOS), o meio contendo LCP apresentou maior diversidade bacteriana ao longo da fermentação fecal, bem como maior relação entre Firmicutes:Bacteroidetes (F:B). Importantes alterações na composição da microbiota intestinal foram observadas no meio contendo LCP, tais como aumento da abundância de microrganismos benéficos à saúde intestinal, a exemplo de *Ligilactobacillus* e *Lactiplantibacillus*, em detrimento do decréscimo de *Prevotella_9* e *Succinivibrio*, além da detecção de diversos metabólitos importantes por meio da análise do perfil metabólico global, como o acetato, propionato e butirato, e aminoácidos, como leucina, valina e isoleucina.

Os resultados da dissertação estão apresentados e discutidos de forma detalhada como artigo científico (apêndice B).

REFERÊNCIAS

AAGAARD, K. *et al.* The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 237, p. 237, 2014.

ABREU, N. C. O.; DINIZ, J. C. As Vantagens da introdução das Plantas Alimentícias Não Convencionais na alimentação dos beneficiários do Bolsa Família da Estratégia Saúde Da Família Bernardo Valadares, em Sete Lagoas-Mg. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**, v. 5, n. 4, p. 16-16, 2017.

AGUILAR, R. I. V. *et al.* Cactus stem (*Opuntia ficus-indica* Mill): anatomy, physiology and chemical composition with emphasis on its biofunctional properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 15, p. 5065-5073, 2017.

AHMAD, R. *et al.* Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 2, p. 307-317, 2017.

AMMAR, I. *et al.* Phenolic profiles, phytochemicals and mineral content of decoction and infusion of *Opuntia ficus-indica* flowers. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 4, p. 388-394, 2015.

ANDRADE, R. M. S. *et al.* Potential prebiotic effect of fruit and vegetable byproducts flour using *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 137, p. 109354, 2020.

ARAGONA, M. *et al.* *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller as a source of bioactivity compounds for health and nutrition. **Natural Product Research**, v. 32, n. 17, p. 2037-2049, 2018.

ARAÚJO, D. F. S. *et al.* Food Plants in the Caatinga. In: **Local Food Plants of Brazil**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 225-250.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**, 2th. ed. Gaithersburg: AOAC, 2019.

AVERSHINA, E. *et al.* Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 87, n. 1, p. 280-290, 2014.

AYOUB, T. E. M. *et al.* Technological characteristics and selected bioactive compounds of *Opuntia dillenii* cactus fruit juice following the impact of pulsed electric field pre-treatment. **Food Chemistry**, v. 210, p. 249-261, 2016.

BADILLA, O. S. *et al.* Use of coconut water (*Cocos nucifera* L) for the development of a symbiotic functional drink. **Heliyon**, v. 6, n. 3, 2020.

BARBERA, G.; INGLESE, P.; BARRIOS, E. P. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Roma: Estudo da FAO em Produção e Proteção Vegetal, 1995. Tradução SEBRAE/PB/FAO, 2001. 216 f.

- BARBIERI, R. L. *et al.* Agricultural biodiversity in Southern Brazil: Integrating efforts for conservation and use of neglected and underutilized species. **Sustainability**, v. 6, n. 2, p. 741-757, 2014.
- 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.
- BELKAID, Y.; HARRISON, O. J. Homeostatic immunity and the microbiota. **Immunity**, v. 46, n. 4, p. 562-576, 2017.
- BELLO, M. G. D. *et al.* Role of the microbiome in human development. **Gut**, v. 68, n. 6, p. 1108-1114, 2019.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BETANCOURT, C. C. B. M. J. *et al.* Pigment composition and antioxidant capacity of betacyanins and betaxanthins fractions of *Opuntia dillenii* (Ker Gawl) Haw cactus fruit. **Food Research International**, 2017; 101: 173–179.
- BEZERRA, A. C. *et al.* Monitoramento Espaço-Temporal da Detecção de Mudanças em Vegetação de Caatinga por Sensoriamento Remoto no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 13, n. 01, p. 286-301, 2020.
- 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.
- BHATTA, S.; STEVANOVIC J., T.; RATTI, C. Freeze-drying of plant-based foods. **Foods**, v. 9, n. 1, p. 87, 2020.
- BIOMA Caatinga. **Associação Caatinga**, Ceará. Disponível em: <https://www.acaatinga.org.br/sobre-a-caatinga/>. Acesso em: 04 de dezembro de 2022.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- BOITEUX L. S. *et al.* Brasileirinha: cultivar de abóbora (*Cucurbita moschata*) de frutos bicolores com valor ornamental e aptidão para consumo verde. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 103-106, 2007.
- BRAND, M. A. Potencial de uso da biomassa florestal da caatinga, sob manejo sustentável, para geração de energia. **Ciência Florestal**, v. 27, p. 117-127, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC no 216, de 15 de setembro de 2004. Aprova o regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2004.

CAATINGA: Palma. **Natureza Bela**, 2016. Disponível em: <https://www.naturezabela.com.br/2016/12/palma-opuntia-cochenillifera.html>. Acesso em: 04 de dezembro de 2022.

CHAVES, E. M. F.; MORAIS, R. F.; BARROS, R. F. M. Popular food practices using wild plants: a potential to minimize nutritional insecurity in the semiarid region of Northeast Brazil. **Gaia Scientia**, v. 11, p. 287–313, 2017.

CHEN, L. *et al.* Development of a dairy-free fermented oat-based beverage with enhanced probiotic and bioactive properties. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 609734, 2020.

CLEMENTE, J. C. *et al.* The microbiome of uncontacted Amerindians. **Science Advances**, v. 1, n. 3, p. e1500183, 2015.

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.

COLL, L. A. *et al.* Fatty acid profile of fruits (pulp and peel) and cladodes (young and old) of prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] from six Spanish cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 84, p. 103294, 2019.

CUEVA, C. *et al.* An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 99, 2017.

DEEHAN, E. C.; WALTER, J. The fiber gap and the disappearing gut microbiome: implications for human nutrition. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 5, p. 239-242, 2016.

DÍAZ, M. S. S. *et al.* *Opuntia* spp.: Characterization and benefits in chronic diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017.

DICK, M. *et al.* Valorization of *Opuntia monacantha* (Willd.) Haw. cladodes to obtain a mucilage with hydrocolloid features: Physicochemical and functional performance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 900-909, 2019.

DOYMAZ, I. Air-drying characteristics of tomatoes. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 4, p. 1291-1297, 2007.

EL-MOSTAFA, K. *et al.* Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14879-14901, 2014.

ESPINOSA, M. V. *et al.* Mercedes *et al.* Ultrasound-assisted extraction of betalains from *Opuntia* fruit pulp of different color varieties. **Agronomy**, v. 12, n. 11, p. 2604, 2022.

FAROOQ, U. *et al.* Fruits and nutritional security. In: **Fruit Crops**. Elsevier, 2020. p. 1-12.

FERNANDES, M. F.; *et al.* An updated plant checklist of the Brazilian Caatinga seasonally dry forests and woodlands reveals high species richness and endemism. **Journal of Arid Environments**, v. 174, p. 104079, 2020.

FILIPPIS, F. *et al.* High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. **Gut**, v. 65, n. 11, p. 1812-1821, 2016

FIORAVANTI, C. A maior diversidade de plantas do mundo. **Pesquisa FAPESP**. Ed. n. 241, p. 42-47. Mar 2016.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. S. 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.

FRACCASCIA, L.; GIANNOCARO, I.; ALBINO, V. Resilience of complex systems: State of the art and directions for future research. **Complexity**, 2018.

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.

GAO, J. *et al.* Protective effect of polysaccharides from *Opuntia dillenii* Haw. fruits on streptozotocin-induced diabetic rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 25-34, 2015.

GIBSON, G. R. *et al.* Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science Technology Bulletin Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 1-19, 2010.

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. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, 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.

GÜMÜŞAY, Ö. A. *et al.* Drying effects on the antioxidant properties of tomatoes and ginger. **Food Chemistry**, v. 173, p. 156-162, 2015.

HATZAKIS, E. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in food science: A comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, p. 189-220, 2019.

HO, N. T. *et al.* Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4169, 2018.

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.

HOSSEN, M. S. *et al.* Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 6, p. 1194-1205, 2017.

HOWLETT, J. F. *et al.* The definition of dietary fiber—discussions at the Ninth Vahouny Fiber Symposium: building scientific agreement. **Food & Nutrition Research**, v. 54, n. 1, p. 5750, 2010.

HU, J. L. *et al.* *In vitro* fermentation of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. by human fecal microbiota. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 384-392, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Biomass e sistema costeiro carinho do Brasil: compatível com a escala 1:250. 000**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019.

INGRISCH, J.; BAHN, M. Towards a comparable quantification of resilience. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 33, n. 4, p. 251-259, 2018.

JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, v. 175, p. 556-567, 2015.

JAKOBSSON, H. E. *et al.* Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. **Gut**, v. 63, n. 4, p. 559-566, 2014.

JESUS, B. *et al.* PANCs - Plantas Alimentícias Não Convencionais, benefícios nutricionais, potencial econômico e resgate da cultura: uma revisão sistemática. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17, n. 33, 2020.

KARAM, M. C. *et al.* Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 188, p. 32-49, 2016.

KARL, J. P. *et al.* Changes in intestinal microbiota composition and metabolism coincide with increased intestinal permeability in young adults under prolonged physiological stress. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 312, n. 6, p. G559-G571, 2017.

KEJING, A. *et al.* Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1292-1300, 2016.

KINASHI, Y; HASE, K. Partners in leaky gut syndrome: intestinal dysbiosis and autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 673708, 2021.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, p.768, 2014.

KOPP, W. How western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 12, p. 2221, 2019.

KORPELA, K. *et al.* Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 10410, 2016.

KUNYANGA, C. N.; VELLINGIRI, V.; IMUNGI, K. J. Nutritional quality, phytochemical composition and health protective effects of an under-utilized prickly cactus fruit (*Opuntia stricta* Haw.) collected from Kenya. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v. 14, n. 7, p. 9561-9577, 2014.

LEVY, M. *et al.* Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 219-232, 2017.

LIBERATO, P.; LIMA, D. V. T.; SILVA, G. M. B. PANCs-Plantas alimentícias não convencionais e seus benefícios nutricionais. **Environmental Smoke**, v. 2, n. 2, p. 102-111, 2019.

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, T. W. *et al.* Nondigestible fructans alter gastrointestinal barrier function, gene expression, histomorphology, and the microbiota profiles of diet-induced obese C57BL/6J mice. **The Journal of Nutrition**, v. 146, n. 5, p. 949-956, 2016.

LOUIS, P.; HOLD, G. L.; FLINT, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 661-672, 2014.

MACCAFERRI, S. *et al.* *In vitro* fermentation of potential prebiotic flours from natural sources: impact on the human colonic microbiota and metabolome. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 8, p. 1342-1352, 2012.

MAGALHÃES, R. M. F. *et al.* Nutritional quality of *Pilosocereus gounellei* using different spine removal and plant storage methods. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 1988-1996, 2018.

MAIA, J. M. *et al.* Motivações socioeconômicas para a conservação e exploração sustentável do bioma Caatinga. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 41, 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.

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

MENEZES, F. N. D. D. *et al.* Acerola (*Malpighia glabra* L.) and guava (*Psidium guayaba* L.) industrial processing by-products stimulate probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*

growth and induce beneficial changes in colonic microbiota. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 4, p. 1-14, 2021a.

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, 2021b.

MORAES, D. Bioma Caatinga. **In vivo: Museu da Vida Fiocruz**, São Paulo, 25 de nov. de 2021. Disponível em: <https://www.invivo.fiocruz.br/biodiversidade/bioma-caatinga/>. Acesso em: 05 de dezembro de 2023.

MORO, T. M. A. *et al.* Use of burdock root flour as a prebiotic ingredient in cookies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 540–546, 2018.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 189-200, 2016.

MOUNIR, B. *et al.* Physico-chemical changes in cladodes of *Opuntia ficus-indica* as a function of the growth stage and harvesting areas. **Journal of Plant Physiology**, v. 251, p. 153196, 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, n. 9, p. 17429-17468, 2015.

MU, Q. *et al.* Leaky gut as a danger signal for autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 598, 2017.

NASCIMENTO, D. S. *et al.* Evaluating the stability of a novel nutraceutical formulation combining probiotic *Limosilactobacillus fermentum* 296, quercetin, and resveratrol under different storage conditions. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-13, 2022.

NATARAJ, B. H. *et al.* Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1-22, 2020.

NDOUL, B. A.; PARADIS, S. C.; VEILLEUX, A. Gut microbiota and intestinal trans-epithelial permeability. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6402, 2020.

NISSEN, L.; CASCIANO, F.; GIANOTTI, A. Intestinal fermentation *in vitro* models to study food-induced gut microbiota shift: An updated review. **FEMS Microbiology Letters**, v. 367, n. 12, p. 1-10, 2020.

NISSEN, L. *et al.* Multiunit *in vitro* colon model for the evaluation of prebiotic potential of a fiber plus D-limonene food supplement. **Foods**, v. 10, n. 10, p. 1-21, 2021.

NOBEL, P.S. 1995. **Environmental biology of Opuntiae**. In: G. Barbera, G.; Inglese, P.; E. Barrios, E. P. Agroecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear. Food and Agriculture Organization (FAO), Rome: **Plant Production and Protection Paper** v.132, p. 36–48, 1995.

ORAK, H. H. *et al.* Effects of hot air and freeze drying methods on antioxidant activity, colour and some nutritional characteristics of strawberry tree (*Arbutus unedo* L) fruit. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 4, p. 391-402, 2012.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA (FAO); ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Americana Latina e o Caribe. **Panorama da segurança alimentar e nutricional, sistemas alimentares sustentáveis para acabar com a fome e a má nutrição**. Santiago; 2017.

OZDAL, T. *et al.* The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 78, 2016.

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**, n. 228, p. 106-115, 2017.

PAULA, D. G. C. *et al.* Maceration time over antioxidant activity, volatile compounds and temporal dominant sensation of fermented jabuticaba. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1-8, 2022.

PAWAR, A. V.; KILLEDAR, S. G.; DHURI, V. G. Opuntia: medicinal plant. **International Journal of Advance Research, Ideas and Innovations in Technology**, v. 3, n. 2, p. 148-154, 2017.

PEDROSA, M.W. *et al.* **Hortaliças Não Convencionais: Saberes e Sabores**. Belo Horizonte, p. 22, 2012.

PEREIRA, J. S. *et al.* Análise espaço-temporal da cobertura vegetal no Município de Taperoá - PB, Brasil. **Revista Espacios**, v. 38, n. 39, p. 1-5, 2017.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141-153, 2014.

PRICE, J. L.; ALI, G. A.; HUTTENHOWER, C. The healthy human microbiome. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2016.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Opens external link in new window. **Nucleic Acids Research**, v. 41 p. 590-596, 2013.

QUINZIO, C. *et al.* Physicochemical and rheological properties of mucilage extracted from *Opuntia ficus indica* (L. Miller). Comparative study with guar gum and xanthan gum. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 1, p. 459-470, 2018.

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

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, p. 27-33, 2015.

RIBEIRO, T. B. *et al.* Prebiotic effects of olive pomace powders in the gut: *In vitro* evaluation of the inhibition of adhesion of pathogens, prebiotic and antioxidant effects. **Food Hydrocolloids**, v. 112, p. 106312, 2021.

RODRÍGUEZ, J. M. *et al.* The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, n. 1, p. 26050, 2015.

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**, p.161.

SANCHEZ, M. *Opuntia dillenii*. **Cybercacto**, 2023. Disponível em: <https://cibercactus.com/pt/opuntia-dillenii/>. Acesso em: 13 de julho de 2023.

SANTOS, M. C. G. **Propriedades nutricionais e funcionais de palma (*Opuntia ficus-indica*) e sua utilização no processamento de geleias**. Dissertação de mestrado em ciência e tecnologia de alimentos – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p. 46, 2014.

SHIRAZINIA, R. *et al.* *Opuntia dillenii*: a forgotten plant with promising pharmacological properties. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 22, n. 1, p. 16, 2019.

SIDDIQUI F. *et al.* *Opuntia dillenii* cladode: Opuntiol and opuntioside attenuated cytokines and eicosanoids mediated inflammation. **Journal of Ethnopharmacol.**, 2016; 182: 221–234.

SINGH, R. K. *et al.* Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-17, 2017.

SIQUEIRA, R. A. *et al.* Fitoquímica e revisão sistematizada da atividade das plantas alimentícias não convencionais (PANCS) sobre a microbiota intestinal. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 15696-15715, 2021.

SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1417-1435, 2013.

SOMMER, F. *et al.* The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 630-638, 2017.

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.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823-1836, 2017.

TITO, A. J. O. *et al.* Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6505, 2015.

TORRERO, E. P. *et al.* Chemical Composition of Prickly Pads from (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller Related to Maturity Stage and Environment. **International Journal of Plant Biology & Research**, 2017.

TULER, A.C.; PEIXOTO, A. L.; SILVA, N. C. B. Plantas alimentícias não convencionais (PANC) na comunidade rural de São José da Figueira, Durandé, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 70, 2019.

VADDER, F. *et al.* Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. **Cell**, v. 156, n. 1, p. 84-96, 2014.

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

VENEGAS, D. P. *et al.* Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. **Frontiers in Immunology**, p. 277, 2019.

VOS, W. M. *et al.* Gut microbiome and health: Mechanistic insights. **Gut**, v. 71, n. 5, p. 1020-1032, 2022.

WANG, M. *et al.* In vitro colonic fermentation of dietary fibers: Fermentation rate, short-chain fatty acid production and changes in microbiota. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 1-9, 2019.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. **World Gastroenterology Organisation Global Guidelines**. 2017. Disponível em: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-english>. Acesso em: 10 de outubro de 2023.

WU, W. *et al.* Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota which is mediated by GPR43. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 4, p. 946-956, 2017.

YANG, H. *et al.* The impact of dietary fiber and probiotics in infectious diseases. **Microbial Pathogenesis**, v. 140, p. 103931, 2020.

ZHANG, Y. J. *et al.* Impacts of gut bacteria on human health and diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 7493-7519, 2015.

ZHANG, Y. *et al.* The positive correlation of antioxidant activity and prebiotic effect about oat phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 402, p. 134231, 2023.

ZHOU, Z. *et al.* Starch structure modulates metabolic activity and gut microbiota profile. **Anaerobe**, v. 24, p. 71-78, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor(a):

Esta pesquisa é intitulada como “CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREBIÓTICO E ANTIOXIDANTE DO LIOFILIZADO DE CLADÓDIOS DE PALMA [*Opuntia dillenii* (Ker Gawl). Haw.]”, o qual tem por objetivo investigar o potencial antioxidante e prebiótico da palma através do pó liofilizado elaborado a partir da polpa dos seus cladódios, em sistemas de fermentação fecal *in vitro*. Essa pesquisa está sendo desenvolvida pela pesquisadora **Sara de Sousa Rocha**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, da Universidade Federal da Paraíba, sob orientação do professor **Dr. Evandro Leite de Souza**.

A condução deste estudo trará informações científicas atualmente escassas no campo de estudo de componentes com propriedades prebióticas, em especial provenientes de liofilizado de cactáceas como a palma, utilizando inóculo fecal de doadores saudáveis, o que irá colaborar para a formulação de estratégias de utilização desses produtos de forma a agregar valor e, consequentemente, auxiliar no incremento do agronegócio familiar.

Solicitamos a sua colaboração para doação de material fecal, o qual será colhido em dia e local previamente combinados 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. Garantimos que seu nome será mantido em sigilo, e que os possíveis riscos envolvidos neste estudo são classificados como riscos mínimos, tais como, desconforto ou constrangimento no ato de expelir e/ou coletar o material fecal, porém, se trata de um estudo no qual não se realiza nenhuma intervenção ou modificação intencional nas variáveis fisiológicas e sociais dos indivíduos participantes.

Dentre os benefícios oferecidos para os participantes do estudo, podemos citar: o exame parasitológico de fezes que será realizado anteriormente às análises fermentativas, além do exame de sangue oculto nas fezes, que podem ajudar a detectar alterações ou inflamações intestinais. Além disso, ficará clara a importância da sua contribuição com o avanço da ciência a partir deste estudo.

Seus dados serão manuseados somente pelos pesquisadores e não será permitido o acesso a outras pessoas.

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

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para a pesquisadora:
Sara de Sousa Rocha - (83) 999935-4772.

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

Converting *Opuntia dillenii* (Ker Gawl). Haw (Cactaceae) cladodes in a novel ingredient with potential prebiotic effects on human intestinal microbiota**Abstract**

This study evaluated the physicochemical characteristics, antioxidant capacity, and potential prebiotic effects on the intestinal microbiota of freeze-dried *Opuntia dillenii* (Ker Gawl). Haw] (Cactaceae). FDOd had high levels of total fiber, especially soluble fiber, as well as minerals, such as potassium, calcium, magnesium, and phosphorus, high total chlorophyll content, antioxidant activity, and the presence of various phenolic compounds, such as catechin, myricetin, isorhamnetin, and rutin. Fermentation of FDOd using human fecal inoculum changed the composition and metabolic activity of the intestinal microbiota, with an increase in the relative abundance of *Ligilactobacillus* (0.03% – 16.44%), *Lactiplantibacillus* (0.00% – 1.11%), and *Agathobacter* (1.80% – 4.23%), besides decreasing the relative abundance of *Prevotella_9* (25.08% – 0.15%) and *Succinivibrio* (24.77% – 1.54%). FDOd fecal fermentation influenced the metabolic profile of the intestinal microbiota with the production of various metabolites with health-promoting properties. The results indicate FDOd as a new ingredient with prebiotic properties in the human intestinal microbiota.

Keywords: Cactaceae, palm, functional food, intestinal microbiota, modulatory effects, antioxidant capacity.

1. Introduction

The emerging consumer awareness about the relationship between diet and health has led to changes in dietary patterns and increased demand for healthier food products. In this context,

the food industry has been seeking to reformulate and develop products that meet this growing consumption trend that also involves the adoption of more sustainable production practices and the valorization of local biodiversity (McClements et al., 2021). Cacti are nonconventional food plant species considered underutilized sources of nutrients and bioactive compounds linked to health benefits and with potential applications to formulate new food ingredients and nutraceuticals aligned with a bioeconomy approach valorizing local biological resources (Aguilar et al., 2017; Bezerril et al., 2021).

Opuntia dillenii (Ker Gawl.) Haw., Cactaceae, commonly known as prickly pear, is a wild plant species occurring in the southern part of North America and the Caribbean, extending to the northern region of South America. *O. dillenii* cladodes are covered with spines, and its fruits are usually smaller than those from other cactus species, which often leads to its disregarded use for food or commercial purposes (Espinosa et al., 2022). Different cacti have been investigated as sources of various bioactive compounds, such as phenolic compounds, organic acids, lipids, dietary fibers, vitamins, minerals, and amino acids (Gao et al., 2015). These compounds act as antioxidants protecting the body against oxidative stress and conditions associated with various non-communicable chronic diseases, such as diabetes, inflammatory bowel diseases, and rheumatoid arthritis, besides acting as potential modulators of the intestinal microbiota (Direito et al., 2021).

The intestinal microbiota is a complex and active community of microorganisms residing in the gastrointestinal tract, with a recognized impact on host health (Feng et al., 2018). Diet is the primary factor influencing the composition and metabolic activity of the human intestinal microbiota throughout life, with a crucial role in shaping the bacterial communities in the intestine (Gulbert et al., 2020). Several plants, including nonconventional food plant species, possess high contents of dietary fibers and phenolic compounds, which may confer benefits to the gut microbiota linked to prebiotic effects (Xu et al., 2017).

Prebiotics are substrates that are non-digestible and selectively utilized by intestinal microorganisms, resulting in host health benefits (Gibson et al., 2017). Besides contributing to reducing the risk of non-communicable chronic diseases, dietary fibers can influence the composition and metabolic activity of bacterial communities forming the intestinal microbiota, including the production of short-chain fatty acids (SCFA), which classifies some dietary fibers as prebiotics (Holscher, 2017). In addition to dietary fibers, phenolic compounds can also act as selective substrates for beneficial bacteria in the intestinal microbiota, including *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* (Lordan et al., 2020). Previous studies have reported high contents of fibers and phenolic compounds in products derived from cactus species, providing high antioxidant and potential prebiotic capacity to these products (Martins et al., 2023; Monteiro et al., 2023); however, investigations focusing on the potential prebiotic effects of *O. dillenii* cladodes on human intestinal microbiota are still scarce.

This study hypothesized that *O. dillenii* cladodes are rich in constituents capable of exerting modulatory effects on human intestinal microbiota linked to prebiotic properties. To test this hypothesis, the physicochemical characteristics, the antioxidant capacity, and the impacts of freeze-dried *O. dillenii* cladodes on the composition and metabolic activity of human intestinal microbiota during an *in vitro* fecal fermentation were investigated.

2. Materials and methods

2.1 Sample collection and preparation of freeze-dried *O. dillenii* cladodes

Young primary order cladodes from *O. dillenii* (Ker Gawl.) Haw. were harvested in the morning from a private rural cultivation area (Cuité, PB, Brazil, latitude: 6° 28' 54" S, longitude: 36° 8' 59" W) during the winter season. After species identification, an exsiccate was generated and registered in the Herbarium of the Center for Education and Health of the Federal University of Campina Grande (UFCG, Cuité, PB, Brazil) under number 3060. The collection of the plant material was registered in the National System for Management of Genetic Heritage

and Associated Traditional Knowledge (SISGEN - Brazil; number A1DDB62).

The cladodes were selected based on their physical integrity and absence of visible signs of infections. The selected cladodes were washed under potable running water, sanitized by immersion in chlorinated potable water (sodium hypochlorite, 200 ppm, 15 min), and rinsed with potable water. The spines and peels were manually separated from the pulp, and horizontal cuts (slices, 1 cm) were made. The cladode pulp was triturated using a domestic blender (model PH900, Philco®, São Paulo, SP, Brazil, low speed, 3 min) and dehydrated in a benchtop freeze-drier (Liotop®, São Carlos, SP, Brazil, temperature - 56 ± 2 °C, vacuum pressure of < 170 µHG, freeze-drying speed of 1 mm/h, 24 h). The dried material was triturated using a domestic mixer (Turbo Chef Vertical Elgin®, 200W, high speed, 2 min) and sieved through an ultrafine mesh sieve (Master Frita®, stainless steel, particle size < 1 mm) (**Supplementary material data, Fig. S1**). Finally, the freeze-dried *O. dillenii* cladodes (FDOd) were stored in hermetically sealed polyethylene bags under light protection and refrigeration (4 ± 0.5 °C) until use in the experiments in a maximum period of 15 days.

2.2 Determination of the physicochemical characteristics of FDOd

The physicochemical characteristics were determined using standard methods (Official Methods of Analysis - AOAC, 2019). pH values were determined with a digital pH meter (Q400AS, Quimis®, São Paulo, SP, Brazil). Water activity (a_w) was determined at 25 ± 2 °C using an AquaLab® device (Series CX-2, Decagon, São José dos Campos, SP, Brazil). Ash content was determined by carbonization and incineration in a muffle furnace at 550 °C until reaching a constant weight. Protein content was determined using the Kjeldahl method, with a nitrogen-to-protein conversion factor of 5.75 as recommended for plant-based proteins (AOAC, 2019), and lipid quantification was performed using the Folch, Less & Stanley (1957) method with extraction in chloroform-methanol solution (2:1, v/v).

The total, soluble, and insoluble dietary fiber contents were determined using an

enzymatic-gravimetric method (TDF 100A, Sigma Aldrich®, St. Louis, MA, USA). Minerals were quantified using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) technique (Horiba Jobin Yvon, Ultima 2, Longjumeau, France, 1200 W radiofrequency power, 12 L/min plasma gas flow, 0.2 L/min auxiliary gas flow, 1.0 bar nebulizer pressure, 1.0 mL/min sample introduction flow rate, and 1s integration time), with results expressed in mg/100 g. Chlorophyll (total, a and b) contents were determined using a standard method (AOAC, 2019). The instrumental color was determined based on the CIELab system (L^* , a^* , and b^*) using a portable colorimeter (CR/10, Konica Minolta, Japan).

An aqueous extract was prepared (1 g of FDOd, 10 mL of ultrapure water, Milli-Q® Water Purification System, EMD Millipore Corporation, Billerica, USA) for the determination of organic acids (Coelho et al., 2018; Lima et al., 2019), while a methanol extract was prepared (1 g of FDOd, 10 mL of 80% methanol, 30 °C, 60 min) for the determination of phenolic compounds (Moro et al., 2018; Padilha et al., 2017). Organic acids and phenolic compounds were determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) technique on an Agilent 1260 Infinity LC chromatograph (Agilent Technologies, St. Clara, USA, Hydro-RP C18 column 150 x 4.6 mm, 4 µm, mobile phase 4 mM/L H₂SO₄, ultrapure water, flow rate 0.7 mL/min) using previously described analytical conditions (Coelho et al., 2018; Padilha et al., 2017). Sample peaks were identified by comparing their retention times with the respective standards for organic acids (expressed in g/100 g) and phenolic compounds (expressed in mg/100 g) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.3 Determination of the antioxidant capacity of FDOd

The ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (ferric reducing antioxidant power) methods were used to determine the antioxidant capacity (Blois, 1958; Re et al., 1999; Benzie & Strain, 1996). FDOd was mixed with 80% methanol (Sigma-Aldrich, 2 g of FDOd, 20 mL of methanol, 24 h)

at room temperature and filtered (125 mm filter, Whatman). The antioxidant capacity determined with ABTS^{•+} and DPPH[•] methods was estimated using a standard Trolox curve (50–2000 μ M), and the results were expressed in Trolox μ mol equivalents per gram of sample (μ mol/g). The antioxidant capacity determined with the FRAP method was estimated using a standard ferrous sulfate curve (50–2000 μ M), and the results were expressed in μ M of ferrous sulfate per gram of sample (μ mol FeSO₄/g). Absorbance measurements were performed with a microplate spectrophotometer (BioTek Eon, Winooski, VT, USA) at 734 nm (ABTS^{•+}), 515 nm (DPPH[•]), and 595 nm (FRAP). The antioxidant capacity estimated with the DPPH[•] and ABTS^{•+} methods was verified by the decrease in absorbance, while the antioxidant capacity estimated with the FRAP method was verified by the increase in absorbance.

2.4 Simulated gastrointestinal digestion of FDOd

The sample (5 g of FDOd + 25 mL of sterile distilled water, 15 min) was exposed to *in vitro* gastrointestinal digestion conditions to produce materials with characteristics like those reaching the human colon. The simulations were conducted continuously in phases simulating the mouth, stomach, duodenum, and ileum as previously described (Sampaio et al., 2022), with pH adjustments, use of digestive enzymes (α -amylase, pepsin, and pancreatin), bile salts, and mechanical agitation. After the simulated ileum conditions, the digestion fluids were dialyzed (0.01 mol/L NaCl, 18 h, 5 ± 0.5 °C) in regenerated cellulose tubing (nominal molecular weight cutoff of 1 kDa, Spectra/6, Spectrum Europe BV, Breda, Netherlands) simulating absorption conditions in the intestine. The dialyzed material was frozen (-18 °C), freeze-dried, and stored (4 ± 0.5 °C) for up to one week in hermetically sealed polyethylene bags before use in fecal fermentation. The experiments were conducted in an incubator with orbital agitation simulating intestinal peristaltic movements, under controlled temperature (TE-424, Tecna[®], 37 ± 0.5 °C) and rotation adjustments at each phase.

2.5 *In vitro* fecal fermentation of FDOd

The procedures used in this study for the *in vitro* fecal fermentation were approved by a Research Ethics Committee with Human Subjects (Federal University of Paraíba, protocol 5.906.607; CAAE: 66.834.523.7.0000.5188). Six healthy adult volunteers (three males and three females, aged 19 to 40 years) provided fresh fecal samples. Donors reported no history of intestinal diseases, following an omnivorous diet, and not using concentrated probiotics or prebiotics, nor antibiotics in the last six months. Fecal samples were collected at the donors home in sterile containers and transported in anaerobic jars (Probac[®], Anaerobac, Brazil, pooled (1:1:1:1:1:1 w/w), diluted (1:10 w/v) in reduced physiological saline solution (0.5 g/L cysteine and 8.5 g/L NaCl), and homogenized with sterile phosphate-buffered saline (PBS; 0.1 M; pH 7.4, 1:10, w/v, 34.04 x g, 2 min) (Andrade et al., 2020; Menezes et al., 2021a). The final fermentation volume consisted of 40% laboratory medium (**Supplementary material data, Table S1**), 40% fecal inoculum, and 20% freeze-dried digested FDOd, under anaerobic conditions (AnaeroGen, 37 ± 1 °C, 48 h) (Hu et al., 2013; Menezes et al., 2021b). A fermentation medium containing fructooligosaccharides (FOS, 20% w/v, a standard prebiotic ingredient) was used as a positive control, and a medium without fermentable substrate (phosphate-saline buffer) was used as a negative control (NC).

2.6 Monitoring changes in intestinal microbiota composition during *in vitro* fecal fermentation

The changes in the bacterial composition were evaluated at time zero and 48 h of *in vitro* fecal fermentation. Microbial diversity was assessed through high-throughput sequencing of the 16S rRNA V3/V4 region using primers 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG) and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). Sequence analysis and taxonomic unit identification were evaluated using previously described procedures (Giongo et al., 2010; Hong et al., 2006). The 16S rRNA libraries were sequenced using the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA, Illumina primers, 300 cycles, and paired-end sequencing with 200 bp). After sequencing, quality filters were applied to the fastq files, and the removal of truncated and low-quality reads

(Phred score < 20) was performed with Trimmomatic tool. Following these procedures, forward and reverse-paired reads were merged into contigs, and singletons and chimeras were removed. The sequences were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) (Uchime v. 4.2.40, Vsearch v. 2.22.1, 97 % identity) and taxonomically assigned, considering a 97% similarity alignment against sequences from the SILVA database. All Illumina 16S rRNA amplicon sequencing data provided in this study can be publicly accessed at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Archive (SRA) (accession number (accession number PRJNA1076928). Alpha diversity was estimated with Chao 1 and Shannon indices with QIIME (version 1.7.0) and subsequently visualized with R software (version 2.15.3).

2.7 *Monitoring microbial metabolic activity during in vitro fecal fermentation*

The pH values and organic acids contents were determined in media containing FDOd, FOS, and NC at zero, 24, and 48 h of *in vitro* fecal fermentation using the HPLC technique as described in **Section 2.2**. The determination of the global metabolomic profile was performed at zero and 48 h of *in vitro* fecal fermentation using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. An aliquot (2 mL) of the fermentation media containing FDOd and FOS was diluted in a solution of methanol and deuterated water (9:1 v/v, 2 mL), and the resulting solution (600 µL) was placed in a tube (5 mm diameter) for NMR analysis. The metabolite determinations were performed on a Bruker Avance Neo 500 instrument (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C, Bruker, Billerica, MA, USA) and previously described analytical conditions (Martins et al., 2023; Sampaio et al., 2022). The spectra were processed using Bruker TopSpin software version 4.1.1(Hatzakis, 2018).

2.8 *Monitoring phenolic compound content and antioxidant capacity during fecal fermentation*

Aliquots (2 mL) from each medium at zero, 24, and 48 h of *in vitro* fecal fermentation were

taken for the determination of phenolic compounds (mg/L) using the procedures described in **Section 2.2**, as well as for the determination of the antioxidant capacity (ABTS^{•+}, DPPH[•], and FRAP methods) using the procedures described in **Section 2.3**.

2.9 Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and repeated on three separate experiments. The results were expressed as average $\pm$ standard deviation. The Shapiro-Wilk test was applied to check the normal distribution of the data. Data were subjected to Student's t-test, or one-way or two-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's test, considering a P-value $\leq$ 0.05 for significance. Statistical analysis was performed with Statistical Package for Social Sciences software (IBM SPSS Statistics, version 22.0).

3. Results

3.1 Physicochemical characteristics and antioxidant capacity of FDOd

FDOd had a low a_w (0.302), slightly acidic pH (4.61), high contents of proteins (16.84 g/100 g), lipids (4.98 g/100 g), and ash (22.36 g/100 g). Nine minerals were identified in FDOd, including the macroelements potassium (4415.49 mg/100 g), calcium (1593.25 mg/100 g), sodium (1010.52 mg/100 g), magnesium (853.55 mg/100 g), and phosphorus (209.04 mg/100 g), and the microelements manganese (8.92 mg/100 g), zinc (5.95 mg/100 g), iron (3.72 mg/100 g), and copper (0.77 mg/100 g). FDOd had low brightness (L^* : 32.91), with a green-yellowish hue (a^* : -3.19; b^* : 5.02), high contents of chlorophyll a (565 mg/100 g) and chlorophyll b (349 mg/100 g), as well as high contents of total dietary fibers (52.36 g/100 g), highlighting the contents of soluble fibers (33.36 g/100 g) rather than of insoluble fibers (19.00 g/100 g) (**Table 1**).

Five organic acids were detected in FDOd, namely malic acid (16.84 g/100 g), citric acid (4.43 g/100 g), succinic acid (3.26 g/100 g), formic acid (1.17 g/100 g), and acetic acid (0.27 g/100 g). Among the sixteen phenolic compounds identified in FDOd, flavonols (catechin:

58.00 mg/100 g), flavanols (myricetin: 785.00 mg/100 g), flavonones (hesperidin: 135.00 mg/100 g), stilbenes (cis-resveratrol: 54.00 mg/100 g and trans-resveratrol: 16.00 mg/100 g), and phenolic acids (caffeic acid: 265.00 mg/100 g and chlorogenic acid: 106.00 mg/100 g) were found in the highest contents. The antioxidant capacity of FDOd was higher when measured with the FRAP method (2.75 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$), followed by ABTS⁺ (0.51 $\mu\text{mol Trolox/g}$) and DPPH[•] method (0.32 $\mu\text{mol Trolox/g}$) (**Table 1**).

3.2 Changes in the composition of the intestinal microbiota during *in vitro* fecal fermentation

The composition of the intestinal microbiota in media with FDOd, FOS, and NC was analyzed using 16S rRNA gene sequencing at zero and 48 h of *in vitro* fecal fermentation. Shannon and Chao 1 indices were determined to assess α -diversity and the richness of bacterial groups in the different fermentation media, respectively (**Fig. 1A and 1B**). An increase ($P \leq 0.05$) in bacterial diversity was observed in the medium with FDOd and NC after 48 h of fecal fermentation compared to time zero, while a decrease ($P \leq 0.05$) was observed in the medium with FOS (**Fig. 1A**). In addition, the medium with FDOd had higher bacterial diversity compared to medium with FOS after 48 h of fecal fermentation ($P \leq 0.05$). The bacterial richness decreased in medium with FOS and FDOd ($P \leq 0.05$) and did not change in NC ($P \geq 0.05$) after 48 h of fecal fermentation (**Fig. 1B**). The Firmicutes to Bacteroidetes (F:B) ratio increased in all examined media after 48 h of fecal fermentation ($P \leq 0.05$), with the medium with FDOd having the highest F:B ratio ($P \leq 0.05$) (**Fig. 1C**).

The predominant phyla in all examined media during the 48 h of fecal fermentation were Proteobacteria (22.79 % - 71.55 %), Firmicutes (18.59 % - 60.89 %), and Bacteroidetes (2.69 % - 37.75 %), followed by Desulfobacterota (0.41 % - 4.60 %), Fusobacteriota (0.22 % - 4.19 %), Actinobacteriota (0.34 % - 1.28 %), and Verrucomicrobiota (0.25 % - 1.05 %), representing $\geq 95\%$ of the total relative abundance (**Fig. 2A**).

The relative abundance of *Ligilactobacillus* (0.03 % vs. 16.44 %) increased in medium

with FDOd after 48 h of fecal fermentation ($P \leq 0.05$) and did not change in medium with FOS (0.02 % vs. 0.01 %) and NC (0.02 % vs. 0.03 %) ($P > 0.05$) after 48 h of fecal fermentation. The relative abundance of *Escherichia-Shigella* increased in NC (2.60 % vs. 12.49 %) and medium with FDOd (3.28 % vs. 10.77 %) after 48 h of fecal fermentation ($P \leq 0.05$), while it decreased in medium with FOS (5.92% vs. 2.59%) ($P \leq 0.05$). The relative abundance of *Faecalibacterium* increased in NC (4.64 % vs. 9.94 %) and decreased in medium with FDOd (4.93 % vs. 3.39 %) and FOS (5.78 % vs. 2.33 %) ($P \leq 0.05$) after 48 h of fecal fermentation. Similarly, the relative abundance of *Bacteroides* increased in NC (5.37 % vs. 8.51 %) after 48 h of fecal fermentation, while decreasing in medium with FDOd (6.65 % vs. 1.65 %) and FOS (6.42 % vs. 2.81 %) ($P \leq 0.05$) (**Fig. 2B and Supplementary material data, Table S2**).

The relative abundance of *Klebsiella* increased in NC (0.01 % vs. 5.98 %) and medium with FDOd (0.02 % vs. 2.33 %) ($P \leq 0.05$) and did not change in medium with FOS (0.00 % vs. 0.09 %) ($P > 0.05$) after 48 h of fecal fermentation. The relative abundance of *Blautia* increased in NC (1.72 % vs. 2.08 %) ($P \leq 0.05$), decreased in medium with FOS (5.66 % vs. 0.55 %) ($P \leq 0.05$), and did not change in medium with FDOd (1.34 % vs. 1.47 %) ($P > 0.05$) after 48 h of fecal fermentation.

The relative abundance of *Agathobacter* decreased in medium with FOS (2.60 % vs 0.23 %) and increased in medium with FDOd (1.80 % vs. 4.23 %) after 48 h of fecal fermentation ($P \leq 0.05$). The relative abundance of *Fusobacterium* increased in medium with FOS (0.01 % vs. 4.19 %) ($P \leq 0.05$) and did not change in medium with FDOd (0.00 % vs. 0.00 %) and NC (0.00 % vs. 0.23 %) ($P > 0.05$) after 48 h of fecal fermentation. At 48 h of fecal fermentation, the genera *Lachnospiraceae NK4A136 group*, *Desulfovibrio*, *Alistipes* and *Citrobacter* had lower relative abundance in media containing FOS and FDOd when compared to NC ($P \leq 0.05$). The relative abundance of *Clostridium sensu stricto 1* decreased in medium with FOS

(3.34 % vs. 2.62 %) and increased in NC (1.28 % vs. 2.66 %) after 48 h of fecal fermentation ($P \leq 0.05$), while not changing in medium with FDOd (0.41 % vs 0.29 %) ($P \leq 0.05$).

The relative abundance of *[Eubacterium] ventriosum* group (NC: 0.78 % vs. 2.40 %, FOS: 0.86 % vs. 2.79 %, FDOd: 0.70 % vs. 2.57 %) and *Ruminococcus* (NC: 2.31 % vs. 0.95 %, FOS: 2.71 % vs. 0.44 %, FDOd: 2.67 % vs. 0.45 %) increased and decreased, respectively, after 48 h of fecal fermentation regardless of the medium ($P \leq 0.05$). NC had the highest relative abundance of *Romboutsia* (2.32 %) after 48 h of fecal fermentation, followed by the medium with FOS (2.26 %) and FDOd (0.20 %). The relative abundance of *Subdoligranulum* decreased in NC and medium with FOS after 48 h of fecal fermentation (2.25 % vs. 0.52 % and 1.19 % vs. 0.11 %, respectively) ($P \leq 0.05$), while did not change in medium with FDOd (0.47 % vs. 0.48 %) ($P > 0.05$). The relative abundance of *Roseburia* (1.57 % vs. 0.16 %) and *Barnesiella* (1.74 % vs. 0.31 %) decreased in medium with FOS ($P \leq 0.05$) and did not change in medium with FDOd (*Roseburia*: 1.15 % vs. 1.90 % and *Barnesiella*: 0.78 % vs. 0.08 %) ($P > 0.05$) after 48 h of fecal fermentation.

The relative abundance of *[Ruminococcus] torques* group (0.41 % vs. 1.78 %) and *Phascolarctobacterium* (0.25 % vs. 1.42 %) increased in NC ($P \leq 0.05$) and did not change in medium with FOS (0.42 % vs 0.24 %) and FDOd (0.48 % vs. 0.76 %) ($P > 0.05$) after 48 h of fecal fermentation. The relative abundance of *Lactiplantibacillus* increased only in medium with FDOd (0.00 % vs. 1.11 %) after 48 h of fecal fermentation ($P \leq 0.05$). Overall, none of the evaluated media induced alterations in the relative abundance of *Lachnoclostridium*, *Lactiplantibacillus*, *[Eubacterium] eligens* group, *Acidaminococcus*, *Prevotella*, *Akkermansia*, *Dialister*, *Christensenellaceae R-7* group, *Fusicatenibacter*, and *[Eubacterium] hallii* group during fecal fermentation ($P > 0.05$).

At 48 h of fecal fermentation, the genera *Pseudomonas*, *Ligilactobacillus*, *Escherichia-Shigella* and *Faecalibacterium* were the most prevalent in medium with FDOd, while in the medium with FOS, the genera *Pseudomonas* and *Fusobacterium* were more present.

3.3 Microbial metabolic activity during *in vitro* fecal fermentation

The pH values decreased in all examined media during 48 h of *in vitro* fecal fermentation ($P \leq 0.05$), with the lowest values in medium with FDOd ($P \leq 0.05$). Malic, citric, and succinic acids were detected only in medium with FDOd at least up to 24 h of fecal fermentation, with increased succinic acid contents at 48 h of fecal fermentation ($P \leq 0.05$). Formic acid was detected until 24 h of fecal fermentation in all examined media, with the highest values in medium with FDOd ($P \leq 0.05$). Acetic acid was detected in all examined media until 48 h of fecal fermentation, with the highest values in medium with FDOd ($P \leq 0.05$) (**Table 2**).

The global metabolic profile was determined at zero and 48 h of *in vitro* fecal fermentation in media with FDOd and FOS (**Supplementary material data, Table S3**). Sixty distinct chemical constituents were identified, including SCFA or medium-chain fatty acids (propionate/propionic acid, isobutyrate/isobutyric acid, valerate/valeric acid, acetate/acetic acid, N-butyrate/N-butyric acid, caprylate/caprilic acid), branched-chain fatty acids (isocaproate/isocaproic acid, isovalerate/isovaleric acid, and ketoisovalerate/ketoisovaleric acid), organic acids (lactate/lactic acid, citrate/citric acid, malonate/malic acid, 3-hydroxyisovalerate, succinate/succinic acid, formate/formic acid), sugars (fructose, α -xylose, β -xylose, β -glucose, α -glucose, D-galactose), essential amino acids (leucine, isoleucine, valine, threonine, lysine, methionine, phenylalanine, and tryptophan), and non-essential amino acids (alanine, ornithine, proline, aspartate, asparagine, glycine, tyrosine, and glutamate). Other classes of compounds, such as amines, ketones, and nitrogenous bases were detected, including gamma-aminobutyric acid (GABA), methylamine, trimethylamine, total lipids, bile salts, ethanol, 3-hydroxybutyrate, uracil, acetone, putrescine, dihydroxyacetone, 3-

hydroxyphenylacetate, phenylacetate, 3-methyl-2-oxoisovalerate, 2-oxoisovalerate, 3-hydroxyisovalerate, 5-aminosalicylate, N-acetyl-5-aminosalicylate, 2-methylbutyrate, UDP-glucuronate, hypoxanthine, homovanillate, and p-cresol were identified. The ^1H NMR spectra in media containing FOS and FDOd after 48 h of fecal fermentation are shown in **Fig. 3**.

Compounds, such as bile salts, 2-methylbutyrate, leucine, isoleucine, valine, valerate/valeric acid, N-butyrate, propionate/propionic acid, isobutyrate/butyric acid, 3-methyl-2-oxoisovalerate, 2-oxoisovalerate, ethanol, alanine, lysine, ornithine, acetate/acetic acid, UDP-glucuronate, tyrosine, N-acetyl-5-aminosalicylate, phenylacetate, tryptophan, formate/formic acid, caprylate/caprylic acid, isocaproate/isocaproic acid, isovalerate/isovaleric acid, total lipids, and ketoisovalerate, were detected in media with FDOd and FOS at zero and 48 h of fecal fermentation.

Among the 60 identified metabolites, 29 were detected only in medium with FDOd, including essential amino acids (threonine, phenylalanine, and methionine) and non-essential amino acids (aspartate, asparagine, and glycine), organic acids (lactate/lactic acid, succinate/succinic acid, and citrate/citric acid), sugars (fructose, α -xylose, β -xylose, β -glucose, α -glucose, and D-galactose), and other organic compounds (methylamine, trimethylamine, putrescine, 5-aminosalicylate, malonate, homovanillate, 3-hydroxyphenylacetate, p-cresol, 5-aminosalicylate, uracil, hypoxanthine, dihydroxyacetone, and 3-hydroxyisovalerate). The amino acids proline (non-essential) and methionine (essential) were detected in medium with FOS at time zero; however, these compounds were not detected after 48 h of fecal fermentation. In contrast, proline and methionine were detected in medium with FDOd at zero and 48 h of fecal fermentation.

3.4 Changes in phenolic compound contents and antioxidant capacity during fecal fermentation

Overall, the contents of detected phenolic compounds decreased during 48 of *in vitro*

fecal fermentation (**Table 3**). Various phenolic compounds, such as catechin, myricetin, isorhamnetin, and rutin, were detected during fecal fermentation, with catechin as the most prevalent compound (0.54 g/L) after 48 h of fecal fermentation, followed by myricetin (0.23 g/L), rutin (0.04 g/L), and isorhamnetin (0.03 g/L). Procyanidin B2 and trans-resveratrol were detected after 24 h of fecal fermentation, although with decreased contents compared to time zero ($P \leq 0.05$). Quercetin 3-glucoside, kaempferol 3-glucoside, hesperidin, cis-resveratrol, caftaric acid, chlorogenic acid, and caffeic acid were detected only at time zero.

The antioxidant capacity in medium with FDOd decreased ($P \leq 0.05$) and did not change in medium with FOS and NC ($P > 0.05$) during the 48 h of fecal fermentation when measured with DPPH[•] method (**Table 3**). However, the antioxidant capacity increased in medium with FDOd after 48 h of fecal fermentation when measured with ABTS^{•+} method ($P \leq 0.05$) while not changing in medium with FOS and NC ($P > 0.05$). In relation to time zero, the antioxidant capacity decreased in medium with FOS after 48 h of fecal fermentation when measured with FRAP method ($P \leq 0.05$), while not changing in NC ($P \geq 0.05$) and increasing in medium containing FDOd ($P \leq 0.05$). Overall, the medium with FDOd had the highest antioxidant capacity during the fecal fermentation, except when measured with DPPH[•] method when the antioxidant capacity in medium with FDOd was higher than NC ($P \leq 0.05$) but did not differ from the medium with FOS ($P > 0.05$). Overall, the highest antioxidant capacity values were found when measured with FRAP method.

4. Discussion

Freeze-drying is typically used for drying food rich in nutrients and thermally sensitive bioactive compounds (e.g., phenolic compounds, vitamins, and anthocyanins) as it operates at low temperatures and high vacuum (Bhatta et al., 2020; Rezvankhah et al., 2019). Additionally, freeze-drying contributes to greater stability of the powdered product, as lower a_w reduces

susceptibility to microbial contamination and biochemical changes (García et al., 2019). The a_w in FDOd was below 0.6, considered safe for inhibiting microbial growth in food (Silva et al., 2023).

Lower pH values, such as that found in FDOd (4.61), can also contribute to increasing product stability by inhibiting the growth of microbial contaminants (Silva et al., 2023). The pH of most foods ranges between 3.5 and 7.0, with a significant impact on the color of fruits, vegetables, and derived products (Bello et al., 2013). Pigments like chlorophyll are generally susceptible to adverse conditions of temperature and pH, making treatment at low temperatures an alternative for preserving the color and nutrients of plant foods, such as cacti (Chandra et al., 2021; Koutchma et al., 2016).

FDOd had a high protein content (16.84 g/100 g) compared to values commonly found in other cacti species (Bezerril et al., 2021; García et al., 2021). Several factors can impact the protein content of cacti, such as water availability, soil conditions, and the maturity stage of the species, as younger cladodes tend to have higher protein contents compared to mature cladodes (García et al., 2007; Mounir et al., 2020). The lipid contents in FDOd (4.90 g/100 g) were like those found in a previous study (4.42 g/100 g) with cladodes of the same cactus species (Chinedu et al., 2017). Lipids can play a role in the absorption process of various nutrients in the gastrointestinal tract, providing a more favorable environment for intestinal microbiota (Zhang et al., 2021).

The maturity stage is one of the primary factors affecting the nutritional composition of cacti, as seen in the higher ash content and the presence of minerals, such as potassium, calcium, sodium, and magnesium (Mannai et al., 2016; Méndez et al., 2015), commonly found in younger cladodes (Castellano et al., 2021). Potassium, calcium, and sodium were the most prevalent minerals in FDOd, which agrees with a previous study evaluating the composition of *O. dillenii* cladodes (Kalegowda et al., 2015; Urbiola et al., 2011). The effect of micronutrients

on the intestinal microbiota is less discussed and traditionally not covered by the prebiotic concept. However, studies report the impacts of vitamins and minerals on the intestinal microbiome, with a role in bacterial genomic regulation and establishing symbiotic interactions within this microbiome (Gupta U. C. & Gupta, S. C., 2015; Steinert et al., 2020). Thus, vitamins and minerals are currently included in the list of substances that can affect the composition of the intestinal microbiota, even though through mechanisms not involving their selective utilization by host microorganisms (Gibson et al., 2017).

FDOd had a lower phosphorus content and a higher magnesium content compared to the results of a previous study with *O. dillenii* cladodes (Ghazi et al., 2015). Magnesium influences mitochondrial function and contributes to the development of nerves and muscles (Liu et al., 2019), and its deficiency has been associated with liver diseases, heart conditions, and diabetes (Blaszczyk & Chodak, 2013). Overall, the contents of trace elements, such as iron and manganese, were lower in FDOd compared to available literature concerning the composition of *O. dillenii* cladodes (Kalegowda et al., 2015; Méndez et al., 2015). As previously mentioned, these differences can be attributed to various factors, such as region and cultivation conditions, climate, as well as genetic and maturity stage differences among the studied plants (Ghazi et al., 2015).

The L*, a*, and b* parameters of FDOd were determined for instrumental color analysis, which is one aspect influencing the acceptability of food products by consumers (Duan et al., 2022). FDOd had low luminosity and a greenish-yellow color, possibly related to the presence of pigments like chlorophyll, which imparts a green color to plant species (Bao et al., 2021). A previous study evaluated the influence of adding *Opuntia ficus-indica* flour to the dough and reported decreased luminosity and darkening of the product when adding higher flour amounts (Rodrigues et al., 2023). The decrease in luminosity could be linked to the presence of plant pigments, which are concentrated in dehydrated products (Bao et al., 2021).

The chlorophyll content provides an indirect estimate of the plant nutritional status, as a large portion of the nitrogen present in the plant is incorporated into this pigment (Nabil et al., 2019). Furthermore, total chlorophyll and its a and b fractions can contribute to the elimination of free radicals, exerting antioxidant effects (Kang et al., 2018). Thus far, no studies have evaluated the chlorophyll content in *O. dillenii* cladodes. However, one study assessed the levels of total chlorophyll and its fractions in *O. ficus-indica* cladode flour and found values lower than those detected in FDOd for total chlorophyll, chlorophyll a, and chlorophyll b (Rodrigues et al., 2023). The difference between these results reinforces that the drying temperature can affect the content of bioactive compounds in plant materials and potentially impact their antioxidant capacity (Değirmencioğlu et al., 2016).

FDOd had a high total fiber content, standing out the content of soluble fiber compared to insoluble fiber. These results differ from those found in *O. ficus-indica* cladodes, which had a higher content of insoluble fiber (29.80 g/100 g) compared to soluble fiber (8.50 g/100 g) (López et al., 2013). The values of dietary fibers in cactus cladodes have been also related to the plant maturity stage, with higher contents of soluble and insoluble fibers commonly found in younger and mature cladodes, respectively (García et al., 2007; Urbiola et al., 2011). Dietary fibers play a role in preventing various gastrointestinal diseases and can exert prebiotic effects, affecting the abundance and metabolic activity of various bacterial groups forming the intestinal microbiota (Sampaio et al., 2022; Silva et al., 2023).

The total dietary fiber contents in FDOd can represent a significant contribution to achieving the recommended daily intake of fiber since approximately 50 g of FDOd provide 100% of the minimum recommended intake (25-30 g/day) (WHO, 2003). The literature shows a direct association between the viscosity of soluble plant polysaccharides, including soluble dietary fiber fraction, with their ability to inhibit glucose absorption (Goff et al., 2018; López et al., 2013), indicating the potential use of FDOd as an adjunct in glycemic control and diabetes

prevention.

Cacti cladodes are considered sources of bioactive compounds, such as dietary fibers, phenolic compounds, and organic acids (Brito et al., 2020; Martins et al., 2022). Malic, citric, and succinic acids were the organic acids most prevalent in FDOd, which were found in higher contents than previously reported for *Cereus jacamaru* DC. (Cactaceae) flour (Martins et al., 2022). Malic acid exerts antimicrobial effects by reducing the pH of the medium and inhibiting the growth of food-contaminating microorganisms, such as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, and *Escherichia coli* (Massilia et al., 2009). Citric acid plays a role in pH adjustment and is used by the food industry as an antioxidant (Adeyi et al., 2019), while succinic acid can serve as a substrate for commensal bacteria and contribute to glycemic and weight control (Datchary et al., 2015; Vadder et al., 2016).

Phenolic compounds are important antioxidants, with strong evidence of their role in reducing the risk of non-communicable chronic diseases (Díaz & Rangel, 2019). To the best of our knowledge, the composition of phenolic compounds in *O. dillenii* cladodes has not yet been reported in the literature. However, the presence of phenolic compounds, such as caffeic acid, catechin, and quercetin, was reported in *O. dillenii* fruits (Chang et al., 2008). Sixteen different phenolic compounds were identified in FDOd. Among these, myricetin, caffeic acid, and hesperidin were the most prevalent compounds, which are recognized for their high bioavailability (Silva et al., 2021). High contents of catechin, cis-resveratrol, and trans-resveratrol were also identified in FDOd, which have well-known antioxidant and anti-inflammatory properties (Luo et al., 2022; Vinha et al., 2023). The results suggest that FDOd may help reduce oxidative stress and decrease the risk of non-communicable chronic diseases, such as cardiovascular and metabolic diseases, neuropathies, and cancer (Díaz & Rangel, 2019; Jomová et al., 2019).

The Shannon and Chao1 indices consider the number of observed OTUs in the sample

and the uniformity of the distribution of bacterial species found therein (Summers et al., 2019). Species richness refers to the number of different species in the examined sample, while diversity depends not only on richness but also on the uniformity of the population of each species (Kim et al., 2017). The medium with FDOd increased the bacterial diversity after 48 h of fecal fermentation compared to time zero, and it was higher compared to medium with FOS. Greater bacterial diversity is considered indicative of intestinal health and linked to improvements in host metabolic markers (Le Chatelier et al., 2013). Although richness decreased in all examined media during the 48 h of fecal fermentation, the medium with FDOd had the highest richness index after 48 h of fecal fermentation, indicating that less abundant bacterial species are possibly being suppressed by species more adapted to the medium.

The medium with FDOd increased the F:B ratio after 48 h of fecal fermentation, with a higher prevalence of Firmicutes. The literature reports that a higher intake of soluble fibers is associated with an increase in the abundance of beneficial bacteria belonging to Firmicutes phylum in the intestinal microbiota (e.g., *Eubacterium eligens* group), and a decrease in the abundance of some potentially pathogenic microorganisms belonging to Bacteroidetes phylum (Chung et al., 2016; Jiang et al., 2016).

The most abundant bacterial phyla in a putatively healthy intestinal microbiota are Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, and Proteobacteria (Bello et al., 2011). The Firmicutes phylum was the most prevalent in medium with FDOd, while the Proteobacteria phylum was the most prevalent in medium with FOS. Although an increase in the abundance of Firmicutes phylum in the intestinal microbiota has been related to obesity (Indiani et al., 2018), this association not always has been identified, being reinforced greater importance of the amounts of SCFA produced in the intestinal environment than just the higher abundance of Firmicutes (Schwiertz et al., 2012). On the other hand, some genera belonging to the Proteobacteria phylum, such as *Escherichia*, *Enterobacter*, and *Klebsiella*, are opportunistic

pathogens associated with intestinal inflammation and detrimental effects on intestinal health due to their immunogenicity (Korpela et al., 2018).

All examined media (NC, FDOd, and FOS) increased the abundance of the genus *Pseudomonas* after 48 h of fecal fermentation, with the highest abundance in medium with FOS. However, *Pseudomonas* spp. can directly correlate with the production of propionic and butyric acids in simulated fecal fermentation conditions, helping to achieve intestinal environment balance (Xu et al., 2018). In contrast, the abundance of the genera *Prevotella_9* and *Succinivibrio* decreased in all examined media after 48 h of fecal fermentation. A higher abundance of *Prevotella_9* in the intestinal microbiota has been associated with a higher risk of arterial hypertension (Mushtaq et al., 2019), while a higher abundance of *Succinivibrio* has been associated with an increase in the populations of pathogenic bacteria (e.g., *Helicobacter pylori*) in intestinal microbiota (Dash et al., 2019).

The relative abundance of the genus *Ligilactobacillus* (Firmicutes phylum) increased only in medium with FDOd after 48 h of fecal fermentation, being one of the most prevalent identified genera. Lactobacilli are often associated with promoting host health by modulating immune system cells and enhancing the resistance of the resident microbiome to pathogenic bacteria invasion (Rezende et al., 2021). Furthermore, a higher abundance of lactobacilli has been linked to increased intestinal peristalsis and relief of intestinal disease symptoms attributed to a higher SCFA production (Shen et al., 2024).

The relative abundance of *Faecalibacterium* and *Bacteroides* decreased in medium with FDOd and FOS after 48 h of fecal fermentation. These results may be explained by potential competitive inhibition among beneficial bacteria that preferentially utilize prebiotics as substrates during fermentation, producing organic acids, such as lactic, acetic, butyric, propionic, and isobutyric acids, which lower intestinal pH and hinder the adaptation of *Faecalibacterium* and *Bacteroides* species (Leite et al., 2023). The relative abundance of

Faecalibacterium in medium with FDOd was like that in medium with FOS. *Faecalibacterium* is one of the most abundant butyric acid-producing bacterial populations in human feces (Hu et al., 2020; Summers et al., 2019). A lower abundance of *Faecalibacterium* and *Bacteroides* in the intestinal microbiota may be associated with an increased risk of chronic non-communicable diseases, such as diabetes and hypertension (Tsai et al., 2021).

The relative abundance of *Blautia* and *Fusobacterium* was not altered in medium with FDOd during fecal fermentation, while the relative abundance of *Blautia* and *Fusobacterium* decreased and increased in medium with FOS, respectively. A lower abundance of *Blautia* in the intestinal microbiota has been negatively correlated with obesity and metabolic complications, such as insulin resistance (Páez et al., 2020), while some *Fusobacterium* species can induce inflammatory responses in the host (Diether & Willing, 2019).

The increased abundance of *Agathobacter* genus in medium with FDOd after 48 h of fecal fermentation suggests benefits, as several species of this genus are butyric acid- producers and can favorably modulate the host immune response (Martini et al., 2022). A lower abundance of the genera *Romboutsia* and *Clostridium_sensu_stricto_1* was found in medium with FDOd. The presence of these genera is usually correlated with cognitive decline induced by elevated contents of lactic acid in the hippocampus of humans and animals with type 1 diabetes (Liguori et al., 2014; Zhao et al., 2018), indicating an important role of the intestinal microbiota in the gut-brain axis.

The genus *Pseudomonas* was the most prevalent in medium with FOS after 48 h of fecal fermentation, followed by medium with FDOd. Some *Pseudomonas* species (e.g. *P. aeruginosa*) are present in the environment and act as opportunistic pathogens in humans. However, the effects of prebiotics in the intestine, such as the production of SCFA and the reduction of environmental pH, can reduce the pathogenicity of this bacterium (González et al., 2014). On the other hand, there was an increase in the abundance of the genus *Ligilactobacillus*

in medium with FDOd after 48 h of fecal fermentation. *Ligilactobacillus* species are among the most predominant members of the Lactobacillaceae family in the human gastrointestinal tract, which can regulate the composition of the intestinal microbiota by inhibiting the excessive proliferation of harmful bacteria, besides providing protection against oxidative stress (Nowak et al., 2019). Additionally, *Ligilactobacillus* competes with pathogenic microorganisms for nutrients, reducing their adherence to intestinal epithelial cells (Averina et al., 2021).

Fecal fermentation of FDOd resulted in the reduction of pH values, with the production of different organic acids, including malic, citric, succinic, formic, and acetic acids, indicating intense metabolic activity by intestinal microbiota (Sampaio et al., 2022). The distal gastrointestinal tract is densely populated by microorganisms that produce succinic acid as a byproduct of anaerobic fermentation, such as bacteria belonging to the phylum Bacteroidetes (Connors et al., 2018). Although the accumulation of succinic acid is commonly associated with inflammation and intestinal diseases, the literature reports interactions between species of the intestinal microbiota, characterizing it as a possible cross-feeding metabolite, promoting the stability of the microbial community (Connors et al., 2018; Henson & Phalak, 2017). The decrease in the content of acetic and formic acids in medium with FDOd during fecal fermentation indicates their utilization by microorganisms capable of using organic acids as substrates for energy production (Wang et al., 2021).

The results of the global metabolomic profile analysis in medium with FDOd showed the presence of a wide variety of chemical compounds normally found in human fecal samples (Shinn et al., 2022). The concentration of some of these compounds, such as SCFA, depends not only on the diversity of the host intestinal microbiota but also on the type of dietary fibers provided as substrates in fecal fermentation process (Havenaar, 2011). Different SCFA were detected in medium with FDOd during fecal fermentation, including acetic, propionic, and butyric acids, which constitute about 95 % of the organic acids in the human colon, as well as

formic acid, generally found in smaller proportion in the human colon (Covián et al., 2016). These SCFA reduce intestinal pH, inhibit the growth of pathogenic bacteria, promote increased nutrient absorption, and play an important role in maintaining intestinal barrier function (Macfarlane, G. T. & Macfarlane, S. 2012). Valeric acid was also detected in medium with FDOd, which has been associated with positive health effects, such as inhibiting the growth of cancer cells and inhibitory effects on *Clostridium difficile* (Abbeele et al., 2022; McDonald et al., 2018).

Various branched-chain fatty acids (BCFA) were found in medium with FDOd, including valerate/valeric acid, isovalerate/isovaleric acid, isobutyrate/isobutyric acid, and isocaproate/isocaproic acid. Considered fermentation products, these acids are present in smaller quantities in the colon, and although little is still known about their impact on host health, there is evidence that these compounds can be oxidized when butyric acid is not available, in addition to acting in the prevention of intestinal permeability disturbance induced by pro-inflammatory cytokines (Abbeele et al., 2022).

Essential amino acids, such as valine, leucine, and lysine, can result from anaerobic protein breakdown. The presence of these amino acids in medium with FDOd may indicate a high protein content in the fermentation medium. When not absorbed in the gastrointestinal tract, these proteins reach the colon and can be fermented or converted into putrefactive amines, such as methylamine, trimethylamine, and putrescine (Ressler et al., 2013). However, when not present in excess, these amines can be absorbed by the intestinal lumen, acting as important regulators of metabolism, growth, and cell proliferation (Diether & Willing, 2019). Digestible carbohydrates can be degraded into monosaccharides, such as glucose, fructose, and galactose, which are absorbed in the small intestine (Omer & Quigley, 2018). These sugars were detected in medium with FDOd during fecal fermentation, indicating the metabolism of carbohydrates, which can serve as substrates for intestinal microorganisms or be converted into other

metabolites, such as organic acids and amino acids (Arnone et al., 2022).

GABA was also detected in medium with FDOd during fecal fermentation and is considered a non-protein amino acid that can be produced by beneficial intestinal bacteria, acting as a neurotransmitter, and modulating the gut-brain axis response (Duranti et al., 2020). GABA can also stimulate the selective growth of SCFA-producing bacteria (Ratajczak et al., 2019), which has sparked interest in its use as a bioactive compound with like-prebiotic effects (Hagi et al., 2016).

Only a portion of the total content of phenolic compounds ingested is available to exert antioxidant effects in the body. Therefore, it is important to consider their bioaccessibility in foods, as only the portion capable of crossing the intestinal barrier is considered bioavailable (Morais et al., 2019). Several phenolic compounds were detected in medium with FDOd after 24 and 48 h of fecal fermentation, including catechin, myricetin, rutin, isorhamnetin, epicatechin gallate, procyanidin B1, procyanidin B2, trans-resveratrol, and syringic acid, but in lower contents compared to time zero, indicating their consumption and metabolism by the intestinal microbiota. Catechin, epicatechin, and rutin are cited as the main compounds related to antioxidant activity measured with ABTS^{•+}, DPPH[•], and FRAP methods (Chen et al., 2015). Overall, an increase in antioxidant capacity was found in medium with FDOd during fecal fermentation, being superior to medium with FOS when evaluated with ABTS^{•+} and FRAP methods. The highest antioxidant capacity values were detected in medium with FDOd after 48 h of fecal fermentation when evaluated with FRAP method, corroborating with the results obtained in a previous study with *C. jacamaru* flour (Martins et al., 2022). These results may be related to the presence of specific phenolic compounds in FDOd, such as myricetin, kaempferol, and resveratrol, which neutralize reactive oxygen species and reduce the formation of free radicals (Díaz & Rangel; Ijaz et al., 2021; Villarreal et al., 2018). Additionally, these results may be associated with the high antioxidant capacity of metabolites formed during the

fecal fermentation of FDOd (Edwards et al., 2018; Ghazi et al., 2015).

5. Conclusion

The results showed that FDOd has a relevant nutritional composition, with a high content of dietary fibers, especially soluble fibers, minerals, and phenolic compounds, exerting antioxidant capacity, as well as potential positive effects on the composition and metabolic activity of the human intestinal microbiota by promoting the increase of beneficial bacteria populations and stimulating the production various metabolites linked to local and systemic health-promotion during fecal fermentation. The results indicate that freeze-drying *O. cladodes* generates a novel ingredient with potential prebiotic properties on the intestinal microbiota, with the valorization of a natural resource (plant species) still underutilized in human nutrition. Further *in vivo* studies are warranted to confirm the effects of FDOd on human intestinal microbiota and metabolic parameters related to health promotion in a translational approach.

Ethical statement

The Ethics Committee for Research with Human Beings of the Federal University of Paraíba (João Pessoa, PB, Brazil; protocol 5.906.607; CAAE: 66.834.523.7.0000.5188) granted ethical approval for involving human subjects in this study.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this manuscript.

Data availability

The data will be made available upon request.

Acknowledgments

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) (Finance code 001); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Process number: 308746/2020-1; and Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba - FAPESQ (Call 09/2021, Grant 3107/2021) for funding this research.

References

- Abbeele, V. P., Ghyselinck, J., Marzorati, M., Koch, A. M., Lambert, W., Michiels, J., & Chalvon-Demersay, T. (2022). The effect of amino acids on production of SCFA and bCFA by members of the porcine colonic microbiota. *Microorganisms*, 10(4), 762. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040762>
- Adeyi, O., Omoregbe, D. I. I., & Jideani, V. A. (2019). Effect of citric acid on physical stability of sunflower oil-in-water emulsion stabilized by gelatinized bambara groundnut flour. *International Journal of Civil Engineering and Technology*. Available in <http://iaeme.com/Home/issue/IJCIET?Volume=10&Issue=1>
- Aguilar, R. I. V., Molina, E. B., Baños, S. B., & Cabrera, F. R. (2017). Cactus stem (*Opuntia ficus-indica* Mill): anatomy, physiology and chemical composition with emphasis on its biofunctional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(15), 5065-5073. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8493>
- Andrade, R. M. S., Silva, S., Costa, C. M. D. S. F., Veiga, M., Costa, E., Ferreira, M. S. L., ... & Pintado, M. E. (2020). Potential prebiotic effect of fruit and vegetable byproducts flour using *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 137, 109354. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109354>
- Arnone, D., Chabot, C., Heba, A. C., Kökten, T., Caron, B., Hansmann, F., ... & Peyrin-Biroulet, L. (2022). Sugars and gastrointestinal health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 20(9), 1912-1924. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2021.12.011>
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. (2019). *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. Gaithersburg: AOAC.
- Averina, O. V., Poluektova, E. U., Marsova, M. V., & Danilenko, V. N. (2021). Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria as representatives of the human gut microbiota. *Biomedicine*, 9(10), 1340. <https://doi.org/10.1021/jf506326t>

- Bao, H., Zhou, J., Yu, J., & Wang, S. (2021). Effect of drying methods on properties of potato flour and noodles made with potato flour. *Foods*, 10(5), 1115. <https://doi.org/10.3390/foods10051115>
- Bello, A. A., Palácios, V. B., Segovia, P. G., Bel, J. M., & Monzó, J. M. (2013). Effect of pH on color and texture of food products. *Food Engineering Reviews*, 5, 158-170. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9067-2>
- Bello, D. M. G., Blaser, M. J., Ley, R. E., & Knight, R. (2011). Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology*, 140(6), 1713-1719. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.011>
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bezerril, F. F., de Souza, M. D. F. V., Lima, M. D. S., Pacheco, M. T. B., de Carvalho, P. O. A. A., Sampaio, K. B., ... & Queiroga, R. D. C. R. D. E. (2021). Physicochemical characteristics and bioactive compounds of the Xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) cactus from Caatinga Brazilian: Are they nutritive and functional? *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 3284-3297. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00906-w>
- Bhatta, S., Stevanovic Janezic, T., & Ratti, C. (2020). Freeze-drying of plant-based foods. *Foods*, 9(1), 1-22. <https://doi.org/10.3390/foods9010087>
- Blaszczyk, U., & Chodak, A. D. (2013). Magnesium: its role in nutrition and carcinogenesis. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 64(3), p. 165-171. Available in <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24325082/>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Brito, G. S. M. S., Santos, E. M., Araújo, G. G. L., Oliveira, J. S., Zanine, A. D. M., Perazzo, A. F., ... & Cavalcanti, H. S. (2020). Mixed silages of cactus pear and gliricidia: chemical composition, fermentation characteristics, microbial population and aerobic stability. *Scientific Reports*, 10(1), 6834. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63905-9>
- Castellano, J., Marrero, M. D., Ortega, Z., Romero, F., Benitez, A. N., & Ventura, M. R. (2021). *Opuntia* spp. fiber characterization to obtain sustainable materials in the composites field. *Polymers*, 13(13), 2085. <https://doi.org/10.3390/polym13132085>
- Chandra, R. D., Prihastyanti, M. N. U., & Lukitasari, D. M. (2021). Effects of pH, high pressure processing, and ultraviolet light on carotenoids, chlorophylls, and anthocyanins of fresh fruit and vegetable juices. *eFood*, 2(3), 113-124. <https://doi.org/10.2991/efood.k.210630.001>

- Chang, S. F., Hsieh, C. L., & Yen, G. C. (2008). The protective effect of *Opuntia dillenii* Haw fruit against low-density lipoprotein peroxidation and its active compounds. *Food Chemistry*, 106(2), 569-575. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.017>
- Chen, G. L., Chen, S. G., Xie, Y. Q., Chen, F., Zhao, Y. Y., Luo, C. X., et al. (2015). Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to *in vitro* digestion. *Journal of Functional Foods*, 17, 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.028>
- Chinedu, N. U., Benjamin, A., & Peter, A. (2017). Chemical composition and physicochemical analysis of matured stems of *Opuntia dillenii* grown in Nigeria. *Food Science and Technology*, 5(5), 106-112. <https://doi.org/10.13189/fst.2017.050502>
- Chung, W. S. F., Walker, A. W., Louis, P., Parkhill, J., Vermeiren, J., Bosscher, D., ... & Flint, H. J. (2016). Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biology*, 14(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0224-2>
- Coelho, E. M., Padilha, C. V. S., Miskinis, G. A., Sá, A. G. B., Pereira, G. E., Azevêdo, L. C., & dos Santos Lima, M. (2018). Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>
- Connors, J., Dawe, N., & Van Limbergen, J. (2018). The role of succinate in the regulation of intestinal inflammation. *Nutrients*, 11(1), 25. <https://doi.org/10.3390/nu11010025>
- Covián, R. D., Madiedo, R. P., Margolles, A., Gueimonde, M., Gavilán, C. G. R., & Salazar, N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in Microbiology*, 7, 185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Dash, N. R., Khoder, G., Nada, A. M., & Al Bataineh, M. T. (2019). Exploring the impact of *Helicobacter pylori* on gut microbiome composition. *PloS One*, 14(6), e0218274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218274>
- Datchary, P. K., Nilsson, A., Akrami, R., Lee, Y. S., De Vadder, F., Arora, T., ... & Bäckhed, F. (2015). Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella*. *Cell Metabolism*, 22(6), 971-982. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.001>
- Değirmencioğlu, N., Gürbüz, O., Herken, E. N., & Yıldız, A. Y. (2016). The impact of drying techniques on phenolic compound, total phenolic content and antioxidant capacity of oat flour tarhana. *Food Chemistry*, 194, 587-594. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.065>
- Díaz, M. D. S. S., & Rangel, N. G. C. (2019). Cacti for production of metabolites: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 8657-8667. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10125-5>

- Diether, N. E., & Willing, B. P. (2019). Microbial fermentation of dietary protein: an important factor in diet–microbe–host interaction. *Microorganisms*, 7(1), 19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010019>
- Direito, R., Rocha, J., Sepodes, B., & Figueira, M. E. (2021). Phenolic compounds impact on rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and microbiota modulation. *Pharmaceutics*, 13(2), 145. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020145>
- Duan, Y., Zhou, S., Liu, R., Wen, Y., Xing, Y., & Yu, X. (2022). Physicochemical, sensorial and microcosmic properties of Chinese dried noodles fortified with unhulled and hulled flaxseed flour. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(1), 676-683. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15449>
- Duranti, S., Ruiz, L., Lugli, G. A., Tames, H., Milani, C., Mancabelli, L., ... & Turrone, F. (2020). *Bifidobacterium adolescentis* as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. *Scientific Reports*, 10(1), 14112. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70986-z>
- Edwards, A. B., Aspee, F. J., Theoduloz, C., & Hirschmann, G. S. (2018). Colonic fermentation of polyphenols from *Chilean currants* (*Ribes* spp.) and its effect on antioxidant capacity and metabolic syndrome-associated enzymes. *Food Chemistry*, 258, 144-155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.053>
- Espinosa, M. V., Peredo, A. V. G., Carrera, C., Palma, M., Barbero, G. F., & González, M. J. A (2022). Ultrasound-assisted extraction of betalains from *Opuntia* fruit pulp of different color varieties. *Agronomy*, 12(11), 2604. <https://doi.org/10.3390/agronomy12112604>
- Feng, Q., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2018). Gut microbiota: an integral moderator in health and disease. *Frontiers in Microbiology*, 9, 151. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00151>
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13428781/>
- Gao, J., Han, Y. L., Jin, Z. Y., Xu, X. M., Zha, X. Q., Chen, H. Q., & Yin, Y. Y. (2015). Protective effect of polysaccharides from *Opuntia dillenii* Haw. fruits on streptozotocin-induced diabetic rats. *Carbohydrate polymers*, 124, 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.068>
- García, L. L., Valencia, R. R. C., Paulet, P. G., & Schoenlechner, R. (2019). Development of gluten-free and egg-free pasta based on quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) with addition of lupine flour, vegetable proteins and the oxidizing enzyme POx. *European Food Research and Technology*, 245, 2147-2156. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03320-1>
- García, M. E. R., Lira, C., Becerra, E. H., Villegas, M. A. C., Fonseca, A. J. P., Molina, I. R., ... & Muñoz-Torres, C. (2007). Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62, 107-112. <https://doi.org/10.1007/s11130-007-0049-5>

- García, M. Q., Cortez, E. G., Bah, M., Molina, A. R., Villegas, M. A. C., Del Real, A., & Molina, I. R. (2021). Comparative analysis of the chemical composition and physicochemical properties of the mucilage extracted from fresh and dehydrated *Opuntia ficus indica* cladodes. *Foods*, 10(9), 2137. <https://doi.org/10.3390/foods10092137>
- Ghazi, Z., Ramdani, M., Tahri, M., Rmili, R., Elmsellem, H., El Mahi, B., & Fauconnier, M. L. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of seeds oils and fruit juice of *Opuntia ficus indica* and *Opuntia dillenii* from Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(8), p. 2338-2345. Available in <https://orbi.uliege.be/handle/2268/189343>
- Gibson, G. R., Hutkins, R. W., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... & Reid, G. (2017). 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>
- Giongo, A., Richardson, A. G. D., Crabb, D. B., & Triplett, E. W. (2010). TaxCollector: modifying current 16S rRNA databases for the rapid classification at six taxonomic levels. *Diversity*, 2(7), 1015-1025. <https://doi.org/10.3390/d2071015>
- Goff, H. D., Repin, N., Fabek, H., El Khoury, D., & Gidley, M. J. (2018). Dietary fibre for glycaemia control: Towards a mechanistic understanding. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre*, 14, 39-53. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.07.005>
- González, M. O., Medina, F. S., Santiago, C. M., Posadas, R. L., Pacheco, D., Krell, T., ... & Abdelali, D. (2014). Fructooligosaccharides reduce *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pathogenicity through distinct mechanisms. *PLoS One*, 9(1), e85772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085772>
- Gulbert, C.; Kong, G.; Renoir, T.; Hannan, A. J. (2020). Exercise, diet and stress as modulators of gut microbiota: Implications for neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease*, 134, 104621. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104621>
- Gupta, U. C., & Gupta, S. C. (2015). Role of vitamins in human health and nutrition: Sources and morbidity. *Current Nutrition & Food Science*, 11(2), 105-115. <http://dx.doi.org/10.2174/1573401311666150429225548>
- Hagi, T., Kobayashi, M., & Nomura, M. (2016). Metabolome analysis of milk fermented by γ -aminobutyric acid-producing *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 994-1001. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9945>
- Hatzakis, E. (2018). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in food science: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 189-220. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12408>
- Havenaar, R. (2011). Intestinal health functions of colonic microbial metabolites: a review. *Beneficial Microbes*, 2(2), 103-114. <https://doi.org/10.3920/BM2011.0003>

- Henson, M. A., & Phalak, P. (2017). Byproduct cross feeding and community stability in an *in silico* biofilm model of the gut microbiome. *Processes*, 5(1), 13. <https://doi.org/10.3390/pr5010013>
- 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>
- Hong, S. H., Bunge, J., Jeon, S. O., & Epstein, S. S. (2006). Predicting microbial species richness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(1), 117-122. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507245102>
- Hu, J. L., Nie, S. P., Li, C., & Xie, M. Y. (2013). *In vitro* fermentation of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. by human fecal microbiota. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 384-392. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.006>
- Hu, J., Zhong, X., Yan, J., Zhou, D., Qin, D., Xiao, X., ... & Liu, Y. (2020). High-throughput sequencing analysis of intestinal flora changes in ESRD and CKD patients. *BMC Nephrology*, 21, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12882-019-1668-4>
- Ijaz, M. U., Anwar, H., Iqbal, S., Ismail, H., Ashraf, A., Mustafa, S., & Samad, A. (2021). Protective effect of myricetin on nonylphenol-induced testicular toxicity: biochemical, steroidogenic, hormonal, spermatogenic, and histological-based evidences. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 22742-22757. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12296-5>
- Indiani, C. M. D. S. P., Rizzardi, K. F., Castelo, P. M., Ferraz, L. F. C., Darrieux, M., & Parisotto, T. M. (2018). Childhood obesity and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the gut microbiota: A systematic review. *Childhood Obesity*, 14(8), 501-509. <https://doi.org/10.1089/chi.2018.0040>
- Jiang, T., Gao, X., Wu, C., Tian, F., Lei, Q., Bi, J., ... & Wang, X. (2016). Apple-derived pectin modulates gut microbiota, improves gut barrier function, and attenuates metabolic endotoxemia in rats with diet-induced obesity. *Nutrients*, 8(3), 126. <https://doi.org/10.3390/nu8030126>
- Jomová, K., Hudecova, L., Lauro, P., Simunkova, M., Alwasel, S. H., Alhazza, I. M., & Valko, M. (2019). A switch between antioxidant and prooxidant properties of the phenolic compounds myricetin, morin, 3', 4'-dihydroxyflavone, taxifolin and 4-hydroxy-coumarin in the presence of copper (II) ions: a spectroscopic, absorption titration and DNA damage study. *Molecules*, 24(23), 4335. <https://doi.org/10.3390/molecules24234335>
- Kalegowda, P., Haware, D. J., Rajarathnam, S., & Shashirekha, M. N. (2015). Minerals of cactus (*Opuntia dillenii*): Cladode and fruit. *Current Science*, 2295-2298. Available in <https://www.jstor.org/stable/24906681>
- 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. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., ... & Isaacson, R. E. (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>
- Korpela, K. (2018). Diet, microbiota, and metabolic health: Trade-off between saccharolytic and proteolytic fermentation. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 65-84. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012830>
- Koutchma, T., Popović, V., Polski, V. R., & Popielarz, A. (2016). Effects of ultraviolet light and high-pressure processing on quality and health-related constituents of fresh juice products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(5), 844-867. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12214>
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., ... & Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), 541-546. <https://doi.org/10.1038/nature12506>
- Leite, A. K. F., Fonteles, T. V., Alves Filho, E. G., Oliveira, F. A. S., & Rodrigues, S. (2023). Impact of orange juice containing potentially prebiotic ingredients on human gut microbiota composition and its metabolites. *Food Chemistry*, 405, 134706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134706>
- Liguori, C., Stefani, A., Sancesario, G., Sancesario, G. M., Marciani, M. G., & Pierantozzi, M. (2014). CSF lactate levels, τ proteins, cognitive decline: a dynamic relationship in Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-308577>
- Lima, R. S., Ferreira, S. R. S., Vitali, L., & Block, J. M. (2019). May the superfruit red guava and its processing waste be a potential ingredient in functional foods? *Food Research International*, 115, 451-459. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.053>
- Liu, M., Yang, H., & Mao, Y. (2019). Magnesium and liver disease. *Annals of Translational Medicine*, 7(20), p. 1-9. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.09.70>
- López, M. A. N., López, O. P., & Camacho, R. R. (2013). Functional and hypoglycemic properties of nopal cladodes (*O. ficus-indica*) at different maturity stages using *in vitro* and *in vivo* tests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10981-10986. <https://doi.org/10.1021/jf403834x>
- Lordan, C., Thapa, D., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2020). Potential for enriching next-generation health-promoting gut bacteria through prebiotics and other dietary components. *Gut Microbes*, 11(1), 1-20. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1613124>
- Luo, Y., Jian, Y., Liu, Y., Jiang, S., Muhammad, D., & Wang, W. (2022). Flavanols from nature: A phytochemistry and biological activity review. *Molecules*, 27(3), 719. <https://doi.org/10.3390/molecules27030719>

- Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S. (2012). Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *Journal of AOAC International*, 95(1), 50-60. https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGE_Macfarlane
- Mannai, F., Ammar, M., Yanez, J. G., Elaloui, E., & Moussaoui, Y. (2016). Cellulose fiber from Tunisian Barbary Fig “*Opuntia ficus-indica*” for papermaking. *Cellulose*, 23, 2061-2072. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0899-9>
- Martini, G., Ciardiello, D., Dallio, M., Famiglietti, V., Esposito, L., Corte, C. M. D., ... & Ciardiello, F. (2022). Gut microbiota correlates with antitumor activity in patients with mCRC and NSCLC treated with cetuximab plus avelumab. *International Journal of Cancer*, 151(3), 473-480. <https://doi.org/10.1002/ijc.34033>
- Martins, A. C. S., Medeiros, G. K. V. V., Oliveira, S. P. A., Albuquerque, T. M. R., Sampaio, K. B., Lima, M. S., ... & Oliveira, M. E. G. (2023). Unrevealing the *in vitro* impacts of *Cereus jacamaru* DC. cladodes flour on potentially probiotic strains, selected bacterial populations, and metabolic activity of human intestinal microbiota. *Food Research International*, 174, 113658. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113658>
- Martins, A. C. S., Medeiros, G. K. V. V., Silva, J. Y. P. D., Viera, V. B., Barros, P. D. S., Lima, M. D. S., ... & Oliveira, M. E. G. D. (2022). Physical, nutritional, and bioactive properties of mandacaru cladode flour (*Cereus jamacaru* DC.): An unconventional food plant from the semi-arid Brazilian Northeast. *Foods*, 11(23), 3814. <https://doi.org/10.3390/foods11233814>
- Massilia, R. M. R., Melgar, J. M., & Belloso, O. M. (2009). Antimicrobial activity of malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157: H7 in apple, pear and melon juices. *Food Control*, 20(2), 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.02.009>
- McClements, D. J., Barrangou, R., Hill, C., Kokini, J. L., Lila, M. A., Meyer, A. S., & Yu, L. (2021). Building a resilient, sustainable, and healthier food supply through innovation and technology. *Annual Review of Food Science and Technology*, 12, 1-28. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-092220-030824>
- McDonald, J. A., Mullish, B. H., Pechlivanis, A., Liu, Z., Brignardello, J., Kao, D., ... & Marchesi, J. R. (2018). Inhibiting growth of *Clostridioides difficile* by restoring valerate, produced by the intestinal microbiota. *Gastroenterology*, 155(5), 1495-1507. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.014>
- Méndez, L. P., Flores, F. T., Martín, J. D., Rodríguez, E. M. R., & Romero, C. D. (2015). Physicochemical characterization of cactus pads from *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica*. *Food Chemistry*, 188, 393-398. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.011>
- Menezes, F. N. D. D., Almeida, E. T. C., Vieira, A. R. S., Aquino, J. S., Lima, M. S., Magnani, M., & de Souza, E. L. (2021b). Impact of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by-product on composition and metabolic activity of human colonic microbiota *in vitro* indicates prebiotic properties. *Current Microbiology*, 78, 2264-2274. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-021-02502-z>

- Menezes, F. N. D. D., de Melo, F. H. C., Vieira, A. R. S., Almeida, É. T., Lima, M. S., Aquino, J. S., ... & de Souza, E. L. (2021a). Acerola (*Malpighia glabra* L.) and guava (*Psidium guayaba* L.) industrial processing by-products stimulate probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* growth and induce beneficial changes in colonic microbiota. *Journal of Applied Microbiology*, 130(4), 1323-1336. <https://doi.org/10.1111/jam.14824>
- Monteiro, S. S., Almeida, R. L., Santos, N. C., Pereira, E. M., Silva, A. P., Oliveira, H. M. L., & Pasquali, M. A. D. B. (2023). New functional foods with cactus components: sustainable perspectives and future trends. *Foods*, 12(13), 2494. <https://doi.org/10.3390/foods12132494>
- Morais, S. G. G., da Silva Campelo Borges, G., dos Santos Lima, M., Martín-Belloso, O., & Magnani, M. (2019). Effects of probiotics on the content and bioaccessibility of phenolic compounds in red pitaya pulp. *Food Research International*, 126, 108681. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108681>
- Moro, T. M. A., Celegatti, C. M., Pereira, A. P. A., Lopes, A. S., Barbin, D. F., Pastore, G. M., & Clerici, M. T. P. S. (2018). Use of burdock root flour as a prebiotic ingredient in cookies. *LWT – Food Science and Technology*, 90, 540-546. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.059>
- Mounir, B., Asmaa, M., Abdeljalil, Z., & Abdellah, A. (2020). Physico-chemical changes in cladodes of *Opuntia ficus-indica* as a function of the growth stage and harvesting areas. *Journal of Plant Physiology*, 251, 153196. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153196>
- Mushtaq, N., Hussain, S., Zhang, S., Yuan, L., Li, H., Ullah, S., ... & Xu, J. (2019). Molecular characterization of alterations in the intestinal microbiota of patients with grade 3 hypertension. *International Journal of Molecular Medicine*, 44(2), 513-522. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4235>
- Nabil, B., Ouabou, R., Ouhammou, M., Saadouni, L., & Mahrouz, M. (2019). Impact of particle size on functional, physicochemical properties and antioxidant activity of cladode powder (*Opuntia ficus-indica*). *Journal of Food Science and Technology*, 57, 943-954. Available in <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-019-04127-4>
- Nowak, A., Paliwoda, A., & Błasiak, J. (2019). Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21), 3456-3467. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1494539>
- Omer, A., & Quigley, E. M. (2018). Carbohydrate maldigestion and malabsorption. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(8), 1197-1199. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.01.048>

- Padilha, C. V. S, Miskinis, G. A., Souza, M. E. A. O., Pereira, G. E., Oliveira, D., Luiz, M. T. B., & Lima, M. (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>
- Páez, A. B., Pugar, E. M. G., Almela, I. L., Pérez, Á. M., Franch, P. C., & Sanz, Y. (2020). Depletion of *Blautia* species in the microbiota of obese children relates to intestinal inflammation and metabolic phenotype worsening. *Msystems*, 5(2), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/msystems.00857-19>
- Ratajczak, W., Rył, A., Mizerski, A., Walczakiewicz, K., Sipak, O., & Laszczyńska, M. (2019). Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs). *Acta Biochimica Polonica*, 66(1), 1-12. https://doi.org/10.18388/abp.2018_2648
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Evans, C. R. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Ressler, R. R. R., Glahn, R. P., Bae, S., & Brenna, J. T. (2013). Branched-chain fatty acids in the neonatal gut and estimated dietary intake in infancy and adulthood. *The importance of immunonutrition*, 77, 133-143. <https://doi.org/10.1159/000351396>
- Rezende, E. S. V., Lima, G. C., & Naves, M. M. V. (2021). Dietary fibers as beneficial microbiota modulators: A proposed classification by prebiotic categories. *Nutrition*, 89, 111217. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111217>
- Rezvankhah, A., Djomeh, Z. E. & Askari, G. (2019). Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. *Drying Technology*, 38(1-2), 235-258. <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1653906>
- Rodrigues, D. S., Cavalcanti, M. T., Gomes, C. A., Araújo, J. S., Lima, R. P., Moreira, I. D. S., ... & Pereira, E. M. (2023). Partial Substitution of Wheat Flour with Palm Flour in Pasta Preparation. *Applied Sciences*, 13(22), 12123. <https://doi.org/10.3390/app132212123>
- Sampaio, K. B., Alves, J. L. B., Nascimento, Y. M., Tavares, J. F., Silva, M. S., Nascimento, D. S., ... & Souza, E. L. (2022). Nutraceutical formulations combining *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin, and or resveratrol with beneficial impacts on the abundance of intestinal bacterial populations, metabolite production, and antioxidant capacity during colonic fermentation. *Food Research International*, 161, 111800. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111800>
- Schwiertz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., & Hardt, P. D. (2012). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*, 18(1), 190-195. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.167>
- Shen, F., Wang, Q., Ullah, S., Pan, Y., Zhao, M., Wang, J., ... & Zhong, H. (2024). *Ligilactobacillus acidipiscis* YJ5 modulates the gut microbiota and produces beneficial

- metabolites to relieve constipation by enhancing the mucosal barrier. *Food & Function*, 15(1), 310-325. <https://doi.org/10.1039/d3fo03259k>
- Shinn, L. M., Mansharamani, A., Baer, D. J., Novotny, J. A., Charron, C. S., Khan, N. A., ... & Holscher, H. D. (2022). Fecal metabolites as biomarkers for predicting food intake by healthy adults. *The journal of nutrition*, 152, 2956-2965. <https://doi.org/10.1093/jn/nxac195>
- Silva, J. C., Jr; Magnani, M. Costa, W. K. A., Madruga, Madruga, M. S., Olegário, L. S., Borges, G. S. C., ... & de Cordeiro, A. M. T. M. (2021). Traditional and flavored kombuchas with pitanga and umbu-cajá pulps: Chemical properties, antioxidants, and bioactive compounds. *Food Bioscience*, 44, 101380. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101380>
- Silva, J. Y. P., Nascimento, H. M. A., Albuquerque, T. M. R., Sampaio, K. B., Santos Lima, M., Monteiro, M., ... & 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*, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10134-x>
- Steinert, R. E., Lee, Y. K., & Sybesma, W. (2020). Vitamins for the gut microbiome. *Trends in Molecular Medicine*, 26(2), 137-140. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.11.005>
- Summers, S. C., Quimby, J. M., Isaiah, A., Suchodolski, J. S., Lunghofer, P. J., & Gustafson, D. L. (2019). The fecal microbiome and serum concentrations of indoxyl sulfate and p-cresol sulfate in cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 662-669. <https://doi.org/10.1111/jvim.15389>
- Tojo, R., Suárez, A., Clemente, M. G., de los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., Gueimonde, M., & Ruas-Madiedo, P. (2014). Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(41), 15163. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i41.15163>
- Tsai, H. J., Tsai, W. C., Hung, W. C., Hung, W. W., Chang, C. C., Dai, C. Y., & Tsai, Y. C. (2021). Gut microbiota and subclinical cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutrients*, 13(8), 2679. <https://doi.org/10.3390/nu13082679>
- Urbiola, M. I. H., Torrero, E. P., & García, M. E. R. (2011). Chemical analysis of nutritional content of prickly pads (*Opuntia ficus indica*) at varied ages in an organic harvest. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5), 1287-1295. <https://doi.org/10.3390/ijerph8051287>
- Vadder, F., Datchary, P. K., Zitoun, C., Duchampt, A., Backhed, F., & Mithieux, G. (2016). Microbiota-produced succinate improves glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis. *Cell Metabolism*, 24(1), 151-157. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.013>
- Villarreal, D. T., Camacho, A., Castro, H., Lopez, R. O., & Garza, A. L. (2019). Anti-obesity effects of kaempferol by inhibiting adipogenesis and increasing lipolysis in 3T3-L1

- cells. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 75, 83-88. <https://doi.org/10.1007/s13105-018-0659-4>
- Vinha, A. F. D., Moutinho, C. G., Brenha, J., & Sampaio, R. (2023). Nutraceuticals based on Portuguese grape pomaces as a potential additive in food products. *Brazilian Journal of Food Technology*, 26(1), 1-10. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.02023>
- Wang, R., Lv, N., Li, C., Cai, G., Pan, X., Li, Y., & Zhu, G. (2021). Novel strategy for enhancing acetic and formic acids generation in acidogenesis of anaerobic digestion via targeted adjusting environmental niches. *Water Research*, 193, 116896. <https://doi.org/10.1016/j.waters.2021.116896>
- World Health Organization. (2003). Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases. *Report of a joint WHO/FAO expert consultation*. Available in <http://health.euroafrica.org/books/dietnutritionwho.pdf>
- Xu, J., Chen, H. B., & Li, S. L. (2017). Understanding the molecular mechanisms of the interplay between herbal medicines and gut microbiota. *Medicinal Research Reviews*, 37(5), 1140-1185. <https://doi.org/10.1002/med.21431>
- Xu, Y., Xiang, S., Ye, K., Zheng, Y., Feng, X., Zhu, X., ... & Chen, Y. (2018). Cobalamin (vitamin B12) induced a shift in microbial composition and metabolic activity in an *in vitro* colon simulation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02780>
- Zhang, Y., Zhang, T., Liang, Y., Jiang, L., & Sui, X. (2021). Dietary bioactive lipids: A review on absorption, metabolism, and health properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(32), 8929-8943. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01369>
- Zhao, L., Dong, M., Ren, M., Li, C., Zheng, H., & Gao, H. (2018). Metabolomic analysis identifies lactate as an important pathogenic factor in diabetes-associated cognitive decline rats. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(12), 2335-2346. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.000690>

Table 1. Physicochemical characteristics and antioxidant capacity of freeze-dried *Opuntia dillenii* cladodes.

Parameters	Contents
a_w	0.302 ± 0.00
pH	4.61 ± 0.47
Proteins (g/100 g)	16.84 ± 0.37
Lipids (g/100 g)	4.98 ± 0.47
Ashes (g/100 g)	22.36 ± 0.64
Mineral content (mg/100 g)	
Macro elements	
K	4415.49 ± 14.34
Ca	1593.25 ± 24.31
Na	1010.52 ± 15.91
Mg	853.55 ± 10.69
P	209.04 ± 0.89
Micro elements	
Mn	8.92 ± 0.30
Zn	5.95 ± 0.24
Fe	3.72 ± 0.02
Cu	0.77 ± 0.10
Color parameters	
L*	32.91 ± 0.09
a*	-3.19 ± 0.05
b*	5.02 ± 0.06
Pigments (mg/100 g)	
Total chlorophyll	912.00 ± 0.03
Chlorophyll α	565.00 ± 0.10^a
Chlorophyll β	349.00 ± 0.08^b
Dietary fiber (g/100 g)	
Soluble fiber	33.36 ± 0.12^a
Insoluble fiber	19.00 ± 0.14^b
Total dietary fiber	52.36 ± 0.16
Organic acids (g/100 g)	
Malic	16.84 ± 0.03
Citric	4.43 ± 0.08
Succinic	3.26 ± 0.07
Formic	1.17 ± 0.03
Acetic	0.27 ± 0.01
Phenolic compounds (mg/100 g)	
Flavanols	
Catechin	58.00 ± 0.03
Epicatechin gallate	41.00 ± 0.01
Procyanidin B2	25.00 ± 0.00
Epigallocatechin gallate	23.00 ± 0.00
Epicatechin	19.00 ± 0.00
Flavonols	
Myricetin	785.00 ± 0.09
Quercetin 3-glucoside	36.00 ± 0.00
Kaempferol 3-glucoside	18.00 ± 0.00
Isorhamnetin	5.00 ± 0.00
Flavonones	
Hesperidin	135.00 ± 0.01
Rutin	34.00 ± 0.00
Stilbenes	
Cis-resveratrol	54.00 ± 0.02
Trans-resveratrol	16.00 ± 0.00
Phenolic acids	
Caftaric acid	265.00 ± 0.01
Chlorogenic acid	106.00 ± 0.00
Caffeic acid	53.00 ± 0.00
Antioxidant capacity	
ABTS ^{•+} ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	0.51 ± 0.02
DPPH [•] ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	0.32 ± 0.03
FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$)	2.75 ± 0.19

Data represents mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). a-b: different superscript small letters in the same column denote statistical difference ($P \leq 0.05$) among parameters, based on Student's t-test. Abbreviations: a_w : water activity; L*: luminosity; a*: red/green coordinate; b*: yellow/blue coordinate; 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. pH values and organic acid contents (g/L) in media with freeze-dried *Opuntia dillenii* cladodes (FDOd), fructooligosaccharides (FOS), and NC (no added fermentable substrate) at time zero, 24, and 48 h of *in vitro* fecal fermentation.

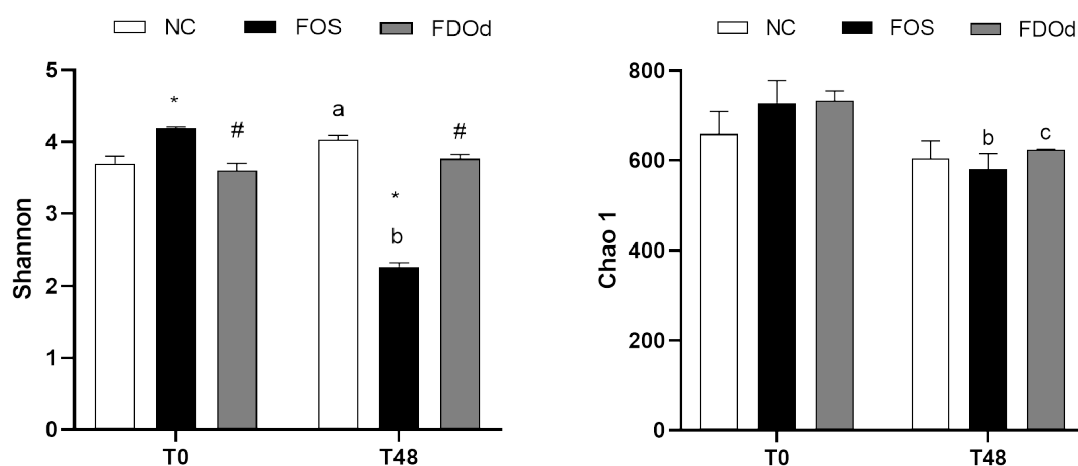
		pH		
Fermentation media		Fecal fermentation time		
		Zero	24 h	48 h
NC		6.69 ± 0.01 ^{Ab}	5.89 ± 0.02 ^{Ba}	5.80 ± 0.01 ^{Ca}
FOS		6.91 ± 0.05 ^{Aa}	6.04 ± 0.06 ^{Ba}	5.66 ± 0.01 ^{Ca}
FDOd		6.66 ± 0.06 ^{Ab}	5.42 ± 0.06 ^{Bb}	5.21 ± 0.06 ^{Cb}
		Organic acids (g/100 g)		
Organic acid	Fermentation media	Fecal fermentation time		
		Zero	24 h	48 h
Malic acid	NC	—	—	—
	FOS	—	—	—
	FDOd	0.09 ± 0.00 ^A	0.05 ± 0.00 ^B	—
Citric acid	NC	—	—	—
	FOS	—	—	—
	FDOd	0.19 ± 0.00 ^B	5.06 ± 0.05 ^A	—
Succinic acid	NC	—	—	—
	FOS	—	—	—
	FDOd	0.14 ± 0.05 ^C	0.46 ± 0.05 ^B	0.62 ± 0.02 ^A
Formic acid	NC	0.01 ± 0.00 ^{Ab}	0.01 ± 0.00 ^{Ab}	—
	FOS	0.01 ± 0.00 ^{Ab}	0.02 ± 0.00 ^{Ab}	—
	FDOd	0.79 ± 0.02 ^{Aa}	0.18 ± 0.01 ^{Ba}	—
Acetic acid	NC	0.04 ± 0.00 ^{Ab}	0.06 ± 0.00 ^{Ab}	0.07 ± 0.04 ^{Ab}
	FOS	0.03 ± 0.00 ^{Ab}	0.04 ± 0.00 ^{Ab}	0.04 ± 0.00 ^{Ab}
	FDOd	1.64 ± 0.04 ^{Aa}	0.20 ± 0.02 ^{Ba}	0.19 ± 0.04 ^{Ba}

Data represents average ± standard deviation (n = 3). A–C: Different superscript capital letters in the same row for the same formulation denote differences ($P \leq 0.05$) based on Tukey's test. a–c: different superscript small letters in the same column at the same time interval denote difference ($P \leq 0.05$) for the same parameter based on Tukey's test. Media with freeze-dried *Opuntia dillenii* cladodes (FDOd), fructooligosaccharides (FOS), and NC (no added fermentable substrate).

Table 3. Phenolic compounds and antioxidant capacity in media with freeze-dried *Opuntia dillenii* cladodes (FDOd) at time zero, 24, and 48 h of *in vitro* fecal fermentation.

Phenolic compounds (g/L)				
Phenolic compounds		Fecal fermentation time		
		Zero	24 h	48 h
Flavanols				
Catechin		6.51 ± 0.06 ^A	5.76 ± 0.03 ^A	0.54 ± 0.01 ^B
Procyanidin B1		—	0.17 ± 0.01 ^A	—
Procyanidin B2		0.95 ± 0.01 ^A	0.32 ± 0.03 ^B	—
Epigallocatechin gallate		0.12 ± 0.01 ^A	—	0.01 ± 0.00 ^B
Flavonols				
Myricetin		5.17 ± 0.00 ^A	0.21 ± 0.01 ^B	0.23 ± 0.01 ^B
Quercetin 3-glucoside		0.34 ± 0.05 ^A	—	—
Kaempferol 3-glucoside		0.55 ± 0.03 ^A	—	—
Isorhamnetin		0.05 ± 0.00 ^B	0.06 ± 0.00 ^A	0.03 ± 0.00 ^C
Flavonones				
Hesperidin		1.03 ± 0.00 ^A	—	—
Rutin		0.19 ± 0.05 ^A	0.05 ± 0.01 ^B	0.04 ± 0.00 ^B
Stilbenes				
Cis-resveratrol		0.35 ± 0.00 ^A	—	—
Trans-resveratrol		0.26 ± 0.01 ^A	0.15 ± 0.02 ^B	—
Phenolic acids				
Caftaric acid		1.62 ± 0.02 ^A	—	—
Chlorogenic acid		0.66 ± 0.01 ^A	—	—
Caffeic acid		0.31 ± 0.04 ^A	—	—
Syringic acid		—	0.06 ± 0.00 ^A	—
Antioxidant capacity				
Method	Fermentation media	Fecal fermentation time		
		0 h	24 h	48 h
ABTS ⁺⁺ (μmol Trolox/g)	NC	0.05 ± 0.01 ^{Ac}	0.06 ± 0.01 ^{Ac}	0.07 ± 0.01 ^{Ac}
	FOS	0.14 ± 0.01 ^{Ab}	0.13 ± 0.01 ^{Ab}	0.14 ± 0.01 ^{Ab}
	FDOd	0.22 ± 0.01 ^{Ba}	0.27 ± 0.01 ^{Aa}	0.28 ± 0.01 ^{Aa}
DPPH [*] (μmol Trolox/g)	NC	0.06 ± 0.02 ^{Ac}	0.06 ± 0.02 ^{Ac}	0.07 ± 0.02 ^{Ab}
	FOS	0.18 ± 0.02 ^{Ab}	0.17 ± 0.02 ^{Ab}	0.15 ± 0.02 ^{Aa}
	FDOd	0.30 ± 0.02 ^{Aa}	0.26 ± 0.01 ^{Ba}	0.20 ± 0.02 ^{Ca}
FRAP (μmol FeSO ₄ /g)	NC	0.37 ± 0.02 ^{Bc}	0.46 ± 0.02 ^{Ac}	0.38 ± 0.02 ^{Bc}
	FOS	0.90 ± 0.02 ^{Ab}	0.83 ± 0.02 ^{Bb}	0.74 ± 0.02 ^{Cb}
	FDOd	2.84 ± 0.02 ^{Ca}	3.49 ± 0.02 ^{Ba}	4.13 ± 0.02 ^{Aa}

Data represents average ± standard deviation (n = 3). A–C: Different superscript capital letters in the same row for the same formulation denote differences ($P \leq 0.05$), based on Tukey and Student's T tests. a–c: different superscript small letters in the same column at a time interval denote difference ($P \leq 0.05$) for the same parameter, based on Tukey's test or Student's t-test. Abbreviations: 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.

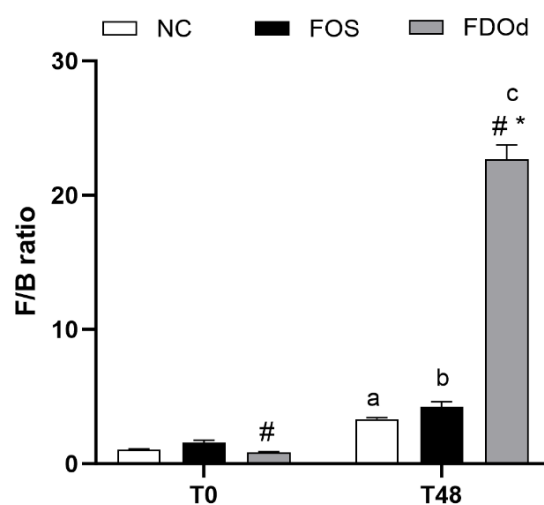


(A) Shannon Index

(B) Chao 1 Index

^a NC T0 vs. NC T48; ^b FOS T0 vs. FOS T48; [#] FDOd T0 vs. FDOd T48; * FOS T48 vs. FDOd T48, [#]FDOd T48 vs. NC T0 differs based on Two-way ANOVA followed by post-hoc Tukey test ($P \leq 0.05$).

^bFOS T0 vs. FOS T48; ^cFDOd T0 vs. FDOd T48 differs based on Two-way ANOVA followed by post-hoc Tukey test ($P \leq 0.05$).



(C) Firmicutes:Bacteroidetes ratio

^aNC T0 vs. NC T48; ^bFOS T0 vs. FOS T48; ^cFDOd T0 vs. FDOd T48, [#]FDOd T48 vs. FOS T48 and NC T48 differ based on Two-way ANOVA followed by post-hoc Tukey test ($P \leq 0.05$).

Fig. 1. Microbial diversity (A), microbial richness (B) and Firmicutes:Bacteroidetes (F:B) ratio (C) in media with freeze-dried *Opuntia dillenii* cladodes (FDOd), fructooligosaccharides (FOS), and NC (no added fermentable substrate) at time zero (T0) and 48 h (T48) of *in vitro* fecal fermentation.

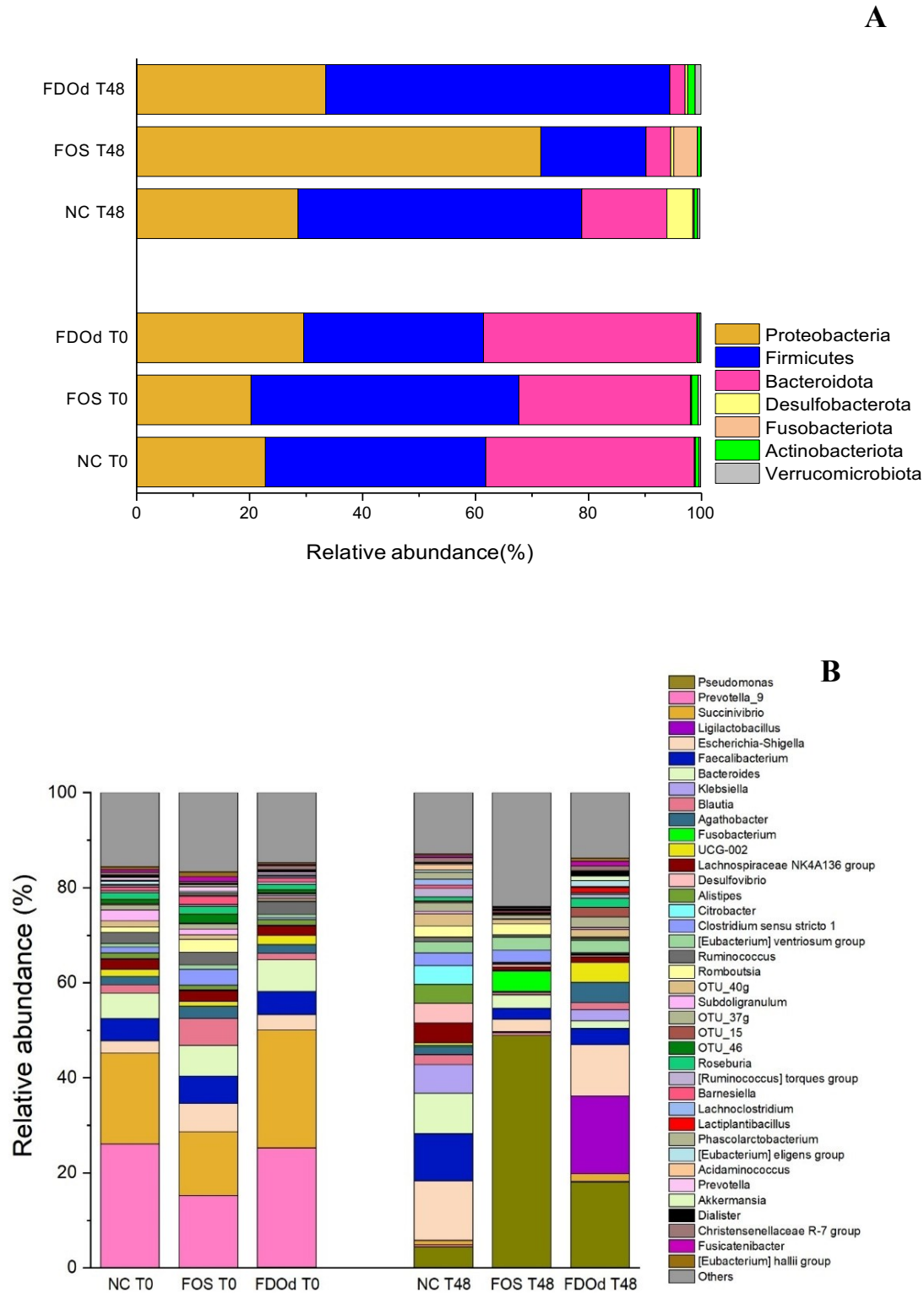


Fig. 2. Relative abundance of the bacterial phyla (A) and the main genera (B) identified in media with freeze-dried *Opuntia dillenii* cladodes (FDOd), fructooligosaccharides (FOS), and NC (no added fermentable substrate) at time zero (T0) and 48 h (T48) of *in vitro* fecal fermentation.

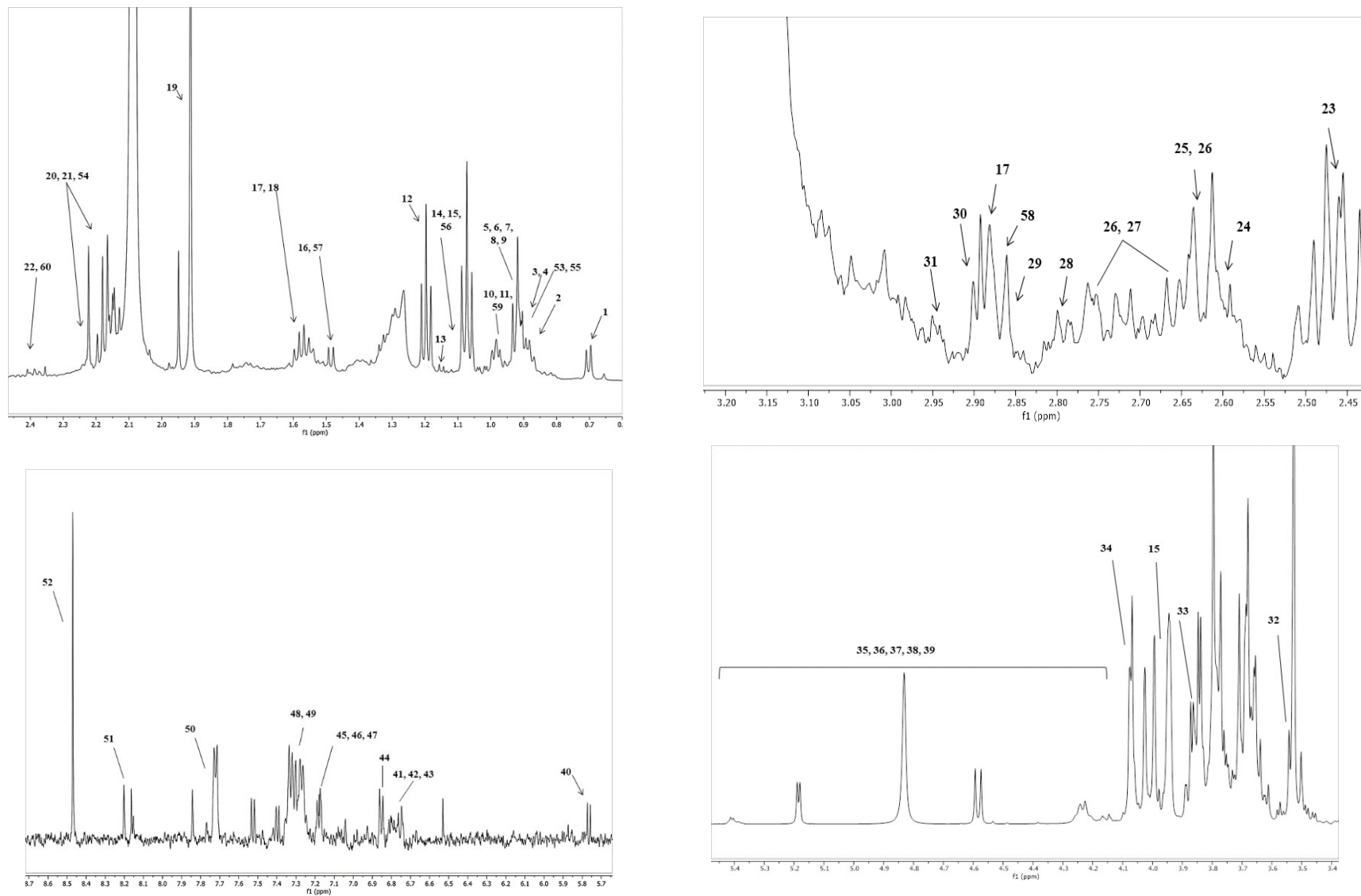


Fig. 3. Representative ^1H NMR spectra in media with freeze-dried *Opuntia dillenii* cladodes (FDOd) at 48 h of *in vitro* fecal fermentation analyzed by ^1H NMR.

APÊNDICE C - DADOS MATERIAIS SUPLEMENTARES

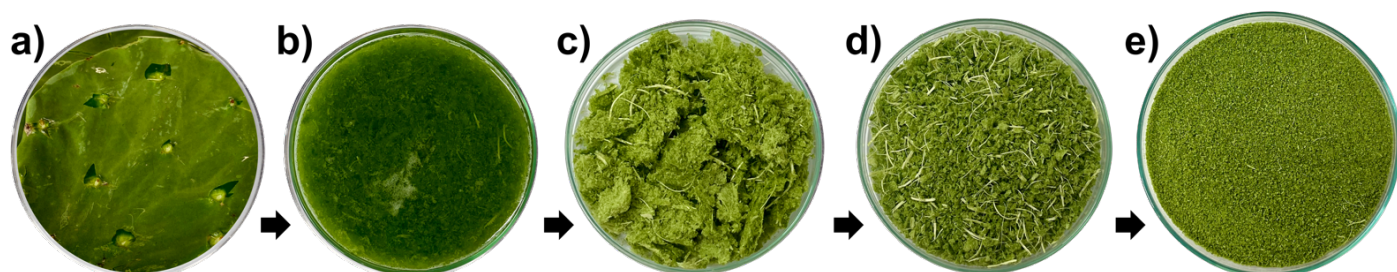


Fig. S1. Processing steps to obtain freeze-dried *Opuntia dillenii* cladodes. (a) cladode after removal of spines (b) fresh crushed cladode, (c) freeze-dried cladode, (d) freeze-dried and crushed cladode, (e) freeze-dried, crushed and sieved cladode.

Table S1. Composition of the growth medium used in *in vitro* fecal fermentation, in the proportion of g or mL/L (Andrade et al., 2020; Bianchi et al., 2010).

Components	Amount (g ou mL/L)
Cloreto de sódio (NaCl)	4,5 g
Cloreto de potássio (KCl)	4,5 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	1,5 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,69 g
Sulfato ferroso (FeSO ₄)	0,005 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,08 g
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,5 g
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄)	0,5 g
Sal biliar	0,4 g
Polissobarto (Tween 80°)	1 mL
L-cisteína	0,8 g
Solução de resazurina (0,025%)	4 mL

Table S2. Relative abundance of different bacterial genus in an *in vitro* human fecal fermentation system with digested freeze-dried *Opuntia dillenii* cladodes (FDOd), fructooligosaccharides (FOS) and NC (no added fermentable substrate) at time zero and 48 h of fecal fermentation.

Bacterial genus	Relative abundance (%)	
	Zero h	48 h
<i>Pseudomonas</i>		
NC	0.01±0.02 ^{Ba}	4.45±0.34 ^{Ac}
FOS	0.01±0.04 ^{Ba}	49.00±2.49 ^{Aa}
FDOd	0.16±0.02 ^{Ba}	18.11±3.75 ^{Ab}
<i>Prevotella 9</i>		
NC	26.06±1.30 ^{Aa}	0.44±0.07 ^{Ba}
FOS	15.17±1.26 ^{Ab}	0.52±0.12 ^{Ba}
FDOd	25.08±2.41 ^{Aa}	0.15±0.03 ^{Ba}
<i>Succinivibrio</i>		
NC	19.17±0.07 ^{Ab}	0.93±0.06 ^{Bb}
FOS	13.49±2.09 ^{Ac}	0.18±0.01 ^{Bc}
FDOd	24.77±3.11 ^{Aa}	1.54±0.11 ^{Ba}
<i>Ligilactobacillus</i>		
NC	0.02±0.00 ^{Aa}	0.03±0.01 ^{Ab}
FOS	0.02±0.00 ^{Aa}	0.01±0.01 ^{Ab}
FDOd	0.03±0.01 ^{Ba}	16.44±1.21 ^{Aa}
<i>Escherichia-Shigella</i>		
NC	2.60±0.26 ^{Bb}	12.49±1.74 ^{Aa}
FOS	5.92±0.53 ^{Aa}	2.59±0.77 ^{Bc}
FDOd	3.28±0.07 ^{Bb}	10.77±2.10 ^{Ab}
<i>Faecalibacterium</i>		
NC	4.64±0.05 ^{Ba}	9.94±0.60 ^{Aa}
FOS	5.78±0.79 ^{Aa}	2.33±0.24 ^{Bb}
FDOd	4.93±0.09 ^{Aa}	3.39±0.04 ^{Bb}
<i>Bacteroides</i>		
NC	5.37±0.20 ^{Bb}	8.51±0.10 ^{Aa}
FOS	6.42±0.47 ^{Aa}	2.81±0.03 ^{Bb}
FDOd	6.65±0.32 ^{Aa}	1.65±0.06 ^{Bb}
<i>Klebsiella</i>		
NC	0.01±0.00 ^{Ba}	5.98±0.08 ^{Aa}
FOS	0.02±0.00 ^{Aa}	0.09±0.01 ^{Ac}
FDOd	0.02±0.00 ^{Ba}	2.33±0.37 ^{Ab}
<i>Blautia</i>		
NC	1.72±0.08 ^{Bb}	2.08±0.07 ^{Aa}
FOS	5.66±0.19 ^{Aa}	0.45±0.05 ^{Bb}
FDOd	1.34±0.39 ^{Ab}	1.47±0.14 ^{Aa}
<i>Agathobacter</i>		
NC	1.78±0.08 ^{Aa}	1.74±0.19 ^{Ab}
FOS	2.60±0.03 ^{Aa}	0.23±0.03 ^{Bc}
FDOd	1.80±0.05 ^{Ba}	4.23±0.21 ^{Aa}
<i>Fusobacterium</i>		
NC	0.00±0.00 ^{Aa}	0.23±0.02 ^{Ab}
FOS	0.01±0.00 ^{Ba}	4.19±0.76 ^{Aa}
FDOd	0.00±0.00 ^{Aa}	0.00±0.00 ^{Ab}
<i>UCG-002</i>		
NC	1.49±0.10 ^{Aa}	0.61±0.10 ^{Ab}
FOS	1.01±0.07 ^{Aa}	0.20±0.02 ^{Ac}
FDOd	1.96±0.08 ^{Ba}	4.17±0.41 ^{Aa}

<i>Lachnospiraceae NK4A136 group</i>		
NC	2.19±0.26 ^{Ba}	4.13±0.78 ^{Aa}
FOS	2.21±0.11 ^{Aa}	0.79±0.07 ^{Bb}
FDOd	1.99±0.10 ^{Aa}	1.18±0.12 ^{Ab}
<i>Desulfovibrio</i>		
NC	0.09±0.01 ^{Ba}	4.10±0.15 ^{Aa}
FOS	0.16±0.03 ^{Aa}	0.46±0.06 ^{Ab}
FDOd	0.09±0.02 ^{Aa}	0.37±0.09 ^{Ab}
<i>Alistipes</i>		
NC	1.10±0.02 ^{Ba}	4.04±0.20 ^{Aa}
FOS	1.05±0.04 ^{Aa}	0.26±0.00 ^{Aa}
FDOd	1.20±0.09 ^{Aa}	0.18±0.03 ^{Aa}
<i>Citrobacter</i>		
NC	0.00±0.00 ^{Ba}	3.90±0.24 ^{Aa}
FOS	0.00±0.00 ^{Aa}	0.13±0.00 ^{Ab}
FDOd	0.00±0.00 ^{Aa}	0.11±0.03 ^{Ab}
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>		
NC	1.28±0.18 ^{Bb}	2.66±0.18 ^{Aa}
FOS	3.34±0.25 ^{Aa}	2.62±0.25 ^{Aa}
FDOd	0.41±0.16 ^{Ab}	0.29±0.03 ^{Ab}
<i>[Eubacterium] ventriosum group</i>		
NC	0.78±0.02 ^{Ba}	2.40±0.19 ^{Aa}
FOS	0.86±0.02 ^{Ba}	2.79±0.45 ^{Aa}
FDOd	0.70±0.01 ^{Ba}	2.57±0.36 ^{Aa}
<i>Ruminococcus</i>		
NC	2.31±0.12 ^{Aa}	0.95±0.07 ^{Ba}
FOS	2.71±0.22 ^{Aa}	0.44±0.04 ^{Ba}
FDOd	2.67±0.18 ^{Aa}	0.45±0.05 ^{Ba}
<i>Romboutsia</i>		
NC	1.08±0.08 ^{Bb}	2.32±0.16 ^{Aa}
FOS	2.69±0.22 ^{Aa}	2.26±0.25 ^{Ab}
FDOd	0.23±0.10 ^{Ac}	0.20±0.01 ^{Ac}
<i>OTU_40g</i>		
NC	1.38±0.03 ^{Ba}	2.63±0.05 ^{Aa}
FOS	1.01±0.07 ^{Aa}	1.03±0.12 ^{Ab}
FDOd	0.55±0.01 ^{Aa}	1.58±0.27 ^{Ab}
<i>Subdoligranulum</i>		
NC	2.25±0.10 ^{Aa}	0.52±0.05 ^{Ba}
FOS	1.19±0.03 ^{Ab}	0.11±0.01 ^{Bb}
FDOd	0.47±0.04 ^{Ac}	0.48±0.06 ^{Ab}
<i>OTU_37g</i>		
NC	1.13±0.01 ^{Aa}	1.71±0.03 ^{Aa}
FOS	1.02±0.15 ^{Aa}	0.71±0.03 ^{Ab}
FDOd	0.40±0.00 ^{Ba}	2.20±0.05 ^{Aa}
<i>OTU_15</i>		
NC	0.23±0.05 ^{Aa}	0.39±0.00 ^{Ab}
FOS	0.19±0.01 ^{Aa}	0.22±0.00 ^{Ab}
FDOd	0.20±0.01 ^{Ba}	2.04±0.36 ^{Aa}
<i>OTU_46</i>		
NC	0.86±0.10 ^{Ab}	0.03±0.01 ^{Ba}
FOS	1.94±0.32 ^{Aa}	0.01±0.00 ^{Ba}
FDOd	0.70±0.06 ^{Ab}	0.01±0.00 ^{Ba}
<i>Roseburia</i>		
NC	1.42±0.14 ^{Aa}	0.87±0.15 ^{Ab}
FOS	1.57±0.16 ^{Aa}	0.16±0.01 ^{Bb}
FDOd	1.15±0.19 ^{Aa}	1.90±0.01 ^{Aa}
<i>[Ruminococcus] torques group</i>		
NC	0.41±0.00 ^{Ba}	1.78±0.06 ^{Aa}
FOS	0.42±0.01 ^{Aa}	0.24±0.03 ^{Ab}

FDOd	0.48±0.00 ^{Aa}	0.76±0.09 ^{Ab}
<i>Barnesiella</i>		
NC	0.82±0.00 ^{Aa}	0.76±0.05 ^{Aa}
FOS	1.74±0.42 ^{Aa}	0.31±0.08 ^{Ba}
FDOd	0.78±0.02 ^{Aa}	0.08±0.01 ^{Aa}
<i>Lachnoclostridium</i>		
NC	0.33±0.05 ^{Aa}	1.24±0.16 ^{Aa}
FOS	0.28±0.03 ^{Aa}	0.12±0.02 ^{Aa}
FDOd	0.38±0.01 ^{Aa}	0.32±0.04 ^{Aa}
<i>Lactiplantibacillus</i>		
NC	0.00±0.00 ^{Aa}	0.00±0.00 ^{Aa}
FOS	0.00±0.00 ^{Aa}	0.00±0.00 ^{Aa}
FDOd	0.00±0.00 ^{Ba}	1.11±0.22 ^{Aa}
<i>Phascolarctobacterium</i>		
NC	0.25±0.01 ^{Ba}	1.42±0.07 ^{Aa}
FOS	0.38±0.02 ^{Aa}	0.03±0.00 ^{Ab}
FDOd	0.16±0.01 ^{Aa}	0.20±0.00 ^{Ab}
<i>[Eubacterium] eligens group</i>		
NC	0.69±0.12 ^{Aa}	0.49±0.02 ^{Aa}
FOS	0.32±0.11 ^{Aa}	0.16±0.02 ^{Aa}
FDOd	0.29±0.01 ^{Aa}	1.19±0.13 ^{Aa}
<i>Acidaminococcus</i>		
NC	0.14±0.00 ^{Aa}	1.12±0.04 ^{Aa}
FOS	0.02±0.00 ^{Aa}	0.04±0.01 ^{Aa}
FDOd	0.00±0.00 ^{Aa}	0.00±0.00 ^{Aa}
<i>Prevotella</i>		
NC	0.59±0.04 ^{Aa}	0.05±0.01 ^{Aa}
FOS	1.04±0.09 ^{Aa}	0.05±0.01 ^{Aa}
FDOd	0.44±0.01 ^{Aa}	0.00±0.00 ^{Aa}
<i>Akkermansia</i>		
NC	0.15±0.04 ^{Aa}	0.24±0.01 ^{Aa}
FOS	0.36±0.03 ^{Aa}	0.09±0.01 ^{Aa}
FDOd	0.18±0.02 ^{Aa}	1.05±0.03 ^{Aa}
<i>Dialister</i>		
NC	0.31±0.02 ^{Aa}	0.15±0.00 ^{Aa}
FOS	0.30±0.03 ^{Aa}	0.01±0.00 ^{Aa}
FDOd	0.34±0.03 ^{Aa}	1.04±0.04 ^{Aa}
<i>Christensenellaceae R-7 group</i>		
NC	0.64±0.06 ^{Aa}	1.02±0.00 ^{Aa}
FOS	0.37±0.02 ^{Aa}	0.24±0.02 ^{Aa}
FDOd	0.86±0.05 ^{Aa}	1.04±0.01 ^{Aa}
<i>Fusicatenibacter</i>		
NC	0.53±0.01 ^{Aa}	0.43±0.03 ^{Aa}
FOS	1.02±0.12 ^{Aa}	0.09±0.00 ^{Aa}
FDOd	0.26±0.11 ^{Aa}	0.99±0.16 ^{Aa}
<i>[Eubacterium] hallii group</i>		
NC	0.58±0.06 ^{Aa}	0.33±0.02 ^{Aa}
FOS	1.00±0.03 ^{Aa}	0.10±0.01 ^{Aa}
FDOd	0.33±0.11 ^{Aa}	0.64±0.11 ^{Aa}

A–B: Different superscript capital letters in the same row for the same cultivation media denote differences ($p \leq 0.05$), based on Student's test. a–c: different superscript small letters in the same column at the same time interval denote difference ($p \leq 0.05$) among cultivation media, based on Tukey's test. Media with freeze-dried *Opuntia dillenii* cladodes (FDOd), fructooligosaccharides (FOS), and NC (no added fermentable substrate).

Table S3. Metabolites identified in media with freeze-dried *Opuntia dillenii* cladodes (FDOd) and fructooligosaccharides (FOS) at zero and 48 h of *in vitro* fecal fermentation analyzed by ^1H -NMR.

Samples	Chemical constituents	Number	Time of incubation	
			0 h	48 h
	Biliary salts	1		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	2-methylbutyrate	2		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Valerate	3		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	N-butyrate	4		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Leucine	5		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Isoleucine	6		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Valine	7		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Propionate/propionic acid	8		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Isobutyrate/butyric acid	9		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	3-methyl-2-oxoisovalerate	10		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	2-oxoisovalerate	11		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Ethanol	12		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	3-hydroxybutyrate	13		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Threonine	14		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Lactate/lactic acid	15		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Alanine	16		

FOS			X	X
FDOd			X	X
	Lysine	17		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Ornithine	18		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Acetate/acetic acid	19		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Proline	20		
FOS			X	—
FDOd			X	X
	Glutamate	21		
FOS			X	—
FDOd			X	X
	5-aminosalicylate	22		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Succinic acid	23		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Methylamine	24		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Methionine	25		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Citric acid	26		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Aspartate	27		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Asparagine	28		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Trimethylamine	29		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Putrescine	30		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Malonate	31		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Glycine	32		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Fructose	33		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Dihydroxyacetone	34		
FOS			—	—
FDOd			X	X

α -Xylose		35		
FOS			—	—
FDOd			X	X
β -Xylose		36		
FOS			—	—
FDOd			X	X
β -Glucose		37		
FOS			—	—
FDOd			X	X
α -Glucose		38		
FOS			—	—
FDOd			X	X
D-galactose		39		
FOS			—	—
FDOd			X	X
UDP-glucuronate		40		
FOS			X	X
FDOd			X	X
Homovanillate		41		
FOS			—	—
FDOd			—	X
3-hydroxyphenylacetate		42		
FOS			—	—
FDOd			—	X
P-cresol		43		
FOS			—	—
FDOd			—	X
Tyrosine		44		
FOS			X	X
FDOd			X	X
5-aminosalicylate		45		
FOS			—	—
FDOd			X	X
Phenylalanine		46		
FOS			—	—
FDOd			X	X
Uracil		47		
FOS			—	—
FDOd			X	X
N-acetyl-5-aminosalicylate		48		
FOS			X	X
FDOd			X	X
Phenylacetate		49		
FOS			X	X
FDOd			X	X
Tryptophan		50		
FOS			X	X
FDOd			X	X
Hypoxanthine		51		
FOS			—	—
FDOd			X	X
Formic acid		52		
FOS			X	X
FDOd			X	X
Caprylate		53		
FOS			X	X

FDOd			X	X
	Isocaproate	54		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Isovalerate	55		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	3-hydroxyisovalerate	56		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Total lipids	57		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Gamma-aminobutyric acid (GABA)	58		
FOS			—	—
FDOd			X	X
	Ketoisovalerate	59		
FOS			X	X
FDOd			X	X
	Acetona	60		
FOS			—	—
FDOd			X	X

Media with freeze-dried *Opuntia dillenii* cladodes (FDOd), fructooligosaccharides (FOS), and NC (no added fermentable substrate).

ANEXOS

ANEXO A – Exsicata da Palma *Opuntia dillenii* (Ker Gawl). Haw.



ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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



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: FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO ESTADO DA PARAÍBA - 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: JOÃO 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. (xique-xique), *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:** JOÃO 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/UEPB**



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 Apreciação 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