

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

**FRANCISCA NAYARA DANTAS DUARTE MENEZES**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUBPRODUTO DO  
PROCESSAMENTO DO PEDÚNCULO DO CAJU (*Anacardium occidentale* L.)  
FRENTE À *Lactobacillus* spp.**

**JOÃO PESSOA-PB**

**2016**

**FRANCISCA NAYARA DANTAS DUARTE MENEZES**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUBPRODUTO DO  
PROCESSAMENTO DO PEDÚNCULO DO CAJU (*Anacardium occidentale* L.)  
FRENTE À *Lactobacillus* spp.**

**JOÃO PESSOA-PB**

**2016**

**FRANCISCA NAYARA DANTAS DUARTE MENEZES**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUBPRODUTO DO  
PROCESSAMENTO DO PEDÚNCULO DO CAJU (*Anacardium occidentale* L.)  
FRENTE À *Lactobacillus* spp.**

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

Área de concentração: Ciências da Nutrição.

Linha de Pesquisa: Análise e Controle de Qualidade em Alimentos.

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

**CO-ORIENTADORA:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Jailane de Souza Aquino

**JOÃO PESSOA-PB**

**2016**

M543a Menezes, Francisca Nayara Dantas Duarte.  
Avaliação *in vitro* do potencial prebiótico do subproduto do processamento do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.) frente à *Lactobacillus* spp. / Francisca Nayara Dantas Duarte Menezes.- João Pessoa, 2016.  
68f. : il.  
Orientador: Evandro Leite de Souza  
Coorientadora: Jailane de Souza Aquino  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS  
1. Nutrição. 2. Análise e controle - qualidade de alimentos.  
3. Subprodutos agroindustriais. 4. Caju. 5. Prebiótico.  
6. *Lactobacillus*.

UFPB/BC

CDU: 612.39(043)

**FRANCISCA NAYARA DANTAS DUARTE MENEZES**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL PREBIÓTICO DO SUBPRODUTO DO  
PROCESSAMENTO DO PEDÚNCULO DO CAJU (*Anacardium occidentale* L.)  
FRENTE À *Lactobacillus* spp.**

**Dissertação aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Evandro Leite de Souza – DN/CCS/UFPB**  
**Coordenador da Banca Examinadora**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Marciane Magnani - DEA/CCT/UFPB**  
**Examinadora Interna**

---

**Prof. Dr. Ismael Ivan Rockenbach – DTA/CTDR/UFPB**  
**Examinador Externo**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Lúcia Raquel Ramos Berguer - DN/CCS/UFPB**  
**Examinadora Suplente Interna**

---

**Prof. Dr. Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira – CCS/UFPB**  
**Examinador Suplente Externo**

À minha mãe Maria do Socorro Dantas Duarte (*in  
memorian*), que sempre me apoiou e desejou as  
minhas vitórias. E apesar da ausência física, sua  
presença sempre será constante nos meus dias.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pelas bênçãos concedidas, por sempre ter me guiado e ajudado em todos os momentos da minha caminhada. Sem a sua ajuda eu jamais teria conseguido.

A minha família, peça fundamental em minha vida. Meu pai Nelson Duarte Pinheiro e minha estrelinha do céu, Maria do Socorro Dantas Duarte (*in memorian*), pelo amor e incentivo que sempre me deram em todos os momentos da minha vida.

A minha querida irmã Nayana Duarte (filhinha), por estar sempre do meu lado, me apoiando e me alegrando com sua alegria contagiante.

Ao meu esposo/amigo/companheiro Wesley Menezes, por todo amor, carinho, apoio, dedicação e compreensão em todos os momentos que precisei.

A minha tia linda Rose Estrela (titia), que apesar da distância, sempre se faz presente em minha vida, orando por mim e desejando as minhas vitórias.

Aos meus familiares que residem na minha querida São João do Rio do Peixe, pelo apoio e compreensão diante dos meus momentos de ausência.

Ao professor Dr. Evandro Leite de Souza e à professora Dra. Jailane de Souza Aquino, pela oportunidade concedida e por todos os ensinamentos ao longo de todo processo de orientação. Agradeço a Deus por ter colocado grandes mestres no meu caminho. A vocês serei eternamente grata.

A querida e doce professora Maria Lúcia da Conceição, pelo carinho, acolhimento e todos os ensinamentos no laboratório.

A minha amiga e companheira de laboratório Digian Arruda, que pacientemente me ensinou e me ajudou nos momentos mais difíceis, principalmente quando tínhamos que montar placas.

A querida Raquel Berguer, pelo exemplo de pessoa humilde, competente e inteligente.

A querida Jéssica Rodrigues, peça fundamental na composição desse trabalho. Obrigada pelo apoio, atenção e paciência!

Às companhias do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, em especial todas as doutorandas que tanto me ajudaram: Estefânia, Kataryne e Jossana. A querida Janaína e todos os alunos da iniciação científica que sempre estiveram dispostos a me ajudar quando precisei.

Às amigas que tive a sorte de conhecer no mestrado: Celina, Laênia, Tayanna, Sonalle e Valdenice. Companhias essenciais que levarei para sempre em meu coração!

A nutricionista Lorena Oliveira e toda equipe da empresa Pé de Fruta, que gentilmente nos forneceu a matéria-prima essencial para esse trabalho.

Ao professor Dr. Marcos dos Santos Lima, do Instituto Federal do Sertão de Pernambuco em Petrolina-PE, pela condução das análises de cromatografia. E a professora do ITAL Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco, por todo apoio nas análises dos resíduos.

A professora Dra. Marciane Magnani e o professor Dr. Ismael Rockenbach, por terem aceitado o convite em participar da banca e por suas contribuições no trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição/UFPB pela oportunidade e atenção no decorrer do curso.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Enfim, muitas são as pessoas e eternos serão os agradecimentos a todos, que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Muito obrigada!



Há para todas as coisas, um tempo determinado por Deus.

(Ecle. 3:1)

## RESUMO

O caju (*Anacardium occidentale* L.) é uma fruta tropical, amplamente difundida e valorizada, tanto por suas características nutricionais quanto pelos seus atributos sensoriais. O principal subproduto gerado do caju decorre do processamento do seu pedúnculo (pseudofruto), representando até 20% do peso total do pseudofruto. Com base nesse contexto, esse estudo teve por objetivo avaliar *in vitro* os efeitos prebióticos de um pó liofilizado obtido a partir do subproduto do pedúnculo do caju (denominado CAP) frente a diferentes cepas probióticas de *Lactobacillus*, a citar: *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 e *L. paracasei* L-10. O crescimento e o número de células viáveis das cepas de *Lactobacillus* foram monitorados em caldo de Mann, Rogosa e Sharpe (MRS), contendo o CAP (20 g/L), glicose (20 g/L) e fruto-oligossacarídeos - FOS (20 g/L), durante um período de 48 h. Também foram avaliados alguns parâmetros relacionados à atividade metabólica das cepas probióticas ensaiadas quando cultivadas nos diferentes meios de cultura, como os valores de pH, produção de ácidos orgânicos e o consumo de açúcares. Para cada cepa de *Lactobacillus* ensaiada, foram observadas contagem similares de células viáveis nos diferentes meios de cultivo, sendo alcançadas contagens entre 8.5 – 9.0 log UFC/mL e valores de pH em torno de 4.0, ao final do cultivo de 48 h. O cultivo de todas as cepas de lactobacilos em MRS contendo glicose, FOS ou CAP resultou em decréscimos de pH, produção de ácidos orgânicos (acético, cítrico, málico, fórmico e láctico) e consumo de açúcares (glicose, frutose e maltose) ao longo do tempo de incubação avaliado, indicando intensa atividade metabólica bacteriana. Em geral, todas as cepas de lactobacilos testadas apresentaram capacidade semelhante para fermentar FOS e CAP, embora algumas diferenças quantitativas relacionadas com a produção de ácidos orgânicos e consumo de açúcares tenham sido detectadas. Os resultados deste estudo mostraram que o CAP possui potencial prebiótico frente a cepas de *Lactobacillus*. Estes resultados podem estimular o setor agro-industrial para valorizar os subprodutos do processamento do pedúnculo do caju como um ingrediente com valor agregado para a indústria de alimentos.

Palavras-chave: Subprodutos Agroindustriais. Caju. Prebiótico. *Lactobacillus*.

## ABSTRACT

The cashew (*Anacardium occidentale* L.) is a tropical, popular and well accepted fruit, due its nutritional characteristics and sensory attributes. The processing of the cashew pseudo-fruit (also called peduncle) generates the main byproduct which represent up to 20% of the total weight of the pseudo-fruit. In the last years, studies verifying the prebiotic potential of the byproducts from the processing of the cashew peduncle are scarce or nonexistent. In this context, the present study aimed to evaluate *in vitro* the prebiotic effects of a lyophilized powder obtained from the byproduct of the cashew peduncle (named CAP) against different probiotic strains of *Lactobacillus*, such as: *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 and *L. paracasei* L-10. The growth and viable cell numbers of the *Lactobacillus* strains were monitored in Mann, Rogosa and Sharpe (MRS) broth containing CAP (20 g/L), glucose (20 g/L) and fructooligosaccharides – FOS (20 g/L), during 48 h. Some parameters related to the metabolic activity of the probiotic strains, cultivated in these different culture media, were evaluated, such as pH, production of organic acids and consumption of sugars. Similar viable cell count for each tested *Lactobacillus* strain in the different culture media were observed, count reached 8.5 - 9.0 log CFU/mL and pH values at approximately 4.0 after 48 h of cultivation. The growth of these *Lactobacillus* strains in MRS broth containing glucose, FOS or CAP resulted in a decrease of pH, production of organic acids (acetic, citric, malic, formic and lactic) and consumption of sugars (glucose, fructose and maltose) during the incubation time, indicating an intense bacterial metabolic activity. Overall, the tested *Lactobacillus* strains showed similar capability to ferment the FOS and the CAP, although some differences related to the production of organic acids and consumption of sugars were detected. The results showed that the CAP possesses a prebiotic potential effect toward *Lactobacillus* strains. These findings may stimulate the agro-industrial sector to valorize the byproducts from the cashew pseudo-fruit processing as an added-value ingredient to the food industry.

Keywords: Agro-industrial Byproducts. Cashew. Prebiotic. Lactobacilli.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figure Captions

**Fig. 1.** Growth curves, measured by absorbance, for *L. acidophilus* LA-05 (A), *L. casei* L-26 (B) and *L. paracasei* L-10 (C) cultivated in MRS containing glucose 2 g/100mL (○), FOS 2 g/100 mL (□), cashew apple byproduct powder (CAP) 2 g/100 mL (▲), CAP 3 g/100 mL (▼) and without carbon source (◇), during 48h of incubation at 37 °C. 64

**Fig. 2.** Viable cell counts for *L. acidophilus* LA-05 (A), *L. casei* L-26 (B) and *L. paracasei* L-10 (C) cultivated in MRS containing with glucose 2 g/100mL (○), MRS broth containing FOS 2 g/100 mL (□), and MRS broth containing cashew apple byproduct powder (CAP) 2 g/100 mL (▲), during 48 h of incubation at 37 °C. 65

**Fig. 3.** Contents (g/L) of citric, lactic, acetic and malic acid in MRS broth containing glucose 2 g/100mL (black barrs), FOS 2 g/100 mL (gray barrs) and freeze-dried cashew apple byproduct powder (CAP) 2 g/100 mL (white barrs), inoculated with *L. acidophilus* LA-05 (A - D), *L. casei* L-26 (F - H) or *L. paracasei* L-10 (I - L), during 48 h at 37 °C. 66

**Fig. 4.** Contents (g/L) of glucose, fructose and maltose in MRS broth containing glucose 2 g/100mL (black barrs), FOS 2 g/100 mL (gray barrs) and cashew apple byproduct powder (CAP) 2 g/100 mL (white barrs), inoculated with *L. acidophilus* LA-05 (A - C), *L. casei* L-26 (D - F) or *L. paracasei* L-10 (G - I), during 48 h at 37 °C. 67

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Estudos realizados com subprodutos do processamento de frutas tropicais. 18

### Artigo:

**Table 1.** Average values n:3 ( $\pm$  standard deviation), of physicochemical parameters of cashew (*Anacardium occidentale* L.) apple byproduct powder used in assays of prebiotic properties.

63

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1 PROCESSAMENTO DE FRUTOS E GERAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS.....	16
<b>2.1.1 Caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.): produção e processamento.....</b>	<b>17</b>
2.2 MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS.....	19
<b>2.2.1 <i>Lactobacillus</i>.....</b>	<b>21</b>
2.3 COMPONENTES PREBIÓTICOS.....	22
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO SUBPRODUTO DO CAJU ( <i>Anacardium occidentale</i> L.) (CAP).....	26
3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	26
<b>3.2.1 Determinação dos açúcares e ácidos orgânicos do CAP.....</b>	<b>27</b>
3.3 ENSAIOS DA ATIVIDADE PREBIÓTICA.....	28
<b>3.3.1 Micro-organismos e preparação do inóculo.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.2 Meio de cultura e condições de crescimento.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.3 Monitoramento do crescimento bacteriano.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.4 Avaliação da viabilidade celular bacteriana.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.5 Parâmetros da atividade metabólica dos probióticos.....</b>	<b>30</b>
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	30
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>40</b>
<b>ARTIGO.....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O caju (*Anacardium occidentale* L.) caracteriza-se como fruto tropical, amplamente difundido e valorizado, tanto por suas características nutricionais quanto pelos seus atributos sensoriais. Este fruto é cultivado em diversos países, sendo Brasil, Índia, Vietnã e Nigéria os principais centros da cultura (HONORATO; RODRIGUES, 2010; ABREU et al., 2013). A castanha de caju (fruto verdadeiro) corresponde a 10% do peso total do fruto, e durante a colheita é separada do pseudofruto, que por sua vez, é destinado ao processamento, para a elaboração de diversos produtos, tais como sucos, polpas e geleias (ATTRI, 2009).

Atualmente, apenas 6% da produção do pedúnculo do caju é explorada comercialmente, de modo que o restante da produção se deteriora e, assim, é desperdiçada (TALASILA; SHAIK, 2015). Neste caso, o processamento do pedúnculo colabora com o aumento da vida de prateleira, além de facilitar o transporte e agregar valor ao produto. Entretanto, o processamento do pedúnculo do caju também contribui para o acúmulo de uma substancial quantidade de subprodutos, composto principalmente por casca e polpa triturada, o qual possui cor amarelo escuro, de aspecto fibroso e odor adstringente, especificamente devido à presença de taninos (PINHO et al., 2011). Devido a falta de infra-estrutura adequada para lidar com a grande quantidade de biomassa gerada, esses subprodutos são, muitas vezes, descartados no ambiente sem qualquer uso comercial (BABBAR et al., 2011). Cabe ressaltar que, a agregação de valor a subprodutos do processamento de frutas é reconhecida como uma demanda de interesse econômico e ambiental, necessitando de investigação científica e tecnológica, que possibilite sua utilização de forma eficiente, segura e economicamente viável (SCHIEBER; STINTZING; CARLE, 2001).

Nos últimos anos, uma considerável ênfase tem sido dada ao estudo de componentes bioativos naturalmente presentes em alimentos, incluindo-se os probióticos e prebióticos (CORRADINI; LANTANO; CAVAZZA, 2013). Os probióticos constituem-se de um grupo de micro-organismos que, por meio de mecanismos de imunomodulação, conferem benefícios à saúde. Entre esses micro-organismos, encontram-se espécies do gênero *Lactobacillus*, que, juntamente com outras espécies probióticas, são capazes de fermentar seletivamente ingredientes prebióticos, permitindo assim alterações específicas, na composição e na atividade da microbiota do trato gastrointestinal (GIBSON et al., 2004; AURELLI et al., 2011; AL-SHERAJI et al., 2013). Os prebióticos caracterizam-se como componentes capazes de modular o crescimento de micro-organismos probióticos, e influenciar positivamente os seus efeitos sobre o organismo hospedeiro. Neste grupo de componentes, encontram-se os

fruto-oligossacarídeos, os quais estão presentes em uma variedade de frutos. O alto teor de carboidratos fermentáveis presentes nos frutos os torna uma potencial fonte de componentes com propriedades prebióticas (GULLÓN et al., 2014).

Neste contexto, considerando as elevadas taxas de produção de subprodutos agroindustriais gerados a partir do processamento do pedúnculo do caju, vê-se a necessidade de realização de estudos que avaliem o potencial de valor agregado destes subprodutos. Considerando estes aspectos, o presente estudo teve por objetivo avaliar *in vitro* o potencial prebiótico de subprodutos do pedúnculo do caju gerados durante o processamento da polpa de frutas. Para tanto, foram determinadas as características físico-químicas do subproduto estudado, bem como a capacidade de cepas de *Lactobacillus* com reconhecido potencial probiótico em utilizar estes subprodutos como fonte de carbono. Os efeitos do subproduto sobre a atividade metabólica bacteriana relacionada ao consumo de açúcares e produção de ácidos orgânicos também foram estudados.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PROCESSAMENTO DE FRUTOS E GERAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

O consumo de frutas tropicais tem aumentado no mercado nacional e internacional devido ao crescente reconhecimento de seu valor nutricional e terapêutico. O Brasil possui um grande número de espécies frutíferas nativas e exóticas sub-exploradas de interesse potencial para a agroindústria, sendo uma possível fonte de renda para populações locais (ABREU et al., 2013; ASYIFAH et al., 2014).

Ultrapassando países como Estados Unidos, Itália e Espanha, e aparecendo com menor produção somente em relação à China e Índia, o Brasil é considerado o terceiro maior produtor de frutas do mundo, com uma produção que supera 41 milhões de toneladas (GONZALEZ-AGUIAR et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2015). No Brasil, grande parte dos frutos produzidos é destinada ao processamento, tendo em vista sua alta perecibilidade. Do total de frutas produzidas no Brasil, 47% é consumido *in natura*, e apenas 2% deste percentual são direcionados para exportação, sendo o restante destinado para a agroindústria, do qual a maior parte é transformada em suco concentrado e congelado com destino para o mercado externo (AYALA-ZAVALA et al., 2011; INFANTE et al., 2013).

A alta perecibilidade dos frutos tropicais dificulta sua comercialização na forma *in natura* a grandes distâncias. Estima-se que, nas áreas tropicais e subtropicais, as perdas pós-colheita de frutos e hortaliças variam entre 15 e 50%, principalmente por manuseio e preservação inadequados (SILVA et al., 2014). A transformação de frutos em produtos processados possibilita absorver grande parte da colheita, favorecendo o consumo de produtos derivados durante o ano todo e a redução do desperdício das matérias-primas (CAETANO; DAIUTO; VIEITES, 2012). Diversos frutos tropicais brasileiros comestíveis são destinadas ao processamento, tornando-se produtos como sucos, polpas, néctares e extratos. Nestes processos, sementes, cascas e outras partes são rotineiramente descartadas, favorecendo o acúmulo desse material no meio ambiente (OLIVEIRA et al., 2009; GORINSTEIN et al., 2011). Nesse contexto, o aproveitamento de subprodutos agroindustriais torna-se essencial devido à busca pela redução de seus potenciais impactos ambientais e geração de possíveis aplicações que agregem valor a tais produtos (INFANTE et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2015).

Geralmente, os subprodutos gerados durante o processamento de frutos caracterizam-se pela grande quantidade de substâncias bioativas de interesse para a indústria (SANCHO et al., 2015). Os subprodutos do processamento dos frutos se constituem de cascas, sementes e bagaço, gerados por diferentes etapas na indústria de processamento (AJILA; BHAT; RAO, 2007; AYALA-ZAVALA et al., 2011). De acordo com Martins e Farias (2002), calcula-se que do total de frutos processados sejam gerados, na produção de sucos e polpas, entre 30 a 40% de subprodutos agroindustriais, porém, na maioria das fábricas esses subprodutos são desperdiçados ou não possuem um destino específico. Entretanto, a identificação e quantificação de nutrientes essenciais em subprodutos gerados no processamento de frutas tropicais são de extrema importância para subsidiar potenciais estudos no campo científico (ROSSO, 2013; SILVA et al., 2014). Assim, alguns estudos já foram realizados com subprodutos do processamento de frutos tropicais com ênfase na identificação de componentes com propriedades bioativas e/ou no seu aproveitamento industrial, como apresentado na Tabela 1.

Nesse contexto, o processamento de frutas contribui como forma de ampliar suas possibilidades de utilização, com a elaboração de produtos derivados. Porém, a busca por melhores alternativas de aproveitamento de frutas tem levado à produção demasiada de subprodutos agroindustriais ainda pouco explorados ou subutilizados. Em virtude deste cenário, faz-se necessária a realização de novos estudos que comprovem as diversas possibilidades de utilização desses subprodutos.

### **2.1.1 Caju (*Anacardium occidentale* L.): produção e processamento**

O caju é um fruto tropical originalmente do Brasil, onde é amplamente cultivada, explorada e comercializada (ABREU et al., 2013). Seu cultivo está relacionado ao alto valor nutricional da sua castanha e seu pseudofruto, caracterizado por apresentar alto teor de vitamina C e fibras (CARR, 2014). Atualmente, o Nordeste brasileiro é o maior produtor de caju, sendo este o responsável por grande parte do agronegócio da região (PINHO et al., 2011).

Encontrado nas cores amarelo, laranja e vermelho, sempre com a polpa de cor amarelo pálido, o caju caracteriza-se por ser um fruto não-climatérico, pesando cerca de 75-80g, com 6-10 cm de comprimento (GARRUTI et al., 2003; TALASIL; SHAIK, 2015). O pedúnculo do caju possui formas arredondadas e alongadas em formato de pêra, de casca

macia, conteúdo carnudo e fibroso, com alto teor de açúcares, ausência de sementes e sabor forte e exótico (FIGUEIREDO et al., 2002).

Tabela 1: Estudos realizados com subprodutos do processamento de frutas tropicais.

<b>Material analisado</b>	<b>Principais Resultados</b>	<b>Referência</b>
Subprodutos do processamento de acerola, caju, goiaba, manga, mamão, abacaxi, e sapoti.	Quantificação de antocioninas, fenólicos, vitamina C, ácidos graxos insaturados, manganês e fósforo.	SANCHO et al., 2015
Subproduto do processamento da maçã	Presença de compostos com ação antioxidante após o processo de digestão gastrointestinal simulada.	GULLÓN et al., 2015
Subproduto do processamento do caju	Avaliação do uso do hidrolisado do subproduto do caju para produção biotecnológica de xilitol.	ALBUQUERQUE et al., 2015
Subproduto do processamento de abacaxi, acerola, caju, goiaba, graviola, mamão, manga, maracujá, pitanga, sapoti, e tamarindo.	Quantificação dos níveis de resveratrol, fenólicos totais, antocioninas, beta-caroteno e licopeno.	SILVA et al., 2014
Subproduto do processamento do caju	Extração e identificação de carotenóides totais.	ABREU et al., 2013
Subproduto do abacaxi, maracujá, caju e manga	Avaliação da atividade antioxidante e identificação de compostos fenólicos	INFANTE et al., 2013
Subproduto do processamento do caju	Quantificação de lipídeos e teor de fibra dietética em hambúrgueres elaborados com suproduto do pedúnculo do caju.	PINHO et al., 2011
Subproduto do processamento de acerola, goiaba, abacaxi, cupuaçu, bacuri e graviola	Quantificação de compostos fenólicos e avaliação da capacidade antioxidante.	SOUSA; VIEIRA, 2011
Subproduto do processamento de acerola, maracujá e abacaxi	Quantificação de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante.	OLIVEIRA et al., 2009

Além disso, o caju é bastante utilizado como matéria-prima para a fabricação de diversos produtos alimentícios (MATIAS et al., 2005; FELIPE et al., 2006). Entretanto, a diversidade de produtos industrializados derivados do pedúnculo do caju, favorece a geração de uma grande quantidade de subprodutos agroindustriais. Na produção de suco e polpas,

cerca de 40% do peso do fruto é descartado na forma de subprodutos agroindustriais, sendo que tal fato também ocorre na maioria das frutas tropicais processadas, como manga, acerola e maracujá (INFANTE et al., 2013; ANDRADE et al., 2015). Vale salientar ainda que cerca de 1,8 milhões de toneladas de caju são processadas anualmente para se obter a castanha e mais de 80% dos pedúnculos (pseudofruto) são descartados após a remoção da amêndoa (ABREU et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2015; TALASIL; SHAIK, 2015).

Com base nessas informações, vê-se a necessidade de estudos que explorem a utilização desses subprodutos, e que avaliem métodos e técnicas que garantam sua utilização como matriz para obtenção de compostos de interesse para a indústria.

## 2.2 MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS

Os probióticos foram descritos pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965), sendo definidos como “*micro-organismos vivos não patogênicos, seletivos, incluindo alguns presentes na flora bacteriana, que têm efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro, além de prevenir e tratar doenças*”. A definição internacional da FAO/OMS, criada por um grupo de peritos convocados em 2001, define os probióticos como “*micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro*” (FAO/WHO, 2002). Atualmente, diversos probióticos têm sido extensivamente estudados em humanos e animais (LIU et al., 2014). Dentre estes, encontram-se bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e, em menor escala, *Enterococcus*, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, bem como *E. coli* e *Bacillus* spp. A influência desses micro-organismos sobre a microbiota intestinal humana envolve fatores como a competição exclusiva contra patógenos e micro-organismos indesejáveis, efeitos antagônicos e imunológicos, resultando no aumento da resistência corporal do indivíduo (CHARALAMPOPOULOS et al., 2002; SAAD, 2006). Existe a possibilidade, portanto, que o aumento da população de bactérias benéficas no intestino grosso pode, juntamente com outros fatores, como o estado imunológico, oferecer maior proteção ao hospedeiro (AL-SHERAJI et al., 2013).

Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando, os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002). Dados experimentais indicam que diversos probióticos são capazes de modular algumas características da fisiologia digestiva, como a imunidade da mucosa e a

permeabilidade intestinal (FIORAMONTI; THEODOROU; BUENO, 2003; BLAUT; CLAVEL, 2007). De acordo com Webb (2011), para exercer benefícios para a saúde, os probióticos devem ser capazes de sobreviver à passagem através do estômago e colonizar o cólon. Neste caso, dois dos principais obstáculos para a sobrevivência dos probióticos são o baixo pH do estômago e as altas concentrações de ácidos biliares no cólon. Em virtude da redução do pH, o crescimento de certas bactérias patogênicas é comprometido, havendo então um fortalecimento do desenvolvimento de bifidobactérias e de bactérias ácido-láticas (SERBAN, 2011; XU et al., 2016).

Cabe ressaltar que, embora ainda não sejam conhecidas às espécies de bactérias que estão envolvidas na manutenção de um ambiente intestinal saudável, é geralmente aceito que os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* desempenham um papel significativo, e que o aumento das suas concentrações pode ser benéfico para a saúde do hospedeiro (TUOHY et al., 2003; GIBSON et al., 2004). Entre os principais benefícios atribuídos ao consumo regular de culturas probióticas destacam-se: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos por meio da produção de ácidos acético e láctico, bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais; e produção de vitaminas (KAUR; CHOPRA; SAINI, 2003; TUOHY et al., 2003; SAAD, 2006; SAAD et al., 2012).

De acordo com Oelschlaeger (2010), os efeitos dos micro-organismos probióticos podem ser classificados em três modos de ação: i) podem ser capazes de modular as defesas do hospedeiro, isto é, atuar na prevenção e terapia de doenças infecciosas, mas também para o tratamento de inflamação (crônica) do trato digestivo, ou partes dele; ii) podem também exercer efeito direto sobre outros micro-organismos comensais e/ou patogênicos; este princípio é, em muitos casos, de importância para a prevenção e tratamento de infecções e restauração do equilíbrio microbiano no intestino; e iii) podem basear-se em ações que afetam produtos microbianos, como toxinas.

A compreensão dos mecanismos de ação das estirpes bacterianas que atuam como probióticos favorece a condução de estratégias para uma terapia nutricional personalizada, visando à melhoria de sintomas específicos de determinadas patologias, contribuindo assim para a restauração do funcionamento do intestino (BINNS; LEE, 2010; SAEZ-LARA et al., 2015; XU et al., 2016). Atualmente, os produtos lácteos são considerados os sistemas alimentares ideais para a veiculação de micro-organismos probióticos, haja vista que

contribuem para a manutenção da viabilidade do micro-organismo ao longo do trato gastrointestinal. Alguns autores sugerem que para proporcionar benefícios à saúde, o micro-organismo probiótico deve conter no mínimo  $10^6$ - $10^7$  UFC por g ou mL de células viáveis em produtos alimentícios (GEBARA et al., 2015). A legislação brasileira preconiza que determinado produto com alegações probióticas deve conter uma recomendação diária do produto pronto para consumo entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC por g ou mL (BRASIL, 2008).

Estudos que envolvem as espécies bacterianas com ação probiótica referem que é possível aumentar a quantidade de micro-organismos promotores da saúde através da introdução de micro-organismos probióticos na dieta ou através da combinação de probióticos e prebióticos, resultando assim em um melhor desempenho da microbiota intestinal, e consequentemente favorecendo ao hospedeiro (AURELI et al., 2011; AL-SHERAJI et al., 2013; GULLÓN et al., 2014).

### 2.2.1 *Lactobacillus*

*Lactobacillus* são caracterizados como bacilos Gram-positivos, regulares e não esporulados, anaeróbios facultativos e fermentativos, sendo identificados pela primeira vez em 1900 a partir de fezes de lactentes amamentados com leite materno. Possuem morfologia celular variando de bacilos longos e finos até, algumas vezes, de bacilos curvados e pequenos. O ácido láctico é o principal produto do metabolismo dos *Lactobacillus* durante a fermentação da glicose. No entanto, os ácidos acético e succínico são igualmente produzidos, mas apenas em pequenas quantidades (KONONEN; WADE, 2007).

Existem mais de 50 espécies de *Lactobacillus* reconhecidas, sendo que se destacam as espécies *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. brevis*. As condições ótimas para o crescimento destes micro-organismos são temperatura entre 35 a 40 °C e pH de 5,5 - 6,0. Alguns membros desse gênero são naturalmente residentes em partes do trato gastrointestinal, cavidade vaginal e oral em humanos e animais (FOOKS; FULLER; GIBSON, 1999).

Existe ainda uma divisão clássica de lactobacilos baseando-se nas suas características fermentativas, classificando-os como: homofermentativos; facultativamente heterofermentativos e obrigatoriamente heterofermentativos (AXELSSON, 2004). Os lactobacilos obrigatoriamente homofermentativos incluem aqueles que fermentam glicose exclusivamente em ácido láctico e não fermentam pentoses ou gliconato, e nesse grupo encontra-se *L. acididophilus*, entre outras espécies. Os obrigatoriamente heterofermentativos

incluem os *Lactobacillus* que fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, sendo que a produção de gás a partir da glicose é uma característica marcante dessas bactérias. O último grupo, os facultativamente heterofermentativos incluem lactobacilos que fermentam hexoses em ácido-lático e podem produzir gás a partir de gliconato, mas não através da glicose. Esses microrganismos também fermentam pentoses, através de uma fosfoacetolase induzida para produzir ácidos láctico e acético, sendo que nesse grupo encontra-se a espécie *L. casei* (HOLZAPFEL et al., 2001; VÁSQUEZ et al., 2005; AXELSSON, 2004).

Entre mais de 400 espécies de bactérias presentes no intestino dos adultos, os *Lactobacillus* são considerados os mais benéficos para a saúde humana (GIBSON, 1998). Os membros deste gênero podem contribuir para a digestão, absorção de nutrientes, prevenção de colonização por patógenos e estimulação da resposta imune em seres humanos (GOPAI; SULLIVAN; SMART, 2001; CIZEIKIENE et al., 2013). Outros fatores benéficos estão associados às espécies do gênero lactobacilos, haja vista que podem auxiliar na digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse nutriente, redução da constipação infantil e diarreia, auxiliar na resistência à proliferação e translocação de micro-organismos patogênicos, prevenção de diarreia e alívio da síndrome do intestino irritável (MANNING; GIBSON, 2004).

Assim como bifidobactérias, lactobacilos estão entre os probióticos de importância para a indústria de alimentos, sendo utilizados, principalmente, como suplementos alimentares na fabricação de diversos produtos (HERBEL et al., 2013). Devido a isso, possuem importante valor comercial para a indústria alimentícia, e sua utilização está relacionada à produção de leites fermentados e como culturas iniciadoras de fermentação na produção de diferentes produtos lácteos (SAAD, 2006). Diante disso, é importante destacar também que os benefícios probióticos referentes ao uso de lactobacilos em alimentos dependem fortemente da sua viabilidade.

### 2.3 COMPONENTES PREBIÓTICOS

Os prebióticos são carboidratos não digeríveis, que proporcionam fonte de carbono fermentável para o crescimento de organismos probióticos no intestino. Estes oligossacarídeos suportam o crescimento da microflora probiótica e suprimem a proliferação de micro-organismos prejudiciais (SREENIVAS; LELE, 2013). Atualmente, os prebióticos são definidos como "um ingrediente seletivamente fermentado que permite mudanças específicas

na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal conferindo benefícios sobre o bem-estar e saúde" (GIBSON et al., 2004; ROBERFROID et al., 2010).

Os prebióticos identificados atualmente são carboidratos não digeríveis, incluindo a lactulose, inulina e diversos oligossacarídeos que fornecem carboidratos fermentáveis pelas bactérias benéficas do cólon (SAAD, 2006), podendo ser encontrados em fontes naturais como vegetais, raízes, frutas, leite e mel (SCOURBOUTAKOS, 2010).

De acordo com Wang (2009), não é o prebiótico, por si só, mas sim as mudanças induzidas na composição da microbiota que são responsáveis pelos efeitos saudáveis, tendo em vista que esses efeitos estão relacionados com o crescimento limitado de micro-organismos, provocando uma mudança seletiva na microflora intestinal (principalmente do cólon). Torna-se importante enfatizar que a definição de prebióticos se sobrepõe de forma significativa com a definição de fibra dietética; com a exceção da sua seletividade para os vários gêneros ou espécies de bactérias endógenas (AL-SHERAJI et al., 2013).

Os prebióticos passam pelo intestino delgado para o cólon e ficam acessíveis para bactérias probióticas para serem utilizados por outras bactérias intestinais. Em outras palavras, os prebióticos são substratos que só podem ser consumidos por um pequeno número de bactérias, motivando o crescimento probiótico devido a sua estrutura química. Dentre os grupos de bactérias presentes no trato gastrointestinal, as bifidobactérias e lactobacilos são os que mais utilizam oligossacarídeos e são considerados micro-organismos capazes de influenciar benéficamente a saúde do hospedeiro (BIELECKA et al., 2002).

A fermentação de polímeros complexos, tais como polissacarídeos e proteínas, no colón, necessita da ação de diferentes grupos de micro-organismos. Os principais produtos de fermentação bacteriana no cólon são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que exercem uma série de efeitos saudáveis, incluindo o alívio da constipação, redução do nível de glicose no sangue, melhoria da absorção de minerais, regulação do metabolismo dos lipídeos, diminuição da incidência de câncer do cólon e a modulação do sistema imunitário. Outros efeitos benéficos causados por prebióticos incluem a inibição de bactérias patogênicas e o "efeito de barreira", que limita o número de locais de adesão disponíveis no intestino (GIBSON; ROBERFROID, 1995; ROBERFROID et al., 2010; GULLÓN et al., 2014).

Diversos prebióticos pertencem ao grupo de oligossacarídeos não digeríveis, que resistem à digestão e absorção no intestino delgado, e são fermentados no cólon. Nesse grupo encontra-se a lactulose, galactose, fruto-oligossacarídeos, inulina e seus hidrolisados, malto-oligossacarídeos e amido resistente, que são os prebióticos normalmente utilizados na dieta humana. Os componentes essenciais finais do metabolismo desses hidratos de carbono são os



ácidos graxos de cadeia curta, em particular o ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, que são usados pelo organismo hospedeiro como uma fonte de energia (AL-SHERAJI et al., 2013).

Os frutanos são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado humano, e conseguem atingir o cólon, onde são seletivamente fermentados por bactérias benéficas, tais como bifidobactérias e lactobacilos (RUBEL et al., 2014). Os galactooligossacarídeos (GOS), fruto-oligossacarídeos (FOS) e inulina são os prebióticos mais comumente conhecidos. A lactulose é um conhecido dissacarídeo com excelente atividade prebiótica, sendo principalmente consumido pelas bactérias do cólon proximal (TUOHY et al., 2003). Os GOS são carboidratos não-digeríveis, derivados a partir de lactose, que ocorre naturalmente no leite de mamíferos, e são constituídos por cadeias de monômeros de galactose (ROBERFROID, 2005; ROBERFROID et al., 2010). Muitos destes compostos prebióticos fazem parte de uma dieta comum. No caso dos frutanos, são encontrados em muitos vegetais, incluindo, por exemplo, alho-poró, cebola e alcachofra; enquanto a inulina é comercialmente disponível, sendo produzida a partir da raiz da chicória. Com relação aos GOS, estes ocorrem naturalmente no leite humano, enquanto betaglucanos ocorrem em grãos e cereais (LICHT; EBERSBACH; FRØKIÆR, 2012).

Nos últimos anos, as pesquisas científicas têm concentrado seus esforços na busca de novos ingredientes com potencial prebiótico. Wichienchot, Jatupornpipat e Rastall, (2010), avaliaram oligossacarídeos presentes na pitaya, que foram capazes de fermentar lactobacilos e bifidobactérias. Em estudo realizado por Yang et al., (2011), foram identificadas as propriedades prebióticas de oligossacarídeos presentes em molho de soja, frente à ação de cepas de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. Um estudo realizado por Gullón et al. (2014) detectou efeitos prebióticos causados por um produto refinado contendo oligossacarídeos pectícos que atuaram na promoção do crescimento de bactérias benéficas, causando também aumento das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Guergoletto et al. (2016) avaliaram as propriedades prebióticas da polpa de juçara (*Euterpe edulis*) em processos fermentativos, e identificaram um aumento na população de bifidobactérias, bem como a presença de ácidos orgânicos importantes.

No momento atual, existe uma preocupação no uso de prebióticos como ingredientes de alimentos funcionais com potencial de modulação da composição da microbiota do cólon (LAPARRA; SANZ, 2010). Uma das principais formas pela qual a composição da microbiota intestinal pode ser modificada é por meio de introdução de prebióticos na dieta (GIBSON; ROBERFROID, 1995). No entanto, para que esses carboidratos não digeríveis possam ser

considerados como prebióticos, devem atender alguns critérios, tais como: resistência à acidez gástrica e enzimas digestivas; susceptibilidade à fermentação por bactérias do intestino; e a capacidade de aumentar a viabilidade e/ou atividade de micro-organismos benéficos (RASTALL; GIBSON, 2006).

Os resultados disponíveis na literatura sugerem que os prebióticos estimulam certas bactérias endógenas residentes no intestino, tais como bifidobactérias e lactobacilos, favorecendo o aumento dessa microflora intestinal. Os achados científicos ainda sugerem que uma dieta contendo carboidratos não-digeríveis, que são seletivamente fermentados por bactérias benéficas, favorecem o chamado princípio prebiótico (WICHIENCHOT; JATUPORNPIPAT; RASTALL, 2010; SAAD et al., 2012 LICHT; EBERSBACH; FRØKIER, 2012). De acordo com Gibson et al. (2004), qualquer componente alimentar que atinge o cólon intacto é um prebiótico potencial. Porém, são necessários estudos que comprovem o possível efeito prebiótico de determinados alimentos, tendo em vista o conhecimento de novas fontes alimentares com potencial prebiótico.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa - PB; no Laboratório Experimental de Alimentos (LEA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Petrolina – PE; e no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas – SP.

#### 3.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO SUBPRODUTO DO CAJU (*Anacardium occidentale* L.) – (CAP)

O subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) foi obtido da empresa Pé de Fruta, localizada na cidade de João Pessoa- PB. As amostras foram coletadas de vários lotes do processamento do fruto, totalizando aproximadamente 6 kg. Em seguida, os subprodutos foram colocados assepticamente em sacos estéreis, acondicionados em caixas isotérmicas e transportados sob condições de armazenamento controladas (10 °C) até o Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba, onde foram congelados a uma temperatura de -18 °C. Em seguida, foram submetidos à liofilização a uma temperatura de - 49 °C e 60 mmHG de pressão por aproximadamente 12 h, utilizando liofilizador Modelo L-101, marca LIOTOP (São Carlos-SP, Brasil).

Após liofilização, o material seco foi triturado utilizando um liquidificador doméstico (baixa velocidade, 10 minutos) e peneirado através de um filtro fino para se obter um pó com tamanho médio de partícula < 1,0 mm. O pó (CAP) obtido foi mantido em sacos de prolipropileno estéreis e sob refrigeração até análise posterior.

#### 3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

O subproduto liofilizado foi submetido a análises para determinação da composição centesimal e características físico-químicas, de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2012). Para tanto, foram realizados os seguintes ensaios: determinação da acidez molar por meio de titulação; umidade e extrato seco total por meio de secagem em estufa estabilizada a 105 °C até obtenção de peso constante; teor de cinzas, quantificado por meio de carbonização, seguida de incineração em forno mufla estabilizado a 550 °C; a determinação

de lipídeos foi realizada pelo método de extração à frio (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957); a quantificação do teor de proteína foi realizada pelo método Kjeldahl.

Para determinação dos teores de fibra solúvel e insolúvel, utilizou-se o mesmo método enzimático-gravimétrico com pequenas adaptações nas etapas de precipitação e filtração do processo de determinação da fibra alimentar total (PROSKY et al., 1992; HORWITZ; LATIMER JR; GEORGE, 2005a). Para determinação dos frutanos houve a hidrólise da sacarose e maltossacarídeos de baixo grau de polimerização, em frutose e glicose, utilizando-se enzima específica (sacarase/maltase). Após o ajuste do pH, fez-se a quantificação da glicose e frutose liberada nessa etapa, por meio de leitura da absorbância (340 nm). Na sequência, parte da amostra foi tratada com uma frutanasase purificada com a finalidade de hidrolisar os frutanos em frutose e glicose. A glicose e a frutose presentes na alíquota foram tratadas com a hexoquinase/fosfato-glicose isomerase/glicose 6-fosfato, e, posteriormente, quantificadas pela leitura da absorbância (340 nm) (HORWITZ; LATIMER JR; GEORGE, 2005b).

### **3.2.1 Determinação dos açúcares e ácidos orgânicos do CAP**

Os açúcares e ácidos orgânicos foram determinados simultaneamente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando cromatógrafo AGILENT (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado com bomba quaternária de solventes (modelo G1311C), degaseificador, compartimento de colunas termostaticado (modelo G1316A) e amostrador automático (modelo G1329B), acoplado em Detector de Arranjos de Diodos (DAD) (modelo G1315D) e Detector de Índice de Refração (RID) (modelo G1362A). Os dados obtidos foram processados utilizando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition<sup>TM</sup> (Agilent Technologies). Os padrões de glicose, frutose, ácido fórmico e butírico foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA); maltose e ramnose foram obtidos da Chem Service (West Chester, EUA); os padrões para os ácidos cítrico, acético, láctico e málico foram obtidos da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), todos com um grau de pureza  $\geq 99\%$ . A água ultrapura foi obtida em sistema MilliQ®, e o ácido sulfúrico da Merck (Darmstadt, Alemanha).

O procedimento analítico seguiu recomendações previamente descritas por Ball et al. (2011). Para determinação dos açúcares maltose, glicose, frutose e ramnose, a detecção foi feita no RID. A coluna utilizada foi a Agilent Hi-Plex H (300 x 7,7 mm) com partículas internas de 8,0  $\mu\text{m}$ , protegida com uma coluna de guarda PL Hi-Plex H 5x3 mm (Agilent

Technologies). As temperaturas do forno de colunas e detector foram mantidas em 50 °C. O volume de injeção da amostra (previamente diluída em água ultrapura e filtrada em membrana de 0,45 µm) foi de 10 µL, com fluxo de 0,5 mL/min e tempo de corrida de 20 min. A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,0 mM/L em água ultrapura.

### 3.3 ENSAIOS DA ATIVIDADE PREBIÓTICA

#### 3.3.1 Micro-organismos e preparação do inóculo

Diferentes cepas de *Lactobacillus* com propriedades probióticas foram utilizadas neste estudo, como segue: *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 e *L. paracasei* L-10 (SÁNCHEZ-ZAPATA et al., 2013; SOUZA et al., 2015). Estas cepas foram obtidas da Coleção de Micro-organismos da Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica do Porto (Porto, Portugal). As culturas estoque foram mantidas em caldo de Mann, Rogosa e Sharpe (CMRS; Himedia, Índia) contendo glicerol (15 g/100 mL) a - 20 °C. Para a utilização nos ensaios, cada cepa foi inicialmente cultivada em CMRS a 37 °C durante 20 - 24 h (fase estacionária de crescimento), colhidas por meio de centrifugação (4500 g, 15 min, 4 °C), lavadas duas vezes em solução salina estéril (0,85 g/100 mL) e ressuspensas em solução salina estéril para obter suspensões de células em que a leitura da densidade óptica a 625 nm (DO 625) foi de 0,1. Esta suspensão apresentou contagens de células viáveis de aproximadamente 6 log UFC/mL quando semeadas em ágar MRS (AMRS; Himedia, Índia).

#### 3.3.2 Meio de cultura e condições de crescimento

O CMRS com modificações na sua composição em relação à fonte de carbono foi utilizado como meio basal para avaliar o efeito prebiótico do CAP (SÁNCHEZ-ZAPATA et al., 2013; SOUSA et al., 2015). A composição dos diferentes meios de cultivo foi a seguinte: triptona 10 g/L, extrato de carne 8 g/L, extrato de levedura 4 g/L, fosfato de di-potássio de hidrogênio 2 g/L, Tween 80 1 g/L, acetato de sódio 5 g/L, citrato de amônio tribásico 2 g/L, sulfato de magnésio 0,2 g/L, sulfato de manganês 0,04 g/L, e a sua respectiva fonte de carbono de 20 ou 30 g/L. Para monitorar o crescimento das estirpes probióticas, foram preparados cinco caldos diferentes: CMRS sem fonte de carbono, CMRS contendo glicose 20 g/L (CMRS original), CMRS contendo fruto-oligossacarídeos (FOS: um ingrediente prebiótico bem conhecido - TUOHY et al., 2003; GIBSON et al., 2004) 20 g/L, CMRS

contendo o CAP com 20 g/L e CMRS contendo CAP com 30 g/L. Além disso, foi monitorado o crescimento bacteriano em água destilada estéril contendo apenas CAP a 20 ou 30 g/L. As concentrações de CAP utilizadas na formulação do CMRS foram escolhidas tendo em vista a quantidade média de carboidratos encontrada neste subproduto (40,7%), de modo que a quantidade definitiva de carboidratos no caldo foi semelhante à encontrada no CMRS original. Todos os ingredientes utilizados na formulação do CMRS foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), com a exceção de FOS, que foi obtido a partir da Galeno Ltda. (Campinas, Brasil).

### 3.3.3 Monitoramento do crescimento bacteriano

A fim de verificar a capacidade das cepas de *Lactobacillus* em utilizar o CAP como única fonte de carbono, bem como para selecionar a concentração do CAP a ser utilizada em ensaios posteriores, o crescimento bacteriano foi avaliado primeiramente utilizando-se um ensaio de monitoramento do crescimento bacteriano em microplaca (SÁNCHEZ-ZAPATA et al., 2013; SOUSA et al., 2015). Para isso, o inóculo de cada uma das cepas testadas foi distribuído (2%, v/v) em uma microplaca de 96 poços contendo 200 µL do respectivo meio de cultivo (contagem final de células viáveis de aproximadamente 5 log UFC/mL). A microplaca foi envolvida em filme plástico, para evitar a desidratação do meio de cultivo. Logo após, a microplaca foi incubada a 37 °C em leitor/incubador de microplacas (EON, Biotek, EUA), para avaliação do crescimento bacteriano (absorvância - DO 655 nm) em diferentes intervalos de tempo de incubação (0 - logo após a homogeneização, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 h).

### 3.3.4 Avaliação da viabilidade celular bacteriana

A viabilidade celular das cepas de *Lactobacillus* nos diferentes meios de cultura foi avaliada utilizando-se o procedimento de contagem de células viáveis. Para tanto, alíquota de suspensões das cepas teste foram inoculadas (2%, v/v) em frascos estéreis contendo 10 mL dos diferentes meios de cultivo (contagem final de células viáveis de aproximadamente 5 log UFC/mL). As misturas foram suavemente agitadas manualmente durante 30s, e subsequentemente incubadas de forma estática sob condições de aerobiose a 37 °C. Em diferentes intervalos de tempo de incubação (0 - apenas depois da homogeneização, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 h de pós-incubação), alíquotas de 100 µL de cada mistura foram diluídas seriadamente em solução salina estéril, e, subsequentemente, alíquotas de 20 µL de cada

diluição foram adicionadas a AMRS, utilizando-se uma técnica de inoculação de microgotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001), para contagem de células viáveis. As placas foram incubadas aerobicamente a 37 °C durante 24 - 48 h, e os resultados foram expressos como log UFC/ mL.

### **3.3.5 Parâmetros da atividade metabólica dos probióticos**

A atividade metabólica das cepas probióticas foi avaliada por meio da determinação do pH, teor de açúcares e ácidos orgânicos nos diferentes meios de cultura em diferentes intervalos de tempo de incubação (0 - apenas depois da homogeneização, 6, 12, 18, 24 e 48 h de pós-incubação). Os valores de pH foram medidos usando-se um potenciômetro digital (modelo Q400A5, Quimus, São Paulo-SP), (AOAC, 2012). Os açúcares (glicose, frutose, maltose e ramnose) e ácidos orgânicos (acético, cítrico, fórmico, butírico, láctico e málico) foram simultaneamente determinados por HPLC, de acordo com as condições descritas anteriormente no item 3.2.1.

## **3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Todas as análises foram realizadas em triplicata, em três experimentos distintos, e os resultados foram expressos como médias e desvio-padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, utilizando um  $P \leq 0,05$ . Para isso, foi utilizado o software Graphpad Prism 6.0.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, F.P; DORNIER, M; DIONISIO, A.P; CARAIL, M; CARIS-VEYRAT, C; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 25-31, 2013.
- AJILA, C. M; BHAT, S. G; RAO, U. J. S. P. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1006–1011, 2007.
- ALBUQUERQUE, T.L; GOMES, S.D.L; MARQUES, J.E; SILVA, J.S; ROCHA, M.V.P. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today**, v. 255, p.33-40, 2015.
- AL-SHERAJI, S. H; ISMAIL, A; MANAP, M. Y; MUSTAFA, S; YUSOF, R. M; HASSAN, F. A. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1542-1553, 2013.
- ANDRADE, R.A.M.S; MACIEL, M.I.S; SANTOS, A.M.P; MELO, E.A. Optimization of the extraction process of polyphenols from cashew apple agro-industrial residues. **Food Science and Technology**, v.35, n.2, p. 354-360, 2015.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC international**. 18. ed., Gaithersburg, USA, 2012.
- ASYIFAH, M.R; LU, K; TING, H.L; ZHANG, D. Hidden potential of tropical fruit waste components as a useful source of remedy for obesity. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 62, n. 16, p.3505-3516, 2014.
- ATTRI, B.L. Effect of initial sugar concentration on the physicochemical characteristics and sensory qualities of cashew apple wine. **Natural Product Radiance**, v.8, n. 4, p.374–379, 2009.
- AURELI, P; CAPURSO, L; CASTELLAZZI, A. M; CLERICI, M. GIOVANNINI, M; MORELLI, L; POLI, A; PREGLIASCO, F; SALVINI, F; ZUCCOTTI, G.V. Probiotics and health: An evidence-based review. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 5, p. 366–376, 2011.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN S; WRIGHT, A; OUWEHAND, A; editors. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 2004. p.1-66.



AYALA-ZAVALA, J. F; VEGA-VEGA, V; ROSAS-DOMINGUEZ, C; PALAFOX-CARLOS; H., VILLA-RODRIGUEZ; J. A., SIDDIQUI, M. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p.1866 – 1874, 2011.

BABBAR, N; OBEROI, H.H; UPPAL, D.S; PATIL, R.T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 391-396, 2011.

BALL, S; BULLOCK, S; LLOYD, L; MAPP, K; EWEN, A. Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids by ion-exchange chromatography. In *Agilent Hi-Plex Columns Applications Compendium*, **Agilent Technologies Inc.**, 2011.

BIELECKA, M; BIEDRZYCKA, E; MAJKOWSKA, A; JUSKIEWICZ, J; WROBLEWSKA, M. Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosystem in rats. **Food Research International**, v. 35, n. 2, p.139–144, 2002.

BINNS, C; LEE, M. K. The use of probiotics to prevent diarrhea in young children attending child care centers: A Review. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**. v. 2, n.6, p. 269-273, 2010.

BLAUT, M., CLAVEL, T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p.751-755, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, **Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. IX-Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**, 2008.

CAETANO, P. K; DAIUTO, E. R; VIEITES, R. L. Physicochemical and sensory characteristics of jam produced with acerola pulp and juice. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 3, p. 191-197, 2012.

CARR, M.K.V. The water relations and irrigation requirements of cashew (*Anacardium occidentale* L.): a review. **Experimental Agriculture**, v. 50, n.1, p. 24–39, 2014.

CHARALAMPOPOULOS, D; WANG, R; PANDIELLA, S. S; WEBB, C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. **Internacional Journal Food Microbiology**. v. 79, n. 1, p. 131–141, 2002.

CIZEIKIENE, D; JUODEIKIENE, G; PASKEVICIUS, A; BARTKIENE, E. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 539–545, 2013.

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

FAO WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report, 1e11, 2002.

FELIPE, E. M .F; COSTA, J. M. C; MAIA, G. A; HERNANDEZ, F. F. H. Evaluation of quality of the mineral parameters of food powders from mango skin and passion fruit rind. **Alimentação e Nutrição**, v.17, n.1, p.79-83, 2006.

FIGUEIREDO, R.W; LAJOLO, F.M; ALVES, R.E; FILGUEIRAS, H.A.C. Physical-chemical changes in early dwarf cashew pseudofruits during development and maturation. **Food Chemistry**, v. 77, n. 3, p.343–347, 2002.

FIORAMONTI, J; THEODOROU, V; BUENO, L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology**, v.17, n. 5, p.711-724, 2003.

FOLCH, J; LEES, M; STANLEY G.H.S. A simple method for isolation and purification of total lipids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n.1, p. 497, 1957.

FOOKS, L. J; FULLER, R; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, v. 9, n.1, p. 53-61, 1999.

GARRUTI, D.S; FRANCO, M.R.B; DA SILVA, M.A.A.P; JANZANTTI, N.S; ALVES, G.L. Evaluation of volatile flavour compounds from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice by the Osme gas chromatography/olfactometry technique. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 83, n. 14, p.1455–1462, 2003.

GEBARA, C; RIBEIRO, M.C.E; CHAVES, K.S; GANDARA, A.L.N; GIGANTE, M.L. Effectiveness of different methodologies for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* La5 from yoghurt and Prato cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 508-513, 2015.

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

GIBSON, G. R. Dietary modulation of human gut microflora using prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. 4, S209–S212, 1998.

GIBSON, G. R; PROBERT, H. M; VAN LOO, J. A. E; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, n. 2, p. 257 – 259, 2004.

GONZALEZ-AGUIAR, G. A. et al. Bioactive compounds in fruits: health benefits and effect of storage conditions. **Postharvest Stewart Review.**, v. 4, n. 3, p. 1-10, 2008.

GOPAI, P. K; SULLIVAN, P. A; SMART, J. B. Utilisation of galactooligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. **International Dairy Journal**, v.11, n. 1, p.19–25, 2001.

GORINSTEIN, S; POOVARODOM, S; LEONTOWICZ, H; LEONTOWICZ, M; NAMIESNIK, J; VEARASILP, S. Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits. *In vitro* and in vivo studies. **Food Research International**, v. 44, n.7, p. 2222–2232, 2011.

GUERGOLETTI, K.B; COSTABILE, A; FLORES, G; GARCIA, S; GIBSON, G.R. In vitro fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, v.196, p.251-258, 2016.

GULLÓN, B; GULLÓN, P; TAVARIA, F; PINTADO, M; GOMES, A. M; ALONSO, J. L; PARAJO, J. C. Structural features and assessment of prebiotic activity of refined arabinoxyloligosaccharides from wheat bran. **Journal of Functional Foods**. v. 6, p. 438-449, 2014.

GULLÓN, B; PINTADO, M.E; BARBER, X; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J; PÉREZ-ÁLVAREZ, J; VIUDA-MARTOS, M. Bioaccessibility, changes in the antioxidant potential and colonic fermentation of date pits and apple bagasse flours obtained from co-products during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 78, p. 169-176, 2015.

HERBEL, S.R; VAHJEN, W; WIELER, L.H; GUENTHER, S. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. **Gut Pathogens**, v.5, n. 27, 2013.

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

HOLZAPFEL, W.H; HABERER, P; GEISEN, R; BJÖRKROTH, J; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n.2, Suppl: 365S-373S, 2001.

HONORATO, T.L; RODRIGUES, S. Dextranucrase stability in cashew apple juice. **Food and Bioprocess Technology**, v3, n. 1, p.105–110, 2010.

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

HORWITZ, W; LATIMER JR; GEORGE W. (Ed.). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 18th ed. 2005b. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. chapter 45, met. 999.03, p. 96-98.

INFANTE, J; SELANI, M. M; TOLEDO, N. M. V; SILVEIRA-DINIZ, M. F; ALENCAR, S. M; SPOTO, M. H. F. Antioxidant activity of agroindustrial residues from tropical fruits. **Brazilian Journal of Food Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 87-91, 2013.

KAUR, I. P; CHOPRA, K; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal Pharmaceutical Sciences**, v.15, n.1, p.1-9, 2003.

KONONEN, E; WADE, W.G. *Propionibacterium, Lactobacillus, Actinomyces*, and other non-sporeforming anaerobic gram-positive rods, p. 872-888. In P.R. Murray (ed.), **Manual of clinical microbiology**. ASM Press, Washington, DC, 2007.

LAPARRA, J. M; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 219–225, 2010.

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

LILLY, D. M; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth promoting factors produced by micro-organisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

LIU, Z; LIN, X; HUANG, G; ZHANG, W; RAO, P; Ni, L. Prebiotic effects of almonds and almond skins on intestinal microbiota in healthy adult humans. **Anaerobe**, v. 26, p.1-6, 2014.

MANNING, T. S; GIBSON, G. R. Prebiotics. Best Practice & Research Clinical **Gastroenterology** . v.18, n.2, p.287–298, 2004.

MARTINS, C. R; FARIAS, R. M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.9, n.1, p. 83-93, 2002.

MATIAS, M. F. O; OLIVEIRA, E. L; GERTRUDES, E; MAGALHÃES, M. A. Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale, L*) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. SPE, p.143-150, 2005.

OLIVEIRA, A.C; VALETIM, I.B; SILVA, C.A; BECHARA, E.J.H. BARROS, M.P; MANO, C.M; GOULART, M.O.F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 469-475, 2009.

OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – A review. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 300, n. 2, p. 57-62, 2010.

PINHO, L.X; AFONSO, M.R.A; CARIOCA, J.O.B; COSTA, J.M.C; RAMOS, A.M. The use of cashew apple residue as source of fiber in low fat hamburgers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n.4, p. 941-945, 2011.

PROSKY, L.; ASP, N-G.; SCHWEIZER, T.F.; DEVRIES, J. W.; FURDA, I. Determination of insoluble and soluble dietary fibers in foods and food products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 75, n. 2, p. 360-367, 1992.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R; AURA, A.M; OKSMANCALEDENTY, K.M; MYLLÄRINEN, P; SAARELA, M; MATTILA-SANHOLM, T; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, n. 1, p.3-11, 2002.

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

ROBERFROID, M. B. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. S1, p. S13–S25, 2005.

ROBERFROID, M; GIBSON, G.R; HOYLES, L; et al., Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S2, p. S1-S63, 2010.

ROSSO, V. V. Bioactivities of Brazilian fruits and the antioxidant potential of tropical biomes. **Food and Public Health**, v. 3, n. 1, p. 37–51, 2013.

RUBEL, I.A; PÉREZ, E.E; GENOVESE, D.B; MANRIQUE, G.D. In vitro prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*. **Food Research International**, v.62, p. 59-65, 2014.

SAAD, S. M. I. Probiotics and prebiotics: the state of the art. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAAD, N. A; DELATTRE B, M; URDACI C, J.M; SCHMITTER D, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1 – 16, 2012.

SAEZ-LARA, M.J; GOMEZ-LLORENTE, C; PLAZA-DIAZ, J; GIL, A. The Role of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Other Related Diseases: A Systematic Review of Randomized Human Clinical Trials. **BioMed Research International**, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/505878>.

SÁNCHEZ-ZAPATA, E; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J; PÉREZ-ALVAREZ, J. A; SOARES, J; SOUSA, S; GOMES, A. M. P; PINTADO, M. M. E; In vitro evaluation of “horchata” co-products as carbono source for probiotic bacteria growth. **Food and Bioproducts Processing**, n. 91, p. 279 – 286, 2013.

SANCHO, S.O; SILVA, A.R.A; DANTAS, A.N.S; MAGALHÃES, T.A; LOPES, G.S; RODRIGUES, S; COSTA, J.M.C; FERNANDES, F.A.N; SILVA, M.G.V. Characterization of the Industrial Residues of Seven Fruits and Prospection of Their Potential Application as Food Supplements. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/264284>

SCHIEBER, A; STINTZING, F.C; CARLE, R. Byproducts of plant food processing as a source of functional compounds: recent developments. **Trends in Food Sciecn & Technology**, v. 12, n. 11, p. 401- 413, 2001.

SCOURBOUTAKOS, M. Synbiotics: combining the power of pre- and probiotics. J. **Food Science Education**. v. 9, n. 1, p. 36–37, 2010.

SERBAN, D. E. The gut microbiota in the metagenomics era: sometimes a friend, sometimes a foe, Roumanian. **Archives of Microbiology and Immunology**. v. 70, n. 3, p.134–140, 2011.

SILVA, L. M. R; FIGUEIREDO, E. A. T; RICARDO, N. M. P. S; VIEIRA, I. G. P; FIGUEIREDO, R. W; BRASIL, I. M. GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, n. 1, p. 398–404, 2014.

SOUSA, M.S.B; VIEIRA, L.M. Total phenolics and in vitro antioxidant capacity of tropical fruit pulp wastes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n.3, p. 202 – 210, 2011.

SOUSA, S; PINTO, J; PEREIRA, C; MALCATA, F.X; PACHECO, M.T.B; GOMES, A.M; PINTADO, M. *In vitro* evaluation of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour prebiotic potential. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 96-105, 2015.

SREENIVAS, K. M; LELE, S.S. Prebiotic activity of gourd Family vegetable fibres using in vitro fermentation. **Food Bioscience**. v. 1, p. 26-30, 2013.

TALASIL, U; SHAIK, K.B. Quality, spoilage and preservation of cashew apple juice: A review. **Journal of Food Science Technology**, v. 52, n. 1, p. 54-62, 2015.

TUOHY, K. M; PROBERT, H. M; SMEJKAL, C. W; GIBSON, G.R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 15, p. 692-700, 2003.

VÁSQUEZ, A; MOLIN, G; PETTERSSON, B; ANTONSSON, M; AHRNE, S. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 430-441, 2005.

WANG, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p. 8 –12, 2009.

WEBB, G. P. Dietary supplements & functional foods. **John Wiley & Sons**, 2011.

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

XU, M; GAGNÉ-BOURQUE, F; DUMONT, M.J; JABAJI, S. Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 168, p. 52-59, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.021>

YANG, B; PRASAD, K.N; XIE, H; LIN, S; JIANG, Y. Structural characteristics of oligosaccharides from soy sauce lees and their potential prebiotic effect on lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p.590-594, 2011.



## APÊNDICE

## APÊNDICE – ARTIGO ORIGINAL

**Potential prebiotic properties of a cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) processing byproduct powder on different *Lactobacillus* species****Running title:** Prebiotic properties of cashew byproduct

Francisca Nayara Dantas Duarte <sup>a</sup>, Jéssica Bezerra Rodrigues <sup>a</sup>, Marcos dos Santos Lima <sup>b</sup>, Maria Teresa Bertoldo Pacheco <sup>c</sup>, Maria Manuela Estevez Pintado <sup>d</sup>, Jailane de Souza Aquino <sup>a</sup>, Evandro Leite de Souza <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil*

<sup>b</sup> *Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal do Sertão de Pernambuco, Petrolina, Brazil*

<sup>c</sup> *Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brazil*

<sup>d</sup> *Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica do Porto, Porto, Portugal*

\* Corresponding author:

Evandro Leite de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Laboratório de Microbiologia de Alimentos

Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

E-mail: [evandroleitesouza@ccs.ufpb.br](mailto:evandroleitesouza@ccs.ufpb.br)

Phone: + 55 83 3216 7807; Fax number: + 55 83 3216 7094

## Abstract

This study evaluated the prebiotic effects of a freeze-dried cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) processing byproduct powder (CAP) on different probiotic *Lactobacillus* strains, namely *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 and *L. paracasei* L-10, using an *in vitro* model. The growth behavior (absorbance at 650 nm) and viable cell counts (cfu/mL) of the *Lactobacillus* strains when cultivated in a cultivation broth containing CAP (20 or 30 g/L), glucose (20 g/L) or fructooligosaccharides (FOS) (20 g/L) were monitored over time. The changes in pH values, production of organic acids and consumption of sugars were also assessed. During the 48-h cultivation, similar viable cell counts were observed for the probiotic strains grown in the different tested media. The cultivation of the *Lactobacillus* strains in broth containing glucose, FOS or CAP resulted in high viable cell counts, decreased pH, production of organic acids and consumption of sugars over time, indicating intense bacterial metabolic activity. Similar capability to ferment the proven prebiotic FOS and CAP was observed among the *Lactobacillus* strains, although some differences related to the production of organic acids and to the consumption of sugars were detected. These results show the potential prebiotic effects of CAP, a byproduct of cashew apple processing, on different probiotic *Lactobacillus* strains.

Keywords: agro-industrial byproduct, cashew, prebiotic activity, *Lactobacillus*.

## 1. Introduction

Cashew (*Anacardium occidentale* L.) is a widespread tropical fruit that is valued for its nutritional and distinguished sensory characteristics. The cashew culture occurs in many countries, although Brazil, India, Vietnam and Nigeria present the greatest production for market destination (Honorato and Rodrigues, 2010). Approximately 1.8 million tons of cashew fruit are processed annually in Brazil and commonly during the harvest the nut (true fruit) is separated from the cashew apple (pseudo-fruit) with the intention of obtaining cashew nut as the only product for market (Talasila and Shaik, 2015). However, the cashew nut represents approximately 10% of the total fruit weight, and only 20% of the produced cashew apples are processed for the production of juice, frozen pulp and jam. The remaining of this production is commonly disposed of in the environment as industrial byproducts (Abreu et al., 2013; Albuquerque et al., 2015; Sancho et al., 2015).

The byproducts that are generated from the industrial processing of cashew apples comprise mainly mashed flesh and peels and represent approximately 20% of the apple total weight (Ajila et al., 2007). Some studies have investigated these byproducts as source of bioactive phytochemicals, particularly those with recognized antioxidant properties (Abreu et al., 2013; Nam et al., 2014; Sancho et al., 2015; Andrade et al., 2015; Albuquerque et al., 2015).

Prebiotic components (e.g., fructooligosaccharides, inulin and raffinose) occur naturally in many plants (Lestari et al., 2013; Guergoletto et al., 2016), and in recent years the search for new sources of prebiotic ingredients has been the subject of many studies (Wichienchot et al., 2010; Yang et al., 2011; Guergoletto et al., 2016). Fruit and their agro-industrial byproducts are considered matrices with potential prebiotic properties due to

their high content of carbohydrates, particularly fiber (Babbar et al., 2011); however, investigations on the prebiotic properties of fruit processing byproducts remain scarce.

Prebiotic components promote the selective growth of beneficial probiotic bacteria in the colon with the production of different organic acids, exerting a number of health effects in the host such as relief of constipation, improvement of mineral absorption, reduction of the incidence of colon cancer and strengthening of immune system (Tuohy et al., 2003; Gibson et al., 2004; Sreenivas and Lele, 2013; Rubel et al., 2014). Other benefits from the organic acid production by the probiotic bacteria in the colon include the inhibition of pathogenic bacteria (Gibson et al., 2004; Rastall and Gibson, 2006; Gullón et al., 2014). Among the probiotics, the *Lactobacillus* species are the most abundant. Similarly to other probiotics, *Lactobacillus* ferment selectively prebiotic ingredients, allowing specific changes in the composition and activity of the intestinal microbiota (Aureli et al, 2011; Al-Sheraji et al, 2013).

This study aimed to evaluate the prebiotic properties of the byproducts generated during the cashew apple processing on different probiotic *Lactobacillus* species using an *in vitro* model. For this, the growth behavior and the cell viability of the *Lactobacillus* strains when cultivated in a synthetic basal broth containing a powder that was produced from cashew apple processing byproducts, glucose or fructooligosaccharides were monitored over time. Still, some parameters related to the fermentable bacterial metabolic activities, namely the decrease in pH, production of organic acids and consumption of sugars, were verified.

## **2. Material and methods**

### *2.1 Preparation of cashew apple byproduct powder*

Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) byproducts were obtained from a frozen fruit pulp processing company located in the city of João Pessoa (Paraíba, Brazil). These byproducts were comprised mostly of mashed peel and small amounts of mashed flesh.

Samples were collected from several batches, comprising a total of approximately six kilograms that formed the pool of the material that was used in this study. The material was frozen at -18 °C and lyophilized (L-101 model, LIOTOP, São Carlos, Brazil). The dried material was grounded using a domestic blender (low speed, 10 min) and sieved through a fine mesh to obtain a powder with an average particle size of < 1.0 mm. The obtained powder was maintained in sterile plastic bags and kept under refrigeration until further analysis.

## *2.2 Physicochemical characterization of cashew apple byproduct powder*

The moisture, ash, protein, fat and carbohydrates content and pH value of cashew apple byproduct powder (CAP) were determined according to standard methods (AOAC, 2012). The insoluble and soluble fiber contents were determined using an enzymatic-gravimetric method (Prosky et al., 1992; Horwitz et al., 2005) and the fructans content was determined using enzymatic hydrolysis according to a previously described method (Horwitz et al., 2005). The amount of sugars (glucose, fructose, maltose and rhamnose) and organic acids (acetic, citric, formic, lactic and malic) was determined by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) using the same equipment and analytical conditions described in item 2.4.4. The physicochemical characterization of CAP is presented in Table 1.

## *2.3 Microorganism and inoculum preparation*

Three well-known probiotic *Lactobacillus* strains were used in this study, including the following: *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 and *L. paracasei* L-10 (Sánchez-Zapata et al., 2013; Sousa et al., 2015). These strains were gently supplied by the Collection of Microorganisms, College of Biotechnology, Portuguese Catholic University (Porto, Portugal). Stock cultures were kept in de Mann, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, India) containing glycerol (15 g/100 mL) at - 20 °C. For use in assays, each

strain was initially grown in MRS broth at 37 °C for 20 – 24 h (stationary growth phase), harvested through centrifugation (4500 g, 15 min, 4 °C), washed twice in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL) and re-suspended in sterile saline solution to obtain cell suspensions at which the OD reading at 625 nm (OD<sub>625</sub>) was 0.1. This suspension provided viable cell counts of approximately 6 log cfu/mL when pour plated in de Mann, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (HiMedia, India).

## *2.4 Assays for evaluation of prebiotic effects*

### *2.4.1 Bacterial cultivation media*

The MRS broth with a modified carbon source was used as a basal medium to evaluate the prebiotic effects of the tested CAP (Huebner et al., 2007; Sánchez-Zapata et al., 2013; Sousa et al., 2015). The compositions of the different MRS broths used to cultivate the tested *Lactobacillus* strains were as follows: tryptone 10 g/L, meat extract 8 g/L, yeast extract 4 g/L, di-potassium hydrogen phosphate 2 g/L, tween 80 1 g/L, sodium acetate 5 g/L, tribasic ammonium citrate 2 g/L, magnesium sulfate 0.2 g/L, manganese sulfate 0.04 g/L, and their respective carbon source 20 or 30 g/L. To monitor the growth of the strains, five different broths were prepared in terms of the sole carbon source added, as follows: broth containing glucose (non-prebiotic ingredient; Huebner et al., 2007) 20 g/L (standard MRS broth), broth containing fructooligosaccharides (FOS; a well-known prebiotic ingredient; Tuohy et al., 2003; Gibson et al., 2004) 20 g/L; broth containing CAP 20 g/L; broth containing CAP 30 g/L and broth without carbon source. Moreover, the bacterial growth in sterile distilled water containing only CAP at 20 or 30 g/L was monitored. The concentrations of CAP that were used in the formulations of the cultivation media were chosen considering the average carbohydrate amounts found in this byproduct (40.7 g/100g), so that the final carbohydrate amount in the cultivation broth was similar to

that found in standard MRS broth. All of the ingredients that were used to prepare the cultivation broths were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), with the exception of FOS that was obtained from Galena Ltd. (Campinas, Brazil).

#### *2.4.2 Screening of bacterial-growth-promoting effects*

To assess the potential of CAP as sole carbon source for the *Lactobacillus* strains, as well as to select the CAP concentration and composition of cultivation media to be used in further assays, the bacterial growth behavior was first assessed by turbidity of cultivation media using a microplate assay (Sánchez-Zapata et al., 2013; Sousa et al., 2015). For this, the inoculum of each of the tested strains was dispensed (2%, v/v) into each well of a 96-well microplate containing 200  $\mu$ L of the respective cultivation media (final viable cell counts of approximately 5 log cfu/mL). The microplate was loosely wrapped with cling wrap to prevent the dehydration of broth. The microplate was statically incubated at 37 °C in a microplate reader/incubator (EON, BioTek, USA), and the bacterial growth (absorbance at optical density - OD<sub>655 nm</sub>) was monitored at different time intervals (0 – just after homogenization and 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 and 48 h post-incubation).

#### *2.4.3 Evaluation of bacterial cell viability*

The cell viability of the *Lactobacillus* strains when cultivated in the different broths was assessed using a viable cell count procedure. For this, the inoculum of each of the tested strains was dispensed (2 %, v/v) in sterile flasks containing 10 mL of the respective cultivation broth (final viable cell counts of approximately 5 log CFU/mL). The mixtures were gently hand-shaken for 30 s and subsequently incubated statically under aerobic conditions at 37 °C. At different time intervals (0 - just after homogenization and 6, 12, 18,



24, 30, 36, 42 and 48 h post-incubation), 100- $\mu$ L aliquots of each mixture were serially diluted in sterile saline solution, and subsequently, 20- $\mu$ L aliquots of each dilution were plated onto the MRS agar using the microdrop inoculation technique (Herigstad et al., 2001). The plates were incubated aerobically at 37 °C for 24 - 48 h. The results of the counts of viable cells are expressed as log cfu/mL.

#### *2.4.4 Evaluation of parameters related to the bacterial metabolic activity*

The metabolic activity of the *Lactobacillus* strains was evaluated by determining the pH values, sugar and organic acid contents in the cultivation media at different time intervals (0 – just after homogenization and 6, 12, 18, 24 and 48 h post-incubation for pH determination and 6, 12, 18, 24 and 48 h post-incubation for sugar and organic acids determination). The pH values were measured using a digital potentiometer following a standard procedure (AOAC, 2012). Sugars (glucose, fructose, maltose and rhamnose) and organic acids (acetic, citric, formic, lactic and malic) were simultaneously measured by HPLC using an Agilent chromatograph (model 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, USA) equipped with a quaternary solvent pump (G1311C model), degasser, thermostatic column compartment (G1316A model) and automatic autosampler (G1329B model), coupled with a diode arrangement detector (DAD) (G1315D model) and Refractive Index Detector (RID) (G1362A model). The other analytic conditions were as follows: an Agilent Hi-Plex H column (7.7  $\times$  300 mm, 8  $\mu$ ); mobile phase H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 mM/L in ultrapure water; and flow rate 0.7 mL/min. The data were processed using the OpenLAB CDS ChemStation Edition™ software (Agilent Technologies). The HPLC sample peaks were identified by comparing their retention times with those of organic acid and sugar standards. Duplicate injections were performed, and the average peak areas were used for quantification (Ball et al., 2011). The standards of glucose, fructose and formic acid were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis,

USA); maltose and rhamnose was obtained from Chem Service (West Chester, USA); and citric, acetic, lactic and malic acids were obtained from Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brazil), all with a purity of  $\geq 99\%$ . Ultrapure water was obtained from a MilliQ® system (EMD Millipore, USA), and sulfuric acid was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.5 Statistical analysis

All of the analyses were performed in triplicate in three different experiments, and the results are expressed as the average of these assays. The data were submitted to an analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's *post-hoc* test using  $P \leq 0.05$ . For these analyses, the computational software GraphPad Prism 6.0 was used.

## 3. Results and discussion

The growth behavior of the probiotics *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 and *L. paracasei* L-10 in basal broth containing or not the different carbon sources, as assessed by monitoring the OD<sub>655</sub> absorbance, during 48 h is presented in Fig. 1 (A–C). A reduced growth of the assayed *Lactobacillus* strains was observed in broth without a carbon source. These results demonstrate that this medium does not sustain the growth of the inoculated strains, and that any increased bacterial growth verified in media containing each of the added carbon sources is strictly related to its potential to improve the bacterial growth and survival. However, no significant ( $P > 0.05$ ) growth was verified when either of the tested probiotic strains was cultivated in a mixture of sterile distilled water and CAP at both 20 and 30 g/L (data not shown). Thus, despite the use of CAP as carbon source, the inoculated strains require other components present in the assayed cultivation media to start and maintain their growth over time.

The greater ( $P \leq 0.05$ ) growth-promoting effects on *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 during the assessed incubation period were observed in broth containing glucose, followed by broth containing FOS and broth containing CAP at 20 and 30 g/L, respectively. In particular, with respect to the two concentrations of CAP in cultivation media, the greater growth-promoting effects on *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 were verified when the CAP was incorporated at 20 g/L (Fig. 1A and 1C). For *L. casei* L-26, greater ( $P \leq 0.05$ ) growth-promoting effects were also observed in broth containing glucose, followed by broth containing FOS; however, no differences ( $P > 0.05$ ) were observed when CAP was incorporated at 20 or 30 g/L in the cultivation media (Fig. 1B).

The results of the microplate assay showed that the media containing CAP at both of the assayed concentrations favored the growth of the tested probiotic strains. These findings reveal the capability of different probiotic *Lactobacillus* species to use CAP as a direct carbon source to promote growth and survival over time. Considering the abovementioned results, cultivation media containing glucose, FOS and CAP at 20 g/L were used in further assays.

The experiments for the confirmation of prebiotic effects were performed by evaluating parameters related to the fermentable bacterial metabolic activities, including the viable cell counts of the tested *Lactobacillus* strains, in addition to the determination of pH values and quantification of organic acids and sugars in the different cultivation media over time. The viable cell counts of *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 and *L. paracasei* L-10 and pH values in broth containing glucose, FOS or CAP during a 48-h cultivation period are shown in Fig. 2 (A – C). Interestingly, all of the tested *Lactobacillus* strains showed similar ( $P > 0.05$ ) viable cell counts in broth containing the same added carbon source. For all of the cultivation media and inoculated *Lactobacillus* strains, i) the durations of the lag and exponential growth phases were approximately 6 and 18 h,

respectively, and ii) the viable cell counts at the end of the incubation period were similar ( $P > 0.05$ ) and were as high as 8.5 - 9.0 log cfu/mL.

These results of similar viable cell counts over time among the *Lactobacillus* probiotic strains when inoculated in the different cultivation media is noteworthy, notwithstanding the differences in bacterial-growth-promoting effects that were observed in earlier assays for the measurement of bacteria growth through cultivation broth turbidity. The viable cell count (cfu per g or mL) procedure is a reliable method to identify the growth of only viable cells (viable colony), while the turbidity method identifies the increase in total cell mass, including viable and non-viable cells (Brock et al., 1994). Components with potential prebiotic effects promote the growth of probiotics with viable cell counts comparable with those verified when the probiotics are grown in presence of glucose (Huebner et al., 2007), as observed in this study.

The cultivation of the *Lactobacillus* strains in broth containing glucose, FOS or CAP resulted in decreases in the pH values of cultivation media (to approximately 4.0), mainly during the first 24 h. However, for the same inoculated strain, no differences ( $P > 0.05$ ) in pH values in the different cultivation media were observed over time. The detection of high viable cell counts and decreases in pH of growth media during cultivation demonstrate the intense metabolic activities (Sanchez-Zapata et al., 2013) of the inoculated *Lactobacillus* strains in broth containing either of the added carbon sources.

The intense bacterial metabolic activity that was verified in broth containing CAP is an interesting finding because the survival and growth of probiotics and the related beneficial effects to the host have been directly associated with decreased pH and increased production of organic acids in the colon. Under these conditions, the growth of certain pathogenic bacteria is inhibited, while the growth of *Lactobacillus* and other beneficial bacteria is stimulated (Gibson et al., 2004). Overall, the insoluble (27.7 g/100 g)

and soluble (7.4 g/100 g) fibers and fructans (1.5 g/100 g) that were detected in the studied CAP (Table 1) are potential metabolic substrates for the establishment of the verified prebiotic effects because the components of dietary fiber and fructans are resistant to digestion and absorption in the human small intestine; when these substrates reach the colon, they are selectively fermented by the beneficial bacteria comprising the intestinal flora (Puupponen-Pimia et al., 2002; Franco-Robles and López, 2015; Shalini and Antony, 2015). The presence of monosaccharides in CAP, such as glucose, fructose and maltose, even in small amounts, may also potentiate the use of CAP as direct fermentable substrate by probiotic bacteria (Sancho et al., 2015).

The contents of acetic, lactic, citric and malic acids that were produced during the 48-h cultivation of the probiotic *Lactobacillus* strains in cultivation media containing glucose, FOS or CAP are presented in Fig. 3 (A – L). Citric acid and malic acid are organic acids that occur naturally in fruit pulps and their byproducts, but some lactic acid bacteria are capable of producing them under different fermentation conditions (Eiteman and Ramalingam, 2015; Ho et al., 2015). Otherwise, lactic and acetic acids are common end-products of lactic acid bacteria fermentation (Zhao et al., 2015; Sandín-Spaña et al., 2016), and the production of these acids in higher amounts during the growth of probiotics is directly associated with intense metabolic activities.

Lactic acid was the most highly produced ( $P \leq 0.05$ ) organic acid by all of the tested *Lactobacillus* strains in broth containing glucose, FOS or CAP, although the detection of lactic acid only occurred from 12 or 18 h of incubation onward. Moreover, in some assessed incubation time intervals, the higher amounts ( $P \leq 0.05$ ) of lactic acid were detected in broth containing glucose or FOS. Possibly this occurred because lactic acid is one of the most important end-products of glucose and fructose fermentation by lactic acid bacteria (Al-Sheraji et al., 2013). Moreover, some *Lactobacillus* species are

homofermentative organisms (e.g., *L. acidophilus*), and lactic acid is the majority organic acid that is produced during the metabolism of carbohydrate by these bacteria (Østle et al., 2003). Overall, acetic acid was detected at similar contents ( $P > 0.05$ ) during the assessed incubation period in all of the cultivation media despite the inoculated *Lactobacillus* strains. Acetic acid is produced during the fermentation of carbohydrates by lactic acid bacteria in the colon and may be used by the host organism as a natural source of energy (Al-Sheraji et al., 2013; Eiteman and Ramalingam, 2015). Still, *Lactobacillus* can produce acetic acid through citrate metabolism (Østle et al., 2003).

The contents of malic acid were greater ( $P \leq 0.05$ ) in cultivation media containing CAP during the 48-h incubation despite the inoculated strain. Otherwise, the contents of citric acid were similar ( $P > 0.05$ ) in the different cultivation media in most of the assessed incubation time periods for all of the tested *Lactobacillus* strains. The prevalence of malic acid in broth containing CAP may be associated with the presence in higher amounts (0.3 g/100g) of this organic acid in CAP (Table 1) and with the capacity of some *Lactobacillus* strains to produce malic acid during the fermentation of carbohydrates (Ho et al., 2015). An early study reported malic acid as one of the main organic acids produced during the fermentation of cocoa beans by *Lactobacillus* spp. (Ho et al., 2015). Formic acid was the organic acid detected at the lowest amounts in the different cultivation media over time, and was detected in broth containing CAP only from 18 h cultivation onward (data not shown).

The contents of glucose, fructose and maltose during the 48-h cultivation of the probiotic *Lactobacillus* strains in cultivation media containing glucose, FOS or CAP are presented in Fig. 4 (A – I). As might be expected, glucose was the most highly ( $P \leq 0.05$ ) detected sugar in broth containing glucose. However, the glucose amounts decreased over time despite of the cultivation media and inoculated strain. For most of the assessed

incubation time points, the glucose contents were similar ( $P > 0.05$ ) in broth containing FOS or CAP inoculated with either of the tested strains (Fig. 4A, D and G). Fructose was the most highly detected sugar in broth containing CAP, where this sugar was totally consumed in an incubation time varying from 18 – 48 h of incubation. Fructose was also detected in broth containing FOS, and similarly, the quantities of this sugar sharply decreased or were totally consumed at the end of the assessed incubation period (Fig. 4B, E and H). Maltose was detected at higher amounts ( $P \leq 0.05$ ) in broth containing FOS despite of the inoculated *Lactobacillus* strain; however, these amounts sharply decreased from 12 or 18 h of incubation onward. Maltose was not detected or was detected in small quantities in broth containing glucose or CAP (Fig. 4C, F and I). This sugar consumption profile agrees with the findings of previous studies that verified the capability of lactic acid bacteria to convert glucose and fructose to lactic acid and lesser amounts of acetic acid as one of the major metabolic activities of this bacterial group (De Vuyst et al., 2010; Ho et al., 2015). Rhamnose was not detected in the different cultivation media.

The amounts of sugars that were observed in broth containing CAP may be associated with the composition of the carbon source that was added to this medium, with fructose and glucose as the majority monosaccharides, in addition to a significant amount of fructans from which part of the detected fructose contents could be derived. Moreover, part of the amounts of glucose, fructose and maltose observed in cultivation media may be consequence of the fermentation of fibers present in CAP by the inoculated *Lactobacillus* strains with the release of mono- and dissaccharides. The capacity of lactic acid bacteria to ferment complex carbohydrates with the release of smaller saccharides was already reported (Lestari et al., 2013). Fructans, which comprises the FOS group, is the main prebiotic ingredient in use by the food industry (Gibson et al., 2004; Rubel et al., 2014; Shalini and Antony, 2015). Overall, the assays to verify the metabolic activity revealed a

similar capability of *L. acidophilus* LA-05, *L. casei* L-26 and *L. paracasei* L-10 to ferment the FOS, a proven prebiotic component, and CAP in cultivation media, although some differences related to the production of organic acids and the consumption of sugars were observed. These differences may be related to i) the already known metabolic diversity of *Lactobacillus* (Hubner et al., 2007), and ii) the distinct composition of each cultivation media primarily due to the different added-carbon sources, because the formation of intermediate- and end-products during carbohydrates fermentation depends on both the substrate composition and the metabolic characteristics of different bacterial species and strains (Almstahl et al., 2013; Sousa et al., 2015).

#### **4. Conclusion**

The results of this study demonstrate that CAP possesses potential prebiotic effects on probiotic strains of *Lactobacillus*. The cultivation of these strains in media containing CAP as the sole carbon source resulted in intense bacterial metabolic activities as observed by high viable cell counts, decreased pH values, organic acid production and sugar consumption over time, similar to observed for the well-known prebiotic ingredient FOS. These findings suggest the byproducts of cashew apple processing as source of ingredients for prebiotic or symbiotic formulations. Finally, these findings may stimulate the agro-industrial sector to valorize the byproducts from fruits, particularly from cashew apples, processing as added-value ingredients to the food industry.

#### **Acknowledgments**

The authors would like to thank CNPq (Brazil) for financial support (Grant 400384/2013-2 and 476302/2013-7) and CAPES (Brazil) for a scholarship awarded to the authors F.N.D. Duarte and J.B.S. Rodrigues.



## References

- Abreu, F.P., Dornier, M., Dionisio, A.P., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dhuique-Mayer, C. 2013. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. Food Chem. 138, 25-31.
- Ajila, C. M., Bhat, S. G., Rao, U. J. S. P., 2007. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. Food Chem. 102, 1006–1011.
- Albuquerque, T.L., Gomes, S.D.L., Marques, J.E., Silva, J.S., Rocha, M.V.P., 2015. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. Catal. Today 255, 33-40.
- Almstahl, A., Lingstrom, P., Eliasson, L., Carlén, A., 2013. Fermentation of sugars and sugar alcohols by plaque *Lactobacillus* strains. Clin. Oral Invest. 17, 1465-1470.
- Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., Hassan, F. A., 2013. Prebiotics as functional foods: A review. J. Funct. Foods 5, 1542-1553.
- Andrade, R.A.M.S., Maciel, M.I.S., Santos, A.M.P., Melo, E.A., 2015. Optimization of the extraction process of polyphenols from cashew apple agro-industrial residues. Food Sci. Technol. 35, 354-360.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC international. 2012, 18th ed.

Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A. M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., Zuccotti, G.V., 2011. Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacol. Res.* 63, 366–376.

Babbar, N., Oberoi, H.H., Uppal, D.S., Patil, R.T., 2011. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Res. Int.* 44, 391-396.

Ball, S., Bullock, S., Lloyd, L., Mapp, K.P., Ewen, A., 2011. Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids by ion-exchange chromatography. In: *Agilent Hi-Plex Columns Applications Compendium*, Agilent Technologies Inc.

Brock, T. D., Madigan M. T., Martinko, J. M., Parker, J., 1994. *Biology of microorganisms*. Prentice-Hall International, Inc., New York. 909pp.

De Vuyst, L., Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Camu, N., 2010. The functional role of lactic acid in cocoa bean fermentation. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria – Novel Applications*. Willey Blackwell, Iowa, USA, pp. 301-325.

Eiteman, M.A., Ramalingam, S., 2015. Microbial production of lactic acid. *Biotechnol. Let.* 37, 955–972.

Franco-Robles, E., López, M.G., 2015. Implication of Fructans in Health: Immunomodulatory and Antioxidant Mechanisms. *Sci. World J.* 2015. doi: [dx.doi.org/10.1155/2015/289267](https://doi.org/10.1155/2015/289267)

Gibson, G.R., Probert, H.M., Van Loo, J.A.E., Roberfroid, M.B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17, 257–259.

Guergoletto, K.B., Costabile, A., Flores, G., Garcia, S., Gibson, G.R., 2016. *In vitro* fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. *Food Chem.* 196, 251-258.

Gullón, B., Gullón, P., Tavaría, F., Pintado, M., Gomes, A.M; Alonso, J. L., Parajo, J.C., 2014. Structural features and assessment of prebiotic activity of refined arabinoxylooligosaccharides from wheat bran. *J. Funct. Foods* 6, 438-449.

Herigstad, B; Hamilton, M; Heersink, J., 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J. Microbiol. Methods* 44, 121–129.

Ho, V.T.T., Zhao, J., Fleet, G., 2015. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 54–67.

Honorato, T.L., Rodrigues, S. Dextranucrase stability in cashew apple juice. (2010) *Food Bioproc. Technol.* 3, 105–110.

Horwitz, W., Latimer Jr., George, W., 2005. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 18th ed. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. chapter 45, 985, 101-102.

Huebner, J., Wehling, R.L., Hutkins, R.W. 2007. Functional activity of commercial prebiotic. Int. Dairy J. 17: 770-775.

Lestari, L.A., Soesatyo, M.H.N.E., Iravati, S., Harmayani, E. 2013. Characterization of Bestak sweet potato (*Ipomoea batatas*) variety from Indonesia origin as prebiotic. Int. Food. Res. J. 20: 2241-2245.

Nam, T.N., Minh, N.P., Dao, D.T.A., 2014. Investigation of processing conditions for dietary fiber production from cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) residue. Int. J. Sci. Technol. Res. 3, 2014.

Østle, H.M., Helland, M.H., Narvhus, J.A., 2003. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. Int. J. Food Microbiol. 87, 17-27.

Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, T.F., Devries, J.W., Furda, I., 1992. Determination of insoluble and soluble dietary fibers in foods and food products. J. AOAC Int. 75, 360-367.

Puupponen-Pimiä, R., Aura, A.M., Oksmancaldentey, K.M., Myllärinen, P., Saarela, M., Mattila-Sanholm, T., Poutanen, K., 2002. Development of functional ingredients for gut health. Trends Food Sci. Technol. 13, 3-11.

Rastall, B., Gibson, G., 2006. Prebiotics: Development and application. Chichester: John Wiley & Sons Press.

Rubel, I.A., Pérez, E.E., Genovese, D.B., Manrique, G.D., 2014. *In vitro* prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*. Food Res. Int. 62, 59-65.

Sánchez-Zapata, E., Fernández-López, J., Pérez-Alvarez, J.A., Soares, J., Sousa, S., Gomes, A.M.P., Pintado, M.M.E., 2013. *In vitro* evaluation of “horchata” co-products as carbon source for probiotic bacteria growth. Food Bioprod. Process. 91, 279 – 286.

Sancho, S.O., Silva, A.R.A., Dantas, A.N.S., Magalhães, T.A., Lopes, G.S., Rodrigues, S., Costa, J.M.C., Fernandes, F.A.N., Silva, M.G.V., 2015. Characterization of the industrial residues of seven fruits and prospection of their potential application as food supplements. J. Chem. 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/264284>

Sandín-España, P., Mateo-Miranda, M., López-Goti, C., De Cal, A., Alonso-Prados, J.L., 2016. Development of a rapid and direct method for the determination of organic acids in peach fruit using LC–ESI-MS. Food Chem. 192, 268–273.

Shalini, R., Antony, U., 2015. Fructan distribution in banana cultivars and effect of ripening and processing on *Nendran* banana. J. Food Sci. Technol. 52, 8244–8251.

Sousa, S., Pinto, J., Pereira, C., Malcata, F.X., Pacheco, M.T.B., Gomes, A.M., Pintado, M., 2015. *In vitro* evaluation of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour prebiotic potential. Food Bioprod. Process. 95, 96-105.

Sreenivas, K.M., Lele, S.S., 2013. Prebiotic activity of gourd family vegetable fibres using in vitro fermentation. Food Biosci. 1, 26-30.

Talasila, U., Shaik, K.B., 2015. Quality, spoilage and preservation of cashew apple juice: A review. J. Food Sci. Technol. 52, 54-62.

Tuohy, K. M., Probert, H.M., Smejkal, C.W., Gibson, G.R., 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Drug Discov. Today 8, 692-700.

Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., Rastall, R.A., 2010. Oligosaccharides of pitaya (*dragon fruit*) flesh and their prebiotic properties. Food Chem. 120, 850-857.

Yang, B., Prasad, K.N., Xie, H., Lin, S., Jiang, Y., 2011. Structural characteristics of oligosaccharides from soy sauce lees and their potential prebiotic effect on lactic acid bacteria. Food Chem. 126, 590-594.

Zhao, J., Li, H., Xi, W., An, W., Niu, L., Cao, Y., Wang, H., Wang, Y., Yin, Y., 2015. Changes in sugars and organic acids in wolfberry (*Lycium barbarum* L.) fruit during development and maturation. Food Chem. 173, 718–724.

### Figure captions

**Fig. 1.** Growth curves, monitored by absorbance at optical density 655 nm, for *L. acidophilus* LA-05 (A), *L. casei* L-26 (B) and *L. paracasei* L-10 (C) cultivated in broth containing glucose 20 g/L (○), FOS 20 g/ mL (□), cashew apple byproduct powder (CAP) 20 g/ mL (▲), CAP 30 g/L (▼) and without carbon source (◇), during 48h of incubation at 37 °C.

**Fig. 2.** Viable cell counts (—) and pH values (----) throughout the cultivation of *L. acidophilus* LA-05 (A), *L. casei* L-26 (B) and *L. paracasei* L-10 (C) in broth containing glucose 20 g/L (○), FOS 20 g/L (□), and cashew apple byproduct powder (CAP) 20 g/L (▲) during 48 h of incubation at 37 °C.

**Fig. 3.** Contents (g/L) of citric, lactic, acetic and malic acid in broth containing glucose 20 g/L (black bars), FOS 20 g/L (gray bars) and freeze-dried cashew apple byproduct powder (CAP) 20 g/L (white bars) inoculated with *L. acidophilus* LA-05 (A - D), *L. casei* L-26 (E - H) or *L. paracasei* L-10 (I - L) for 48 h at 37 °C.

**Fig. 4.** Contents (g/L) of glucose, fructose and maltose in broth containing glucose 20 g/L (black bars), FOS 20 g/L (gray bars) and cashew apple byproduct powder (CAP) 20 g/L (white bars) inoculated with *L. acidophilus* LA-05 (A - C), *L. casei* L-26 (D - F) or *L. paracasei* L-10 (G - I) for 48 h at 37 °C.

**Table 1.** Average values (n:3),  $\pm$  standard deviation, of physicochemical parameters of cashew (*Anacardium occidentale* L.) apple byproduct powder used in assays of prebiotic properties.

Parameters	Average values
Moisture (g/100g)	$6.2 \pm 0.3$
Ash (g/100g)	$2.2 \pm 0.1$
pH	$4.4 \pm 0.1$
Protein (g/100g)	$9.9 \pm 0.1$
Lipids (g/100g)	$2.1 \pm 0.1$
Carbohydrates (g/100g)	$44.5 \pm 0.3$
Soluble fiber (g/100g)	$7.4 \pm 0.2$
Insoluble fiber (g/100g)	$27.7 \pm 0.2$
Total dietary fiber (g/100g)	$35.1 \pm 0.3$
Fructans (g/100g)	$1.5 \pm 0.0$
Glucose (g/100 g)	$0.1 \pm 0.0$
Fructose (g/100 g)	$0.2 \pm 0.0$
Maltose (g/100 g)	$0.1 \pm 0.0$
Rhamnose (g/100g)	Nd
Acetic acid (g/100 g)	Nd
Citric acid (g/100 g)	$0.2 \pm 0.0$
Formic acid (g/100 g)	Nd
Lactic acid (g/100 g)	Nd
Malic acid (g/100 g)	$0.3 \pm 0.0$

nd: not detected



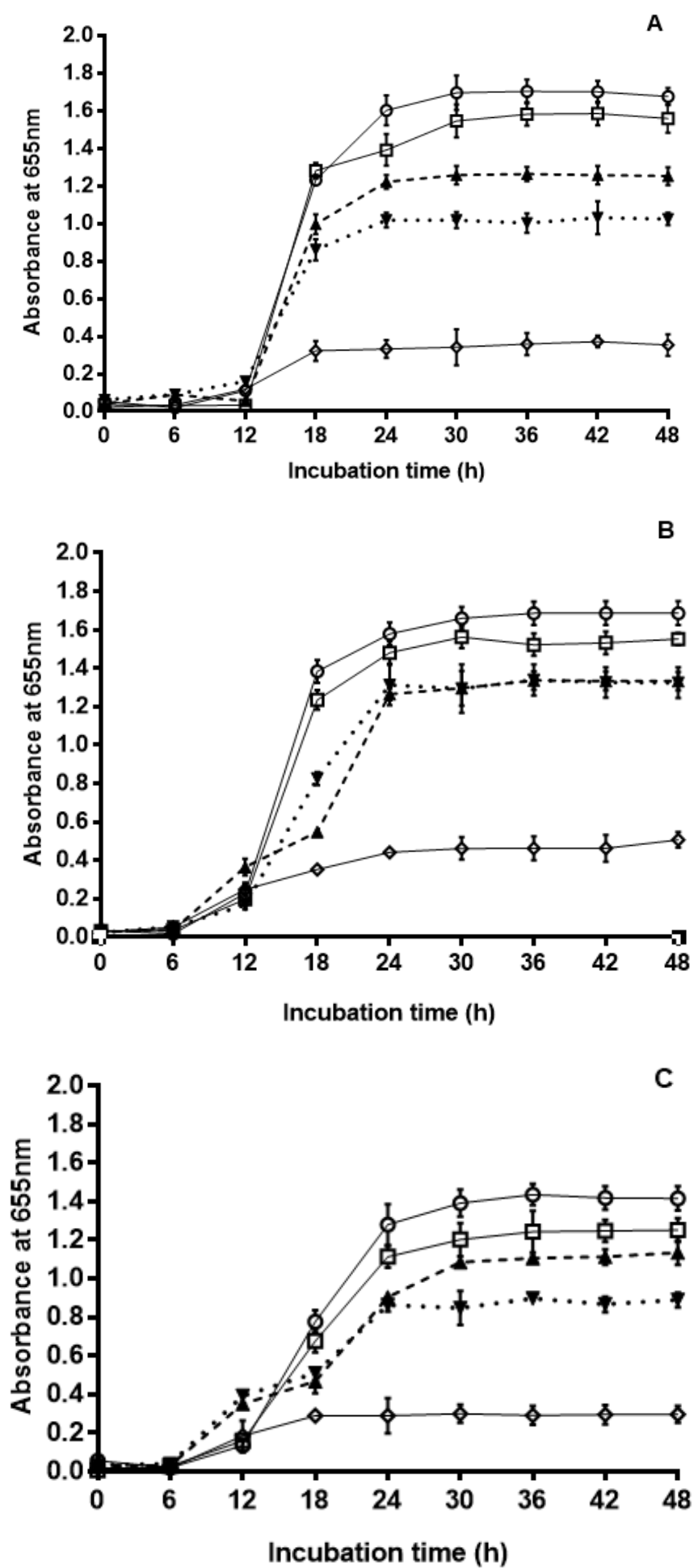


Fig. 1

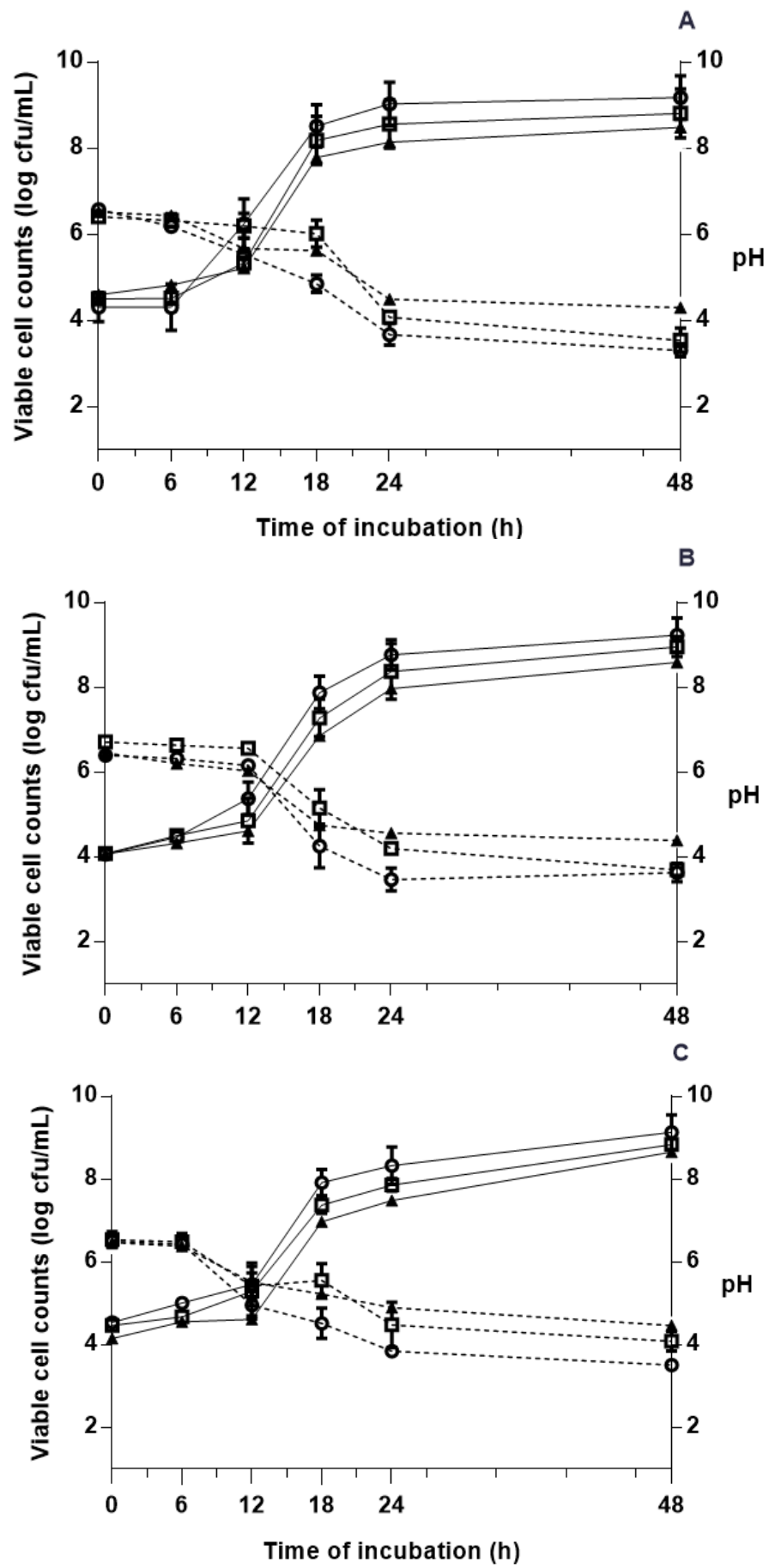


Fig. 2

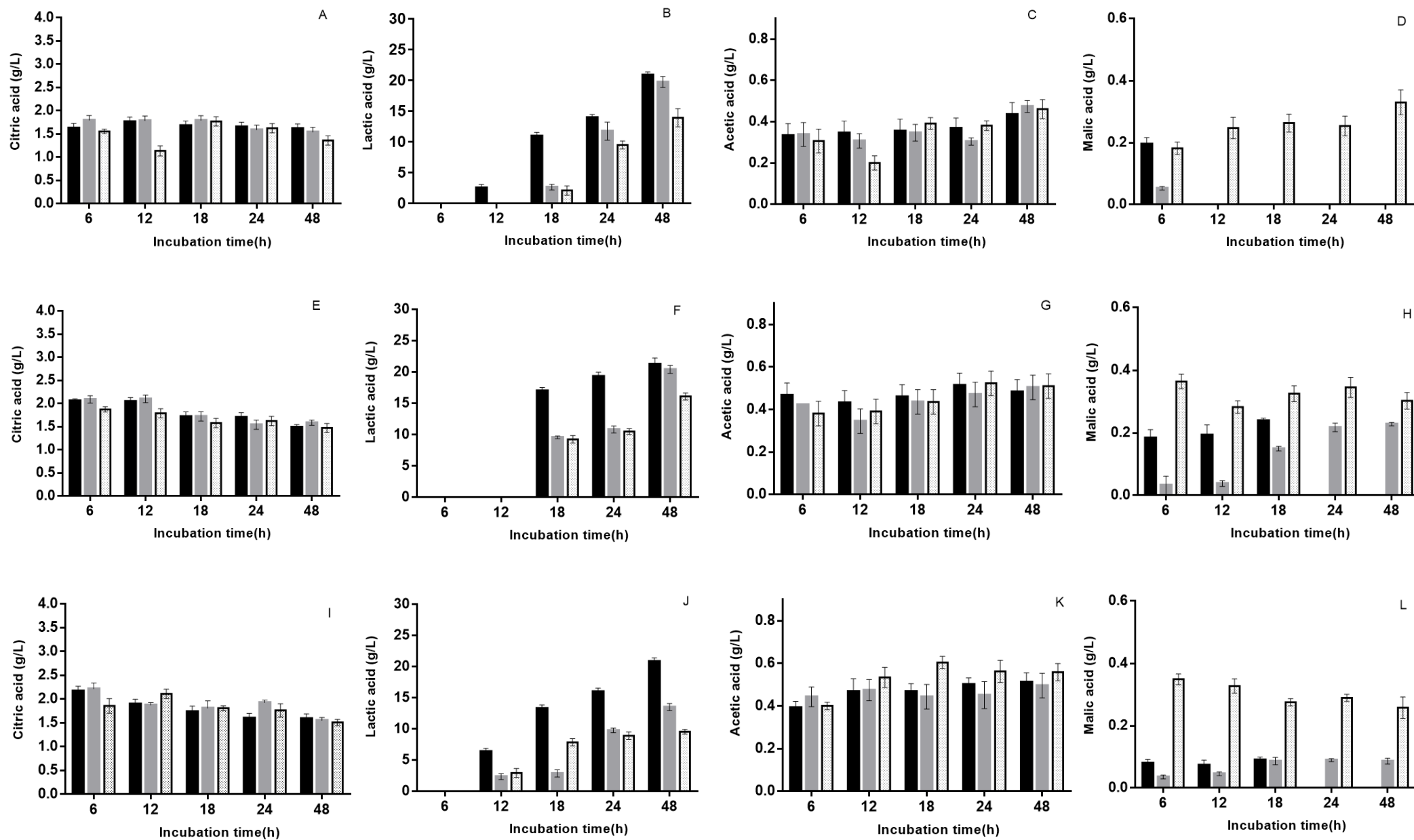


Fig. 3

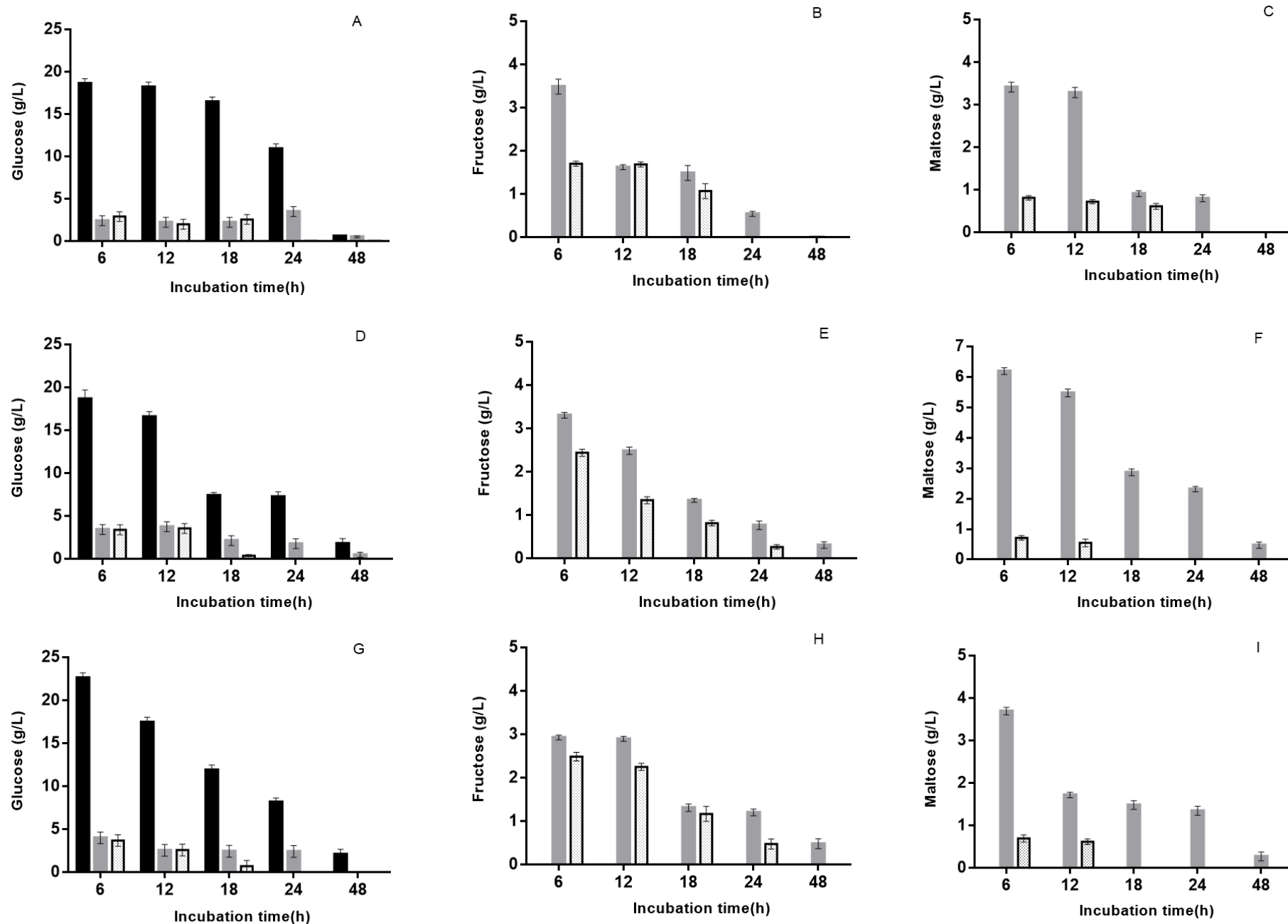


Fig. 4