TRANSFORMAÇÕES METABÓLICAS *IN VITRO* DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA JABUTICABA NA DIGESTÃO E NA FERMENTAÇÃO COLÔNICA

Tamirys Barcellos Revorêdo Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadores: Prof[a]. Dr[a]. Mariana Costa Monteiro
Prof. Dr. Daniel Perrone Moreira

Rio de Janeiro
Março de 2016

TRANSFORMAÇÕES METABÓLICAS *IN VITRO* DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA JABUTICABA NA DIGESTÃO E NA FERMENTAÇÃO COLÔNICA

Tamirys Barcellos Revorêdo Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Aprovada por:

_____
Profª Drª Mariana Costa Monteiro, DSc
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____
Prof Dr. Daniel Perrone Moreira, DSc
Instituto de Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____
Prof Dr. Alexandre Guedes Torres, DSc
Instituto de Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____
Profª Drª, Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues, DSc
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____
Prof Drª. Eliane Fialho de Oliveira, DSc
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
Março de 2016

À minha família.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela minha vida e por todas as oportunidades de crescimento. Agradeço todas as dificuldades que enfrentei, com certeza me fizeram muito mais forte. Esses dois anos foram de muito amadurecimento.

À minha família por todo apoio e amor, em especial minha mãe, pelo seu exemplo e força. À meu avô, que fisicamente já não está entre nós, que veio do nordeste formar a nossa família e sempre foi um homem de bem. Vocês são muito importantes para mim.

Ao Gabriel, meu namorado, por todo o companheirismo e paciência. Muito obrigada por me fazer sorrir até nos momentos mais difíceis.

Às minhas amigas, em especial Nathália e Roberta, por toda amizade e incentivo.
Ao meu psicólogo e amigo, César Said, por todos os conselhos. Muito obrigada por não me permitir desistir.

A meus orientadores, Mariana e Daniel, por todo conhecimento compartilhado. Aprendi muito com vocês, são grandes pesquisadores e amam o que fazem.

Aos meus amigos do LBNA, que me acolheram e me ensinaram muito. Obrigada Ellen, Genilton, Fabrício, Laís, Vanessa, Aline, Emília, Camila, André, Kim, Nívea, Isabelle e Yuri, por toda ajuda e por todos os momentos de descontração, quero levá-los comigo para sempre.

A todos os amigos do LABAFS, pelos momentos de aprendizado e pela alegria de sempre, em especial Júlia e Cris.

À Nívea e Isabel por toda ajuda, só nós sabemos o quanto quebramos a cabeça. Sem vocês tudo seria mais difícil, com certeza aprendemos muito juntas.

À Kim, minha primeira orientadora, quem me iniciou nesse mundo da pesquisa. Muito obrigada por tudo que me ensinou, não tenho dúvidas que será uma excelente professora.

Ao laboratório de biologia de anaeróbios, em especial os professores Leandro e Regina, pela parceria.

Ao LBNA.

Ao laboratório DAFFE.

À minha revisora Eliane Fialho e a todos os integrantes da banca pelas contribuições valiosas.

Aos meus voluntários, sem eles nada disso seria possível.

Muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Estou muito feliz em ter cumprido mais esse desafio.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

(Chico Xavier)

TRANSFORMAÇÕES METABÓLICAS *IN VITRO* DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA JABUTICABA NA DIGESTÃO E NA FERMENTAÇÃO COLÔNICA.

O metabolismo dos compostos fenólicos é relevante por gerar metabólitos relacionados com a bioatividade de um determinado alimento e seus possíveis efeitos à saúde humana. Um dos principais fatores que afetam o metabolismo dos compostos fenólicos é a sua interação com constituintes da matriz alimentar. Tem sido estimado que cerca de 90% dos compostos fenólicos ingeridos seguem até o cólon, onde são metabolizados pelas bactérias colônicas. No entanto, não há estudos acerca da bioacessibilidade e do metabolismo colônico dos compostos fenólicos em frutas nativas brasileiras, tais como a jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*). Dentre os métodos utilizados pela indústria de alimentos para a obtenção de suco de frutas destaca-se o despolpamento e o processamento por arraste a vapor. Em ambos os processamentos grande quantidade de resíduo, constituído principalmente pela casca da jabuticaba, seria descartado. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo investigar a bioacessiblidade dos compostos fenólicos de resíduos provenientes da produção de suco de jabuticaba por meio de modelos de digestão simulada *in vitro* e fermentação colônica *ex vivo*. Os resíduos foram provenientes da obtenção de suco de jabuticaba obtidos por despolpamento (RD) e por arraste a vapor (RAV). Os resíduos foram caracterizados quanto à composição centesimal e os teores de compostos fenólicos solúveis e insolúveis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A digestão simulada *in vitro* de ambos os resíduos mimetizou as fases oral, gástrica e intestinal quanto à condições controlada de pH, temperatura e agitação. O metabolismo colônico dos compostos fenólicos do RD foi investigado por meio da incubação com fezes de voluntários sadios por até 72 horas. Os metabólitos gerados após as etapas de digestão e fermentação foram analisados por CLAE. Os teores de fibra dietética do RAV foram superiores ao do RD, enquanto que os teores de compostos fenólicos solúveis e insolúveis foram similares em ambos os resíduos. Os resultados da digestão *in vitro* indicam que as antocianinas apresentam baixa bioacessibilidade (em média 22%). Em contrapartida, o ácido gálico e a quercetina apresentaram bioacessibilidade muito elevada (em média 700%), sugerindo que os mesmos são formados a partir de compostos fenólicos mais complexos como, respectivamente, galotaninos e formas glicosiladas de flavonóis. Foi observada uma intensa modificação no perfil dos compostos fenólicos ao longo da fermentação. O aumento dos teores de ácido gálico e o aparecimento da cianidina ao longo da fermentação foram relacionados, respectivamente, à metabolização da delfinidina-3-*O*-glicosídeo e da cianidina-

3-*O*-glicosídeo. Os resultados do presente estudo sugerem que os potenciais efeitos benéficos associados aos compostos fenólicos presentes na jabuticaba não estariam relacionados com suas formas intactas, mas sim aos seus metabólitos.

Palavras-chave: compostos fenólicos, ácido elágico, ácido gálico, antocianinas, bioacessibilidade, metabolismo.

IN VITRO METABOLIC TRANSFORMATION OF FENOLIC COMPOUNDS OF JABUTICABA IN THE DIGESTION AND COLONIC FERMENTATION

The metabolism of phenolic compounds is important as it generates metabolites related to the bioactivity of food and its possible effects on human health. One of the main factors that affect the metabolism of phenolic compounds in humans is their interaction with food matrix constituents. It has been estimated that 90% of the total phenolic compounds intake follow until the colon where they are metabolized by gut microbial community. However, no previous study has been reported the bioaccessibility and the colonic metabolism of phenolic compounds of Brazilian fruits such as jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*). Common methods used by the food industry for obtain fruit juices include depulping process and steam extraction. In both processing large amount of residue mainly consisting of the jabuticaba peel it would be discarded. In this sense, the aims of this study was to investigate the bioaccessibility of phenolic compounds of jabuticaba residue using in vitro simulated digestion and colonic fermentation. Residues were produced from jabuticaba juice obtained by depulping process (DR) and by steam extraction (SER). Residues were characterized for chemical composition and the content of soluble and insoluble phenolic compounds by high-performance liquid chromatography (HPLC). The in vitro simulated digestion mimicked oral, gastric and intestinal phases under conditions of controlled pH, temperature and agitation. The colonic metabolism of phenolic compounds was investigated by anaerobically incubation with human feces up to 72 hours. The metabolites were analyzed by HPLC. The contents of dietary fiber of SER were higher than that DR, whereas the contents of soluble and insoluble phenolic compounds were similar in both residues. The results of in vitro simulated digestion indicate that the anthocyanins exhibit low bioaccessibility (22% on average). However, gallic acid and quercetin presented the highest bioaccessibility (700% on average), suggesting that they are formed from phenolic compounds with more complex structure such as, respectively, gallotannins and glycosylated forms of flavonols. An intense modification in the profile of phenolic compounds was observed throughout the fermentation. The increase in the contents of gallic acid and the presence of cyanidin throughout the fermentation were related, respectively, to the metabolization of delphinidin-3-*O*-glucoside and cyanidin-3-*O*-glucoside. The results of the present study suggest that the potential beneficial effects of phenolic compounds present in jabuticaba would not be related to their intact forms, but to their metabolites.

Key words: Phenolic compounds, ellagic acid, gallic acid, anthocyanins, bioaccessibility, metabolism.

SUMÁRIO

Introdução..... 17
Revisão bibliográfica..... 20
1. Compostos fenólicos..... 21
1.1 Antocianinas..... 22
1.2 Outros flavonoides..... 24
1.3 Ácidos fenólicos..... 25
2. Bioacessibilidade e biodisponibilidade dos compostos fenólicos..... 26
3. Digestão simulada *in vitro*..... 28
4. Fermentação colônica..... 28
4.1 Microbiota colônica humana..... 29
4.2 Bactérias colônicas e compostos fenólicos..... 30
5. Jabuticaba *(Myrciaria jaboticaba*)..... 30
5.1 Botânica, cultivo e consumo..... 30
5.2 Composição nutricional..... 31
5.3 Compostos fenólicos..... 32
5.4 Propriedades benéficas na saúde..... 32
6. Tipos de processamentos de sucos..... 33
Objetivos..... 35
Objetivo geral..... 36
Objetivos específicos..... 36
Material e Métodos..... 37
1. Reagentes, padrões e solventes..... 38
2. Obtenção e separação da matéria-prima..... 38
3. Determinação da composição centesimal..... 38
4. Determinação dos teores e do perfil dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência..... 39
4.1 Extração das amostras..... 39
4.2 Condições cromatográficas..... 40
4.2.1 Antocianinas..... 40
4.2.2 Compostos fenólicos não-antociânicos..... 41
5. Digestão simulada *in vitro* e fermentação colônica *ex vivo*..... 41

5.1 Simulação da fase oral..... 42
5.2 Simulação da fase gástrica..... 42
5.3 Simulação da fase intestinal..... 43
5.4 Fermentação colônica *ex vivo*..... 44
5.4.1 Voluntários..... 44
5.4.2 Condições experimentais..... 44
5.5 Análise de compostos fenólicos e seus metabólitos..... 45
5.6 Cálculo da área abaixo da curva (AUC)..... 46
6. Análises estatísticas..... 46
Resultados e discussão..... 47
1. Rendimento..... 48
2. Composição centesimal..... 48
3. Perfil de compostos fenólicos..... 49
4. Digestão simulada *in vitro*..... 51
4.1 Etapa gástrica..... 51
4.2 Etapa intestinal..... 55
5. Fermentação colônica..... 61
Conclusão..... 68
Referências bibliográficas..... 74
Anexos..... 81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
AOAC	*Association of Official Analytical Chemists*
bs	Base seca
C3G	Cianidina-3-*O*-glicosídeo
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEASA	Central de abastecimento do estado do Rio de Janeiro
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
D3G	Delfinidina-3-*O*-glicosídeo
DAD	Detector de arranjo de diodo
DCNT	Doenças crônicas não-transmissíveis
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
IL-8	Interleucina 8
INJC	Instituto de Nutrição Josué de Castro
IQ	Instituto de Química
IMPPG	Instituto de Microbiologia Professor Paulo Góes
LBNA	Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Classificação dos fitoquímicos dietéticos..... 21

Figura 2. Estrutura química básica dos ácidos hidroxibenzóicos, dos ácidos hidroxicinâmicos e dos flavonoides..... 22

Figura 3. Estrutura química básica das principais antocianidinas e grupamentos para formação das diferentes antocianinas encontradas na natureza..... 23

Figura 4. Efeito do pH na estrutura das antocianinas..... 24

Figura 5. Estruturas químicas básicas das seis subclasses dos flavonoides..... 25

Figura 6. Estruturas químicas dos ácidos gálico e elágico..... 26

Figura 7. Rota dos compostos fenólicos da dieta e de seus metabólitos..... 27

Figura 8. Desenho esquemático do extrator de sucos por arraste a vapor..... 34

Material e Métodos

Tabela 1. Programação do gradiente de concentração da fase móvel utilizada na análise das antocianinas nos resíduos da jabuticaba..... 40

Tabela 2. Programação do gradiente de concentração da fase móvel utilizada na análise de fenólicos não-antociânicos nos resíduos da jabuticaba..... 41

Tabela 3. Composição do fluido gástrico artificial (por 500 ml de solução)..... 42

Figura 1. Sistema usado na digestão simulada *in vitro*..... 43

Tabela 4. Composição do fluido intestinal artificial (por 500 ml de solução)..... 43

Tabela 5. Composição dos meios utilizados para a diluição das fezes (por 1L de meio)..... 45

Resultados e discussão

Tabela 1. Teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, carboidratos e fibra dietética dos diferentes resíduos……..... 48

Tabela 2. Teores (mg/100 g) de compostos fenólicos solúveis e insolúveis (hidrólises alcalina e ácida) nos resíduos.....……... 50

Figura 1. Teores (mg/100 g, bs) de compostos fenólicos solúveis e insolúveis do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado e do resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor..... 51

Figura 2. Teores totais (mg/100 g, bs) de compostos fenólicos após a etapa gástrica da digestão simulada *in vitro* do resíduo obtido do suco de

jabuticaba despolpado e do resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor..... 52

Figura 3. Teores (mg/100 g, bs) de compostos fenólicos após a etapa gástrica da digestão simulada *in vitro* do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado e do resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor.. 53

Figura 4. Teores totais (mg/100 g, bs) de compostos fenólicos após a etapa intestinal da digestão simulada *in vitro* do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado e do resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor.. 56

Figura 5. Teores (mg/100 g, bs) de compostos fenólicos após a etapa intestinal da digestão simulada *in vitro* do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado e do resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor.. 57

Figura 6. Variação absoluta (mg/100 g, bs) dos teores de compostos fenólicos entre as etapas intestinal e gástrica da digestão simulada *in vitro* do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado e do resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor..... 60

Figura 7. Teores totais (mg/100 g, bs) dos compostos fenólicos após 4 h, 24 h e 48 h de fermentação colônica do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado no meio complexo e no meio pobre em nutrientes..... 61

Figura 8. Teores (mg/100 g, bs) dos compostos fenólicos após 4 h, 24 h e 48 h de fermentação colônica do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado no meio complexo e no meio pobre em nutrientes ....…..... 62

Tabela 3. Área abaixo da curva (mg.h.100 g^{-1}) dos compostos fenólicos ao longo das 48 horas de fermentação colônica no meio pobre em nutrientes e no meio complexo do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado.....…….. 63

Figura 9. Teores totais (mg/100 g, bs) dos compostos fenólicos após 4 h, 24 h, 48 h e 72 h de fermentação colônica do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado no meio complexo.....…….. 64

Figura 10. Teores (mg/100 g, bs) dos compostos fenólicos do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado após 4 h, 24 h, 48 h e 72 h de fermentação colônica com o meio complexo..... 65

Tabela 4. Área abaixo da curva (mg.h.100g^{-1}) dos compostos fenólicos ao longo

das 72 horas de fermentação colônica no meio complexo do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado..... 67

Conclusão

Figura 11. Representação esquemática da via metabólica da quercetina-3-*O*-rutinosídeo e da quercetina presentes no resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado..... 70

Figura 12. Representação esquemática da via metabólica da miricetina-3-*O*-ramnosídeo e da miricetina presentes no resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado..... 71

Figura 13. Representação esquemática da via metabólica das antocianinas presentes no resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado..... 72

Figura 14. Representação esquemática da via metabólica dos ácidos gálico e elágico presentes no resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado..... 73

Introdução

Os compostos fenólicos constituem um grupo de compostos bioativos encontrados em alimentos de origem vegetal e caracterizados por possuírem uma ou mais hidroxilas ligadas a um ou mais anéis aromáticos. Sua presença nas plantas está relacionada à defesa contra a radiação ultravioleta ou à agressão de patógenos (MANACH *et al*., 2004). Estudos realizados em modelos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os compostos fenólicos possuem efeitos benéficos, dentre os quais: a capacidade de inibir a proliferação de células tumorais, proteção contra o estresse oxidativo, potencial anti-inflamatório e melhora da secreção de insulina (DEL RIO *et al*., 2013; DEL RIO; BORGES; CROZIER , 2010; SILVA *et al*., 2008; FERGUSON *et al*., 2004).

Ademais, diversos estudos epidemiológicos sugerem que uma dieta rica em frutas de coloração escura podem reduzir a incidência de doenças cardiovasculares, diabetes e câncer, fato atribuído à presença dos compostos fenólicos nessas frutas, em especial às antocianinas (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). No entanto, para associar os efeitos dos compostos fenólicos no organismo humano é de extrema importância investigar seu metabolismo. Diversos fatores, tais como, ação de enzimas, pH, técnicas de pré-preparo e preparo dos alimentos, interações químicas com outros fitoquímicos e interação de constituintes da matriz alimentar, podem influenciar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade desses compostos (PALAFOX-CARLOS *et al*., 2011; MANACH *et al*., 2004; NIELSEN *et al*., 2003).

Recentemente, tem sido muito investigada a influência das bactérias colônicas no metabolismo dos compostos fenólicos. Os estudos relatam que esses compostos são extensamente metabolizados por essas bactérias gerando metabólitos de baixo peso molecular, que são então absorvidos e, assim, contribuem para o aumento da biodisponibilidade (PIMPÃO *et al*., 2014; CARDONA *et al*., 2013; WILLIAMSON; CLIFFORD, 2010; AURA *et al*., 2005). Portanto, os efeitos benéficos associados aos compostos fenólicos não estão somente relacionados às suas formas intactas encontradas no alimento, mas também aos seus metabólitos (AURA *et al*., 2005).

Apesar da bioacessibilidade e do metabolismo colônico das antocianinas e de outros compostos fenólicos de diferentes matrizes alimentares, tais como casca de uva, maçã, amora, repolho roxo e romã, terem sido investigados, não há estudos acerca desses compostos em frutas nativas brasileiras, tais como a jabuticaba (MOSELE *et al*., 2015; PODSEDEK *et al*., 2014; FERNÁNDEZ; LABRA, 2013; BOUAYED *et al*., 2011; HASSIMOTTO *et al*., 2008). A jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) é uma fruta nativa da Mata Atlântica brasileira, que

apresenta diferentes classes de compostos fenólicos, em especial antocianinas (INADA *et al*., 2015; WU *et al*., 2013; WU *et al*., 2012).

Tradicionalmente, a jabuticaba é consumida na sua forma *in natura*. No entanto, nos locais de seu cultivo também são fabricados produtos tais como geleia, licor e vinho de jabuticaba (WU *et al*., 2012). Apesar disso, grande parte da produção da fruta é descartada devido a sua elevada perecibilidade. Nesse sentido, a produção de suco de jabuticaba se torna uma alternativa para minimizar essas perdas, além de oferecer uma nova forma de consumo da mesma.

Diferentes métodos de extração podem ser empregados para obtenção de sucos de fruta, sendo o despolpamento tradicional o mais utilizado em virtude da simplicidade. Através desse processamento a polpa é separada da casca e da semente, gerando um resíduo no qual grande parte dos compostos bioativos fica retido. Com o objetivo de extrair substâncias de aroma e antocianinas, de maneira a produzir um suco com atributos sensoriais desejáveis e, ao mesmo tempo, obter um produto microbiologicamente seguro, algumas indústrias, em especial a de suco de uva, tem utilizado o processamento por arraste a vapor (ANJOS, 1999).

Ainda assim, para a elaboração de suco de jabuticaba por meio de ambos os processamentos, as cascas e as sementes seriam desprezadas, o que geraria grande quantidade de resíduo, visto que juntas essas frações representam aproximadamente 50% do peso da fruta (LIMA *et al*., 2008). Portanto, torna-se relevante investigar as modificações ocorridas durante o processo de digestão simulada *in vitro* bem como o metabolismo colônico dos compostos fenólicos presentes em resíduos de suco de jabuticaba, como forma de contribuir para o aproveitamento integral desta fruta e a sua valorização econômica. Esses resíduos poderiam ser aproveitados para outros fins, tais como a produção de ingredientes funcionais e extratos ricos em compostos fenólicos.

Revisão Bibliográfica

1. Compostos fenólicos

Os fitoquímicos são definidos como compostos bioativos não-nutrientes de plantas e têm sido relacionados a redução do risco de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), podem ser classificados como: carotenoides, compostos fenólicos, alcaloides, compostos não-nitrogenados e compostos organosulfurados (**Figura 1**). Os fitoquímicos mais estudados são os compostos fenólicos e os carotenoides. Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas e são caracterizados por possuírem uma ou mais hidroxilas ligadas a um ou mais anéis aromáticos. Eles podem ser classificados pelo número e posição de seus átomos de carbono e são comumente encontrados conjugados a açúcares e ácidos orgânicos. São abundantes na nossa dieta e evidências científicas demonstram seu papel na prevenção de diversas doenças, como câncer e doenças cardiovasculares. Estes compostos são divididos em duas classes, a saber, os flavonoides (que incluem as subclasses flavonóis, flavonas, isoflavonas, antocianidinas, flavanóis e flavanonas) e os não-flavonoides (que incluem os derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico) (**Figura 2**) (MANACH *et al.*, 2004).

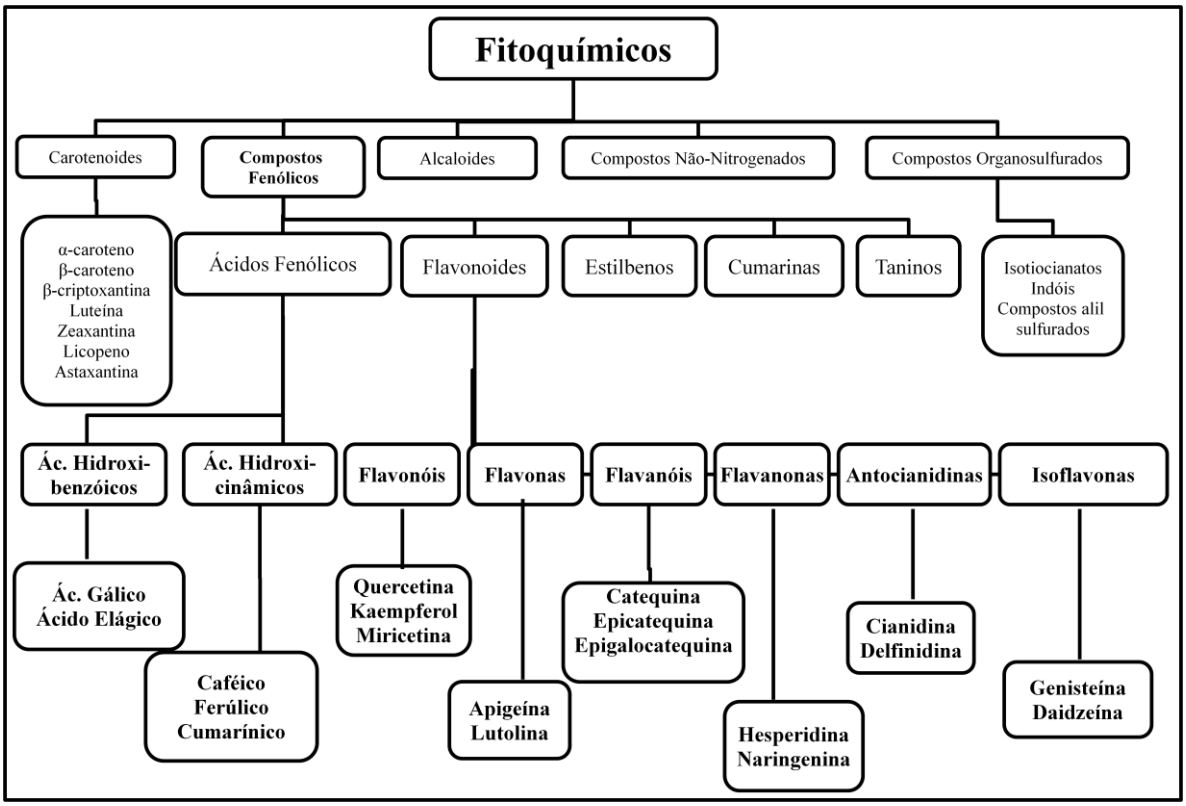


Figura 1.Classificação dos fitoquímicos dietéticos (Adaptado de LIU, 2004).

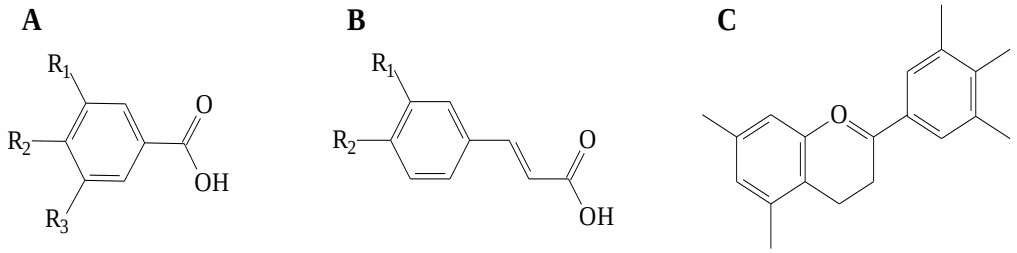


Figura 2. Estrutura química básica dos ácidos hidroxibenzóicos (A), dos ácidos hidroxicinâmicos (B) e dos flavonoides (C) (Adaptado de MANACH *et al*., 2004).

A maior parte dos compostos fenólicos está presente nos alimentos nas formas solúvel e insolúvel, os quais estão ligados covalentemente a açúcares ou componentes da parede, tais como celulose, hemicelulose, lignina, pectina e proteínas estruturais. Os ácidos fenólicos formam ligações éter com ligninas por meio dos seus grupos hidroxilas presentes no anel aromático e ligações éster com proteínas e carboidratos estruturais por meio de seu grupo carboxílico. As hidrólises ácida e alcalina são capazes de liberar esses compostos fenólicos. O tratamento ácido rompe principalmente ligações glicosídicas e solubiliza os açúcares, enquanto que, geralmente, deixa as ligações éster intactas. A hidrólise alcalina rompe as ligações éster de compostos fenólicos conjugados a constituintes da parede celular, como os polissacarídeos (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

1.1. Antocianinas

As antocianinas são o maior grupo dos flavonoides, consistindo de 15 carbonos, com um anel benzeno ligado a um anel heterocíclico formado com um átomo de oxigênio e um grupo fenil na posição 2. São pigmentos hidrossolúveis com elevado poder antioxidante, amplamente distribuídos em frutas e vegetais de coloração escura, principalmente na casca. As formas agliconas (antocianidinas) raramente são encontradas em plantas e estão geralmente presentes na forma glicosilada (3-*O*-glicosídeo ou 3,5-*O*-diglicosídeo). Existem seis principais formas agliconas das antocianinas (delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina, pelargonidina e malvidina), sendo a cianidina a mais comum em alimentos. A acilação com ácidos cinâmicos também é comum, formando os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico (WU *et al*., 2013; MANACH *et al*., 2004; CLIFFORD, 2000) (**Figura 3**).

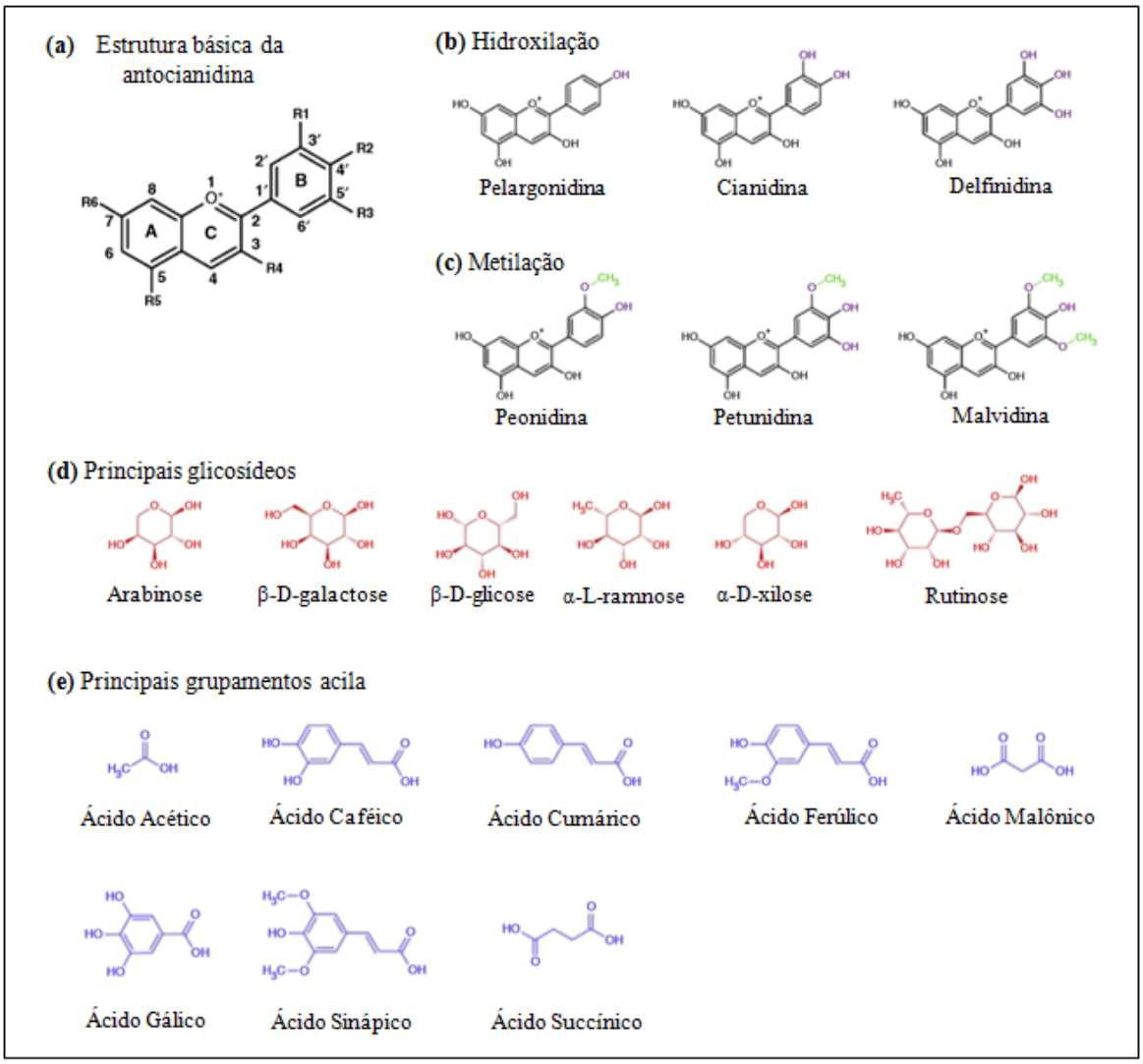


Figura 3. Estrutura química básica das principais antocianidinas e grupamentos para formação das diferentes antocianinas encontradas na natureza (ZHANG; BUTELLI; MARTIN, 2014).

As estruturas das antocianinas são dependentes do pH do meio (**Figura 4**). O cátion flavílio vermelho predomina em faixas de pH entre 1,0 e 3,0. Quando o pH aumenta para 4,0 ou acima, e subsequentemente há perda de prótons, a estrutura molecular predominante é a pseudobase carbinol ao lado das formas pseudobase chalcona e base quinoidal (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

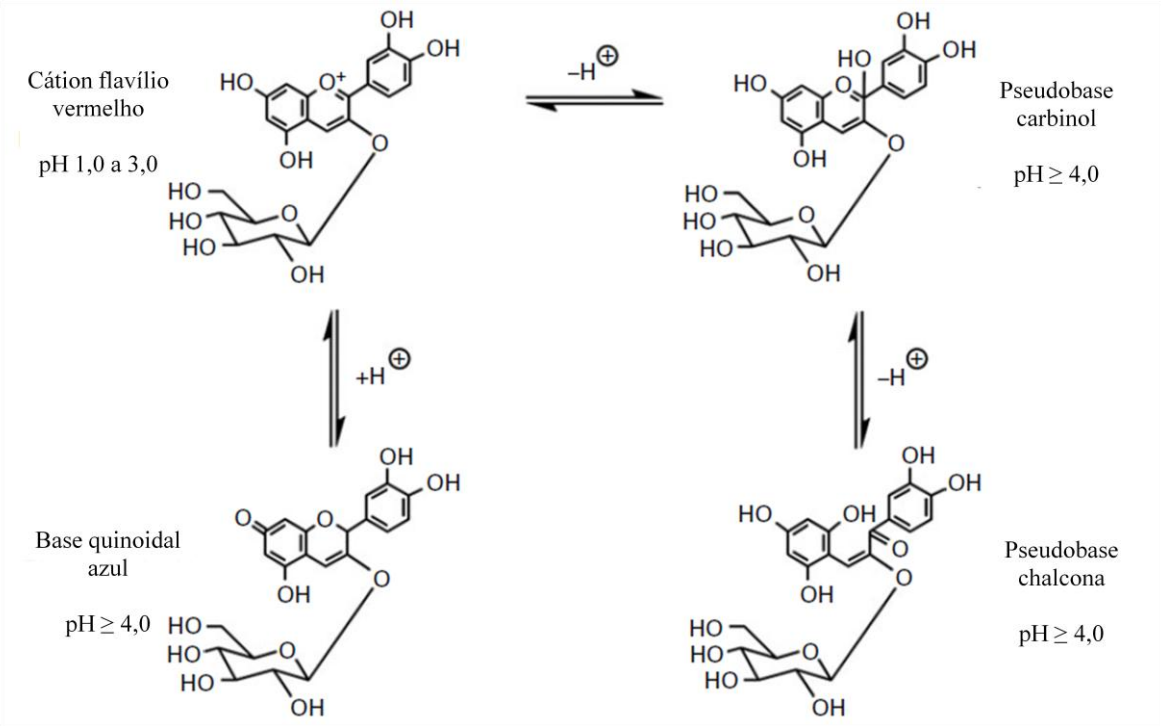


Figura 4. Efeito do pH na estrutura das antocianinas (Adaptado de DEL RIO; BORGES; CROZIER , 2010).

1.2. Outros flavonoides

Além das antocianinas, outras 5 subclasses constituem o grupo dos flavonoides (**Figura 5**). Os flavonóis são os flavonoides mais amplamente distribuídos nos alimentos, embora encontrado em pequenas quantidades. A maioria se apresenta na sua forma glicosilada, sendo a glicose e a ramnose os principais açúcares (como por exemplo, a miricetina-3-*O*-ramnosídeo e a quercetina-3-*O*-glicosídeo). As principais fontes são cebolas, maçã, chá e brócolis (WILLIAMSON; MANACH, 2005; MANACH *et al*., 2004).

As flavonas são menos comuns que os flavonóis em frutas e vegetais, consistindo principalmente de glicosídeos de luteolina e apigenina. Flavonas polimetoxiladas são os mais hidrofóbicos flavonoides. As fontes mais importantes dessa subclasse são aipo e salsa, sendo também encontrada em cereal, como o trigo, na sua forma glicosilada (MANACH *et al*., 2004).

Os flavanóis ou flavan-3-ols não são encontrados glicosilados em alimentos, ao contrário das outras subclasses de flavonoides. Seu grupo inclui as catequinas e proantocianidinas (taninos condensados). As catequinas são encontradas principalmente no

chá verde e chocolate e as proantocianidinas estão presentes em uvas, vinho e maçãs (MANACH *et al*., 2004).

As flavanonas estão geralmente glicosiladas a um dissacarídeo na posição 7, sendo naringerina (toranja), hesperidina (laranja) e eriodictiol (limão) as principais agliconas. São encontradas em tomates e algumas plantas aromáticas, como a menta, mas estão presentes em alta concentração somente em frutas cítricas (MANACH *et al*., 2005; MANACH *et al*., 2004).

As isoflavonas são consideradas fitoestrógenos, encontradas particularmente em leguminosas, sendo genisteína, daidzeína e gliciteína as principais formas agliconas. Soja e seus produtos são as principais fontes e estão presentes na forma glicosídica, mas em alguns produtos fermentados encontram-se formas agliconas (WILLIAMSON; MANACH, 2005; MANACH *et al*., 2004).

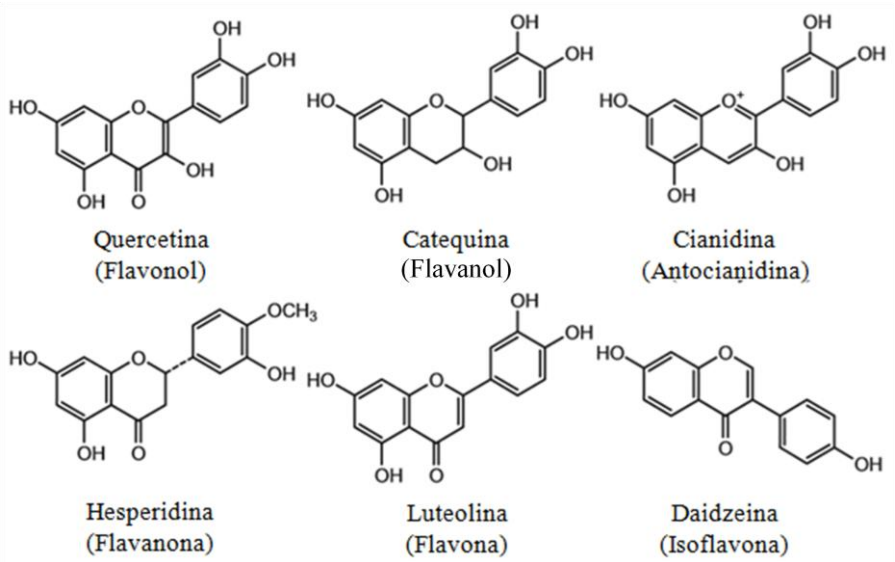


Figura 5. Estruturas químicas básicas das seis subclasses dos flavonoides (HE, GIUSTI, 2010).

1.3. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são divididos em duas classes, os ácidos hidroxicinâmicos e os ácidos hidroxibenzóicos. Os ácidos *p*-cumárico, caféico e ferúlico são os mais comuns ácidos hidroxicinâmicos e raramente são encontrados na sua forma livre nos alimentos. As formas conjugadas são glicosiladas ou formadas por ligações éster. A ligação do ácido caféico com o ácido quínico forma o ácido clorogênico, encontrado em elevada concentração no café.

O conteúdo de ácidos hidroxibenzóicos em vegetais é geralmente pequeno, com exceção de algumas frutas vermelhas, cebolas e chás. Os ácidos gálico e elágico são exemplos de ácidos hidroxibenzóicos (**Figura 6**), que podem estar presentes na forma livre ou como componentes de complexas estruturas, os taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos). Galotaninos estão presentes em frutas como manga e elagitaninos estão presentes em frutas vermelhas, como morango, framboesa e amora (MANACH *et al*., 2004).

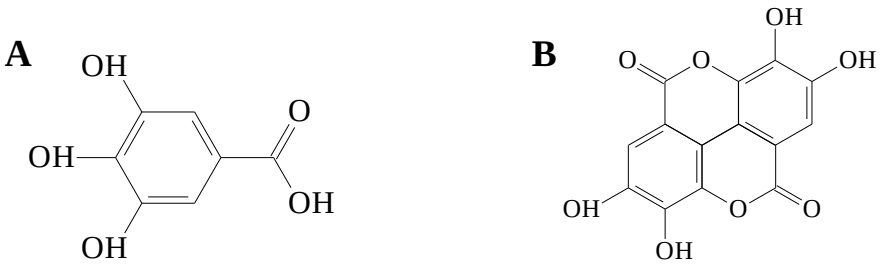


Figura 6. Estrutura química dos ácidos gálico (A) e elágico (B).

2. Bioacessibilidade e biodisponibilidade dos compostos fenólicos

Os potenciais efeitos benéficos dos compostos fenólicos na saúde humana não dependem somente de sua concentração nos alimentos, mas principalmente de sua bioacessibilidade e biodisponibilidade após a ingestão. Biodisponibilidade é definida como a proporção de determinado composto ou nutriente que é digerida, absorvida e utilizada no metabolismo normal. O primeiro fator importante determinante a ser considerado quando se avalia a biodisponibilidade de compostos fenólicos é a sua bioacessibilidade, termo utilizado para definir a quantidade do composto que estará disponível para ser absorvida no intestino após o processo de digestão (PALAFOX-CARLOS *et al*., 2011).

A absorção e transporte de compostos bioativos presentes em vegetais, de maneira geral, são complexos. As agliconas podem ser absorvidas no intestino delgado. No entanto, a maior parte dos compostos fenólicos presentes nos alimentos está na sua forma conjugada (éster, glicosídeos ou polímeros), que não pode ser absorvida diretamente. Essas formas precisam ser hidrolisadas por enzimas intestinais presentes na borda em escova ou pela microflora colônica para serem absorvidas. Estima-se que somente 5 a 10% dos compostos fenólicos ingeridos são absorvidos no intestino delgado, sendo assim, a maior parte segue para o intestino grosso (MANACH *et al*., 2005; MANACH *et al*., 2004).

Os compostos fenólicos que são absorvidos no intestino delgado podem ser submetidos à biotransformações de fase I (oxidação, redução e hidrólise) e particularmente de fase II (metilação, sulfatação e glucuronidação) nos enterócitos e em seguida nos hepatócitos, resultando em metabólitos conjugados hidrossolúveis. Estes metabólitos são liberados para a circulação sistêmica, distribuídos para os tecidos e eliminados via urina. Os compostos fenólicos que são secretados via rota biliar até o duodeno, podem ser submetidos à ação de enzimas, especialmente β-glucuronidase, na parte distal do intestino, podendo ser reabsorvidos ou seguir para o cólon (CARDONA *et al*., 2013; MANACH *et al*., 2005; MANACH *et al*., 2004). Os 90 a 95% dos compostos fenólicos ingeridos que alcançam o intestino grosso são extensamente metabolizados pela microbiota colônica, podendo ser absorvidos e atingir a circulação sistêmica ou exercer efeitos benéficos no próprio intestino (DEL RIO *et al*., 2010; MANACH *et al*., 2005) (**Figura 7**).

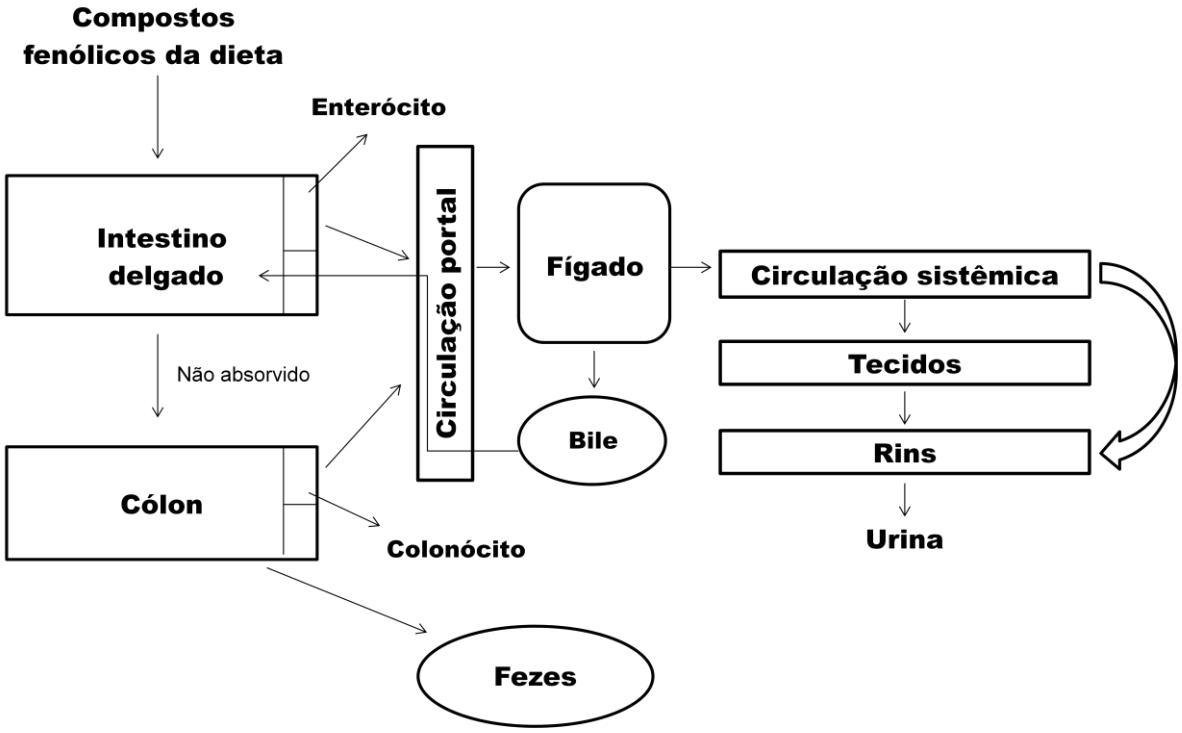


Figura 7. Rota dos compostos fenólicos da dieta e de seus metabólitos (Adaptado de CARDONA *et al*., 2013).

3. Digestão simulada *in vitro*

Muitos estudos têm utilizado métodos de digestão simulada *in vitro* para avaliar mudanças estruturais, bioacessibilidade e digestibilidade de alimentos e seus componentes. Os modelos de digestão simulada *in vitro* são uma alternativa aos modelos animais e humano. Embora os modelos *in vivo* proporcionem resultados mais fidedignos, requerem mais tempo e elevado custo (HUR *et al*., 2011).

A maioria dos estudos *in vitro* considera somente duas etapas para mimetizar o processo de digestão, a do estômago e a do intestino delgado. Os modelos são baseados na incubação com pepsina para simular a fase estomacal e em seguida de pancreatina para simular a fase intestinal. Essas enzimas requerem a presença de componentes adicionais nos fluidos digestivos para operarem eficientemente, como no caso da pancreatina que requer a presença de cálcio e sais biliares. É importante ressaltar que o preparo das soluções enzimáticas deve ser realizado pouco tempo antes de cada análise, pois a atividade enzimática pode diminuir ao longo do tempo. O uso da temperatura a 37°C durante as etapas da digestão *in vitro* é consenso para a maioria dos estudos, enquanto que a concentração e composição enzimática variam de acordo com a matriz alimentar investigada. Quanto ao tempo de incubação, de maneira geral, os estudos utilizam de 1 a 2 horas de incubação para a fase gástrica e 2 horas para a fase intestinal, conforme fisiologia humana (MOSELE *et al*., 2015; FERNÁNDEZ; LABRA 2013; HUR *et al*., 2011; OOMEN *et al*,. 2003).

Sendo assim, as características da digestão *in vitro* como: tempo de incubação, uso de enzimas específicas bem como fluidos digestivos podem ser ajustadas de acordo com as características da amostra a ser analisada (HUR *et al*., 2011).

4. Fermentação colônica

A complexidade dos sistemas de fermentação *in vitro* varia de simples batelada a modelos de fluxo contínuo (equipamentos que simulam cada parte do cólon), com o uso de diferentes técnicas de inoculação fecal. A escolha do sistema depende do objetivo e do tempo necessário para incubação. A fermentação tipo batelada permite a utilização de uma única ou várias populações de bactérias ou ainda de material fecal, em um meio cuidadosamente selecionado, sem a adição de mais nutrientes ao longo do processo. Este tipo de fermentação ocorre, geralmente, em sistema fechado e sob condições anaeróbias. Particularmente, essa

técnica é utilizada para investigar o metabolismo de componentes provenientes da dieta pela microbiota intestinal. Ademais, este sistema é menos dispendioso que outros tipos mais complexos de fermentação. No entanto, sua limitação é quanto ao período de tempo de incubação, o qual consiste em poucos dias em relação a outros sistemas que permitem a manutenção da microbiota por um tempo maior, variando de dias até semanas (PAYNE *et al*., 2012; MACFARLANE, MACFARLANE, 2007).

Quanto ao uso de amostras de fezes, Aguirre *et al*. (2012) avaliaram a estabilidade e atividade da microbiota em estudos de fermentação *in vitro* com o uso de amostra de fezes individuais de doadores ou em forma de *pool*. Eles concluíram que a preparação de um *pool* a partir de amostras de fezes de vários doadores pode ser utilizado para experimentos de fermentação, pois o perfil e atividade da comunidade bacteriana foram considerados adequados quando comparados a amostras de fezes individuais (AGUIRRE *et al*., 2012; AURA *et al*., 2005)

4.1. Microbiota colônica humana

Há um crescente interesse na microbiota colônica humana e como suas atividades metabólicas impactam na saúde. A microbiota humana protege contra enteropatógenos, extrai nutrientes e energia dos alimentos e é extremamente variável no hospedeiro e entre hospedeiros (LOZUPONE *et al*., 2012; MACFARLANE, MACFARLANE, 2007). O trato intestinal de humanos abriga uma comunidade microbiana complexa, com cerca de 100 trilhões de células, excedendo o número de células humanas (BACKRED *et al*., 2005).

A microbiota começa a ser formada no nascimento, quando o intestino é imediatamente colonizado por bactérias provenientes da mãe e do ambiente. Influências externas podem causar modificações na microbiota ao longo da vida, tais como: mudanças na alimentação, infecções bacterianas e uso de antibióticos. Desequilíbrios na microbiota têm sido relacionados com obesidade, doenças inflamatórias intestinais, desordens neurológicas e câncer ((KOTTE *et al*., 2012; LOZUPONE *et al*., 2012).

A maioria dos estudos sobre o microbioma intestinal humano é realizado por meio da análise da microbiota fecal humana, devido a fácil aquisição, mínimo custo e por ser menos invasivo. As bactérias são os principais microrganismos presentes na microbiota, mas também são encontrados fungos, vírus e *archaea*. Recentes estudos de fezes humanas e biópsia do cólon humano revelaram 9 diferentes filos, e o projeto microbioma humano, o mais completo estudo da microbiota humana, estimou que o intestino possui aproximadamente

1.150 espécies de bactérias (DAVE *et al*., 2012; ARUMUGAM *et al*., 2011; TURNBAUGH *et al*., 2007; BACKRED *et al*., 2005; ECKBURG *et al*., 2005).

Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobactéria, Fusobactéria, Proteobactéria, Verrucomicrobia, Cianobactéria, Espiroquetas e VadinBE97, são os diferentes filos encontrados. Os filos dominantes correspondem aos Firmicutes (Gram-positivo) e Bacteroidetes (Gram-negativo), que juntos correspondem a aproximadamente 90% da microbiota humana (DAVE *et al*., 2012; LOZUPONE *et al*., 2012).

4.2. Bactérias colônicas e compostos fenólicos

As bactérias colônicas estão envolvidas em extensivas modificações na estrutura de compostos fenólicos a uma série de metabólitos de baixo peso molecular. Esses metabólitos quando absorvidos podem exercer efeitos benéficos na saúde, tanto quanto seus compostos de origem encontrados nos alimentos, ou podem exercer efeitos na própria microbiota colônica que os metabolizou. Os metabólitos gerados podem modular e causar mudanças na população de bactérias por seletivos efeitos prebióticos e atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos (CARDONA *et al*., 2013).

Alguns estudos têm demonstrado a influência dos compostos fenólicos e de seus metabólitos nas bactérias. Boto-Ordóñez *et al*. (2014) observaram, em um ensaio clínico randomizado, que metabólitos de antocianinas podem estimular a colonização instestinal por bactérias benéficas, principalmente *Bifidobacterium spp.* Pereira *et al*. (2016) avaliou a ação do extrato da casca de jabuticaba na manutenção de bactérias presentes em um queijo *Petit Suisse* probiótico. A adição do extrato ocasionou menor decréscimo na contagem de *Lactobacillus acidophilus* e não afetou a contagem de *Bifidobacterium lactis*, sendo uma potencial opção na diminuição do estresse oxidativo deste produto e na manutenção dos microrganismos benéficos à saúde humana.

5. Jabuticaba *(Myrciaria jaboticaba*)

5.1. Botânica, cultivo e consumo

A jabuticabeira (*Myrciaria* sp.), árvore nativa da mata atlântica, pertencente a família *Myrtaceae* e ao gênero *Myrciaria*, também denominado de *Plinia*. Originária do Centro, Sul e

Sudeste do Brasil, sendo encontrada também em outros países como Argentina, Paraguai, Bolívia e países da América Central. A jabuticaba, sua fruta, amadurece rapidamente entre 40 a 60 dias, sendo não-climatérica, possui de 2 a 3 cm de diâmetro e de 1 a 4 sementes. (GURAK *et al*., 2014; WU; LONG; KENNELLY; 2013; CITADIN *et al*., 2010).

Possui casca de coloração escura e frágil, com uma polpa de cor branca levemente ácida e doce. Existem diversas espécies descritas na literatura, sendo que apenas três tem dispersão natural e em cultivos no Brasil: *Myrciaria trunciflora* (Berg) Mattos (jabuticaba-de-cabinho); *Myrciaria cauliflora* (DC.) Berg (jabuticaba-paulista, ponhema ou assu) e *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg (jabuticaba-sabará), sendo esta a mais cultivada e conhecida, principalmente nos Estados de Minas Gerais e São Paulo (WU; LONG; KENNELLY; 2013; CITADIN *et al*., 2010).

A jabuticaba apresenta grande potencial de comercialização, tanto pelo seu consumo *in natura*, quanto pelos seus produtos. Nos locais de seu cultivo são fabricados geleia, licor e vinho de jabuticaba. Ademais, pode ser aproveitada pela indústria farmacêutica e de alimentos, devido ao seu elevado teor de compostos antioxidantes. No entanto, grande parte da produção da fruta é descartada devido a sua elevada perecibilidade, pois possui vida útil muito curta depois de colhida, de aproximadamente três dias, o que prejudica sua comercialização (WU *et al*., 2012; CITADIN *et al*., 2010; LIMA *et al*., 2008).

5.2. Composição nutricional

A composição nutricional da jabuticaba e de suas frações já foi caracterizada por alguns autores. Os valores de carboidratos variaram de 75,97 a 90,1% (base seca) (bs) para a fruta inteira, 90,32 a 93,1% para a polpa e de 84,23 a 87,9% para o resíduo (casca e semente). Os valores de umidade variaram de 79,41 a 87,4% para a fruta inteira, já para a polpa e o resíduo, variaram de 84,95 a 90,7% e de 76,6 a 86%, respectivamente. Os valores de proteínas para a fruta inteira, polpa e resíduo variaram de 0,78 a 5,0% (bs), 0,47 a 3,5% (bs) e 1,26 a 7,5% (bs), respectivamente. Os valores de lipídios para a fruta inteira, polpa e resíduo variaram de 0,42 a 1,8% (bs), 0,06 a 0,2% (bs) e 0,5 a 0,63%, respectivamente. Os valores de fibra dietética total variaram de 9,26 a 38% para a fruta inteira, 0 a 5,23% (bs) para a polpa e 20,54 a 36,1% (bs) para o resíduo. Os valores de cinzas para estas mesmas frações variaram, respectivamente, de 2,95 a 3,82% (bs), 2,71% a 3,2 % (bs) e 2,38 a 4,2% (bs) (INADA *et al.*, 2015; GURAK *et al.*, 2014; LIMA *et al*., 2008).

Quanto aos micronutrientes, foram identificados ao todo 14 minerais na jabuticaba, sendo considerada uma boa fonte de cálcio, ferro, cobre, manganês, magnésio, potássio e fósforo. Apresenta em sua composição algumas vitaminas, como a vitamina C, E, B1, B2, mas em pequena quantidade. Já a vitamina A, está presente em quantidade considerável na fruta (LIMA *et al*., 2011; WU; LONG; KENNELLY; 2013; INADA *et al.*, 2015).

5.3. Compostos fenólicos

Trinta e dois compostos fenólicos já foram identificados na jabuticaba, sendo as antocianinas os compostos predominantes e responsáveis pela cor arroxeada da casca. Foram identificadas 5 antocianinas na fruta: peonidina, peonidina-3-*O*-glicosídeo, piranocianina B, cianidina-3-*O*-glicosídeo e delfinidina-3-*O*-glicosídeo, sendo as duas últimas as principais antocianinas encontradas. Flavonoides, depsídeos, ácidos fenólicos, galotaninos e elagitaninos também foram identificados na fruta, sendo estes dois últimos presentes em quantidades consideráveis em relação a outras frutas da mesma família (INADA *et al*., 2015; WU; LONG; KENNELLY; 2013; WU *et al*., 2012; REYNERTSON *et al*., 2006).

Na literatura, os teores de cianidina-3-*O*-glicosídeo variaram de 280 a 433 mg/100 g (bs) e de delfinidina-3-*O*-glicosídeo variaram de 48 a 81 mg/100 g (bs) para a fruta inteira. Os maiores valores foram encontrados na casca, variando de 1261,0 a 1963,6 mg/100 g (bs) para a cianidina-3-*O*-glicosídeo e de 269,0 a 634,8 mg/100 g (bs) para delfinidina-3-*O*-glicosídeo. (INADA *et al*., 2015; LEITE-LEGATTI *et al*., 2012; REYNERTSON *et al*., 2006). Quanto ao resíduo (casca e semente), Inada *et al*. (2015) relataram teores intermediários entre a fruta inteira e a casca, sendo 707 mg/100 g (bs) e 157 mg/100 g (bs) para as duas antocianinas, respectivamente.

5.4. Propriedades benéficas na saúde

Os compostos fenólicos são apontados como os responsáveis pela bioatividade e potenciais efeitos benéficos da fruta, em especial as antocianinas (INADA *et al*., 2015; WU; LONG; KENNELLY; 2013). A jabuticaba apresenta elevada atividade antioxidante e anti-inflamatória (ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012; REYNERTSON *et al*., 2008; REYNERTSON *et al*., 2006). Alguns estudos têm investigado os potenciais efeitos benéficos associados à jabuticaba nas DCNT e suas complicações. Leite *et al*. (2011) observaram aumento da atividade antioxidante plasmática em modelo animal *in vivo* após o consumo de

casca de jabuticaba, efeito atribuído à presença das antocianinas. Reynertson *et al*. (2006) demonstraram que depsídeos e antocianinas presentes na fruta podem reduzir a produção de IL-8 (interleucina 8), tendo potencial efeito anti-inflamatório no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).

Leite-Legatti *et al*. (2012) reportaram efeito antiproliferativo de extratos da casca de jabuticaba em células de câncer de leucemia (K-562) e próstata (PC-3). Lenquiste *et al*. (2012) também relataram potenciais efeitos benéficos da jabuticaba no tratamento da obesidade e resistência à insulina, além de ser capaz de aumentar o HDL colesterol. Alezandro; Granato; Genovese (2013) demonstraram que o consumo de jabuticaba por ratos diabéticos em um período de 40 dias resultou na melhora do perfil lipídico e diminuição no estresse oxidativo.

6. Tipos de processamentos de sucos

Diferentes métodos de extração podem ser empregados para obtenção de sucos de frutas. Dentre eles, destaca-se o despolpamento tradicional, que é utilizado para extrair a polpa da fruta do material fibroso, das sementes e das cascas, é um método simples e o mais utilizado. Esse processamento consiste em fazer com que a fruta passe, descascada ou não, inteira ou já desintegrada, pela despolpadeira. A polpa deve ser recolhida pela parte de baixo do equipamento, enquanto que os resíduos sólidos ficam retidos no mesmo (MATTA *et al*., 2005).

Outro método de extração, muito utilizado pela indústria de suco de uva, é o processamento de suco por arraste a vapor. Nesse método a fruta é submetida ao cozimento em atmosfera com vapor d’água saturado. A adequada manipulação, de acordo com as boas práticas de fabricação, permite ser acondicionado em garrafas de vidro estéreis e armazenado em temperatura ambiente, pois o processamento resulta em suco pasteurizado. O aparelho extrator é composto por um conjunto de três panelas superpostas, que se encaixam. O compartimento para as frutas fica dentro do coletor de suco e o conjunto formado por esses dois componentes se encaixa sobre a reentrância do recipiente utilizado para aquecer a água (**Figura 8**) (ANJOS, 1999; RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998).

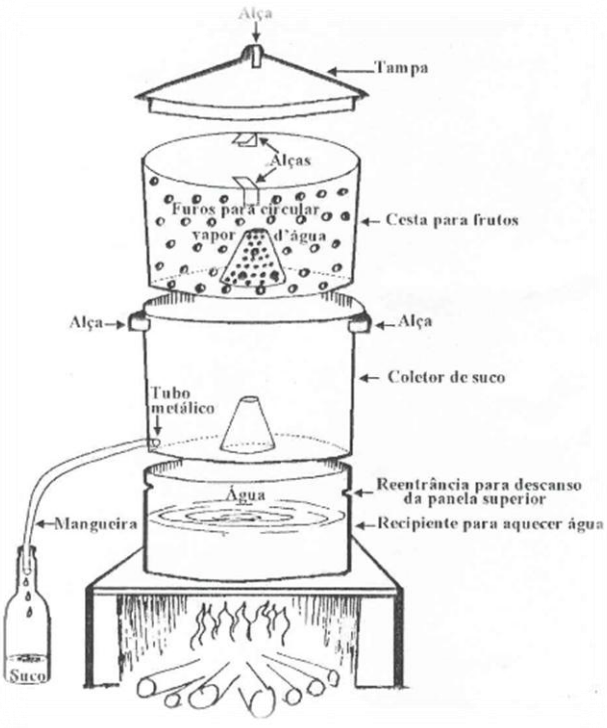


Figura 8. Desenho esquemático do extrator de sucos por arraste a vapor (ANJOS, 1999).

Objetivos

OBJETIVO GERAL:

Investigar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos de resíduos provenientes da produção de suco de jabuticaba por meio de modelos de digestão simulada *in vitro* e fermentação colônica *ex vivo*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a composição centesimal dos resíduos provenientes da obtenção de suco de jabuticaba obtidos por despolpamento e por arraste a vapor;
- Investigar o perfil e os teores de compostos fenólicos solúveis e insolúveis dos resíduos;
- Investigar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos dos resíduos em condições de digestão simulada *in vitro*;
- Avaliar o efeito do meio de fermentação e o metabolismo colônico dos compostos fenólicos do resíduo proveniente do despolpamento da jabuticaba através de modelo de fermentação *ex vivo*;

Material e Métodos

1. Reagentes, padrões e solventes

Os reagentes pepsina gástrica suína, pancreatina suína, bile suína, albumina bovina, resazurina, cisteína, peptona, extrato de levedura, pectina, xilana, goma arábica, amido de batata, caseína e inulina foram adquiridos de Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Os padrões externos de cianidina-3,5-di-*O*-glicosídio, cianidina-3-*O*-galactosídeo, cianidina-3-*O*-glicosídio, cianidina-3-*O*-rutinosídio, delfinidina-3-*O*-glicosídio, cianidina, malvidina, delfinidina e pelargonidina foram adquiridos de Indofine Chemical Co. (Hillsborough, NJ, USA). Os padrões externos de naringenina, rutina, miricetina, quercetina, miricitrina e os ácidos gálico, 3,4-dihidroxifenilacético, vanílico, elágico, siríngico, 2,4-dihidroxibenzóico, cafeico, ferúlico, *m*-cumárico, 5-cafeoilquínico, *p*-cumárico, rosmarínico, benzóico, salicílico, 3,4-dihidroxibenzóico e 4-hidroxifenilacético foram adquiridos de Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Todos os solventes foram grau HPLC adquiridos de Tedia (Fairfield, OH, USA). Foi utilizada água grau HPLC (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, USA).

2. Obtenção e separação da matéria-prima

As amostras de jabuticaba foram adquiridas, no período da safra (novembro de 2014), na central de abastecimento do Estado do Rio de Janeiro (CEASA, RJ). As frutas foram selecionadas (maduras e íntegras), lavadas e sanitizadas em solução de hipoclorito de sódio a 100 ppm durante 15 minutos. Como parte de outro projeto, foi elaborado o suco pelas técnicas de despolpamento e arraste a vapor e os resíduos (casca e semente) gerados foram embalados à vácuo e armazenados a -20 °C até o momento de sua utilização. Essa dissertação faz parte de um projeto mais amplo de investigação química e do uso tecnológico da jabuticaba, que parte da premissa de uso integral da matéria-prima.

3. Determinação da composição centesimal

Os teores de umidade, resíduo mineral fixo, proteína, lipídeo e fibra dietética nos resíduos liofilizados foram determinados em triplicata de acordo com os métodos oficiais, sendo considerado o fator de conversão de 6,25 para determinação dos teores de proteínas (AOAC, 2000). Os teores de carboidratos foram calculados pela diferença entre 100% e a

soma das porcentagens de umidade, cinzas, proteína, fibra e lipídeos totais. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos (LBNA) do Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4. Determinação dos teores e do perfil de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.1. *Extração das amostras*

A extração dos compostos fenólicos solúveis e insolúveis nos resíduos foi realizada em triplicata de acordo com metodologia adaptada de Mattila & Kumpulainen (2011). Para a extração, os resíduos foram liofilizados e moídos em moinho laboratorial (A11, IKA®).

Para a extração dos compostos fenólicos solúveis, aproximadamente 1 g de amostra foi extraída com 20 mL de solução gelada de etanol:água (80:20, *v*/*v*) por 10 minutos através de agitação em vórtex. Posteriormente foram centrifugadas (2500 ×*g*, 5 minutos, 10 ºC) (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific™). O sobrenadante foi coletado e o precipitado re-extraído. Os sobrenadantes coletados foram reunidos, evaporados em rotaevaporador (R-215, Büchi®) e o precipitado seco reconstituído com 20 mL de água Milli-Q.

A extração dos fenólicos insolúveis foi realizada por meio de hidrólise alcalina e hidrólise ácida. Para realizar a hidrólise alcalina, o precipitado obtido da extração dos compostos fenólicos solúveis foi incubado com 12 mL de água destilada e 5 mL de NaOH 10M sob agitação a temperatura ambiente e no escuro por 16 horas (IKA KS 4000i control). Após esse período, o pH foi ajustado para 2,0 e a mistura extraída por 30 segundos com 15 mL de acetato de etila. Após centrifugação (2500 ×*g*, 5 minutos, 10 ºC) o sobrenadante foi coletado e o precipitado re-extraído mais duas vezes. Os sobrenadantes foram reunidos, evaporados e o precipitado seco reconstituído em 10 mL de solução metanol:água (80:20, *v*/*v*).

Para realizar a hidrólise ácida, o precipitado obtido após a hidrólise alcalina foi incubado com 2,5 mL de HCl concentrado a 85 ºC por 30 minutos. Após, o mesmo processo de extração com acetato de etila descrito para a hidrólise alcalina foi realizado.

Todos os extratos obtidos foram armazenados a -20 °C até o momento da análise e filtrados em membrana de éster de celulose de 0,45 µm antes das análises por CLAE.

4.2. Condições cromatográficas

A identificação e a quantificação dos compostos fenólicos (antocianinas e não-antociânicos) foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em sistema de cromatografia líquida (Shimadzu®) que incluiu uma bomba quaternária LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, sistema CBM-20A como controlador e degaseificador DGU-20A5, foi realizada no Laboratório de Alimentos Funcionais (LABAFS) do Instituto de Nutrição Josué de Castro (INJC) da UFRJ.

4.2.1. Antocianinas

A separação cromatográfica dos analitos foi obtida utilizando-se uma coluna de CLAE de fase reversa C18 (5 μm, 250 mm × 4,6 mm, Kromasil®). A fase móvel consistiu em uma mistura de três soluções: solução aquosa de ácido fórmico 1% (eluente A), solução de ácido fórmico em metanol 1% (eluente B) e acetonitrila (eluente C). O eluente foi monitorado a 530 nm e o gradiente de concentração da fase móvel foi programado de acordo com metodologia descrita por Inada *et al*. (2015) utilizando-se fluxo de 2,0 mL/minuto, conforme apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Programação do gradiente de concentração da fase móvel utilizada na análise das antocianinas nos resíduos da jabuticaba.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Eluente C (%)
0,01	80	18	2
2,00	80	18	2
6,00	66	32	2
8,00	46	52	2
18,00	80	18	2
28,00	80	18	2

Os padrões externos de cianidina-3,5-di-*O*-glicosídio, cianidina-3-*O*-galactosídeo, cianidina-3-*O*-glicosídio, cianidina-3-*O*-rutinosídio, delfinidina-3-*O*-glicosídio, cianidina, malvidina, delfinidina e pelargonidina foram injetados na forma de *pool* para a identificação dos mesmos e para a elaboração da curva de calibração. Os dados de integração foram adquiridos pelo *software* LC solution (Shimadzu Corporation®, version 1.25, 2009).

4.2.2. Compostos fenólicos não-antociânicos

A separação cromatográfica dos analitos foi obtida utilizando-se uma coluna de CLAE de fase reversa C18 (5 µm, 250 mm × 4,6 mm, Phenomenex®). A fase móvel consistiu em uma mistura de duas soluções: solução aquosa de ácido fórmico 0,3% (eluente A) e metanol 100% (eluente B). O eluente foi monitorado na faixa de 190 a 370 nm e o gradiente de concentração da fase móvel foi programado conforme descrito por Inada *et al*. (2015), com modificações, utilizando-se fluxo de 1,0 mL/minuto, conforme apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Programação do gradiente de concentração da fase móvel utilizada na análise de compostos fenólicos não-antociânicos nos resíduos da jabuticaba.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0,01	84,0	16,0
8,00	76,0	24,0
12,00	74,6	25,4
20,00	74,0	26,0
30,00	60,0	40,0
40,00	45,0	55,0
50,00	20,0	80,0
52,00	10,0	90,0
52,01	84,0	16,0
62,01	84,0	16,0

Os padrões externos de naringenina, rutina, miricetina, quercetina, miricitrina e os ácidos gálico, 3,4-dihidroxifenialcético, vanílico, elágico, siríngico, 2,4-dihidroxibenzóico, cafeico, ferúlico, *m*-cumárico, 5-cafeoilquínico, *p*-cumárico, rosmarínico, benzóico, salicílico, 3,4-dihidroxibenzóico e 4-hidroxifenilacético foram injetados na forma de *pool* para a identificação dos mesmos e para a elaboração da curva de calibração. Os dados de integração foram adquiridos pelo *software* LC solution (Shimadzu Corporation®, version 1.25, 2009).

5. Digestão simulada *in vitro* e fermentação colônica *ex vivo*

O procedimento de digestão *in vitro* foi realizado no LBNA (IQ/UFRJ) com objetivo de simular as etapas oral, gástrica e intestinal da digestão baseadas na fisiologia humana. Foram testadas e otimizadas, para a matriz em questão, as metodologias descritas por Oomen

et al. (2003) e Fernández & Labra (2013). A fermentação colônica foi realizada de acordo com adaptação de metodologias descrita por Hu *et al*. (2004) e Mosele *et al*. (2015) no Laboratório de Biologia de Anaeróbios do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) da UFRJ. Todas as etapas foram realizadas em triplicata.

5.1. Simulação da fase oral

Em frascos de vidro foram pesados aproximadamente 0,25 g dos resíduos liofilizados e adicionados 2 mL de água e 3 mL de saliva humana, obtida através da doação espontânea por uma voluntária sadia em jejum. Em seguida, os frascos foram incubados a 37 °C por 1 minuto sob agitação orbital a 260 rpm (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific™).

5.2. Simulação da fase gástrica

Nos frascos provenientes da fase oral foram adicionados 2,5 mL de fluido gástrico artificial contendo pepsina gástrica suína (**Tabela 3**) e o pH foi ajustado para 2 com HCl 5M. Em seguida, os frascos foram selados com septo de borracha, a atmosfera foi modificada pela introdução de nitrogênio com o auxílio de um balão de gás conectado a uma seringa (**Figura 1**) e incubados a 37 ºC por 2 horas sob agitação orbital a 260 rpm.

Tabela 3. Composição do fluido gástrico artificial (por 500 mL de solução).

Reagente	Quantidade
NaCl (g)	2,75
NaH_2PO_4 (g)	0,27
KCl (g)	0,82
$CaCl_2$ (g)	0,42
NH_4Cl (g)	0,31
Glicose (g)	0,65
Uréia (g)	0,085
Mucina (g)	3,0
Pepsina gástrica suína (g)	2,64
Albumina bovina (g)	1,0
HCl concentrado (mL)	8,3

Figura 1. Sistema usado na digestão simulada i*n vitro*.

5.3. Simulação da fase intestinal

Nos frascos provenientes da fase gástrica foi adicionada solução de $NaHCO_3$ 1M para o ajuste do pH das amostras para 6,0. Em seguida, foram adicionados 2 mL de fluido duodenal artificial contendo bile suína, pancreatina suína e albumina bovina (**Tabela 4**), com auxílio de uma seringa e balão de borracha cheio com N_2 para manter a anaerobiose do sistema reacional. Os frascos foram incubados a 37 ºC por 2 horas sob agitação orbital a 260 rpm.

Tabela 4. Composição do fluido intestinal artificial (por 500 mL de solução).

Reagente	Quantidade
NaCl (g)	6,75
$CaCl_2$ (g)	0,205
$NaHCO_3$ (g)	3,99
KH_2PO_4 (g)	0,06
KCl (g)	0,517
$MgCl_2$ (g)	0,0375
Uréia (g)	0,1375
Bile suína (g)	25,0
Pancreatina suína (g)	4,0
Albumina bovina (g)	1,2
HCl concentrado (mL)	0,185

5.4. Fermentação colônica ex vivo

5.4.1. Voluntários

Inicialmente, duas voluntárias saudáveis foram recrutadas para doação espontânea de fezes para realizar experimento preliminar com objetivo de avaliar o efeito do meio de fermentação sobre o metabolismo colônico dos compostos fenólicos. Após esse experimento e definição do meio de fermentação, seis voluntários saudáveis de ambos os sexos (2 homens e 4 mulheres) foram recrutados para doação espontânea de fezes. Em ambos os casos as amostras de fezes foram reunidas em *pools* e utilizadas até duas horas após a sua obtenção. Os critérios de inclusão dos voluntários foram: idade entre 18 e 35 anos, índice de massa corpórea dentro da eutrofia (18,5 a 24,9 kg/m^2), não apresentar doenças gastrointestinais, funcionamento intestinal regular (de 1 evacuação a cada dois dias a 2 evacuações ao dia, de consistência normal) e sem uso de suplementos nutricionais, antibióticos, probióticos, prébioticos ou simbióticos nos três meses anteriores a coleta das fezes. Os voluntários foram orientados a não ingerirem, por pelo menos 2 dias antes da coleta, os seguintes alimentos fontes de compostos fenólicos: frutas em geral (principalmente jabuticaba, uva e frutas vermelhas), feijão preto, repolho roxo, sucos, iogurtes, refrigerantes e bebidas alcoólicas (**Anexo 1**).

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (N° 512.847). A participação dos voluntários foi mediante a assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) (**Anexo 2**).

5.4.2. Condições experimentais

Primeiramente, foram testados dois meios, um pobre em nutrientes e outro rico em nutrientes (complexo) (MCDONALD *et al*., 2013) (**Tabela 5**), para diluição das fezes e realização do experimento de fermentação. Ambos os meios foram autoclavados e saturados com CO_2 em câmara de anaerobiose por 48 horas. Uma alíquota (0,5 g) do *pool* de fezes das duas voluntárias foi diluída no meio (10 mL), distribuídas em tubos, adicionadas do extrato final obtido após o processo de digestão simulada *in vitro* e incubadas a 37 ºC sem agitação e em anaerobiose. Após experimento preliminar, o meio complexo foi escolhido para realização da fermentação colônica *ex vivo* com o *pool* de fezes dos seis voluntários. Nesse experimento, entretanto, a fermentação foi realizada sob agitação orbital a 40 rpm. Experimento controle,

constituído da incubação das fezes sem a adição do resíduo digerido, também foi realizado com o *pool* de fezes, e analisado por CLAE.

Tabela 5. Composição dos meios utilizados para a diluição das fezes (por 1L de meio).

Meio pobre em nutrientes	Meio complexo
$MgSO_4$ (0,1 g)	Peptona (2,0 g)
KH_2PO_4 (0,2 g)	Extrato de levedura (2,0 g)
NaCl (3,0 g)	$NaHCO_3$ (2,0 g)
Na_2HPO_4 (1,15 g)	$CaCl_2$ (0,01 g)
KCl (0,2 g)	NaCl (0,1 g)
Tioglicolato de sódio (1,0 g)	Pectina (2,0 g)
Resazurina (2,0 mL)	Xilana (2,0 g)
Císteína (0,5 g)	Goma arábica (2,0 g)
	Amido de batata (5,0 g)
	Caseína (3,0 g)
	Inulina (1,0 g)

5.5. Análise de compostos fenólicos e seus metabólitos

Para investigação das etapas gástrica e intestinal da digestão simulada *in vitro* e da fermentação colônica *ex vivo*, experimentos paralelos independentes foram realizados, de maneira que somente alíquotas relativas à etapa a ser investigada foram retiradas do sistema reacional. Assim, após as etapas de digestão gástrica, que incluiu a etapa oral, e intestinal, e 4 h, 24 h e 48 h após a incubação com o *pool* de fezes, o conteúdo dos frascos foi transferido para tubos tipo Falcon, que foram centrifugados por 5 minutos a 2500 × *g* e o sobrenadante foi coletado. No caso do experimento com o *pool* de fezes de seis voluntários, um tempo adicional de 72 h de incubação foi incluído.

Aos sobrenadantes obtidos em todas as etapas da digestão e fermentação foi adicionado ácido tricloroacético 100% (5:1, *v*/*v*), a mistura foi homogeneizada em vórtex e, em seguida centrifugados por 5 minutos a 12100 × *g*. O sobrenadante final foi filtrado em membrana de éster de celulose de 0,22 µm e armazenado a -20 °C até o momento da injeção no sistema de CLAE, conforme descrito no item 4.2

5.6. Cálculo da área abaixo da curva (AUC)

A área abaixo da curva expressa a variação da concentração de determinado composto em função do tempo e é calculada a partir do valor do incremento de certo composto em um determinado ponto em relação à concentração inicial. A AUC foi calculada com auxílio do *software* GraphPad Prism para Windows , versão 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA).

6. Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. A comparação das médias foi realizada por Teste *t* de Student não-pareado ou análise de variância (Oneway ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey, utilizando o *software* GraphPad Prism para Windows, versão 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA). Os resultados foram considerados significativos quando $p<0,05$.

Resultados e Discussão

1. Rendimento dos resíduos

A produção do suco de jabuticaba obtido por despolpamento gerou aproximadamente 35% de resíduo (casca e semente) e a produção de suco de jabuticaba obtido por arraste a vapor obteve um rendimento de aproximadamente 49%.

2. Composição centesimal

Os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídios, carboidratos e fibra dietética dos resíduos da produção de suco de jabuticaba despolpado e por arraste a vapor estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, carboidratos e fibra dietética dos diferentes resíduos[1].

Resíduo	Despolpado	Arraste a vapor
Umidade (%)	75,0±1,1[a]	74,9±3,1[a]
Proteínas (g/100 g)	5,2±0,3[a]	4,8±0,2[a]
Cinzas (g/100 g)	4,8±0,11[a]	2,2±0,02[b]
Lipídeos (g/100 g)	0,4±0,0[a]	0,9±0,1[b]
Carboidratos (g/100 g)	65,1±0,9[a]	63,1±1,1[b]
Fibra dietética (g/100 g)	24,5±0,8[a]	29,0±1,1[b]

[1]Resultados expressos em base seca como média ± DP de triplicatas. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa (Teste *t* não-pareado, $p<0,05$).

Os teores de umidade e proteínas foram similares em ambos os resíduos. No entanto, os teores de cinzas e carboidratos foram significativamente maiores no resíduo obtido na produção do suco despolpado comparado ao resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor. Por outro lado, os teores de lipídios e fibra dietética do resíduo obtido na produção do suco a vapor foram superiores ao do despolpado (**Tabela 1**).

O teor de umidade observado no resíduo obtido na produção do suco a vapor foi inferior ao relatado na literatura para o resíduo de suco de jabuticaba obtido através de aquecimento (86%) (GURAK *et al*., 2014). Os mesmos autores observaram menores teores de proteínas (1,3%) e fibra dietética (20,5%), e teores similares de cinzas (2,4%) e lipídeos (0,6%). Os teores de umidade, cinzas e lipídios observados no resíduo obtido por despolpamento foram semelhantes aos descritos por Inada *et al*. (2015), que utilizaram o mesmo processo para obtenção de suco de jabuticaba. No entanto, os teores de proteínas

(7,5%) e fibra dietética (38,2%) relatados por estes autores foram superiores aos observados no presente trabalho.

As diferenças encontradas entre os estudos citados podem estar associadas a diferenças no estádio de maturação da fruta, nas práticas agrícolas empregadas, nas condições climáticas e nas variedades da fruta, já que existem controvérsias quanto à classificação das diferentes jabuticabeiras devido à grande variabilidade de seus atributos físicos e químicos (JESUS, DE *et al*., 2004).

3. Perfil de compostos fenólicos

Dez compostos fenólicos foram identificados em ambos os resíduos, sendo três derivados do ácido hidroxibenzóico (ácidos gálico, elágico e 3,4-dihidroxibenzóico), um derivado do ácido hidroxicinâmico (ácido *m*-cumárico), quatro flavonóis (miricetina, miricetina-3-*O*-ramnosídeo, quercetina e quercetina-3-*O*-rutinosídeo) e duas antocianinas (cianidina-3-*O*-glicosídeo e delfinidina-3-*O*-glicosídeo) (**Anexos 3** a **6**). Os teores de compostos fenólicos totais observados no presente trabalho (**Tabela 2**) foram similares ao relatado por Inada *et al*. (2015) (1658,0 mg/100 g, bs) para o resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado. Os teores de compostos fenólicos totais nas frações solúveis e insolúveis foram equivalentes (p>0,05) em ambos os resíduos (**Tabela 2**). No entanto, pode-se observar diferenças no perfil de compostos fenólicos entre os dois resíduos, especialmente na fração solúvel e nos constituintes em menor quantidade. Os teores de ácido elágico e quercetina-3-*O*-rutinosídeo, predominantes em ambos os resíduos, foram menores no resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor quando comparado ao resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado, o que pode estar associado a menor estabilidade desses compostos em altas temperaturas (**Figura 1**).

Dos compostos fenólicos identificados, cianidina-3-*O*-glicosídeo, delfinidina-3-*O*-glicosídeo, quercetina-3-*O*-rutinosídeo, miricetina-3-*O*-ramnosídeo, quercetina e ácido *m*-cumárico foram identificados somente na fração solúvel em ambos os resíduos. A miricetina e os ácidos gálico e elágico foram quantificados na fração solúvel e nas frações insolúveis (obtida após as hidrólises alcalina e ácida) e o ácido 3,4-dihidroxibenzóico foi quantificado somente na forma insolúvel ligado por ligações ésteres à parede celular (preferencialmente clivadas após hidrólise alcalina) (**Tabela 2**).

Os compostos fenólicos predominantes em ambos os resíduos foram a cianidina-3-*O*-glicosídeo (65%, em média) e o ácido elágico (16%, em média). Inada *et al*. (2015) relataram teores similares de cianidina-3-*O*-glicosídeo (707 mg/100 g, bs) e delfinidina-3-*O*-glicosídeo (157 mg/100 g, bs) no resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado (**Figura 1**).

Os compostos fenólicos presentes na fração solúvel representaram, em média, 91% do total (**Tabela 2**). Outros autores já relataram que os compostos fenólicos solúveis são predominantes em frutas e vegetais (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014; VINSON *et al*., 2001). É importante destacar que os compostos fenólicos solúveis são mais biodisponíveis no organismo humano (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014) e, portanto, de maior relevância do ponto de vista biológico.

Tabela 2. Teores (mg/100 g) de compostos fenólicos solúveis e insolúveis (hidrólises alcalina e ácida) nos resíduos[1].

Composto	Extrato	Despolpado	Arraste a vapor
Ácido gálico	Fenólicos solúveis	4,7±0,4[a]	13,0± 0,3[b]
Ácido *m*-cumárico		6,3±0,2[a]	21,4±0,7[b]
Ácido elágico		138,6±5,6[a]	104,6±3,4[b]
Miricetina		5,6±0,3[a]	3,8±0,0[b]
Miricetina-3-*O*-ramnosídeo		9,5±0,1[a]	13,1±0,1[b]
Quercetina		1,1±0,0[a]	0,4±0,0[b]
Quercetina-3-*O*-rutinosídeo		115,6±2,8[a]	90,3 ±1,9[b]
Cianidina-3-*O*-glicosídio		1112,0±82,4[a]	994,0±36,9[a]
Delfinidina-3-*O*-glicosídio		159,4±8,7[a]	170,2 ±4,9[a]
Subtotal		***1552,7±83,0[a]***	***1410,8±46,6[a]***
Ácido gálico	Fenólicos insolúveis: Hidrólise alcalina	0,9±0,1[a]	1,3±0,1[a]
Ácido elágico		38,6±0,0[a]	40,0±5,0[a]
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico		1,3±0,2[a]	0,5±0,0[b]
Miricetina		0,5±0,1[a]	0,7±0,0[a]
Subtotal		***41,3±0,2[a]***	***42,5±4,6[a]***
Ácido gálico	Fenólicos insolúveis: Hidrólise ácida	8,9±0,8[a]	4,0±0,0[b]
Ácido elágico		112,8±5,5[a]	88,6±6,3[a]
Miricetina		0,8±0,1[a]	0,5±0,0[b]
Subtotal		***122,5±4,7[a]***	***93,1±6,3[b]***
Total		**1716,5±83,9[a]**	**1512,2±48,3[a]**

[1]Resultados expressos em base seca como média±DP de triplicatas. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os resíduos (Teste *t* não-pareado, $p<0,05$).

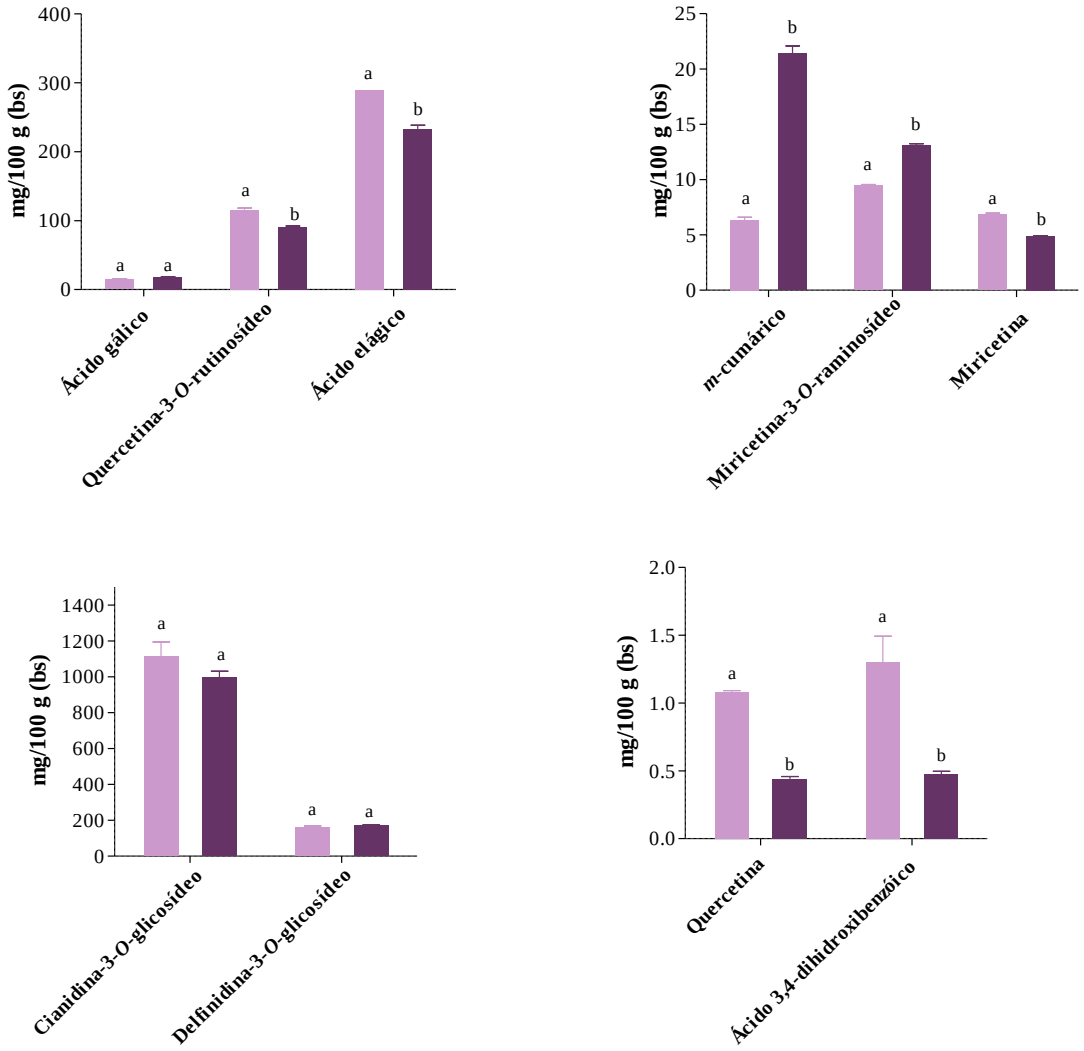


Figura 1. Teores (mg/100 g, bs) de compostos fenólicos solúveis e insolúveis do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado (■) e do resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor (■). Letras diferentes para um mesmo composto indicam diferença significativa entre os resíduos (Teste *t* não-pareado, $p<0,05$).

4. Digestão simulada *in vitro*

4.1. Etapa gástrica

Após a etapa gástrica da digestão, o teor total de compostos fenólicos (soma de todos os compostos encontrados) observado no resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado (960 mg/100 g, bs) foi superior quando comparado aquele obtido na produção do suco por arraste a vapor (705 mg/100 g, bs) (**Figura 2**). Esses teores equivalem, respectivamente, a 56% e 46% do teor inicial de compostos fenólicos nos respectivos resíduos, sugerindo que os

compostos fenólicos do resíduo obtido da produção do suco de jabuticaba por arraste a vapor apresentaram menor bioacessibilidade nessa etapa da digestão ou que os mesmos foram mais rapidamente metabolizados.

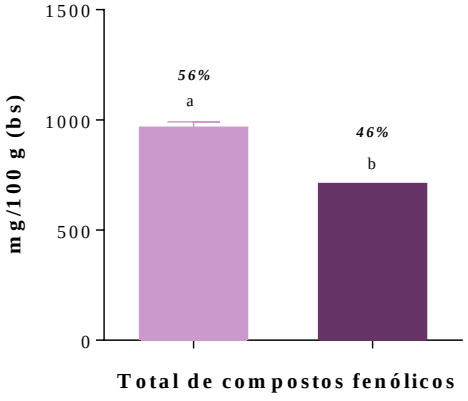


Figura 2. Teores totais (mg/100 g, bs) de compostos fenólicos após a etapa gástrica da digestão simulada *in vitro* do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado (■) e do resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor (■). Letras diferentes para um mesmo composto indicam diferença significativa entre os resíduos (Teste *t* não-pareado, $p<0,05$). Os valores expressos sobre cada composto equivalem ao teor percentual relativo ao encontrado nos respectivos resíduos.

Dos dez compostos fenólicos identificados nos resíduos, oito compostos (ácidos gálico e elágico, quercetina-3-*O*-rutinosídeo, miricetina-3-*O*-ramnosídeo, quercetina, miricetina, cianidina-3-*O*-glicosídeo e delfinidina-3-*O*-glicosídeo) foram identificados após a etapa gástrica da digestão simulada *in vitro* (**Figura 3** e **Anexo 7**). Todos esses compostos estavam presentes na fração solúvel dos resíduos, sendo o ácido gálico, o ácido elágico e a miricetina também encontrados nas frações insolúveis. Somente os ácidos *m*-cumárico e 3,4-dihidroxibenzóico, que representaram menos de 1% do teor total de compostos fenólicos nos resíduos (**Tabela 2**), não foram identificados.

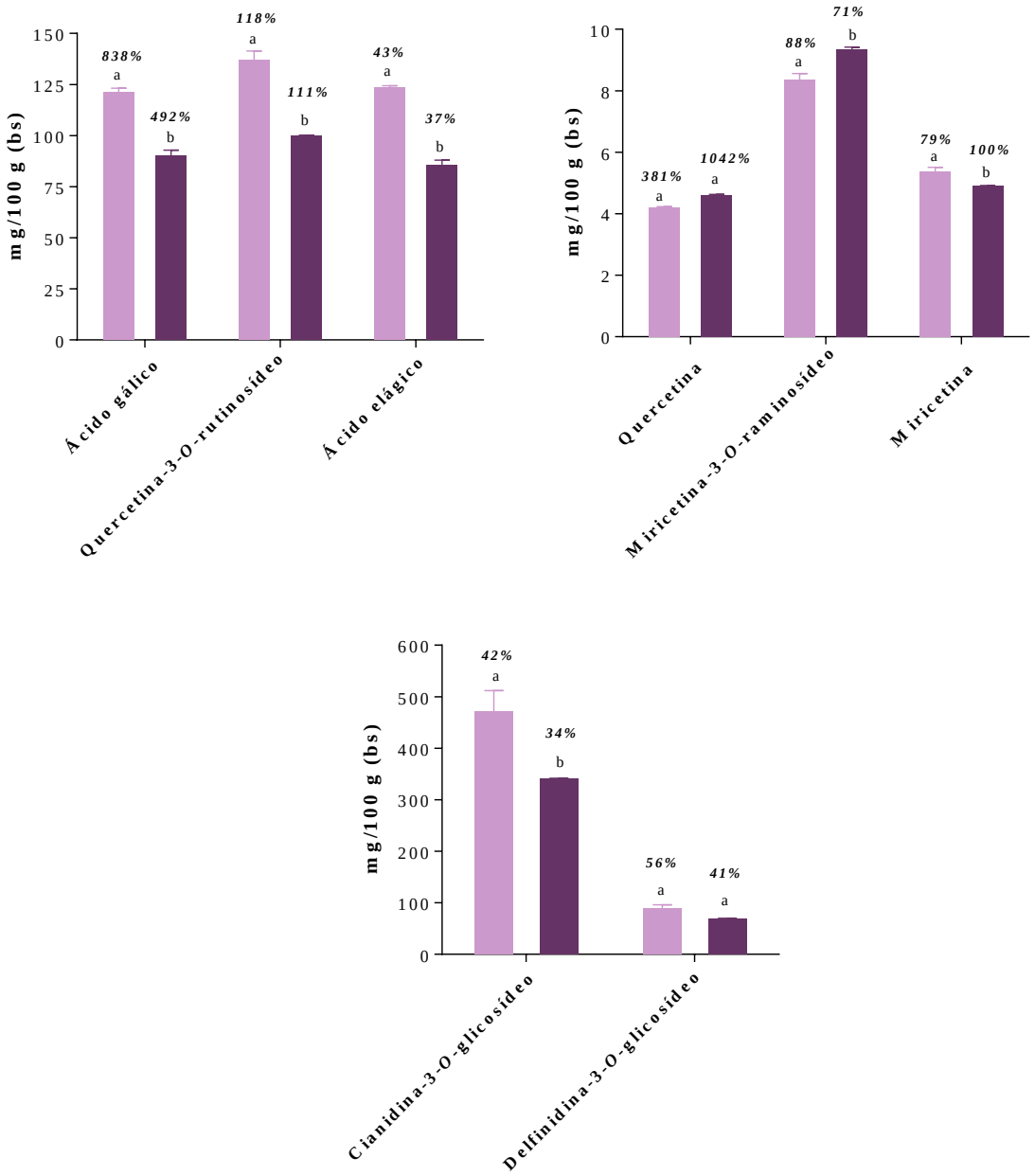


Figura 3. Teores (mg/100 g, bs) de compostos fenólicos após a etapa gástrica da digestão simulada *in vitro* do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado (■) e do resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor (■). Letras diferentes para um mesmo composto indicam diferença significativa entre os resíduos (Teste *t* não-pareado, $p<0,05$). Os valores expressos sobre cada composto equivalem ao teor percentual relativo ao encontrado nos respectivos resíduos.

Após a etapa gástrica da digestão somente os teores de quercetina e delfinidina-3-*O*-glicosídeo foram semelhantes em ambos os resíduos. Os teores de cianidina-3-*O*-glicosídeo, miricetina, ácido gálico, quercetina-3-*O*-rutinosídeo e ácido elágico após a etapa gástrica da digestão foram maiores para o resíduo do suco despolpado, enquanto que o teor de miricetina-

3-*O*-ramnosídeo foi superior no resíduo do suco por arraste a vapor (**Figura 3**). Dos compostos observados após a etapa gástrica da digestão *in vitro* de ambos os resíduos, quercetina, ácido gálico e quercetina-3-*O*-rutinosídeo apresentaram teores superiores no digerido em relação aos teores presentes inicialmente nas matrizes, sugerindo que os mesmos foram liberados de estruturas celulares e/ou formados a partir de compostos fenólicos de estrutura molecular mais complexa. O ácido gálico foi o composto fenólico mais bioacessível no resíduo do suco despolpado (até 838% em relação ao teor inicial) enquanto a quercetina foi o composto fenólico mais bioacessível no resíduo do suco a vapor (1042%). Em ambos os resíduos, a bioacessibilidade da quercetina-3-*O*-rutinosídeo foi similar e correspondeu, em média, a 115% (**Figura 3**).

A elevada bioacessibilidade do ácido gálico após a etapa gástrica da digestão *in vitro* pode ser atribuída à hidrólise parcial de galotaninos, conforme já relatado em estudos que investigaram o processo de digestão simulada *in vitro* de diferentes frutas (MOSELE *et al*., 2016; MOSELE *et al*., 2015), utilizando condições de ensaio semelhantes às empregadas no presente trabalho. Apesar dos galotaninos não terem sido analisados nos resíduos investigados no presente estudo, já foi descrita na literatura a presença de 7 compostos dessa classe na jabuticaba (ALEZANDRO *et al*., 2013; WU *et al*., 2013). A menor bioacessibilidade do ácido gálico após a etapa gástrica da digestão simulada *in vitro* do resíduo do suco a vapor (492%) quando comparada ao do resíduo do suco despolpado (838%) pode ser atribuída, dentre outros fatores, aos maiores teores de fibra dietética (**Tabela 1**) no resíduo obtido da produção do suco a vapor. A formação de complexos entre os compostos fenólicos e os constituintes da matriz alimentar, em especial as fibras dietéticas, pode influenciar negativamente sua bioacessibilidade durante o processo de digestão, principalmente dos galotaninos e elagitaninos. (JACOB; PALIYATH; 2008; MOSELE *et al*., 2016).

A quercetina também apresentou elevada bioacessibilidade (até 1042%) após a etapa gástrica da digestão *in vitro*. Hur *et al*. (2013) também observaram aumento da quercetina após a digestão simulada *in vitro* de extrato de cebola. Segundo esses autores, visto que a quercetina é a forma aglicona de diversos outros flavonoides, poderia ser formada em abundância em decorrência de reações de desglicosilação durante a digestão *in vitro*. Na jabuticaba já foram observadas diferentes formas glicosiladas da quercetina, tais como: quercetina-3-*O*-glicosídeo, quercetina-3-*O*-rutinosídeo, quercetina-3-*O*-ramnosídeo e quercetina-7-*O*-glicosídeo (INADA *et al*., 2015; WU *et al*., 2013). No presente trabalho, somente foi possível analisar a quercetina-3-*O*-rutinosídeo, em função da indisponibilidade dos padrões analíticos das demais formas glicosiladas. No entanto, não foi observada redução

da bioacessibilidade dessa forma glicosilada. Nesse sentido, o aumento da bioacessibilidade da quercetina após a etapa gástrica da digestão em ambos os resíduos está provavelmente associado à desglicosilação de outras formas glicosiladas da quercetina, não identificadas no presente trabalho, às formas agliconas.

Os valores de bioacessibilidade observados para ácido elágico (até 40%), miricetina-3-*O*-ramnosídeo (até 88%), miricetina (até 100%), cianidina-3-*O*-glicosídeo (até 42%) e delfinidina-3-*O*-glicosídeo (até 56%) sugerem baixa extração/liberação desses compostos da matriz e/ou metabolização após a etapa gástrica da digestão. É importante destacar que, apesar de ser o composto fenólico mais abundante nos resíduos, a cianidina-3-*O*-glicosídeo apresentou os menores valores de bioacessibilidade (38%, em média) (**Figura 3**). Além da menor bioacessibilidade das antocianinas em relação aos outros compostos fenólicos, já foi relatado na literatura que essa classe de compostos é a que apresenta a menor biodisponibilidade, das suas formas intactas, dentre os compostos fenólicos e que, além disso, o estômago não é o sítio de absorção mais importante de todo o trato gastrointestinal (BOTO-ORDÓÑEZ *et al*., 2014; HRIBAR; ULRIH, 2014; CZANK *et al*., 2013; MCGHIE; WALTON, 2007).

As formas glicosiladas dos flavonoides (miricetina-3-*O*-ramnosídeo, quercetina-3-*O*-rutinosídeo, cianidina-3-*O*-glicosídeo e delfinidina-3-*O*-glicosídeo) foram mais bioacessíveis no resíduo do suco despolpado enquanto as formas agliconas (miricetina e quercetina) foram mais bioacessíveis no resíduo do suco a vapor (**Figura 3**). A maior bioacessibilidade das formas agliconas após a etapa gástrica da digestão do resíduo do suco a vapor quando comparado ao resíduo do suco despolpado pode estar relacionada ao aquecimento empregado no processo de produção, que pode ter promovido a transformação das formas glicosiladas nas formas agliconas observadas (NUNES *et al*., 2016; AYDIN; GOCMEN, 2015).

4.2. Etapa intestinal

Similarmente ao observado na etapa gástrica, o teor total de compostos fenólicos após a etapa intestinal da digestão do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado (958 mg/100 g, bs) foi superior quando comparado ao resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor (613 mg/100 g, bs) (**Figura 4**). Esses teores equivalem, respectivamente, a 56% e 40% do teor inicial de compostos fenólicos no resíduo do suco despolpado e no resíduo do suco obtido por arraste a vapor, corroborando com a possível menor bioacessibilidade e/ou

mais rápida metabolização dos compostos fenólicos presentes no resíduo obtido da produção do suco de jabuticaba por arraste a vapor.

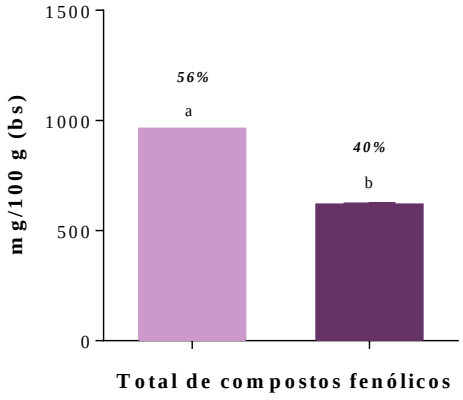


Figura 4. Teores totais (mg/100 g, bs) de compostos fenólicos após a etapa intestinal da digestão simulada *in vitro* do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado (■) e do resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor (■). Letras diferentes para um mesmo composto indicam diferença significativa entre os resíduos (Teste *t* não-pareado, $p<0,05$). Os valores expressos em percentual sobre cada composto equivalem ao teor inicial nos respectivos resíduos.

Após a etapa intestinal da digestão simulada *in vitro* dos resíduos foram encontrados os mesmos compostos fenólicos observados após a etapa gástrica (**Figura 5** e **Anexo 8**).

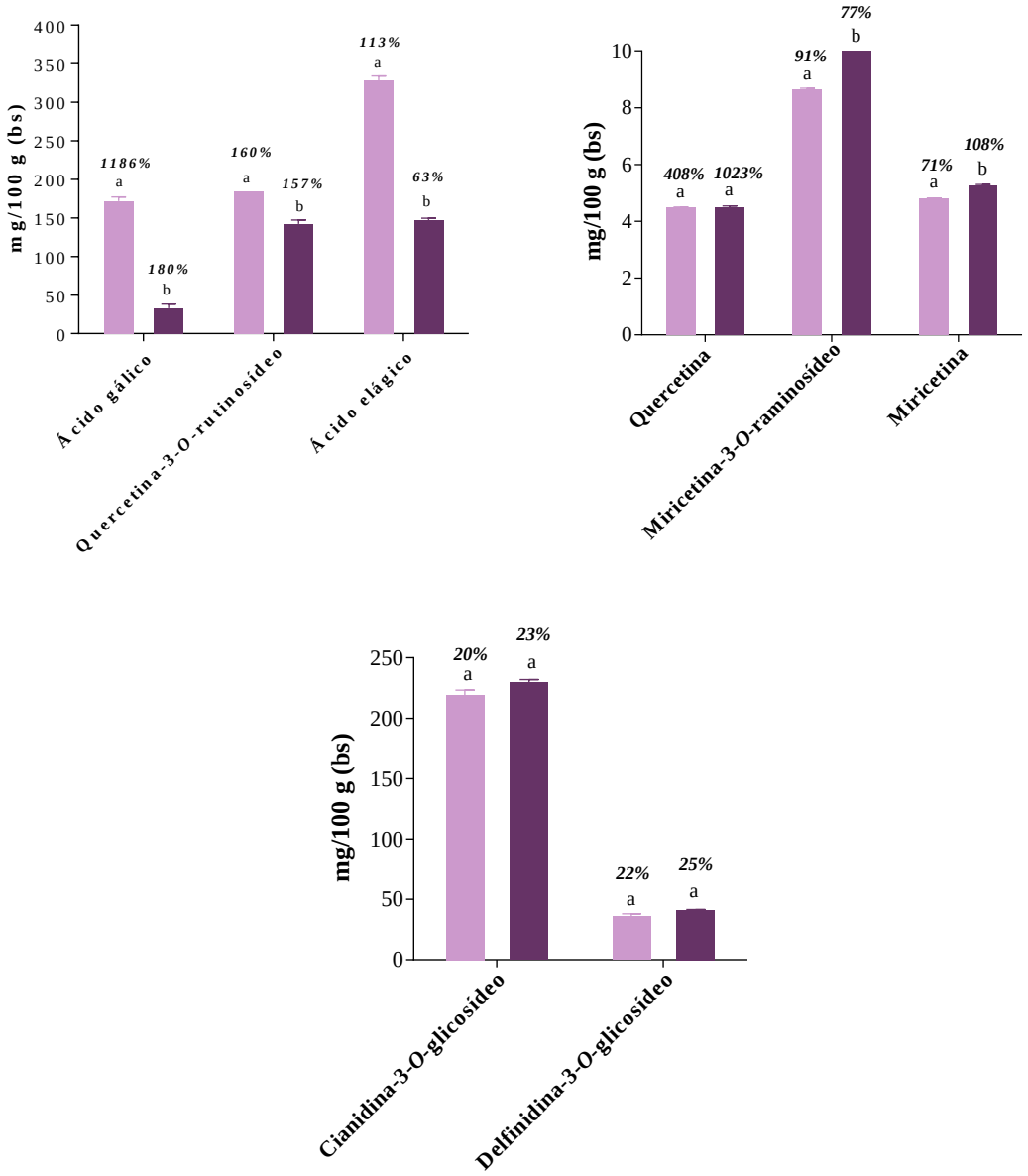


Figura 5. Teores (mg/100 g, bs) de compostos fenólicos após a etapa intestinal da digestão simulada *in vitro* do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado (■) e do resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor (■). Letras diferentes para um mesmo composto indicam diferença significativa entre os resíduos (Teste *t* não-pareado, $p<0,05$). Os valores expressos em percentual sobre cada composto equivalem ao teor inicial nos respectivos resíduos.

Após a etapa intestinal da digestão os teores de quercetina, cianidina-3-*O*-glicosídeo e delfinidina-3-*O*-glicosídeo foram semelhantes em ambos os resíduos. Os teores de quercetina-3-*O*-rutinosídeo e dos ácidos gálico e elágico após a etapa intestinal da digestão foram

maiores para o resíduo do suco despolpado, enquanto que os teores de miricetina e miricetina-3-*O*-ramnosídeo foram superiores no resíduo do suco por arraste a vapor (**Figura 5**).

É válido relembrar que os experimentos da digestão simulada *in vitro* foram realizados de forma independente. Dessa forma, os resultados obtidos após a etapa intestinal representam os efeitos relativos às etapas gástrica e intestinal da digestão simulada *in vitro*. Nesse sentido, para avaliar de maneira isolada o efeito da etapa intestinal na bioacessibilidade dos compostos fenólicos dos resíduos é necessário descontar os teores de compostos fenólicos observados após a etapa gástrica dos teores observados após ambas as etapas em sequência.

Em ambos os resíduos, a bioacessibilidade das antocianinas cianidina-3-*O*-glicosídeo e delfinidina-3-*O*-glicosídeo diminuiu após a etapa intestinal da digestão simulada *in vitro* (**Figura 6A**). Já foi relatado na literatura a maior bioacessibilidade das antocianinas na etapa gástrica da digestão *in vitro* em decorrência da maior estabilidade da forma de cátion flavílio, predominante em condições ácidas. Por outro lado, em valores de pH neutro a alcalino, como acontece na etapa intestinal da digestão simulada, as antocianinas se transformam em carbinol pseudobase e pseudobase chalcona, que são formas mais instáveis, o que justifica sua maior perda (MOSELE *et al*., 2016; PODSEDEK *et al*., 2014).

A bioacessibilidade do ácido elágico, da miricetina-3-*O*-ramnosídeo e da quercetina-3-*O*-rutinosídeo aumentou após a etapa intestinal da digestão simulada de ambos os resíduos. Outros autores (MOSELE *et al*., 2016; MOSELE *et al*., 2015) já relataram o aumento de ácido elágico após a etapa intestinal da digestão *in vitro* de frutas, associado à diminuição dos elagitaninos. Estes compostos parecem estar conjugados aos constituintes da estrutura celular, tais como polissacarídeos e proteínas, sendo extraídos com o aumento do pH (LIU *et al*., 2013). Apesar dos elagitaninos não terem sido analisados nos resíduos no presente estudo, 10 compostos dessa classe já foram descritos na jabuticaba (ALEZANDRO *et al*., 2013; WU *et al*., 2013). Similarmente ao observado para o ácido gálico após a etapa gástrica da digestão *in vitro*, o ácido elágico também apresentou menor bioacessibilidade após a etapa intestinal da digestão do resíduo do suco a vapor (26%) quando comparada ao do resíduo do suco despolpado (70%) (**Figura 6B**), o que também pode ser atribuído aos seus maiores teores de fibra dietética (**Tabela 1**).

O aumento da bioacessibilidade da quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**Figura 6B**) e da miricetina-3-*O*-ramnosídeo (**Figura 6C**) após a etapa intestinal da digestão simulada *in vitro* pode ser explicado pelo fato de que grande parte das formas glicosiladas dos flavonoides não-antociânicos são mais bioacessíveis após a fase intestinal, devido à sua maior estabilidade em meio alcalino (TAGLIAZUCCHI *et al*., 2010). De maneira similar, Hur *et al*. (2011)

demostraram que a bioacessibilidade da quercetina-3-*O*-rutinosídeo aumentou 197% após a etapa intestinal da digestão de extrato de trigo.

O ácido gálico, a miricetina e a quercetina não apresentaram o mesmo padrão de comportamento entre os resíduos, ora aumentando ora diminuindo após a etapa de digestão intestinal (**Figura 6B** e **6C**). A influência da matriz alimentar na bioacessibilidade dos compostos fenólicos já foi relatada, sendo observada bioacessibilidade diferente entre os compostos isolados (padrões analíticos ou extratos purificados) e aqueles presentes no alimento (HUR *et al*., 2011; PODSEDEK *et al*., 2014).

Quando os compostos fenólicos são considerados em conjunto, observou-se uma diminuição de 6,0% no teor total após a etapa intestinal da digestão do resíduo obtido do suco por arraste a vapor, em relação à etapa gástrica. Por outro lado, não houve variação (-0,1%) no teor total após a etapa intestinal da digestão do resíduo obtido do suco despolpado, em relação à etapa gástrica (**Figura 6D**). Sendo assim, o resíduo do suco despolpado foi escolhido para a realização da fermentação colônica.

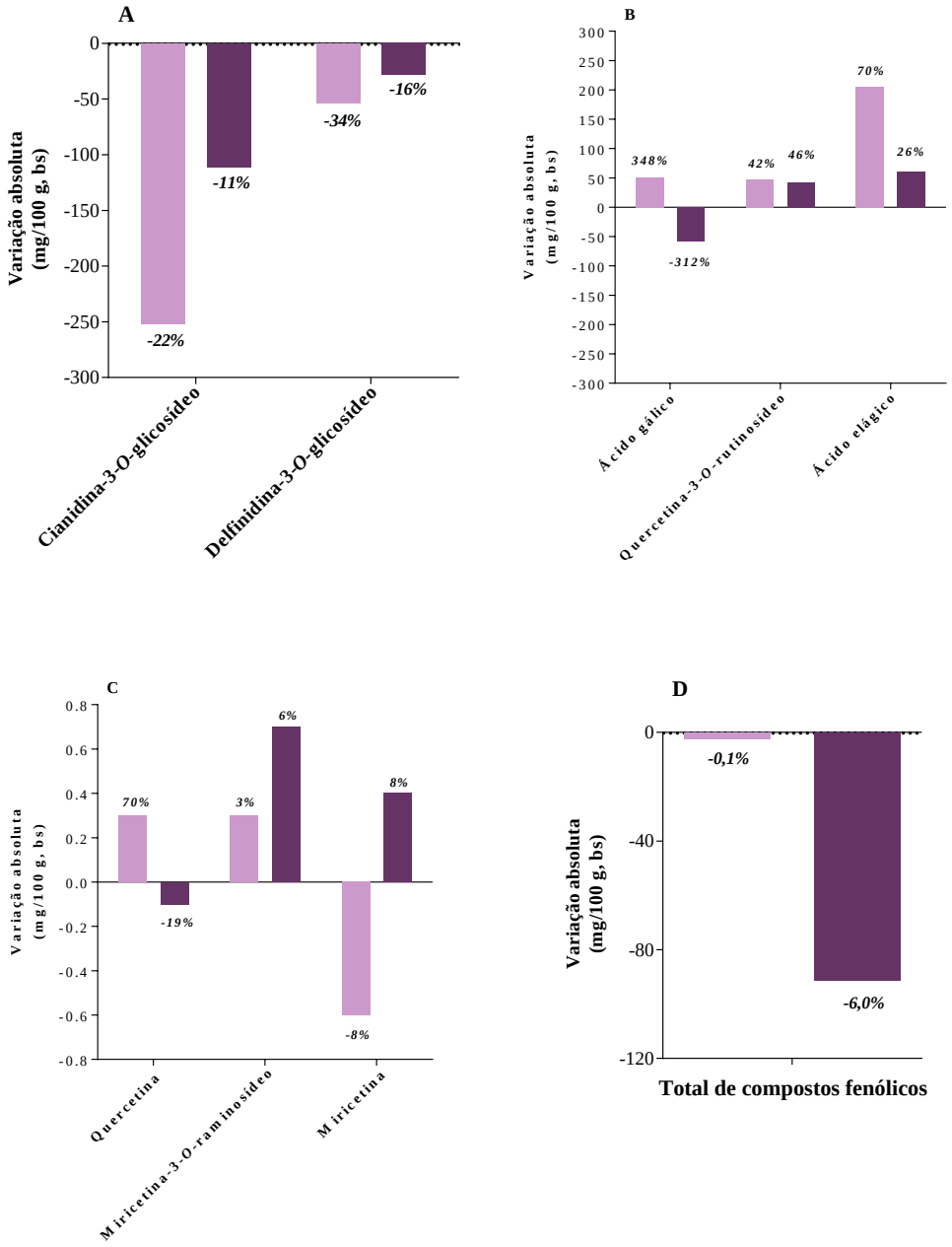


Figura 6. Variação absoluta (mg/100 g, bs) dos teores de compostos fenólicos entre as etapas intestinal e gástrica da digestão simulada *in vitro* do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado (■) e do resíduo obtido na produção do suco por arraste a vapor (■). Os valores expressos em percentual sobre cada composto equivalem a variação relativa à etapa gástrica da digestão simulada *in vitro*.

5. Fermentação colônica

Inicialmente, foi realizado um estudo preliminar, com um *pool* de fezes de duas voluntárias, para a definição do melhor meio para incubação das fezes, sendo um meio de cultura complexo e um meio de cultura pobre em nutrientes. Meios pobres em nutrientes apresentam os componentes básicos para a manutenção da viabilidade das bactérias anaeróbias e são amplamente utilizados em estudos de investigação de microbiota (MOSELE *et al*., 2015; MOSELE *et al*., 2016; HU *et al*., 2004). Meios complexos também têm sido utilizados devido à sua capacidade em manter a comunidade microbiana fecal por mais tempo, mimetizando de maneira mais fidedigna as condições do trato gastrointestinal (MCDONALD *et al*., 2013; DALL'ASTA *et al*., 2012; KIM, KIM, CERNIGLIA, 2011).

Não foi detectada a presença de compostos fenólicos nas fezes no experimento controle. O perfil dos compostos fenólicos ao longo das 48 horas de fermentação foi similar para ambos os meios, e de maneira geral, os teores totais de compostos fenólicos reduziram ao longo das 48 horas de fermentação colônica (**Figura 7**).

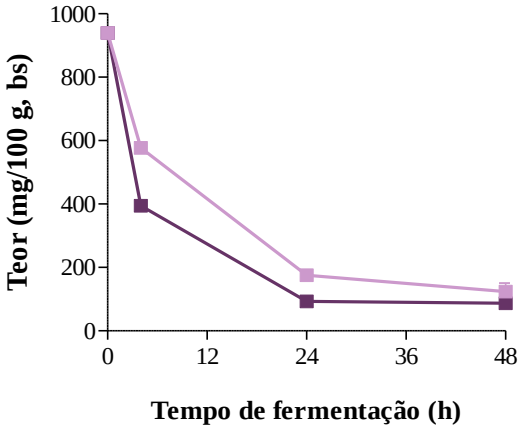


Figura 7. Teores totais (mg/100 g, bs) dos compostos fenólicos após 4 h, 24 h e 48 h de fermentação colônica do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado no meio complexo (■) e no meio pobre em nutrientes (■).

Seis compostos fenólicos foram identificados após a fermentação colônica em ambos os meios, sendo eles: ácidos gálico e elágico, cianidina-3-*O*-glicosídeo, delfinidina-3-*O*-glicosídeo, cianidina e quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**Anexos 9** a **12**). A variação do teor desses compostos ao longo das 48 horas de fermentação está apresentada na **Figura 8**.

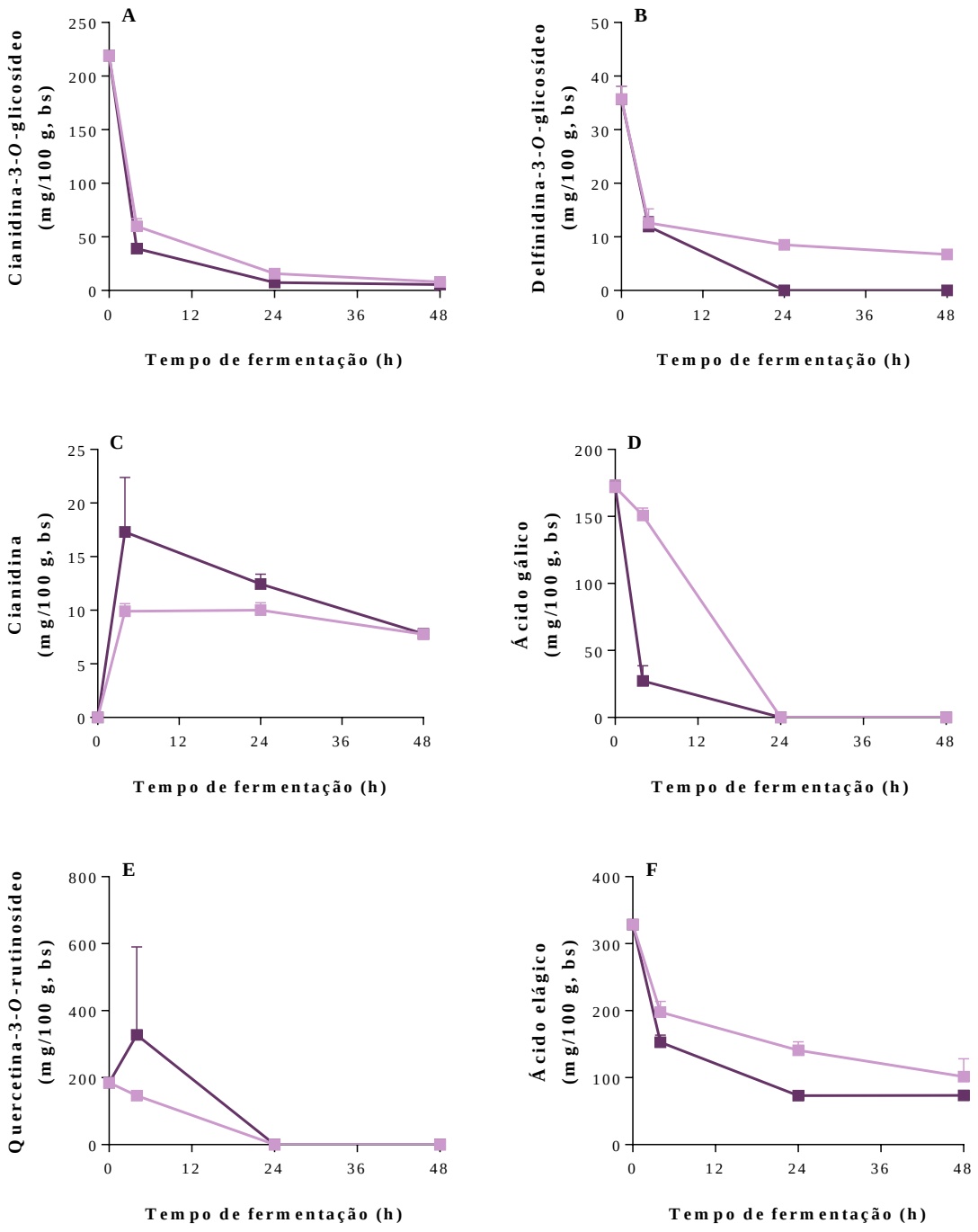


Figura 8. Teores (mg/100 g, bs) dos compostos fenólicos após 4 h, 24 h e 48 h de fermentação colônica do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado no meio complexo (■) e no meio pobre em nutrientes (■). Cianidina-3-*O*-glicosídeo (**A**), delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**B**), cianidina (**C**), ácido gálico (**D**), quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**E**) e ácido elágico (**F**).

A partir dos dados obtidos em cada ponto de coleta de amostra calculou-se a área abaixo da curva (AUC) de cada composto (**Tabela 3**). A AUC é uma ferramenta utilizada

para avaliar a variação de concentração de um determinado composto ao longo do tempo e, portanto, poderia ser utilizada como indicador da taxa de metabolização.

Cianidina-3-*O*-glicosídeo, delfinidina-3-*O*-glicosídeo, ácido gálico e ácido elágico apresentaram maiores AUC no meio complexo, enquanto que a quercetina-3-*O*-rutinosídeo e a cianidina não apresentaram diferença significativa entre os dois meios, provavelmente devido ao elevado desvio-padrão desses compostos entre as replicatas dos experimentos de fermentação em meio pobre (**Tabela 3**). De maneira geral, as maiores AUC dos compostos fenólicos durante a incubação no meio complexo em relação ao meio pobre em nutrientes, sugerem que as bactérias colônicas utilizaram os compostos fenólicos como fonte de carbono para sua manutenção nesse meio. Sendo assim, o meio complexo foi escolhido para o segundo ensaio de fermentação colônica.

Tabela 3. Área abaixo da curva (mg.h.100 g^{-1}) dos compostos fenólicos ao longo das 48 horas de fermentação colônica no meio pobre em nutrientes e no meio complexo do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado[1].

Composto	**Meio pobre em nutrientes**	**Meio complexo**
Cianidina-3-*O*-glicosídeo	1.140,0±52,3[a]	1.600,0±32,5[b]
Delfinidina-3-*O*-glicosídeo	214,6±27,1[a]	491,2±11,7[b]
Cianidina	575,1±83,0[a]	431,8±11,3[a]
Ácido gálico	670,1±126,6[a]	2.153,5±54,4[b]
Ácido elágico	4.979,0±176,8[a]	7.344,5±225,6[b]
Quercetina-3-*O*- rutinosídeo	4.299,5±3153,0[a]	2.123,0±176,8[a]
Total de fenólicos	11.878,0±3191,9[a]	14.143,5±136,5[a]

[1]Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os meios de cultivo (Teste *t* não-pareado, $p<0,05$).

Definida a utilização do meio complexo para realizar a fermentação colônica, foi, então, realizado o experimento com um *pool* de fezes de seis voluntários por um período de 72 horas de fermentação (**Figura 9**). A inclusão de mais um tempo de fermentação justificou-se pela observação dos resultados de fermentação preliminares, nos quais a cianidina e o ácido elágico não atingiram um platô de concentração após 48 horas de fermentação.

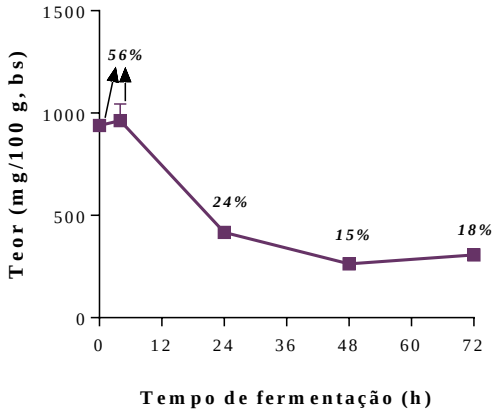


Figura 9. Teores totais (mg/100 g, bs) dos compostos fenólicos após 4 h, 24 h, 48 h e 72 h de fermentação colônica do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado no meio complexo. Os valores expressos sobre cada ponto equivalem aos valores em percentual do teor inicial no resíduo obtido do suco despolpado.

O perfil de compostos fenólicos observado foi similar aquele da fermentação anterior, realizada com o *pool* de fezes de dois voluntários (**Figura 10**). Todos os compostos fenólicos identificados nesta etapa, com exceção da cianidina, foram também observados após a etapa intestinal da digestão do resíduo. Miricetina, miricetina-3-*O*-ramnosídeo e quercetina, observadas após a etapa intestinal da digestão *in vitro* do resíduo obtido do suco despolpado, não foram identificadas ao longo da fermentação colônica. Estes flavonoides podem ter sido metabolizados a ácidos fenólicos de baixo peso molecular, como os ácidos hidroxifenilacéticos, pela desgligosilação mediada pela microbiota colônica, seguida da fissão do anel C da aglicona (DEL RIO *et al*., 2010; AURA *et al*., 2005). Entretanto, o principal metabólito colônico da quercetina, o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DEL RIO *et al*., 2010), não foi encontrado no presente trabalho. De maneira análoga, os principais metabólitos da miricetina seriam os ácidos 3,4,5-trihidroxifenilacético e 3,5-dihidroxifenilacético, que não foram investigados por ausência de padrão analítico (SMITH; GRIFFITHS, 1970).

Similarmente ao observado no experimento anterior, constatou-se uma extensa metabolização dos compostos fenólicos após as 72 horas de fermentação colônica (**Figura 9**). Nas primeiras 4 horas de fermentação não houve variação no percentual bioacessível do total de compostos fenólicos quando comparado à etapa intestinal da digestão. Entre 4 horas e 24 horas de fermentação foi observada a redução mais expressiva no percentual bioacessível (de 56% para 24%), atingindo 18% após 72 horas de fermentação colônica.

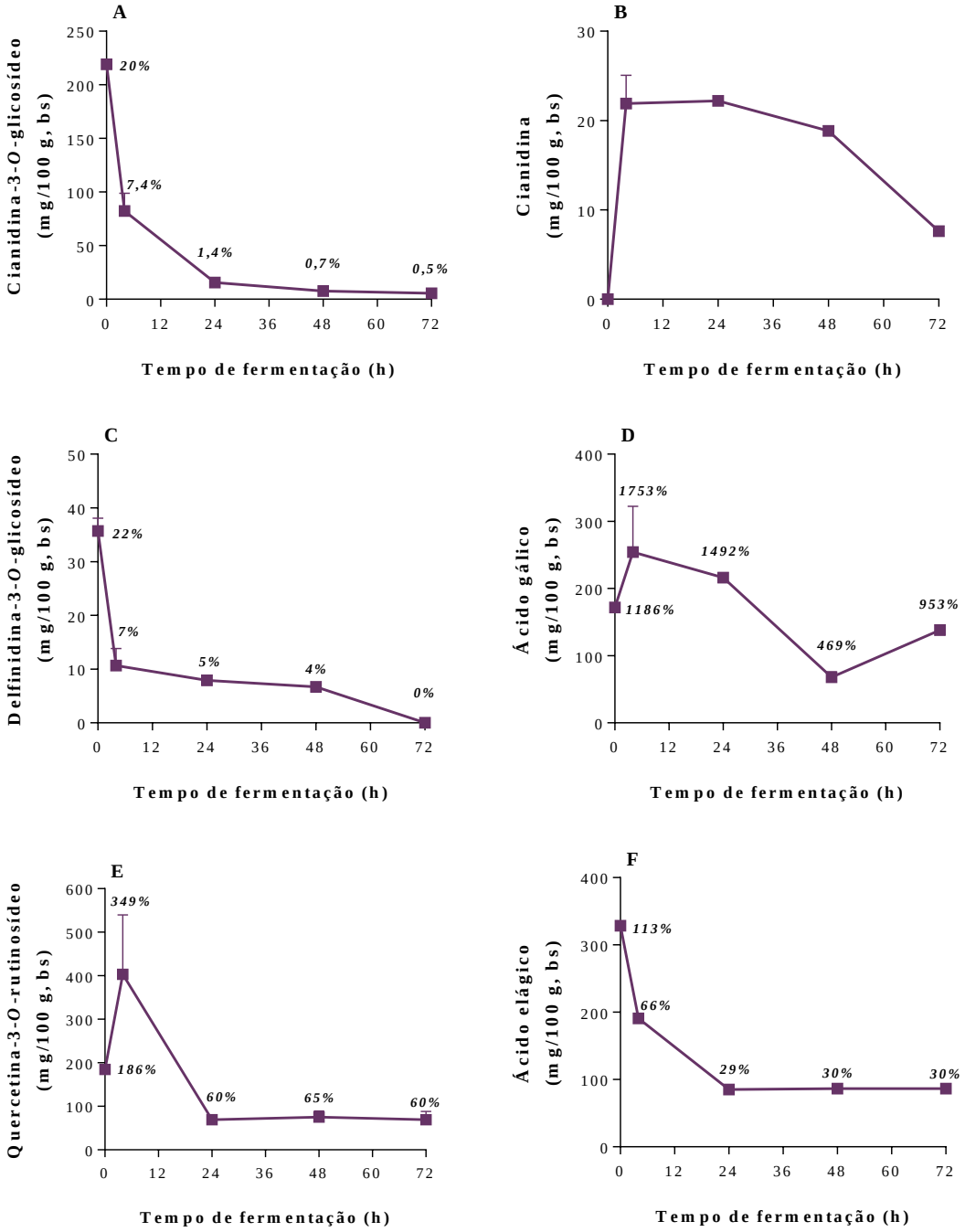


Figura 10. Teores (mg/100 g, bs) dos compostos fenólicos do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado após 4 h, 24 h, 48 h e 72 h de fermentação colônica com o meio complexo. Cianidina-3-*O*-glicosídeo (**A**), cianidina (**B**), delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**C**), ácido gálico (**D**), quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**E**) e ácido elágico (**F**). Os valores expressos sobre cada ponto equivalem aos valores em pecentual do teor inicial no resíduo obtido do suco despolpado.

Observou-se a redução dos teores de cianidina-3-*O*-glicosídio ao longo da fermentação colônica (**Figura 10A**), associada ao aumento dos teores de cianidina (**Figura 10B**), indicando que as bactérias colônicas promoveram a sua desglicosilação, assim como

observado por outros autores (AURA *et al*., 2005; HASSIMOTTO, GENOVESE e LAJOLO, 2008). Os teores de delfinidina-3-*O*-glicosídeo também reduziram ao logo da fermentação colônica, não sendo mais detectada sua presença após 72 horas (**Figura 10C**). Hidalgo *et al*. (2012) apontaram o ácido gálico como um possível produto da metabolização dessa antocianina pelas bactérias do cólon. No presente estudo, foram observados aumentos na bioacessibilidade do ácido gálico nos tempos de 4 horas e 72 horas de fermentação colônica (**Figura 10D**).

De maneira geral, a bioacessibilidade colônica das formas intactas das antocianinas (cianidina-3-*O*-glicosídeo e delfinidina-3-*O*-glicosídeo) foi muito baixa (menor ou igual a 7,4%), similar ao já relatado na literatura para essa classe de compostos (PODSEDEK *et al*., 2014; HIGALGO *et al*., 2012). A diminuição dos teores de cianidina-3-*O*-glicosídeo e delfinidina-3-*O*-glicosídeo ao longo da fermentação, associada ao aumento de possíveis metabólitos (cianidina e ácido gálico) sugere, entretanto, que essa classe de compostos é extensamente metabolizada pelas bactérias colônicas, como já descrito na literatura (PODSEDEK *et al*., 2014; HIGALGO *et al*., 2012; MCGHIE, WALTON, 2007; AURA *et al*., 2005). Portanto, a baixa bioacessibilidade das antocianinas não indica, necessariamente, baixa bioatividade, uma vez que os seus metabólitos podem ser absorvidos e exercerem efeitos biológicos (HRIBAR, ULRIH, 2014).

Observou-se um aumento dos teores do flavonol quercetina-3-*O*-rutinosídeo nas primeiras 4 horas de fermentação, entretanto, o elevado desvio-padrão observado compromete a interpretação desse comportamento inicial. Em seguida, observou-se o decréscimo dos teores desse composto ao longo da incubação (**Figura 10E**). Enzimas presentes na microbiota colônica, tais como α-L-ramnosidase e β-glicosidase estariam envolvidas na desglicosilação da quercetina-3-*O*-rutinosídeo (quercetina-3-*O*-ramnosídeo-β-1,6-glicosídeo), gerando, respectivamente, quercetina e quercetina-3-*O*-ramnosídeo. Essa última não foi investigada por ausência de padrão analítico e sua forma aglicona não foi observada ao longo da fermentação, possivelmente por sua metabolização a ácidos fenólicos de baixo peso molecular, conforme discutido anteriormente (JAGANATH *et al*., 2006; DEL RIO; BORGES; CROZIER, 2010).

O ácido elágico apresentou redução da bioacessibilidade (de 112% para 30%) ao longo das 72 horas de fermentação colônica (**Figura 10F**). Estudos indicam que este composto fenólico é pouco absorvido, sendo extensamente metabolizado no cólon por ação da microbiota local a compostos da classe das urolitinas (principalmente urolitina A e urolitina B) (GONZÁLEZ-BARRIO; EDWARDS; CROZIER, 2011; DALL'ASTA *et al*., 2012; MOSELE *et al*., 2015). No entanto, no presente trabalho não foi possível a identificação

desses metabólitos por ausência de padrões comerciais. Os valores de AUC ao longo da fermentação por 72 horas (**Tabela 4**) corroboram com a baixa bioacessibilidade das antocianinas e sua extensa metabolização ao ácido gálico.

Tabela 4. Área abaixo da curva (mg.h.100g^{-1}) dos compostos fenólicos ao longo das 72 horas de fermentação colônica no meio complexo do resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado.

Composto	**AUC (mg.h.100 g^{-1})**
Cianidina-3-*O*-glicosídeo	2.018,0±165,5
Delfinidina-3-*O*-glicosídeo	533,8±36,8
Cianidina	1.295,0±29,7
Ácido gálico	11.443,0±547,3
Ácido elágico	7.938,5±84,1
Quercetina-3-*O*-rutinosídeo	9.363,5±1.909,9
Total de fenólicos	32.592,5±2.206,9

Conclusão

A caracterização química de ambos os resíduos (em especial os teores de fibra dietética), em conjunto com os resultados de digestão simulada *in vitro*, demonstraram que a matriz alimentar influenciou a bioacessibilidade dos compostos fenólicos. Os dados de digestão *in vitro* indicam que as antocianinas apresentam baixa bioacessibilidade (em média 22%). Em contrapartida, o ácido gálico e a quercetina apresentaram bioacessibilidade muito elevada (em média 700%), sugerindo que os mesmos são formados a partir de compostos fenólicos mais complexos como, respectivamente, galotaninos e formas glicosiladas de flavonóis.

Experimentos de fermentação colônica devem ser preferencialmente realizados com meio de cultura complexo, rico em nutrientes, de maneira a preservar a complexidade da microbiota colônica por um período mais longo. Além disso, a opção por um meio complexo ajuda a mimetizar condições fisiológicas e reduz a utilização dos compostos fenólicos como fonte de carbono pelas bactérias colônicas, como quando em um meio pobre em nutrientes.

De maneira geral, os compostos fenólicos foram extensamente metabolizados pela microbiota colônica, em especial entre 4 horas e 24 horas de fermentação, sendo também observada uma intensa modificação no perfil dos compostos fenólicos ao longo de todo o tempo de fermentação utilizado nessa dissertação. O aumento dos teores de ácido gálico e o aparecimento da cianidina ao longo da fermentação foram relacionados, respectivamente, à metabolização da delfinidina-3-*O*-glicosídeo e da cianidina-3-*O*-glicosídeo. As vias metabólicas dos compostos fenólicos presentes no resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado são apresentadas de maneira esquemática nas **Figuras 11** a **14**.

Os resultados do presente estudo sugerem que os potenciais efeitos benéficos associados aos compostos fenólicos presentes na jabuticaba não estariam relacionados com suas formas intactas, mas sim aos seus metabólitos. Portanto, os efeitos benéficos locais e sistêmicos desses metabólitos deveriam ser investigados, de maneira a avaliar o real potencial bioativo do resíduo obtido da produção do suco de jabuticaba.

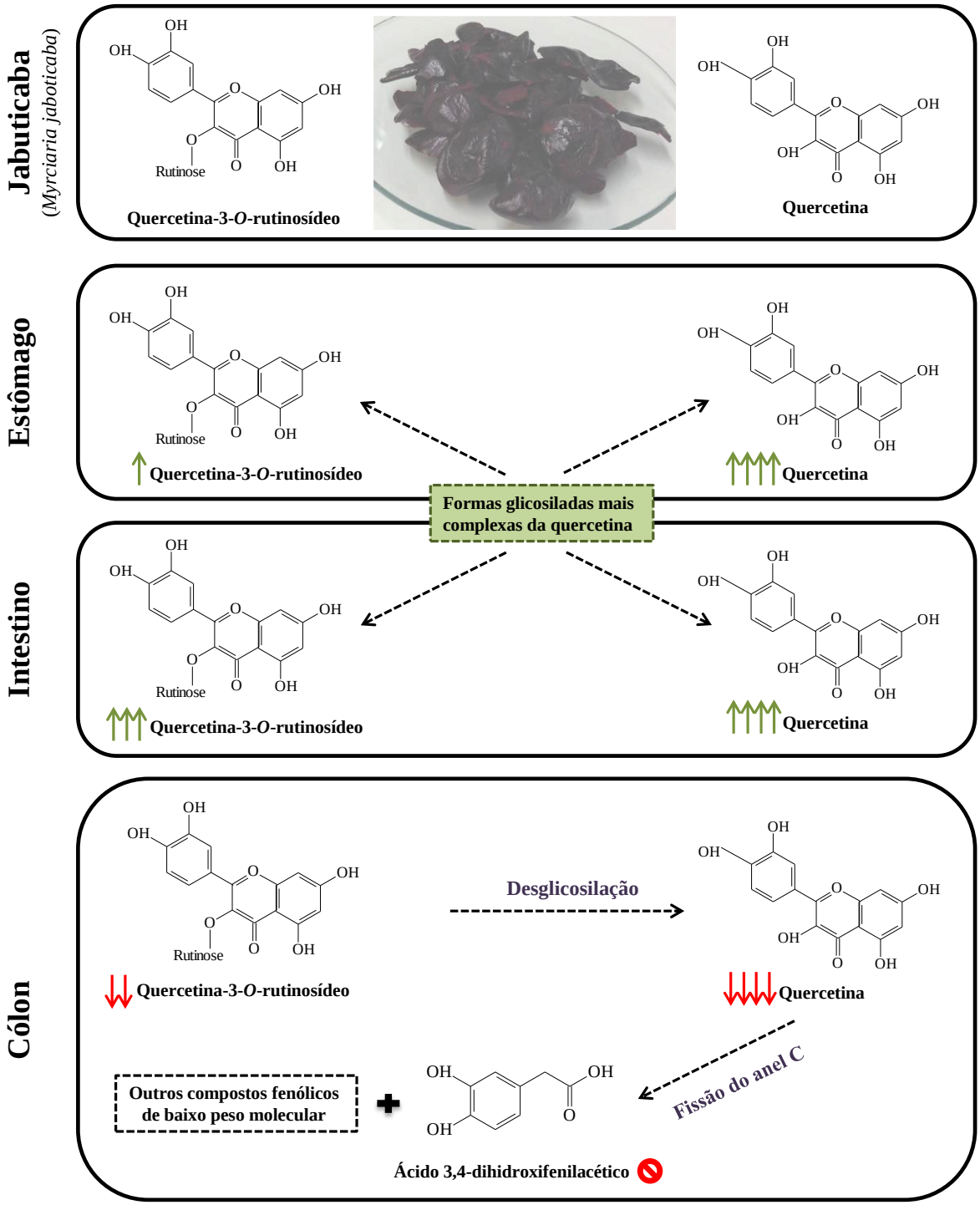


Figura 11. Representação esquemática da via metabólica da quercetina-3-*O*-rutinosídeo e da quercetina presentes no resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado. As setas vermelhas e verdes representam, respectivamente, diminuição e aumento dos compostos em comparação com o resíduo da jabuticaba. As setas tracejadas representam possíveis vias metabólicas, já descritas para outros alimentos, mas não observadas no presente trabalho. O símbolo representa metabólitos já descritos na literatura, mas não identificados no presente estudo.

% de variação: (-100/-75%) (-75/-50%) (-50/-25%) (-25/-0%)

(100/125%) (125/150%) (150/200%) (>200%)

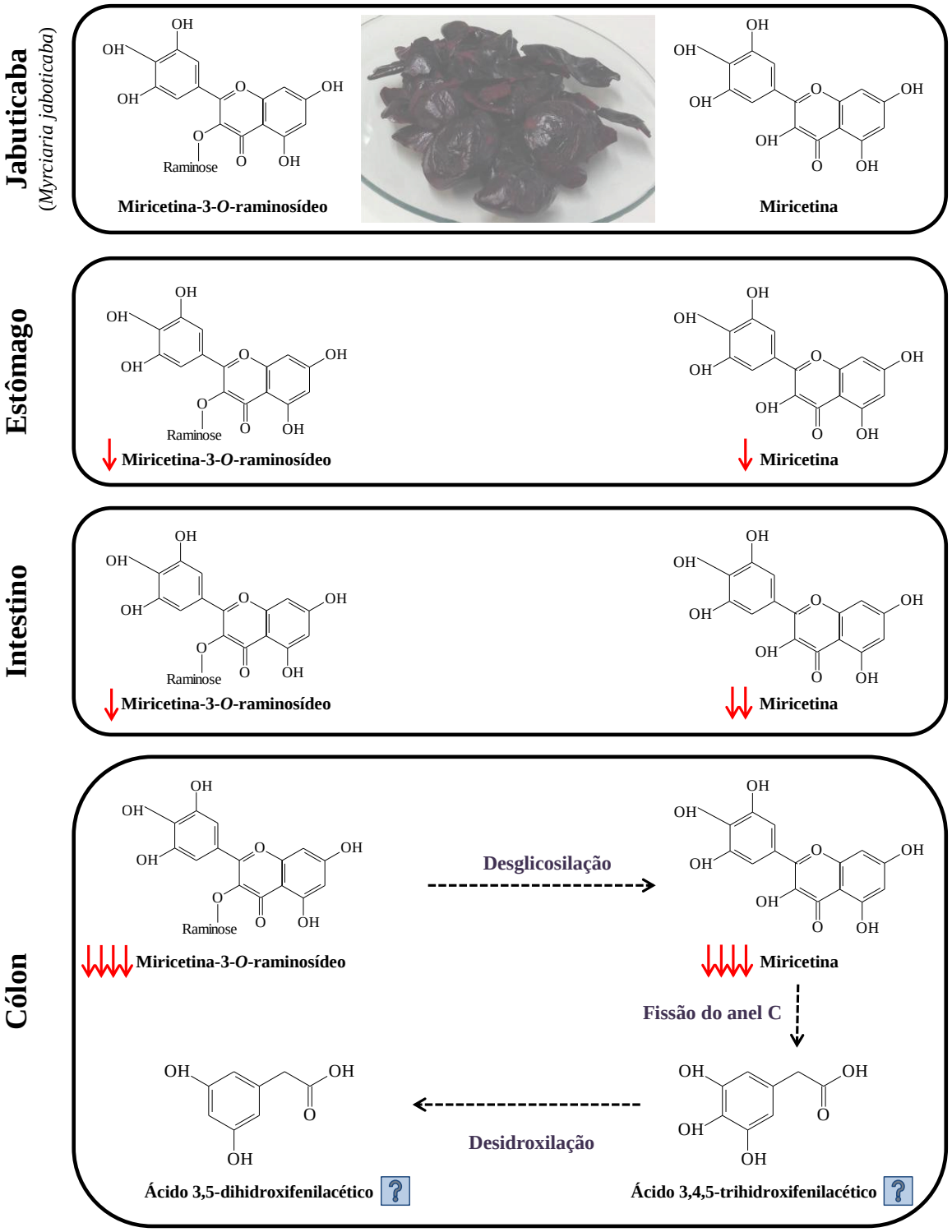


Figura 12. Representação esquemática da via metabólica da miricetina-3-*O*-raminosídeo e da miricetina presentes no resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado. As setas vermelhas representam diminuição dos compostos em comparação com o resíduo da jabuticaba. As setas tracejadas representam possíveis vias metabólicas, já descritas para outros alimentos, mas não observadas no presente trabalho. O símbolo ? representa metabólitos já descritos na literatura, mas para os quais não havia padrão comercial.

% de variação: ↓↓↓↓ (-100/-75%) ↓↓↓ (-75/-50%) ↓↓ (-50/-25%) ↓ (-25/-0%)

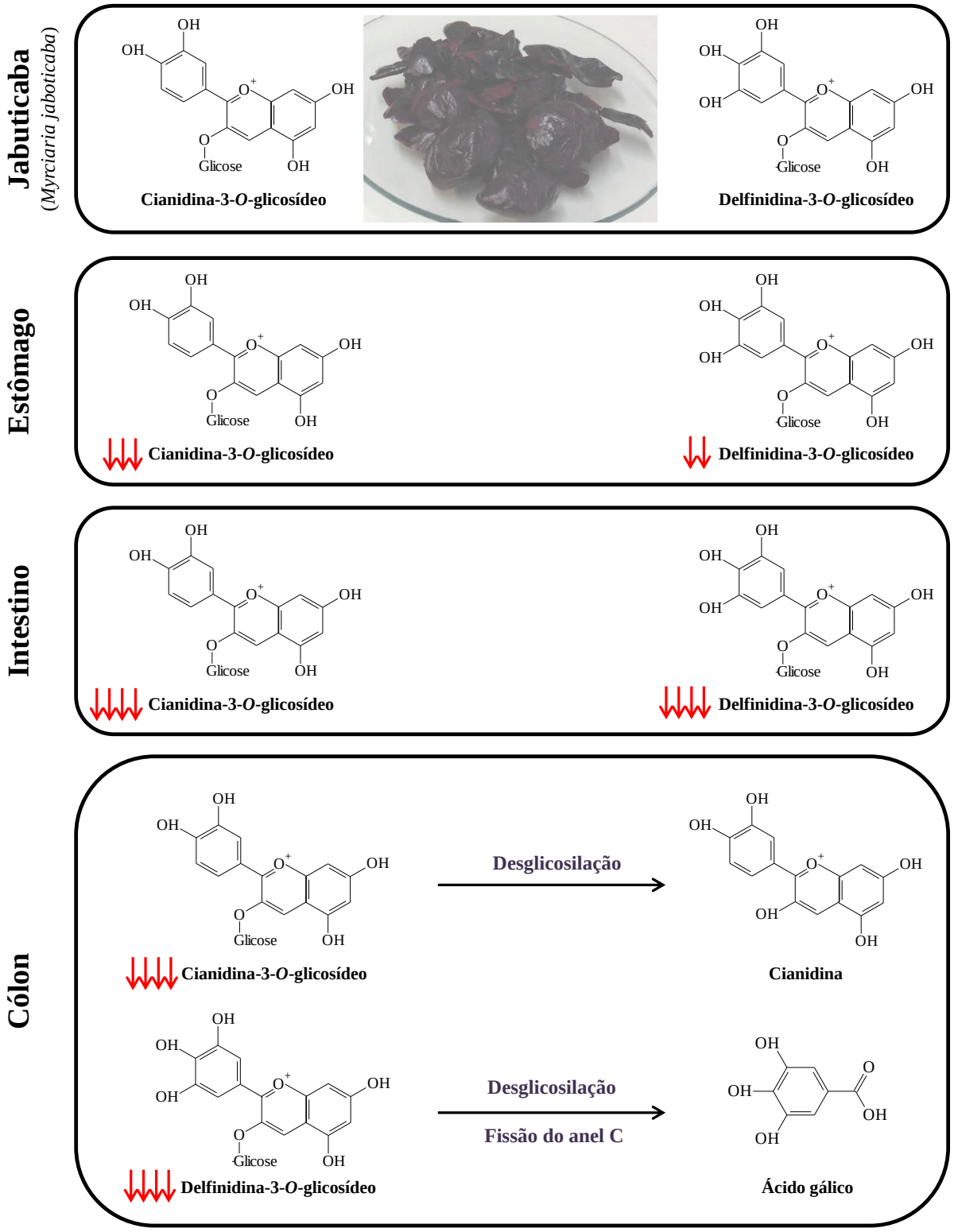


Figura 13. Representação esquemática da via metabólica das antocianinas presentes no resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado. As setas vermelhas representam diminuição dos compostos em comparação com o resíduo da jabuticaba.

% de variação: ↓↓↓↓ (-100/-75%) ↓↓↓ (-75/-50%) ↓↓ (-50/-25%) ↓ (-25/-0%)

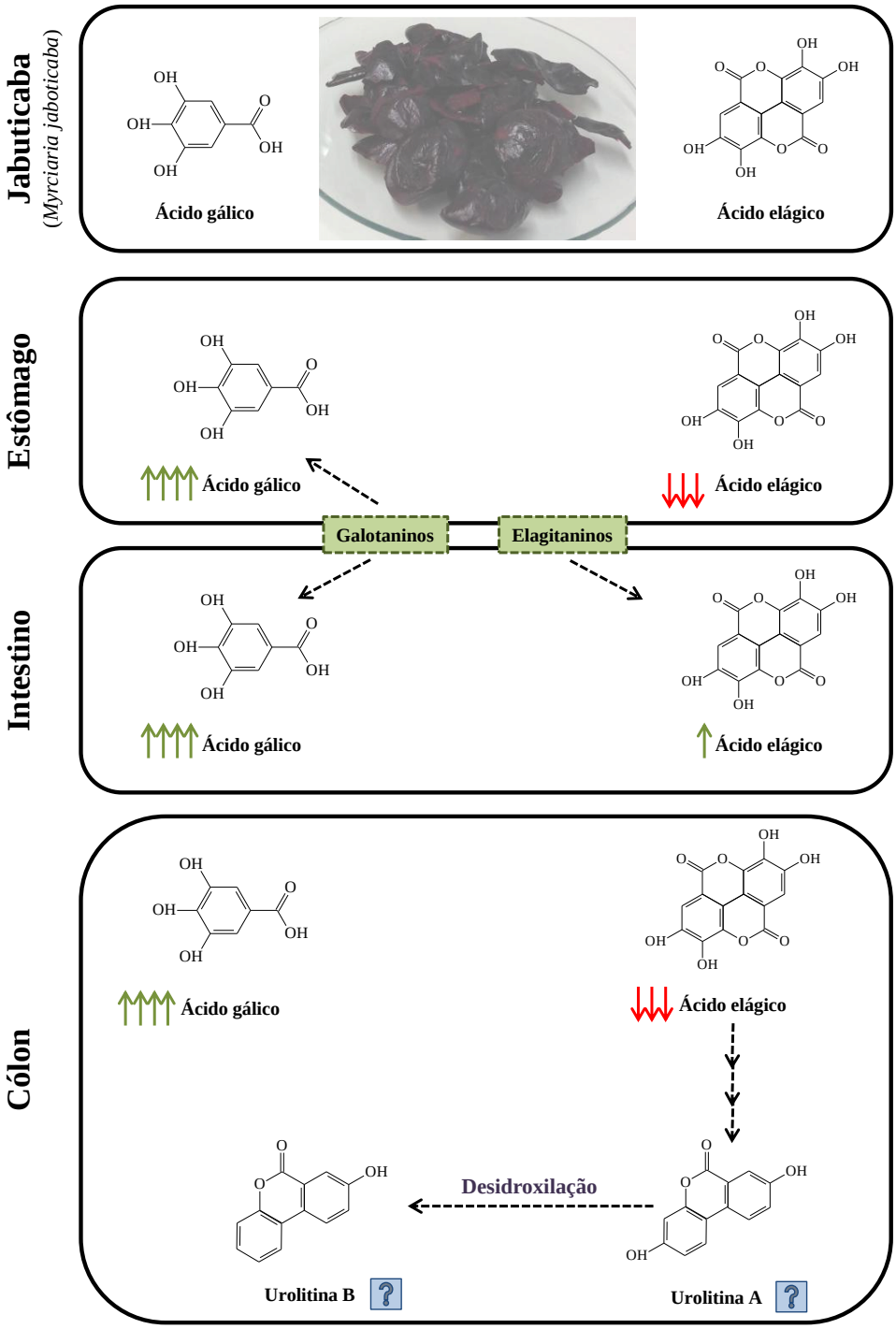


Figura 14. Representação esquemática da via metabólica dos ácidos gálico e elágico presentes no resíduo obtido do suco de jabuticaba despolpado. As setas vermelhas e verdes representam, respectivamente, diminuição e aumento dos compostos em comparação com o resíduo da jabuticaba. As setas tracejadas representam possíveis vias metabólicas, já descritas para outros alimentos, mas não observadas no presente trabalho. O símbolo ? representa metabólitos já descritos na literatura, mas para os quais não havia padrão comercial.

% de variação: (-100/-75%) (-75/-50%) (-50/-25%) (-25/-0%)

(100/125%) (125/150%) (150/200%) (>200%)

Referências Bibliográficas

ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jabuticaba (Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 8, p. 1679–1687, 2012.

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

AGUIRRE, M.; RAMIRO-GARCIA, J.; KOENEN, M. E.; VENEMA, K. To pool or not to pool? Impact of the use of individual and pooled fecal samples for in vitro fermentation studies. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 1–7, 2014.

ALEZANDRO, M. R.; DUBÉ, P.; DESJARDINS, Y.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg* and *Myrciaria cauliflora (Mart.) O. Berg*. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 468–477, 2013.

ALEZANDRO, M. R.; GRANATO, D.; GENOVESE, M. I. Jaboticaba (Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 650–659, 2013.

ANJOS, J.B.D. Extrator de sucos vegetais a vapor. Petrolina, PE: **Comunicado Técnico da Embrapa Semi-Árido**, 1999. v. 85, 3p.

AOAC International. (2000). *Official methods of analysis* (17th ed.). **Gaitherburg: AOAC International**.

ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E.; et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, p. 174–180, 2011.

AURA, A.-M.; MARTIN-LOPEZ, P.; O'LEARY, K. A.; et al. In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. **European Journal of Nutrition**, v. 44, n. 3, p. 133–142, 2005.

AYDIN, E.; GOCMEN, D. The influences of drying method and metabisulfite pre-treatment onthe color, functional properties and phenolic acids contents and bioaccessibility of pumpkin flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 385–392, 2015.

BACKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307, p. 1915–1920, 2005.

BOTO-ORDÓÑEZ, M.; URPI-SARDA, M.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; et al. High levels of Bifidobacteria are associated with increased levels of anthocyanin microbial metabolites: a randomized clinical trial. **Food & Function**, v. 5, n. 8, p. 1932–8, 2014.

BOUAYED, J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and

antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 14–21, 2011.

CARDONA, F.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TULIPANI, S.; TINAHONES, F. J.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415–1422, 2013.

CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jabuticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 343–656, 2010.

CLIFFORD, M. N. Review Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1118–1125, 2000.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.

CZANK, C.; CASSIDY, A.; ZHANG, Q.; et al. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: A ^{13}C-tracer study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, n. 5, p. 995–1003, 2013.

DALL'ASTA, M.; CALANI, L.; TEDESCHI, M.; et al. Identification of microbial metabolites derived from in vitro fecal fermentation of different polyphenolic food sources. **Nutrition**, v. 28, n. 2, p. 197–203, 2012.

DAVE, M.; HIGGINS, P. D.; MIDDHA, S.; RIOUX, K. P. The human gut microbiome: Current knowledge, challenges, and future directions. **Translational Research**, v. 160, n. 4, p. 246–257, 2012.

DEL RIO, D.; BORGES, G.; CROZIER, A. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. **The British journal of nutrition**, v. 104 Suppl , p. S67–S90, 2010.

DEL RIO, D.; COSTA, L. G.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Polyphenols and health: What compounds are involved? **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–6, 2010.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; et al. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–92, 2013.

ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEIN, C. N.; et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, p. 1635–1638, 2005.

FERGUSON, P. J.; KUROWSKA, E.; FREEMAN, D. J.; CHAMBERS, A. F.; KOROPATNICK, D. J. A Flavonoid Fraction from Cranberry Extract Inhibits Proliferation of Human Tumor Cell Lines. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 6, p. 1529–1535, 2004.

FERNÁNDEZ, K.; LABRA, J. Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 196–202, 2013.

GONZÁLEZ-BARRIO, R.; EDWARDS, C. A.; CROZIER, A. Colonic catabolism of ellagitannins, elagic acid, and raspberry anthocyanins: In Vivo and in Vitro Studies. **Drug Metabolism and Disposition**, v.39, n. 9, p. 1680–1688, 2011.

GURAK, P. D.; BONA, G. S. DE; TESSARO, I. C.; MARCZAK, L. D. F. Jaboticaba Pomace Powder Obtained as a Co-product of Juice Extraction: A Comparative Study of Powder Obtained from Peel and Whole Fruit. **Food Research International**, v. 62, p. 786–792, 2014.

HASSIMOTTO, N. M. A; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra L.*) in rats. **Nutrition Research**, v. 28, n. 3, p. 198–207, 2008.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010.

HIDALGO, M.; ORUNA-CONCHA, M. J.; WALTON, G. E.; et al. Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 3882 – 3890, 2012.

HRIBAR, U.; ULRIH, N. P. The metabolism of anthocyanins. **Current Drug Metabolism**, v. 15, n. 1, p. 3–13, 2014.

HU, J.; ZHENG, Y. L.; HYDE, W.; HENDRICH, S.; MURPHY, P. A. Human fecal metabolism of soyasaponin I. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2689–2696, 2004.

HUR, S. J.; LEE, S. J.; KIM, D. H.; CHUN, S. C.; LEE, S. K. Onion extract structural changes during in vitro digestion and its potential antioxidant effect on brain lipids obtained from low- and high-fat-fed mice. **Free Radical Research**, v. 47, n. 12, p. 1009–1015, 2013.

HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1–12, 2011.

INADA, K. O. P.; OLIVEIRA, A. A.; REVORÊDO, T. B.; et al. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422–433, 2015.

JACOB, J. K.; PALIYATH, G. Physico-chemical characteristics of nanovesicle-carbohydrate complexes in grape juice concentrate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1305–1315, 2008.

JAGANATH, I. B.; MULLEN, W.; EDWARDS, C. A.; CROZIER, A. The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man.

Free Radical Research, v. 40, n. 10, p. 1035–1046, 2006.

JESUS, N. DE; MARTINS, A. B. G.; ALMEIDA, E. J. DE; et al. Caracterização de quatro grupos de jabuticabeira, nas condições de jaboticabal-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 482–485, 2004.

KIM, B-S.; KIM, J. N.; CERNIGLIA, C. E. In vitro culture conditions for maintaining a complex population of humam gastrointestinal tract microbiota. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

KOOTTE, R. S.; VRIEZE, A.; HOLLEMAN, F.; et al. The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 112–120, 2012.

LEITE, A. V.; MALTA, L. G.; RICCIO, M. F.; et al. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba Vell Berg*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2277–2283, 2011.

LEITE-LEGATTI, A. V.; BATISTA, Â. G.; DRAGANO, N. R. V.; et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596–603, 2012.

LENQUISTE, S. A.; BATISTA, A. G.; MARINELI, R. DA S.; DRAGANO, N. R. V.; MARÓSTICA, M. R. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 153–160, 2012.

LIMA, A. J. B. DE; CORRÊA, A. D.; ALVES, A. P. C.; ABREN, C. M. P.; DANTAS-BARROS, M. Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora Berg*) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, n. 4, p. 416–421, 2008.

LIU, B.; LI, W.; HU, L.; ZHAO, J. Mild alkaline hydrolysis is an efficient and low-cost method for improving the free phenolic content and health benefit of pomegranate peel extract. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, n. 5, p. 694–700, 2013.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12 Suppl, p. 3479S–3485S, 2004.

LOZUPONE, C. A.; STOMBAUGH, J. I.; GORDON, J. I.; JANSSON, J. K.; KNIGHT, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, v. 489, p. 220-230, 2012.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 156–162, 2007.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols : food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 93 intervention studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 243S–255S, 2005.

MATTA, V. M. *et al*. **Polpa de fruta congelada**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 35 p.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3660–3667, 2002.

MCDONALD, J. A. K.; SCHROETER, K.; FUENTES, S.; et al. Evaluation of microbial community reproducibility, stability and composition in a human distal gut chemostat model. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, n. 2, p. 167–174, 2013.

MCGHIE, T. K.; WALTON, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 6, p. 702–713, 2007.

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

MOSELE, J. I.; MACIÀ, A.; ROMERO, M.-P.; MOTILVA, M.-J. Stability and metabolism of Arbutus unedo bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under in vitro digestion and colonic fermentation. **Food Chemistry**, v. 201, p. 120–130, 2016.

NIELSEN, I. L.; DRAGSTED, L. O.; RAVN-HAREN, G.; FREESE, R.; RASMUSSEN, S. E. Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2813–2820, 2003.

NUNES, J. C.; LAGO, M. G.; CASTELO-BRANCO, V. N.; et al. Effect of drying method on volatile compounds, phenolic profile and antioxidant capacity of guava powders. **Food Chemistry**, v. 197, p. 881–890, 2016.

OOMEN, A. G.; ROMPELBERG, C. J. M.; BRUIL, M. A.; et al. Development of an In Vitro Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 281–287, 2003.

PALAFOX-CARLOS, H.; AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 6–15, 2011.

PAYNE, A. N.; ZIHLER, A.; CHASSARD, C.; LACROIX, C. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 17–25, 2012.

PEREIRA, E. P. R.; FARIA, J. A. F.; CAVALCANTI, R. N.; et al. Oxidative stress in probiotic Petit Suisse: Is the jabuticaba skin extract a potential option? **Food Research International**, v. 81, p. 149–156, 2016.

PIMPÃO, R. C.; DEW, T.; FIGUEIRA, M. E.; et al. Urinary metabolite profiling identifies novel colonic metabolites and conjugates of phenolics in healthy volunteers. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 58, n. 7, p. 1414–1425, 2014.

PODSĘDEK, A.; REDZYNIA, M.; KLEWICKA, E.; KOZIOŁKIEWICZ, M. Matrix effects on the stability and antioxidant activity of red cabbage anthocyanins under simulated gastrointestinal digestion. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; et al. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (Myrciaria cauliflora). **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1228–1230, 2006.

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883–890, 2008.

RIZZON, L.A.; MANFROI, V.; MENEGUZZO, J. **Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1998, 24 p.

SILVA, A. R.; PINHEIRO, A. M.; SOUZA, C. S.; et al. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. **Cell Biology and Toxicology**, v. 24, p. 75–86, 2008.

SMITH, G. E.; GRIFFITS, L. A. Metabolism of myricetin, myricitrin and 3,4,5-trihydroyphenylacetic. **Biochemistry Journal**, v. 118, p. 53, 1970.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 599–606, 2010.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C. M.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The human microbiome project. **Nature**, v. 449, p. 804–810, 2007.

VINSON, J. A; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5315–5321, 2001.

WILLIAMSON, G.; CLIFFORD, M. N. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S3, p. S48–S66, 2010.

WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 148–159, 2013.

WU, S. B.; WU, J.; YIN, Z.; et al. Bioactive and marker compounds from two edible dark-colored Myrciaria fruits and the synthesis of jaboticabin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 17, p. 4035–4043, 2013.

WU, S.; DASTMALCHI, K.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Metabolite Profiling of Jaboticaba (Myrciaria cauliflora) and Other Dark-Colored Fruit Juices. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, p. 7513–7525, 2012.

ZHANG, Y.; BUTELLI, E.; MARTIN, C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 19, p. 81–90, 2014.

Anexos

ANEXO 1

Instruções para doação espontânea de fezes

- Não consumir por no mínimo 48 horas antes da coleta:

- Feijão preto;
- Repolho roxo;
- Frutas em geral, mas principalmente jabuticaba, uva e frutas vermelhas;
- Bebidas alcoólicas;
- Sucos, iogurtes e refrigerantes a base de uva, jabuticaba e frutas vermelhas.

Coleta das fezes deve ser realizada pela manhã e entregue o mais rápido possível (até 2 horas após a coleta).

Qualquer dúvida entrar em contato pelos telefones:

Tamirys Barcellos

976818386 (Whatsapp)

987897295 (oi)

ANEXO 2

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Trabalho de pesquisa: "Caracterização dos metabólitos gerados durante o processo de digestão simulada *in vitro* e após fermentação colônica de resíduos do suco da jabuticaba *(myrciaria jaboticaba*)"

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) de uma pesquisa cujo objetivo é investigar as mudanças que componentes naturalmente presentes na casca e na semente de jabuticaba sofrem quando em contato com fezes. Este estudo está sendo realizado pela nutricionista e mestranda do Programa de Pós-Graduação em Nutrição (UFRJ), Tamirys Barcellos R. Silva, sob orientação da Prof. Dr[a] Mariana Monteiro do Instituto de Nutrição e do Prof. Dr. Daniel Perrone do Instituto de Química, ambos da UFRJ.
Participando deste estudo, dois dias antes de uma coleta de fezes você será orientado a:

- Não consumir frutas em geral (principalmente jabuticaba, uva e frutas vermelhas), feijão preto, repolho roxo, sucos, refrigerantes a base de uva e bebidas alcoólicas.

As fezes dos voluntários adultos serão coletadas e armazenadas em potes plásticos. Todos os materiais para coleta e armazenamento das amostras lhe serão fornecidos gratuitamente. Também serão solicitadas informações socioeconômicas (local onde mora, renda familiar mensal) e relativas à sua saúde (hábitos alimentares e de estilo de vida, histórico pessoal e familiar de doenças pré-existentes, uso de medicamentos, etc).

Esclarecemos que o procedimento de coleta de fezes não acarretará desconforto ou riscos para você. Lembramos que é muito importante a lavagem das mãos com água e sabão após a coleta das fezes para não adquirir ou transmitir nenhuma doença. Esclarecemos, ainda, que não há benefício direto para o participante, e que você não terá despesas relacionadas à pesquisa, nem retorno financeiro (por exemplo, para pagamento de transporte e alimentação). A sua participação na pesquisa não é obrigatória e sua recusa não acarretará nenhum prejuízo. Além disso, você poderá se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem constrangimentos, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo ou penalização, sem necessidade de justificativa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso direto com os responsáveis pela pesquisa das seguintes formas:

- Tamirys Barcellos Revorêdo Silva - email: tamirys.barcellos@hotmail.com – Telefone de contato: 98789-7295
- Prof. Mariana Costa Monteiro - email: macostamonteiro@gmail.com - Endereço: Av. Carlos Chagas Filho, 373, Centro de Ciências da Saúde, bloco J, segundo andar, sala 16. Cidade Universitária. Rio de Janeiro. Telefone de contato: 3938-6449
- Prof. Daniel Perrone - email: danielperrone@iq.ufrj.br. Endereço: Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Centro de Tecnologia, bloco A, sala 528A. Cidade Universitária. Rio de Janeiro. Telefone de contato: 3938-8213.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ – Rua Professor Rodolpho Paulo Rocco, nº 255, sala 01D-46/1º andar. Cidade Universitária/Ilha do Fundão. Rio de Janeiro. Telefone (21) 2562-2480, de segunda a sexta-feira, das 8 às 15 horas ou através do email: cep@hucff.ufrj.br.

Todos os dados fornecidos são considerados confidenciais, sendo totalmente garantido o sigilo das informações e sua privacidade. Os dados não serão divulgados de forma a

possibilitar a sua identificação e os resultados obtidos neste trabalho serão divulgados em revistas científicas da área.

Acredito ter sido suficientemente informado (a) a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com a nutricionista Tamirys Barcellos R. Silva sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu (ou meu representante legal) e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

_____ _____ Rio de Janeiro, ____/____/____

Nome do sujeito da pesquisa | Assinatura do sujeito da pesquisa

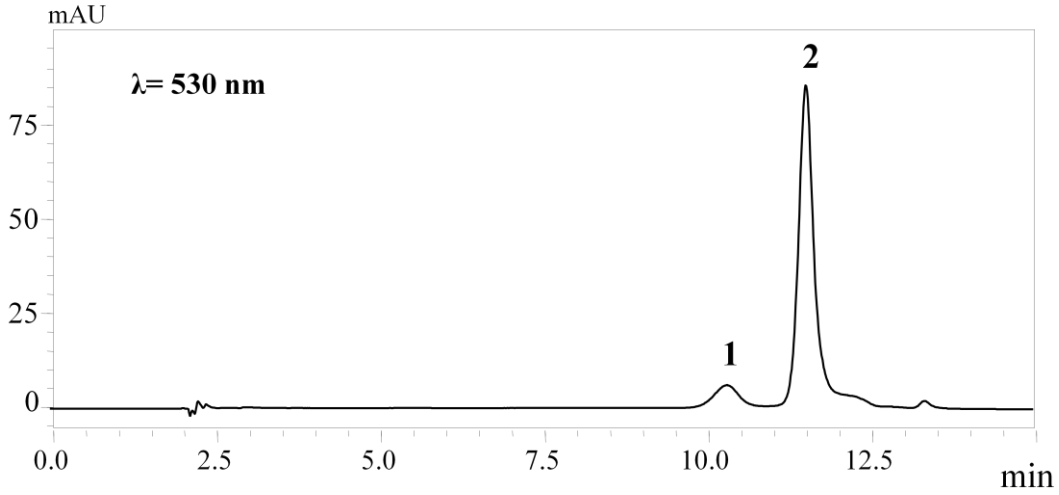
obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do voluntário para participação no estudo.

_____ _____ Rio de Janeiro, ____/____/____

Nome do pesquisador responsável | Assinatura do pesquisador responsável

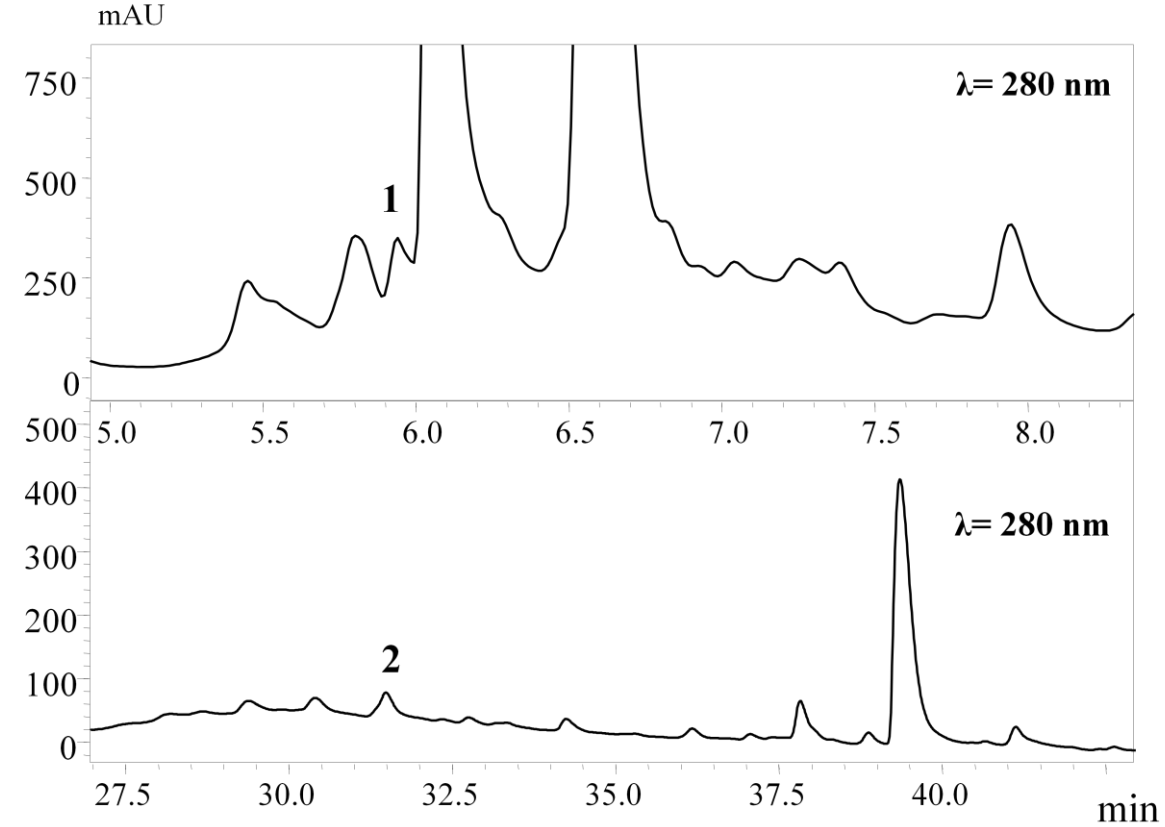
ANEXO 3

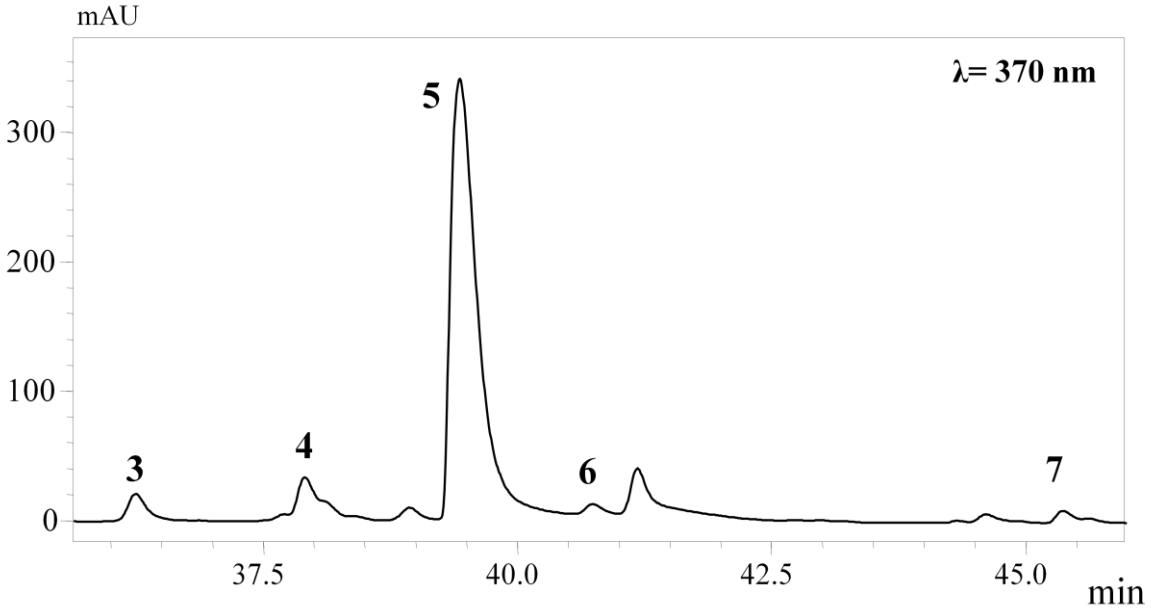
Cromatograma do perfil de antocianinas do extrato da fração solúvel do resíduo de suco de jabuticaba obtido por despolpamento. Compostos identificados: delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**1**) e cianidina-3-*O*-glicosídeo (**2**).



ANEXO 4

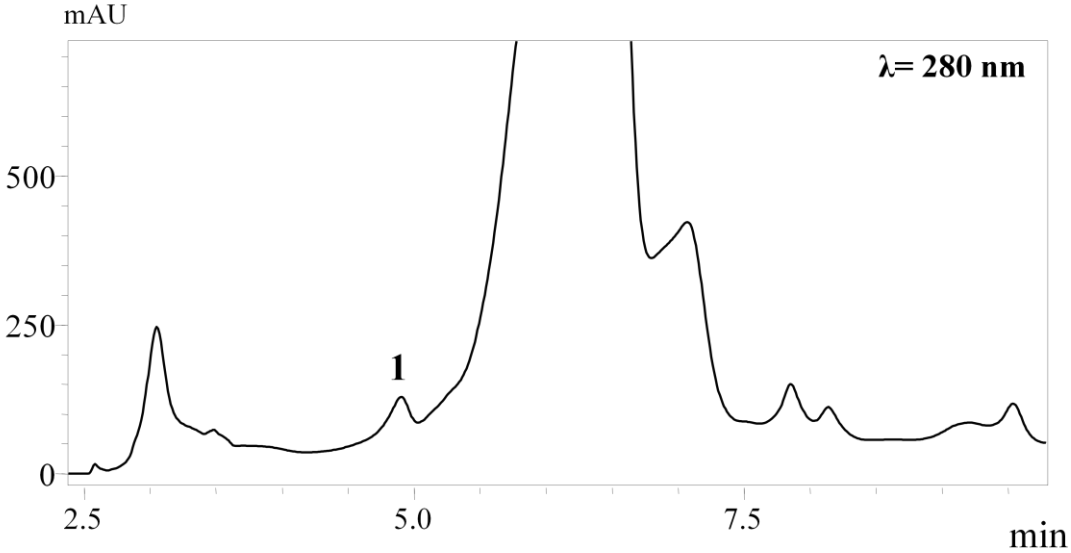
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos não-antociânicos da fração solúvel do resíduo de suco de jabuticaba obtido por despolpamento. Compostos identificados: ácido gálico (**1**), ácido *m*-cumárico (**2**), miricetina-3-*O*-ramnosídeo (**3**), quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**4**), ácido elágico (**5**), miricetina (**6**) e quercetina (**7**).

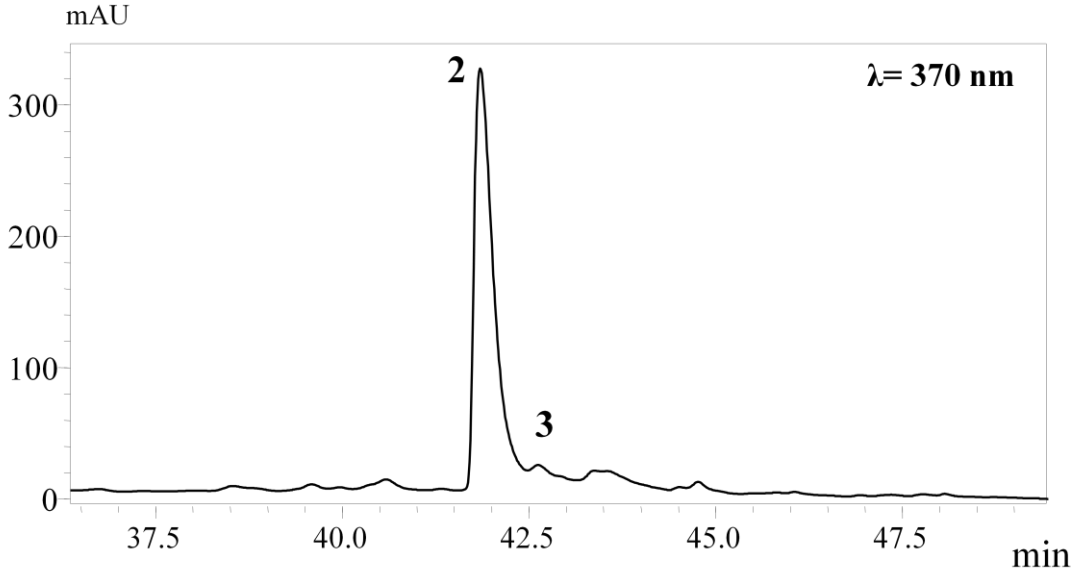




ANEXO 5

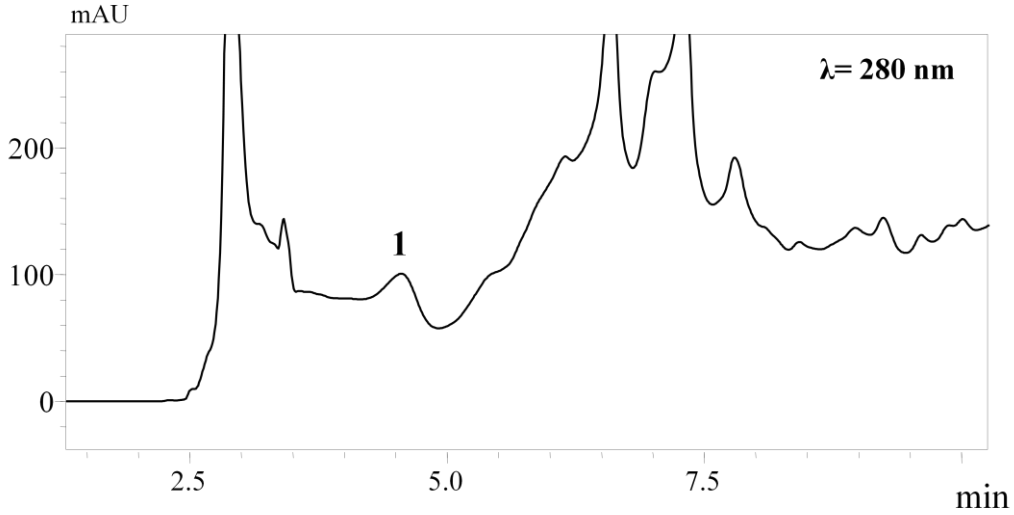
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fração insolúvel alcalina do resíduo de suco de jabuticaba obtido por despolpamento. Compostos identificados: ácido gálico (**1**), ácido elágico (**2**) e miricetina (**3**).

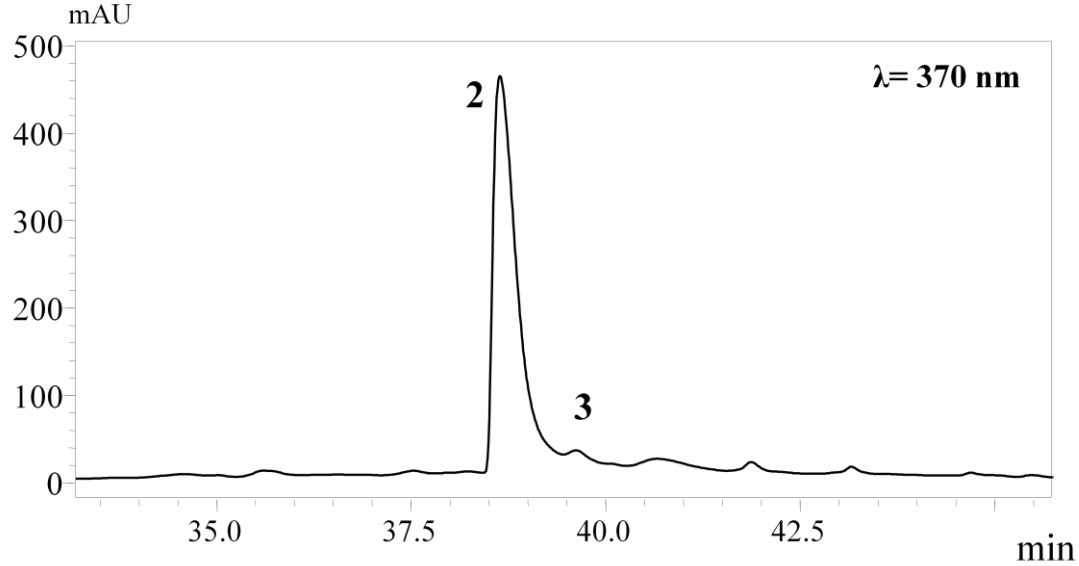




ANEXO 6

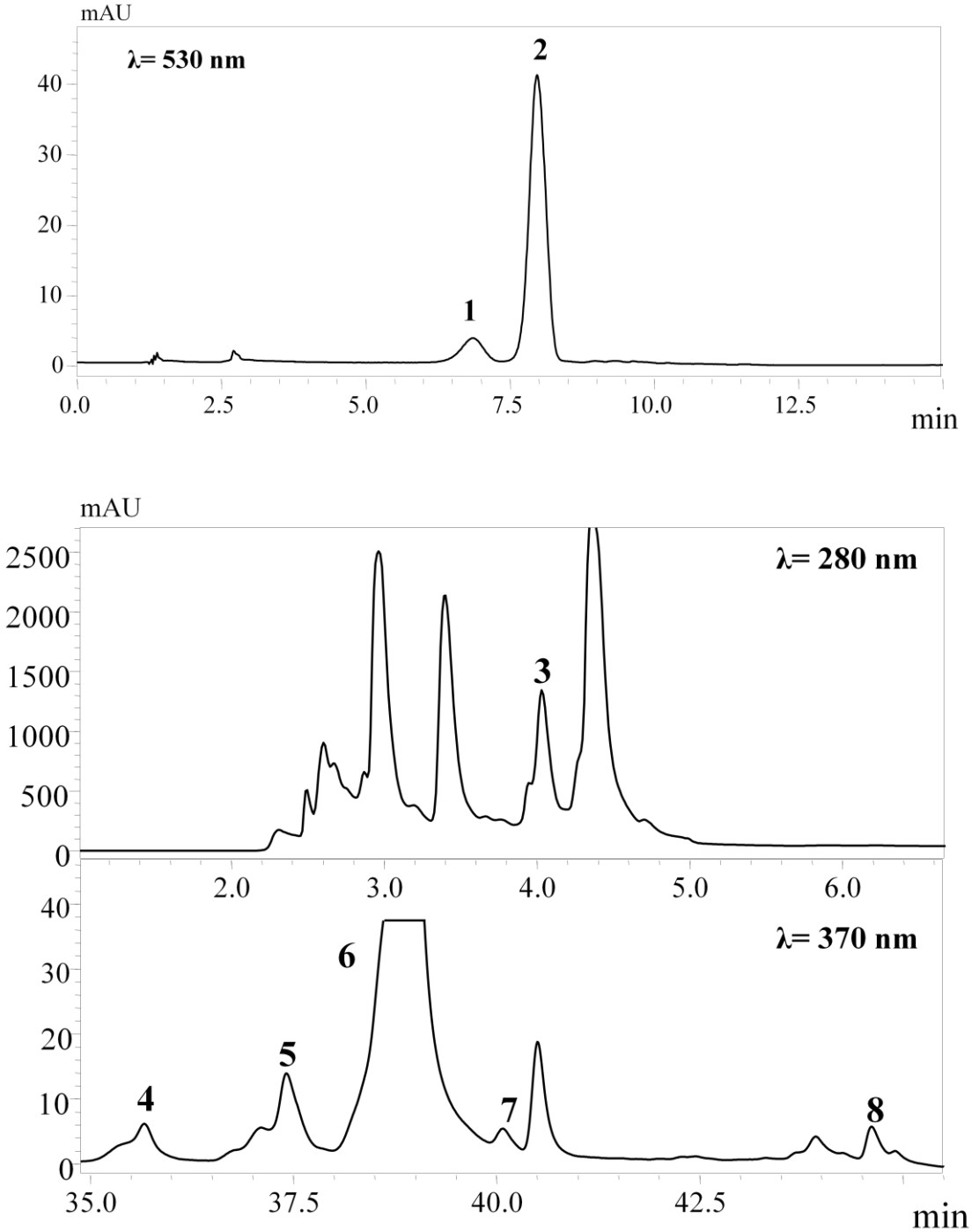
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fração insolúvel ácida do resíduo de suco de jabuticaba obtido por despolpamento. Compostos identificados: ácido gálico (**1**), ácido elágico (**2**) e miricetina (**3**).





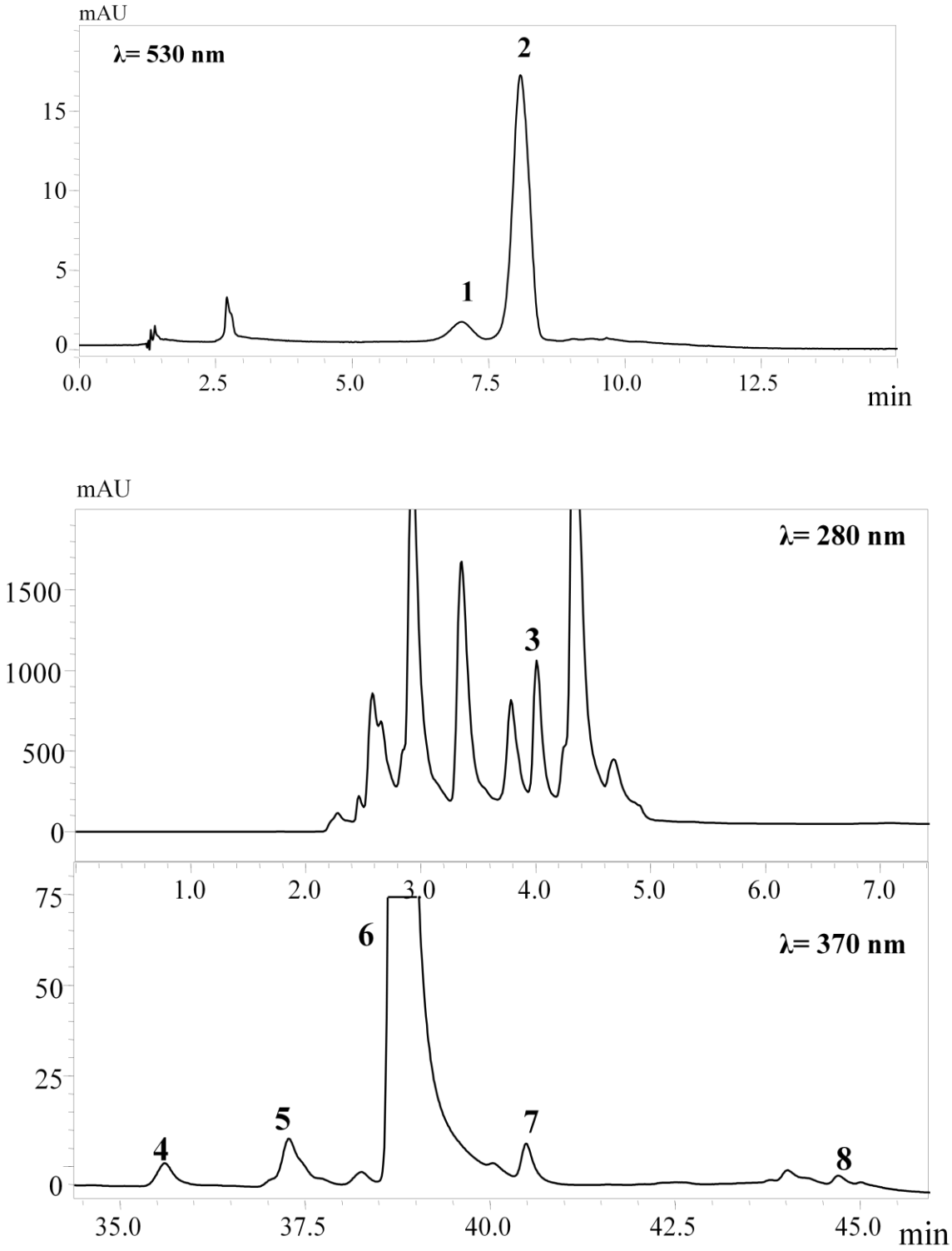
ANEXO 7

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da etapa gástrica da digestão *in vitro* do resíduo de suco de jabuticaba obtido por despolpamento. Compostos identificados: delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**1**), cianidina-3-*O*-glicosídeo (**2**), ácido gálico (**3**), miricetina-3-*O*-ramnosídeo (**4**), quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**5**), ácido elágico (**6**), miricetina (**7**) e quercetina (**8**).



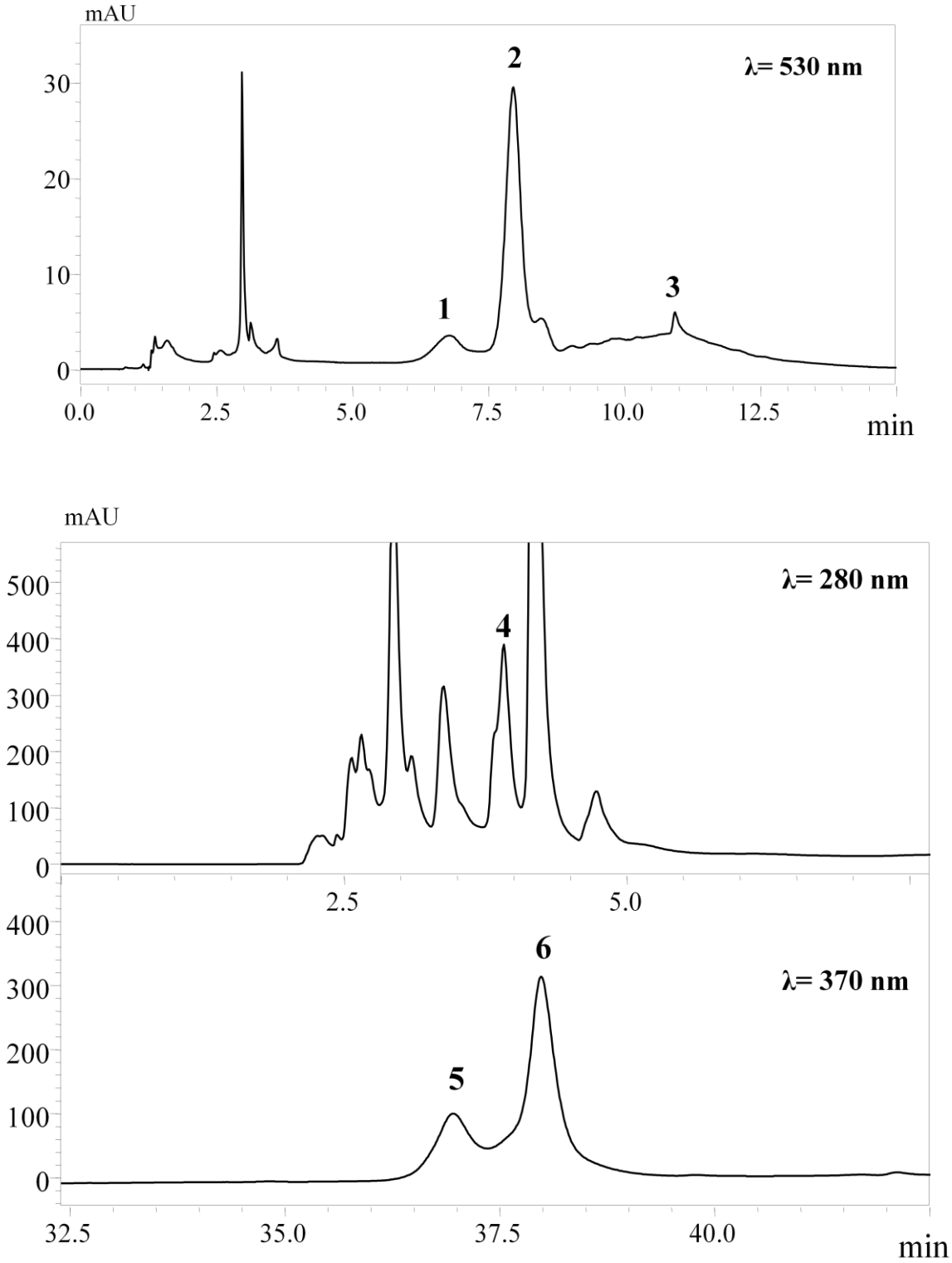
ANEXO 8

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da etapa intestinal da digestão *in vitro* do resíduo de suco de jabuticaba obtido por despolpamento. Compostos identificados: delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**1**), cianidina-3-*O*-glicosídeo (**2**), ácido gálico (**3**), miricetina-3-*O*-ramnosídeo (**4**), quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**5**), ácido elágico (**6**), miricetina (**7**) e quercetina (**8**).



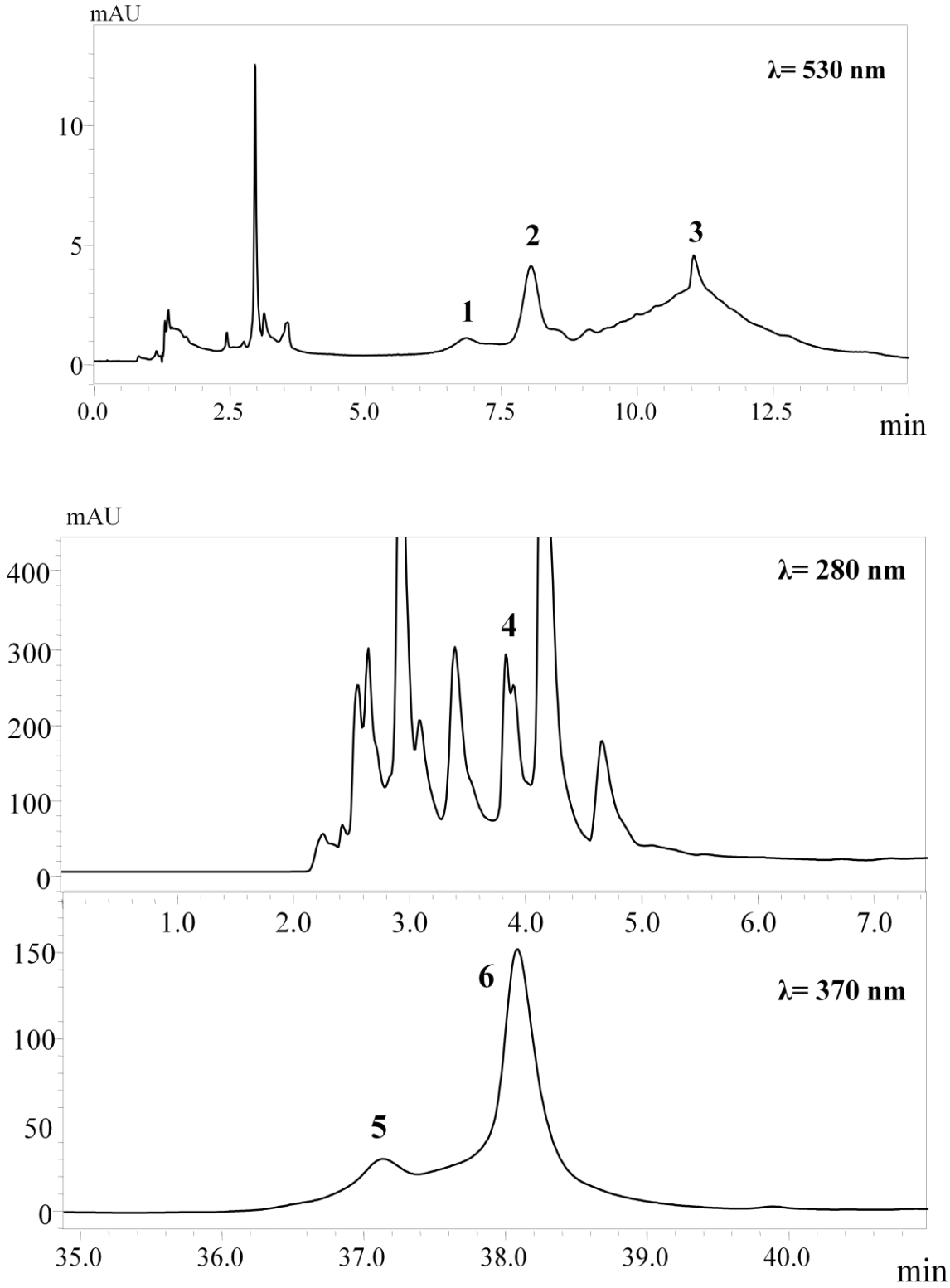
ANEXO 9

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos após 4 horas de fermentação colônica do resíduo de suco de jabuticaba obtido por despolpamento. Compostos identificados: delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**1**), cianidina-3-*O*-glicosídeo (**2**), cianidina (**3**), ácido gálico (**4**), quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**5**) e ácido elágico (**6**).



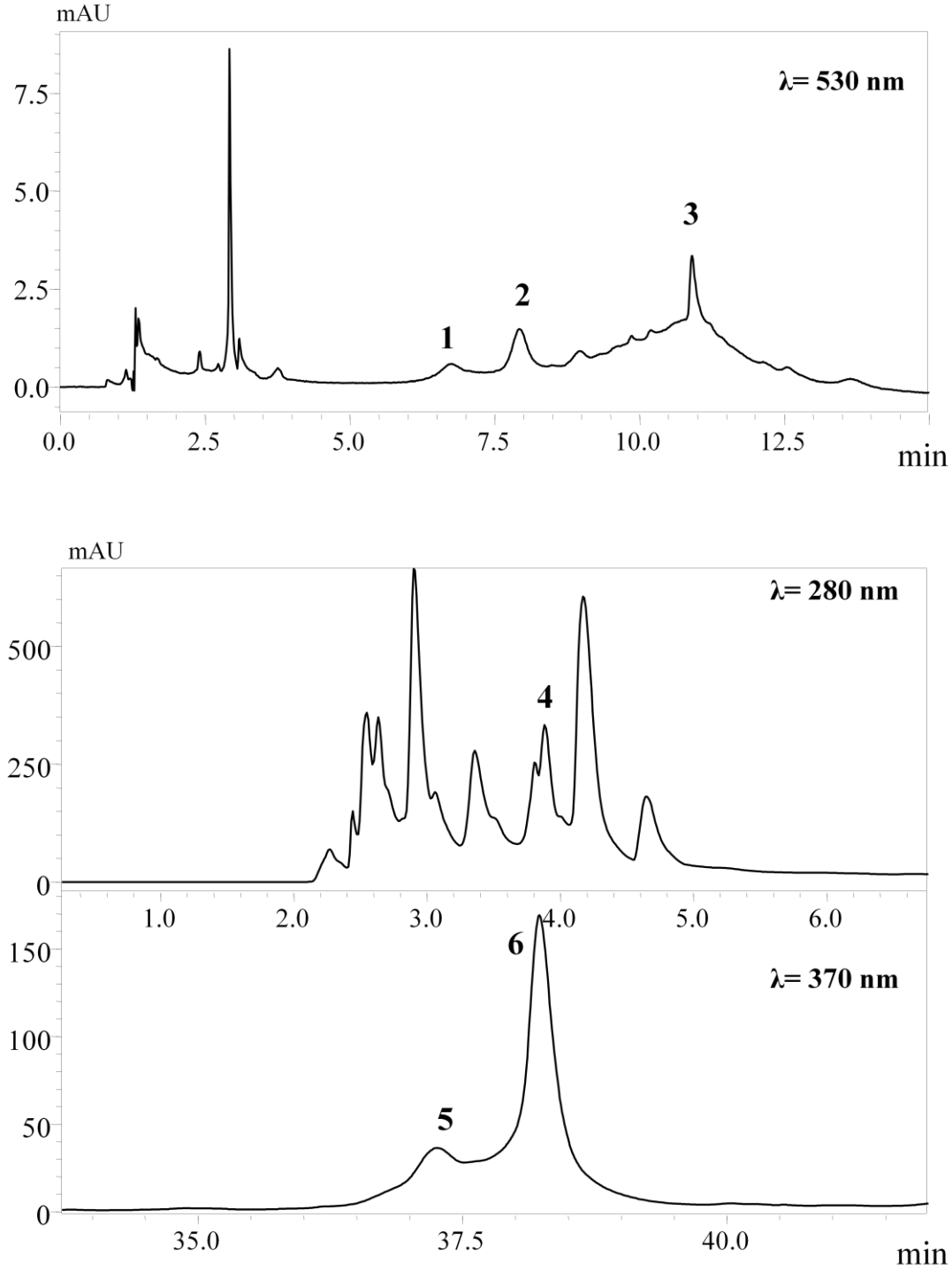
ANEXO 10

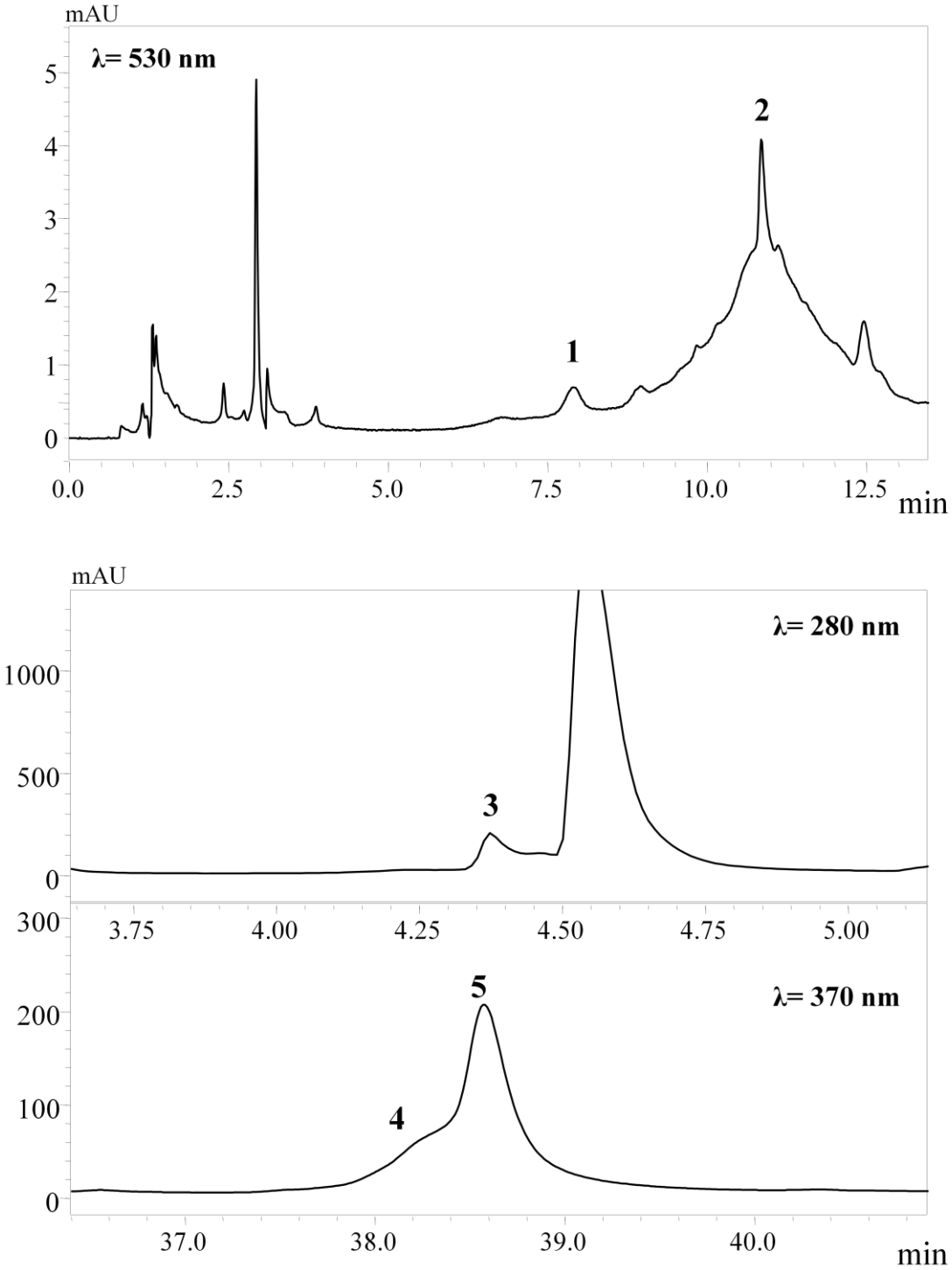
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos após 24 horas de fermentação colônica do resíduo de suco de jabuticaba obtido por despolpamento. Compostos identificados: delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**1**), cianidina-3-*O*-glicosídeo (**2**), cianidina (**3**), ácido gálico (**4**), quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**5**) e ácido elágico (**6**).



ANEXO 11

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos após 48 horas de fermentação colônica do resíduo de suco de jabuticaba obtido por despolpamento. Compostos identificados: delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**1**), cianidina-3-*O*-glicosídeo (**2**), cianidina (**3**), ácido gálico (**4**), quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**5**) e ácido elágico (**6**).



ANEXO 12

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos após 72 horas de fermentação colônica do resíduo de suco de jabuticaba obtido por despolpamento. Compostos identificados: cianidina-3-*O*-glicosídeo (**1**), cianidina (**2**), ácido gálico (**3**), quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**4**) e ácido elágico (**5**).