UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos
Área de Bromatologia

Caracterização de compostos bioativos de maracujá (*Passiflora tenuifila*) e efeito do seu consumo sobre marcadores bioquímicos, microbiota intestinal em indivíduos eutróficos e obesos.

José Thiago do Carmo Santos

Tese para obtenção do grau de DOUTOR
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

São Paulo-SP
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos
Área de Bromatologia

Caracterização de compostos bioativos de maracujá (*Passiflora tenuifila*) e efeito do seu consumo sobre marcadores bioquímicos, microbiota intestinal em indivíduos eutróficos e obesos.

José Thiago do Carmo Santos

Versão corrigida da tese conforme resolução CoPGr 6018

Tese para obtenção do grau de DOUTOR
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

São Paulo-SP
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S237c	<p>Santos, José Thiago do Carmo Caracterização de compostos bioativos de maracujá (<i>Passiflora tenuifila</i>) e efeito do seu consumo sobre marcadores bioquímicos, microbiota intestinal em indivíduos eutróficos e obesos. / José Thiago do Carmo Santos. - São Paulo, 2019. 203 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto</p> <p>1. MARACUJÁ. 2. FÍSICO-QUÍMICA. 3. COMPOSTOS FENÓLICOS. 4. EXCREÇÃO. 5. MICROBIOTA INTESTINAL. I. T. II. Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto, orientador.</p>
-------	---

José Thiago do Carmo Santos

Caracterização de compostos bioativos de maracujá (*Passiflora tenuifila*) e efeito do seu consumo sobre marcadores bioquímicos, microbiota intestinal em indivíduos eutróficos e obesos.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do título de DOUTOR

Prof^a. Dr^a. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
Presidente/Orientadora

1 °. examinador

2 °. examinador

3 °. examinador

4 °. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2020.

Dedico este trabalho aos meus pais e maiores exemplos na vida, JOSEFINA e GENIVALDO, como retribuição a todo carinho, apoio, estímulo e dedicação dados.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, presença constante em minha vida, pelo consolo, força, foco e paciência ao longo desses anos que não me permitiram desistir;

À Prof^a. Dr^a. NEUZA MARIKO AYMOTO HASSIMOTTO, pela orientação e por todas as oportunidades e desenvolvimento profissional;

Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pelas valiosas considerações e apontamentos ao longo da jornada e no compartilhamento de experiência;

Aos colegas do laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, em especial, Janayra, Ana Sansone, Victor, Samira e aos colegas do grupo Flavonoides, Alessandra, Aline, Ana Marla, Jaqueline, Jéssica, Luciane, Mariana e Mayara pelos momentos de troca de experiência, apoio durante os experimentos e debate que ajudaram no desenvolvimento desse trabalho;

Aos técnicos de laboratório, Elias Araújo, Lúcia Justinos, Luciene Lauer, Aline de Oliveira, Tânia Shiga, Fabiana Lima, Felipe Dörr, por toda ajuda nos experimentos e pelo inestimável compartilhamento de conhecimento técnico-científico que tanto contribuíram para este trabalho e crescimento profissional;

À Dr^a. Ana Maria, da EMBRAPA-Cerrados e membro da Rede Passiflora, pela cessão de todo o fruto utilizado no estudo e por compartilhar conosco o entusiasmo e conhecimento técnico sobre o maracujá;

Ao Dr. Francisco Tomás-Barberán e a todos do Grupo de calidad, seguridad y bioactividad de alimentos vegetales (CEBAS-CSIC, Espanha) pelo exemplo de humildade, grande acolhimento e pela disponibilidade e enorme apoio na análise de identificação de metabólitos de flavonoides em urina e na identificação de proantocianidinas pelo método de fluroglucinólises, em especial, as companheiras de *internship* Kim Inada e Serene Hilary;

À Prof^a. Dr^a. Carla Taddei de Castro Neves e seus orientandos, Ramón Cortez, Luiz Gustavo e Luana Moreira, pela disponibilidade e enorme apoio e parceria na análise da microbiota intestinal;

Ao Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço por toda disponibilidade, paciência, empenho e auxílio na análise estatística;

À equipe do Ambulatório de Nutrição do IDPC, em especial, à nutricionista Cristiane Kovacs, por todo apoio antes e durante o experimento biológico;

À aluna de iniciação científica Jéssica Rodriguez, pelo grande apoio na análise do consumo alimentar e paciência com esse protótipo de orientador;

Ao FoRC, com destaque à Claudia Denani, Isabel Bossi pela ajuda em toda burocracia e a Dr^a. Miriam Roldán pelo apoio em espectrometria de massas;

Aos membros da banca do exame de qualificação, pelas considerações e direcionamentos dado ao trabalho;

Aos funcionários da FCF/USP, de modo especial aos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (Edilson, Roberta, Vanessa, Mônica, Cleo e Lurdinha) pela grande paciência, carinho e respeito ao longo desses anos;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências dos alimentos pela oportunidade de realização do doutorado. Vale ressaltar que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e contou com auxílio financeiro da FAPESP.

À toda minha família, em especial aos meus pais, Josefina e Genivaldo, e minha irmã Tiana Soraia pela paciência, suporte, orientação e compreensão pela minha ausência durante o processo, e também aos meus primos, Prof. Dr. João Batista Filho, Prof. Dr. Roberto Santos Junior e Prof. Ms. Márcio Batista Santos, por demonstrarem que com esforço, dedicação e persistência chega-se lá;

À minha namorada, INGRYD CAROLINNE, por sempre impulsionar-me, pelo imensurável apoio, grande companheirismo, ombro de desabafo, porto seguro após cada momento difícil, compreensão... faltam palavras para agradecer;

Às grandes amigas, Manuela Siqueira pelos conselhos, parceria, partilha, momentos de descontração e incalculável apoio ao longo dessa jornada; Isabel Massaretto, grande exemplo de pessoa, pela imensurável ajuda durante minha estadia na Espanha e por compartilhar comigo sua longa experiência de laboratório e de vida; Elisa Brasilli pelos conselhos, sensibilidade e leveza; Mayra Cristianne, grande amiga de vida e Luciana Tedesco e Augusto Sattler, pelo carinho, apoio e motivação;

À Carlos, Cleide e Daniele, família postiça em São Paulo pelo apoio e momentos de descontração;

“Prefiram o conhecimento ao ouro puro,
pois a sabedoria é mais preciosa do que
rubis; nada do que vocês possam
desejar compara-se a ela”

Provérbios 8:10-11

RESUMO

SANTOS, J. T. C. **Caracterização de compostos bioativos de maracujá (*Passiflora tenuifila*) e efeito do seu consumo sobre marcadores bioquímicos, microbiota intestinal em indivíduos eutróficos e obesos.** 2019. Tese (Doutorado) – Faculdade Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O maracujá (*Passiflora ssp.*) é conhecido por suas características sensoriais e por apresentar diversos compostos bioativos. Estudos prévios demonstraram que o consumo a longo prazo de maracujá melhorou os parâmetros bioquímicos, inflamatórios e antioxidantes. Uma espécie que tem despertado interesse é a *Passiflora tenuifila* Killip consumida pela população local, porém, ainda com baixa expressão comercial. Assim, o objetivo deste trabalho consiste em avaliar o efeito da ingestão a médio prazo de maracujá (*P. tenuifila* Killip) em indivíduos eutróficos e obesos. Inicialmente foi realizada uma caracterização do fruto em dois estágios de amadurecimento (verde e maduro), uma vez que são consumidas nestas duas formas. Foram avaliadas características físico-químicas e o perfil de flavonoides por HPLC-ESI-MS/MS. O conteúdo de Sólidos Totais Solúveis variou entre 20,80 e 23,55° Brix, porém não foi observada diferença significativa entre os dois estágios. Os principais açúcares identificados foram a sacarose e glicose, variando entre 4,0-8,5%, apresentando maior conteúdo no estágio verde ($p < 0.05$). Os principais ácidos orgânicos encontrados foram o cítrico, tartárico e málico, no entanto os teores variaram entre os lotes analisados. Os frutos nos dois estágios apresentaram o mesmo perfil de flavonoides, apresentando como compostos majoritários a procianidina-Tipo B e flavonas C-glicosiladas (luteolina e apigenina). Após a caracterização do fruto, foram recrutados indivíduos adultos (entre 19 e 59 anos), eutróficos (IMC= 19,0- 24,99 Kg/m²) ou obesos (IMC > 30,00) que ingeriram durante 30 dias uma dose diária do maracujá (*P. tenuifila* Killip). Foram avaliados marcadores antropométricos, perfil bioquímico sérico, do estresse oxidativo e permeabilidade intestinal. Foi avaliado também a excreção de flavonoides na urina por HPLC-ESI-QTOF-MS/MS e a microbiota intestinal por 16s rRNA. A ingestão diária por somente 30 dias de uma porção de *P. tenuifila* Killip demonstrou grandes benefícios. O consumo da *P. tenuifila* Killip foi responsável pela redução da concentração de colesterol total e LDL sérico dos indivíduos obesos ($p < 0,05$). Foi observado tendência na redução da permeabilidade intestinal e redução significativa ($p < 0,05$) no biomarcador do estresse oxidativo 8-OHdG (associado à dano à estrutura do DNA). O consumo do maracujá *P. tenuifila* Killip aumentou a excreção de metabólitos na urina produzidos a partir da metabolização de flavonas-C-glicosiladas e flavan-3-ol e, por fim, foi capaz de modular a microbiota reduzindo a abundância relativa do filo *Firmicutes* (associada a obesidade) e aumentando a proporção de *Lachnospiraceae* (família associada à redução de inflamação local e ao metabolismo de compostos fenólicos).

Palavras-chaves: *P. tenuifila* Killip, flavonoides, biodisponibilidade, microbiota.

ABSTRACT

SANTOS, J. T. C. **Characterization of bioactive compounds of passion fruit (*Passiflora tenuifila*) and effect of consumption on biochemical markers, intestinal microbiota in eutrophic and obese subjects.** 2019. Thesis (Doctorate) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Passion fruit (*Passiflora* spp.) is known for its sensory characteristics and for presenting various bioactive compounds. Previous studies shown that long-term passion fruit consumption has improved biochemical, inflammatory and antioxidant parameters. A species that has aroused interest is *Passiflora tenuifila* Killip consumed by the local population, but has no commercial expression yet. The objective of this study is to evaluate the effect of medium-term intake of passion fruit (*P. tenuifila* Killip) on eutrophic and obese subjects. Initially, the fruit was characterized in two ripening stages (green and ripe), which are the most consumed stages. Physico-chemical characteristics and flavonoid profile were evaluated by HPLC-ESI-MS/MS. The total soluble solids content ranged from 20.80 to 23.55 ° Brix, but no significant difference was observed between the two stages. The main sugars identified were sucrose and glucose, ranging from 4.0-8.5%, with higher content in the green stage ($p < 0.05$). The main organic acids found were citric, tartaric and malic, however the levels varied between the lots analyzed. The fruits in both stages presented the same profile of flavonoids, presenting as major compounds procianidin Type B and C-glycosylated flavones (luteolin and apigenin). After fruit characterization, adult (between 19 and 59 years), eutrophic (BMI = 19.0-24.99 Kg/m²) or obese (BMI > 30.00) ingested for 30 days a daily dose of passion fruit (*P. tenuifila* Killip) and anthropometrics indicators, serum biochemical profile, oxidative stress and intestinal permeability were evaluated. The excretion of flavonoids in urine by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS and intestinal microbiota by 16s rRNA was also evaluated. Daily intake for only 30 days of a portion of *P. tenuifila* Killip has shown great benefits. The *P. tenuifila* Killip consumption was responsible for reduction of total cholesterol and LDL in obese subjects ($p < 0.05$). There was a tendency to reduce intestinal permeability and a significant reduction ($p < 0.05$) of 8-OHdG (oxidative stress biomarker, associated with damage to DNA structure). *P. tenuifila* Killip consumption increased the excretion of urine metabolites produced by metabolism of flavones-C-glycosylated and flavan-3-ol and, finally, was able to modulate the microbiota, reducing the relative abundance of the *Firmicutes* (phylum associated with obesity) and increasing the proportion of *Lachnospiraceae* (family associated with reduced local inflammation and metabolism of phenolic compounds).

Keywords: *P. tenuifila* Killip, flavonoids, bioavailability, microbiota.

LISTA DE FIGURAS

SEÇÃO I

Figura 1 – Fruto da <i>Passiflora tenuifila</i> Killip em dois estádios consumidos: Verde completamente desenvolvido (A) e maduro (B).	27
Figura 2 – Frutos de maracujá-alho classificados em sete estádios de maturação (LIMA et al., 2010).	28
Figura 3 – Conteúdo de ácidos orgânicos do maracujá-alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) <i>in natura</i> em dois estádios de maturação.*	49
Figura 4 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD ($\lambda=240$ nm) do maracujá-alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) <i>in natura</i> e liofilizado indicando a ausência de ácido ascórbico no material seco.	51
Figura 5 – Conteúdo de açúcares solúveis de maracujá-alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) <i>in natura</i> em dois estádios de maturação.*	52
Figura 6 - Perfil de aminas bioativas de maracujá-alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) <i>in natura</i> em dois estádios de maturação.*	53
Figura 7 – Teor de fenólicos totais de maracujá-alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) <i>in natura</i> em dois estádios de maturação.	54
Figura 8 – Capacidade antioxidante pelo método de varredura do radical DPPH de maracujá-alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) <i>in natura</i> .*	55
Figura 9 – Capacidade de absorção de radicais de oxigênio pelo método ORAC de maracujá- alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) <i>in natura</i> .*	56
Figura 10 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD ($\lambda=270$ nm) do maracujá-alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) (A) e ampliação do tempo 9 à 14 min (B).	58
Figura 11 – Espectro de massas da procianidina dímero (A), procianidina dímero (epicatequina e epiafzelequina) (B) e galocatequina (C) identificadas por LC-ESI-MS em frutos de maracujá-alho.	61
Figura 12 - Estrutura proposta para o pico 10. Monômeros de flavan-3-ol catequina e epicatequina que compõem o dímero de proantocianidina identificado. Estrutura proposta para o pico 10 e os principais pontos de fragmentação (B). Adaptado de Es-Safi, Guidouche & Ducrot (2007).	62
Figura 13 - Espectro de massas da luteolina-6-C- glucosil-2'-O-rhaminosideo identificada por LC-ESI-MS em frutos de maracujá-alho (A). Clivagem do resíduo de glicose, destacando a perda de 120 Da comum para C-glicosilado (B). Adaptado de Davis & Brodbelt (2004).	63
Figura 14 - Espectro de massa da luteolina-8-C-6"-desoxi-3"-hexulose-2"-O-rhamnosídeo por LC-ESI-MS em frutos de maracujá-alho.	64
Figura 15 - Espectro de massa da isoorientina (A); diosmetina (B) e dimetoxilluteolina (C) identificada por LC-ESI-MS em frutos de maracujá-alho.	65

Figura 16- Espectro de massa da vicenin-2 (A); apigenina-8-C-deoxosídeo (B) e isovitexin-2-ramnosídeo (C) identificada por LC-ESI-MS em frutos de maracujá-alho. 66

Figura 17- Identificação de PA's pelo método de Fluroglucinólises, cromatograma obtido por CLAE-DAD ($\lambda=280$ nm) do maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) (A) e ampliação do tempo 6,5 à 24,5 min (B). 69

Figura 18 - Participação dos flavonoides quantificados no extrato hidrometanólico de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip). 74

Figura 19 - Concentração (mg/100g b.s.) dos flavonoides presentes no extrato hidrometanólico de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip). 75

Figura 20– Componente principal 1 versus Componente principal 2 dos flavonoides de diferentes lotes e respectivos estádios de maturação do fruto de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) *in natura*. Lotes 1, 2 e 3 coletados em agosto/2016, dezembro/2016 e maio/2017, respectivamente. Maracujá verde (V) e maduro (M). ... 76

Figura 21– Agrupamento dos compostos fenólicos com base na análise dos componentes principais de diferentes lotes e respectivos estádios de maturação do fruto de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) *in natura*. Lotes 1, 2 e 3 coletados em agosto/2016, dezembro/2016 e maio/2017, respectivamente. Maracujá verde (V) e maduro (M). 77

SEÇÃO II

Figura 1- Mecanismo proposto de absorção e metabolismo de flavonoides no intestino delgado. 96

Figura 2 - Via proposta do metabolismo de homorientina. 99

Figura 3 - Estrutura dos principais flavan-3-ol, dímeros e trímero de PAs..... 101

Figura 4- Desenho experimental do estudo com destaque para os dias da coleta (dia 0, 15 e 30)..... 111

Figura 5 – Efeito do consumo de *P. tenuifila* Killip sobre os marcadores antropométricos dos indivíduos eutróficos e obesos, suplementados durante 30 dias consecutivos. * 122

Figura 6- Efeito do consumo de *P. tenuifila* Killip sobre a glicemia, insulina plasmática e índice HOMA-IR de indivíduos eutróficos e obesos, suplementados durante 30 dias consecutivos. * 123

Figura 7- Efeito do consumo de *P. tenuifila* Killip sobre o perfil lipídico de indivíduos eutróficos e obesos, suplementados durante 30 dias consecutivos. * 125

Figura 8- Concentração de Zonulina Plasmática entre os indivíduos eutróficos e obesos (A)* e Variação da concentração entre o dia 30 e basal (B) suplementados com *P. tenuifila* Killip durante 30 dias consecutivos. 127

Figura 9- Concentração do marcador 8-isoprostano no plasma de indivíduos eutróficos e obesos suplementados com *P. tenuifila* Killip durante 30 dias consecutivos. * 128

Figura 10- Concentração do marcador 8-OHdG na urina de indivíduos eutróficos e obesos suplementados com *P. tenuifila* Killip durante 30 dias consecutivos.* 130

Figura 11 - Via proposta da metabolização de PAs e catequina gerando metabólitos direto e derivados fenil- γ -valerolactonas.	133
Figura 12 - Via proposta da metabolização de flavan-3-ol gerando ácidos fenilvaléricos, hipúrico, benzoico e derivados.	134
Figura 13 - Excreção de metabólitos de fenólicos na urina de indivíduos eutróficos e obesos suplementados com <i>P. tenuifila</i> Killip durante 30 dias consecutivos.	136
Figura 14 – Análise dos componentes principais dos metabólitos de fenólicos excretados dividido por grupo e tempo	139
Figura 15 - Variação Interindividual do percentual de filos nos dias 0, 15 e 30 de suplementação de maracujá.....	158
Figura 16 - Análise de componentes principais dos filos no período basal e dispersão dos indivíduos eutróficos e obesos.	159
Figura 17 - Abundância relativa dos filos(A), famílias (B) e gêneros (C) no período basal	162
Figura 18 - Variação de filos entre os dias 0d-15d e 0d-30d de suplementação de maracujá.	164
Figura 19 - Índice de beta diversidade entre os dias 0, 15 e 30 de suplementação de maracujá, separados por eutróficos (A) e obesos (B)*.	171

LISTA DE TABELAS

SEÇÃO I

Tabela 1- Principais compostos fenólicos identificados em espécies de <i>Passifloras</i> por ordem de aparição.	30
Tabela 2- Características físicas e físico-químicas do fruto maracujá-alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) em dois estádios de maturação*	45
Tabela 3- Composição centesimal de maracujá-alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) <i>in natura</i> em dois estádios de maturação e da farinha de maracujá-alho (FM).*	48
Tabela 4- Fenólicos totais e capacidade antioxidante da farinha de maracujá-alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip).	54
Tabela 5 - Identificação de flavonoides e ácido fenólico por LC-ESI-MS de frutos de marucujá-alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip).....	59
Tabela 6- Identificação de PAs de frutos de marucujá (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) por LC-ESI-MS através do método de catálise ácida na presença de fluroglucinol.....	68
Tabela 7- Quantificação de flavonoides e ácido fenólico de frutos maracujá-alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) <i>in natura</i> , resultado expresso em mg/100g b.u.....	72

SEÇÃO II

Tabela 1 - Bactérias intestinais envolvidas no metabolismo de flavonas e flavan-3-ol.	106
Tabela 2- Principais características dos indivíduos participantes do estudo*	116
Tabela 3- Parâmetros bioquímicos dos indivíduos participantes do estudo*	118
Tabela 4 - Médias e desvio padrão das características de consumo de acordo com recordatório alimentar de 24h dos indivíduos eutróficos e obesos participantes.*	120
Tabela 5- Metabólitos de compostos fenólicos encontrados na urina dos indivíduos participantes.	131
Tabela 6- Perfil de filos nos dias 0, 15 e 30 de suplementação de maracujá ^a	161
Tabela 7- Perfil de Família nos dias 0, 15 e 30 de suplementação de maracujá ^a	166
Tabela 8- Perfil de Gênero nos dias 0, 15 e 30 de suplementação de maracujá ^a	167
Tabela 9- Índice de alpha diversidade entre os dias 0, 15 e 30 de suplementação de maracujá, separados por grupo*	170

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% GC	Percentual de gordura corporal
[M-H]	íon molecular
16S <i>rRNA</i>	16S ribosomal RNA
8-OHdG	8-hidroxi-2-deoxiguanosina
AAPH	2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride
AG eq.	Equivalente em Ácido Gálico
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ALT	Alanina aminotransferase
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AST	Aspartato amino transferase
b.s.	Base seca
b.u.	Base úmida
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BGC	β -glucosidases citossólica
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CART	Transcrito Relacionado à Cocaína e à Anfetamina
CBs	Compostos bioativos
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo
COMT's	Cathecol O-methyltransferase
COX-2	Ciclooxygenase-2
CT	colesterol total
DL/DE	Diâmetro longitudinal/Diâmetro equatorial
DP	Degrau de polimerização
DP	Desvio padrão
DPPH	α,α -difeníl- β -picrilhidrazina
EC ₅₀	Dose correspondente à 50% do efeito esperado
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Zonulin Transactivates Epidermal Growth Factor Receptor
EP	Erro padrão
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI	ElectroSpray Ionization
FM	Farinha de maracujá (<i>P. tenuifila</i>)
FT	Fenólicos totais
GEE	Generalised Estimated Equation
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
GLUT	Glucose Transporter
HDL	High-density lipoprotein
Homa-IR	Homeostatic model assement of insulin resistance

IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
Kcal	Quilocaloria
LC-ESI-MS/MS	Liquid Chromatography with Electrospray Ionization with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry
LDL	Low-density lipoprotein
LFH	Lactase-Florizina Hidrolase
LPS	Lipopolissacarídeos
m/z	razão massa sobre a carga
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MDR	Multidrug Resistance
M _E	monômero de extensão
MRPs	Multidrug Resistance Proteins
MS ₂	Fragmento do íon molecular
M _T	Monômero terminal
NFκB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
NO	Óxido Nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y
ORAC	<i>Oxygen Radical Assay Capacity</i>
OTU's	Operational Taxonomic Units
PAR-2	Proteinase Activeted Receptor-2
PAs	Proantocianidinas
PCA	Principal Component Analysis
P-gP	Glicoproteína P
PTFE	Politetrafluoretileno
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RFA-5C	metabólitos resultantes da fissão do anel ao lado do carbono 5
RFL-3/1C	metabólitos resultantes da fissão do anel da cadeia lateral ao lado do carbono 3 e 1
SLGT-1	Sodium-glucose transport proteins
SPE	Solid phase extraction
SST	Sólido Solúveis Totais
SULT's	Sulfotransferase
Tmax	Hora da maior concentração
TMB	Taxa Metabólica Basal
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TR	tempo de retenção
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico
UFC	Unidade Formadora de colônia
UGT	Uridine-5'-diphosphate Glucuronosyl Transferase
UI	Unidade internacional
v/v	volume/volume
VET	Valor Energético Total
VLDL	Very low-density lipoprotein

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	20
Referência bibliográfica.....	22
SEÇÃO I	24
Caracterização físico-química, compostos bioativos e capacidade antioxidante do maracujá nativo brasileiro (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip)	25
1. INTRODUÇÃO	25
1.1. O gênero <i>Passiflora</i> : Distribuição, compostos bioativos e potencial biológico	26
1.1.1. <i>Passiflora tenuifila</i> Killip	26
1.1.2. Compostos bioativos do maracujá	28
1.1.3. Atividades biológicas reportadas à ingestão de passifloras.....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. Material.....	35
2.2. Métodos	35
2.2.1. Caracterização física e físico-química dos frutos de <i>P. tenuifila</i> Killip.....	35
2.2.2. Composição centesimal	36
2.2.3. Determinação de açúcares solúveis	37
2.2.4. Determinação de ácidos orgânicos	38
2.2.5. Determinação de aminas bioativas	38
2.2.6. Determinação de fenólicos totais e capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	39
2.2.7. Quantificação e identificação de flavonoides e ácidos fenólicos do fruto <i>in natura</i> e da FM (<i>P. tenuifila</i> Killip).....	41
2.3. Análise dos produtos da clivagem de proantocianidinas	43
2.4. Análise Estatística	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.1. Caracterização físico-química e composição centesimal de maracujá-alho	44
3.2. Perfil de ácidos orgânicos de maracujá-alho	49
3.3. Açúcares solúveis de maracujá-alho	51
3.4. Perfil de aminas bioativas	52
3.5. Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante <i>in vitro</i> de maracujá-alho.....	53

3.6.	Identificação de flavonoides e ácidos fenólicos de frutos de maracujá-alho	57
3.7.	Identificação de Proantocianidinas	67
3.8.	Quantificação de flavonoides e ácido fenólico de frutos de maracujá-alho	70
3.9.	Análise de componente principal do perfil de compostos fenólicos da <i>P. tenuifila</i> Killip nos dois estádios de maturação analisados	75
4.	CONCLUSÕES	78
	Referências bibliográficas	79
	SEÇÃO II	90
	EFEITO DO CONSUMO DE <i>Passiflora tenuifila</i> Killip EM INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS E OBESOS E PERFIL DOS METABÓLITOS DE FENÓLICOS EXCRETADOS	91
1.	INTRODUÇÃO	91
1.1.	Obesidade e as alterações morfofuncionais que afetam a absorção	92
1.2.	Metabolismo de compostos fenólicos e influência da microbiota intestinal na biodisponibilidade	94
1.3.	Metabolismo das Flavonas-C-glicosiladas	98
1.4.	Metabolismo de Flavan-3-ol e das proantocianidinas	100
1.5.	A ação da microbiota sobre o metabolismo de compostos fenólicos	103
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	109
2.1.	Material	109
2.2.	População de estudo	109
2.3.	Delineamento experimental	110
2.4.	Parâmetros antropométricos	111
2.5.	Análise do consumo alimentar	112
2.6.	Parâmetros bioquímicos	112
2.7.	Quantificação de marcadores do estresse oxidativo	113
2.7.1.	Determinação de 8-isoprostano	113
2.7.2.	Determinação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG)	113
2.7.3.	Dosagem de zonulina plasmática	113
2.7.4.	Análise dos metabólitos de flavonoides excretado na urina através de UPLC-ESI-QTOF	114
2.8.	Análise estatística	114
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	116
3.1.	Caracterização dos indivíduos participantes	116
3.1.1.	Perfil bioquímico dos indivíduos participantes	118
3.2.	Consumo alimentar dos indivíduos ao longo do experimento	119

3.3.	Efeito da ingestão do fruto de <i>P. tenuifila</i> Killip sobre marcadores antropométricos e bioquímicos	121
3.4.	Quantificação de zonulina plasmática: marcador de permeabilidade intestinal	126
3.5.	Efeito do consumo de <i>P. tenuifila</i> Killip sobre marcadores do estresse oxidativo	128
3.6.	Perfil de excreção dos metabólitos de flavonoides na urina dos indivíduos eutróficos e obesos	130
4.	CONCLUSÃO	140
	Referências bibliográficas	141
	CARACTERÍSTICAS DA MICROBIOTA INTESTINAL EM INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS E OBESOS APÓS INGESTÃO DO FRUTO DE <i>P. tenuifila</i> Killip....	153
1.	INTRODUÇÃO	153
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	155
2.1.	Extração de DNA, preparação e sequenciamento da biblioteca de amplicons do gene rRNA 16S	155
2.2.	Bioinformática	156
2.3.	Análise estatística	156
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	157
4.	CONCLUSÃO	172
	Referências bibliográficas	173
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	178
	ANEXOS	180
	Anexo I - Procedimento Operacional Padronizado para o preparo da farinha liofilizada de maracujá-alho, fornecido pela Sublimar Produtos Liofilizado.....	181
	Anexo II - Espectro de massa dos flavonoides minoritários identificados por LC-ESI-MS em frutos de maracujá-alho.	182
	Anexo III - Espectro de massa das PAs de frutos <i>P. tenuifila</i> por LC-ESI-MS através do método de catálise ácida na presença de fluroglucinol.....	184
	Anexo IV – Parecer consubstanciado do CEP, aprovando o experimento em humanos	191
	Anexo V – Currículo Lattes	196
	Anexo VI – Ficha do aluno	201
	Anexo VII – Informações para os membros de banca julgadoras	203

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Brasil possui características geográficas e climáticas que sustentam uma das maiores biodiversidades do mundo. No entanto, um grande número de espécies de frutas nativas e exóticas permanece inexplorado (PAZ et al., 2015; SCHIASSI et al., 2018; DANTAS et al., 2019). Nos últimos anos, os frutos do bioma cerrado e mata atlântica têm sido investigados por suas elevadas quantidades de compostos bioativos e também por sua capacidade antioxidante (DE SOUZA et al., 2012; NERI-NUMA et al., 2018; SCHIASSI et al., 2018).

Das 150 espécies de maracujá (*Passiflora ssp.*) nativas desses biomas, somente duas são exploradas comercialmente. O mesmo ocorre com os estudos científicos que estão centrados nas espécies comercializadas, eisindo poucas informações sobre as silvestres (ALEXANDRE et al., 2004; DEMBITSKI et al., 2011; BORGES; LIMA, 2009; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003).

Muitas espécies de passifloras estão associadas à atividade ansiolítica, sedativa, antidepressiva e contra distúrbios do sono (AYRES et al., 2015, 2017; GAZOLA et al., 2018; KIM et al., 2019). Mais recentemente, foram reportados efeito anti-inflamatório, antidiabético, antimicrobiano neuroprotetores e antioxidantes para espécies nativas indicando o grande potencial biológico apresentado pelas mesmas (SANTANA, 2015; CORRÊA et al., 2016; SHANMUGAM et al., 2018).

Esses efeitos são atribuídos, principalmente, a presença de compostos fitoquímicos, em particular, os flavonoides (LEWIS et al., 2013; SARAVANAN; ARUNACHALAM; PARIMELAZHAGAN, 2014; CORRÊA et al., 2016), que além de reconhecido potencial antioxidante, podem modular vias sinalização celular e modulação da expressão gênica associadas a inflamação, sistema nervoso, metabolismo de macronutrientes e energético (KWON et al., 2012; CHOI et al., 2014; CORRÊA et al., 2016).

Contudo para alcançar o efeito biológico esperado em tecidos ou órgão específico, os compostos bioativos, como os fenólicos, devem estar livres da matriz alimentar e disponíveis na circulação sistêmica após a absorção no sistema digestivo, estando dessa forma, susceptíveis a condições que podem afetar sua estabilidade, biodisponibilidade e bioatividade (TENORE et al., 2013).

Além desses fatores, características individuais apresentam grande impacto. Alterações morfofisiológicas sobre a permeabilidade intestinal que ocorre comumente em indivíduos obesos, por exemplo, podem afetar a absorção de compostos bioativos e seus parâmetros farmacocinéticos (BLOUIN; WARREN, 1999; TEIXEIRA et al., 2012) bem como a microbiota intestinal que apresenta inúmeras funções metabólicas que incluem a transformação de muitos compostos que atingem o cólon através de sua variada gama de enzimas além de quebrar a ligação entre os compostos fenólicos e componentes da matriz alimentar (MOSELE; MACIÀ; MOTILVA, 2015).

Dessa forma, estudos comparativos de excreção dos fenólicos avaliando o impacto de características fisiológicas como nível de permeabilidade intestinal e perfil de microbiota podem trazer maior clareza a respeito desse assunto favorecendo recomendações mais personalizadas do consumo destes compostos.

Diante do exposto, torna-se importante a identificação dos compostos bioativos presente em espécies silvestres de passiflora, como a *P. tenuifila* Killip, bem como avaliar sua metabolização e até sua possível atividade biológica para um melhor entendimento dos mecanismos de ação destes compostos na promoção da saúde.

Vale salientar que este trabalho foi desenvolvido em parceria e colaboração com a Rede Passitec da EMBRAPA-Cerrados que tem por finalidade gerar informações e tecnologia para o uso das passifloras silvestres como ingrediente e/ou matéria-prima para indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (TEXEIRA; SOUSA; COSTA, 2011).

Para melhor compreensão e avaliação dos resultados obtidos, além de facilitar a futura publicação de artigos científicos, o trabalho foi organizado em seções conforme descrito abaixo:

Seção 1: Caracterização físico-química, compostos bioativos e atividade antioxidante do maracujá nativo brasileiro (*Passiflora tenuifila* Killip)

Seção 2: Avaliação do consumo do fruto de *Passiflora tenuifila* Killip em indivíduos eutróficos e obesos e perfil dos metabólitos de fenólicos excretados

Referência bibliográfica

ALEXANDRE, R. S. et al. Germinação de sementes de genótipos de maracujazeiro. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, n. 12, p. 1239–1245, 2004.

AYRES, A. S. F. S. J. et al. Comparative central effects of the aqueous leaf extract of two populations of *Passiflora edulis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, p. 499–505, 2015.

AYRES, A. S. F. S. J. et al. Monoaminergic neurotransmission is mediating the antidepressant-like effects of *Passiflora edulis* Sims fo. *edulis*. **Neuroscience Letters**, v. 660, p. 79–85, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2017.09.010>>.

BLOUIN, R. A.; WARREN, G. W. January 1999 Pharmacokinetic Considerations in Obesity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 1, p. 1–7, 1999.

CHOI, J. S. et al. Effects of C -glycosylation on anti-diabetic , anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 27–33, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.020>>.

CORRÊA, R. C. G. et al. The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (passion fruit). **Trends in Food Science and Technology**, v. 58, p. 79–95, 2016.

DANTAS, A. M. et al. Bioaccessibility of phenolic compounds in native and exotic frozen pulps explored in Brazil using a digestion model coupled with a simulated intestinal barrier. **Food Chemistry**, v. 274, n. May 2018, p. 202–214, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.099>>.

DE SOUZA, V. R. et al. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381–386, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.191>>.

GAZOLA, A. C. et al. The sedative activity of flavonoids from *Passiflora quadrangularis* is mediated through the GABAergic pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 100, p. 388–393, 2018.

KIM, G. H. et al. Improvement in neurogenesis and memory function by administration of *Passiflora incarnata* L. extract applied to sleep disorder in rodent models. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 98, p. 27–40, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.03.005>>.

KWON, J. Y. et al. Piceatannol, Natural Polyphenolic Stilbene, Inhibits Adipogenesis via Modulation of Mitotic Clonal Expansion and Insulin Receptor-dependent Insulin Signaling in Early Phase of Differentiation. **Journal of**

Biological Chemistry, v. 287, n. 14, p. 11566–11578, 2012.

LEWIS, B. J. et al. Antihypertensive effect of passion fruit peel extract and its major bioactive components following acute supplementation in spontaneously hypertensive rats ☆. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 1359–1366, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.11.003>>.

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

NERI-NUMA, I. A. et al. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, v. 103, n. October 2017, p. 345–360, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.053>>.

PAZ, M. et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462–468, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614014782>>.

SANTANA, F. C. de. **Avaliação dos compostos bioativos presentes na semente de Passifloras spp. e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015.

SARAVANAN, S.; ARUNACHALAM, K.; PARIMELAZHAGAN, T. Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from *Passiflora subpeltata* leaves – A promising species of *Passiflora*. **Industrial Crops & Products**, v. 54, p. 272–280, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.038>>.

SCHIASSI, M. C. E. V. et al. Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v. 245, n. October 2017, p. 305–311, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.104>>.

SHANMUGAM, S. et al. UHPLC-QqQ-MS/MS identification, quantification of polyphenols from *Passiflora subpeltata* fruit pulp and determination of nutritional, antioxidant, α -amylase and α -glucosidase key enzymes inhibition properties. **Food Research International**, v. 108, p. 611–620, 2018.

TEIXEIRA, T. F. S. et al. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. **Clinical Nutrition**, v. 31, n. 5, p. 735–740, 2012.

TENORE, G. C. et al. In vitro bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca). **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3519–3524, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.051>>.

Seção I

Caracterização físico-química, compostos bioativos e capacidade antioxidante do maracujá nativo brasileiro (*Passiflora tenuifila* Killip)

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as frutas dos biomas cerrados e mata atlântica têm sido investigadas por sua quantidade considerável de compostos bioativos e alta capacidade antioxidante (SOUZA et al., 2012; NERI-NUMA et al., 2018; SCHIASSI et al., 2018). O maracujá (*Passiflora spp.*) possui aproximadamente 150 espécies do gênero no Brasil, porém poucas foram caracterizadas por seus perfis bioativos (ALEXANDRE et al., 2004).

Uma espécie que tem despertado interesse é a *Passiflora tenuifila* Killip consumida pela população local, porém, ainda com baixa expressão comercial. Diferentemente das espécies comerciais de maracujá, onde apenas a polpa é consumida, o fruto de *P. tenuifila* Killip é geralmente consumido integralmente com casca e sementes. Segundo o relatado, o fruto de *P. tenuifila* Killip é consumido entre o estágio verde (fruto totalmente desenvolvido) até o estágio maduro.

É reconhecido o efeito do processo de amadurecimento dos frutos em seus parâmetros nutricionais, físicos e sobretudo no conteúdo e perfil de açúcares solúveis, ácidos orgânicos e de compostos bioativos. Sendo assim, é possível que exista diferença na composição química entre os estádios de maturação consumidos do fruto *P. tenuifila* (ORNELAS-PAZ et al., 2013; AUBERT et al., 2019; HUANG et al., 2019).

O potencial funcional do fruto de *P. tenuifila* é elevado e assim como outros frutos do cerrado pode oferecer grandes oportunidades para aplicação na indústria alimentícia e também em programas de melhoramento genético para a seleção de variedades com maiores valores nutricionais (SCHIASSI et al., 2018).

Visto isso, a caracterização desse fruto é importante para identificar novas fontes de compostos bioativos, apresentando uma alternativa para melhorar a dieta da população local, além de oferecer vantagens econômicas no uso sustentável da biodiversidade (DENARDIN et al., 2015; KONCZAK et al., 2010).

Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar as características físico-químicas de *P. tenuifila* Killip, sobretudo os compostos bioativos, nos dois estádios de maturação consumidos.

1.1. O gênero *Passiflora*: Distribuição, compostos bioativos e potencial biológico

O maracujá, nome popular dado a várias espécies do gênero *Passiflora* no Brasil, é amplamente encontrado na região tropical da América, Ásia e África, é cultivado comercialmente em vários países, sendo o Brasil o principal produtor seguido por Peru, Venezuela, África do Sul, Sri Lanka e Austrália (RODRIGUEZ-AMAYA, 2003; BORGES; LIMA, 2009; DEMBITSKY et al., 2011).

O gênero *Passiflora*, o maior da família *Passifloraceae*, é formado por 400 espécies conhecidas, destas, a literatura aponta entre 50 e 60 espécies que apresentam frutos comestíveis. Embora exista uma ampla variabilidade genética demonstrada pela biodiversidade nativa, somente algumas espécies apresentam importância nos pomares comerciais do Brasil. A *Passiflora edulis* Sims, conhecida popularmente como maracujá azedo ou maracujá amarelo representa 95% da área de cultivo destinada ao maracujá devido à qualidade de suas frutas, vigor, rendimento, suculência e a pela preferência dos consumidores (RODRIGUEZ-AMAYA, 2003; BERNACCI et al., 2008; BORGES; LIMA, 2009; DEMBITSKY et al., 2011; AYRES et al., 2017). Contudo outras espécies nativas brasileiras mesmo não apresentando grande importância comercial, são consumidas pela população local, como é o caso da *P. tenuifila* Killip.

1.1.1. *Passiflora tenuifila* Killip

A *P. tenuifila* Killip, é popularmente conhecida como maracujá-alho provavelmente devido ao seu aroma característico associado ao alho e também por Yogo na Argentina (CERVI; DUNAISKI JUNIOR, 2004; HOLANDA, 2015). É encontrada de forma endêmica nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Distrito Federal e região sul do Brasil, sendo também relatado na Argentina, Bolívia e Paraguai. Ocorre em regiões de mata atlântica e cerrado (CERVI; DUNAISKI JUNIOR, 2004; BRAGA et al., 2005; BOTANICAL GARDEN OF RIO DE JANEIRO, 2019).

A espécie destaca-se por ser resistente à bacteriose (*Xantomas axonopodis* pv. *Passifloaræ*) e à verrugose (*Cladosporium herbarum*) além de apresentar características importantes para o melhoramento como auto-compatibilidade (há fecundação no cruzamento entre flores da mesma planta), precoce (a maturidade é alcançada entre 71 e 90 dias após a semeadura) (BRAGA et al., 2005).

O seu fruto (Figura 1) é subgloboso de 5-7 cm de diâmetro e de cor amarela, quando maduro. A polpa apresenta cor amarelo-alaranjado e sementes obovadas de 5-6 x 3,3,5mm e alveoladas (CERVI; DUNAISKI JUNIOR, 2004; BRAGA et al., 2005). O fruto possui características diferentes que podem ser facilmente observadas quando comparadas a outros maracujás, no formato, tamanho, cor da polpa, sabor e aroma, e no número de sementes (LIMA et al., 2010).

Figura 1– Fruto da *Passiflora tenuifila* Killip em dois estádios consumidos: Verde completamente desenvolvido (A) e maduro (B).

Adaptado de Holanda (2015).

Em termos de produtividade o fruto apresenta rendimento de 28,85% de suco, produzindo 640 frutos por planta/ano, 7,14 Kg/planta/ano (BRAGA et al., 2005).

O ponto de colheita recomendado para o fruto é quando alcança o estágio 3 (Figura 2), momento no qual é capaz de completar o amadurecimento fora da planta. Observa-se a alteração da cor verde para o amarelo nos últimos estádios. O fruto alcança a senescência no estágio 7 onde ocorre perda da massa e

enrugamento da casca (BRAGA et al., 2005; SPINOSA, 2016). O consumo do fruto ocorre entre o estágio 3 a 6, porém são escassos na literatura caracterização quanto ao perfil de compostos bioativos de cada estágio de desenvolvimento.

Figura 2– Frutos de maracujá-alho classificados em sete estádios de maturação (LIMA et al., 2010).

1.1.2. *Compostos bioativos do maracujá*

Como consenso, os compostos bioativos são definidos como nutrientes ou não que ocorrem na natureza, fazendo parte da cadeia alimentar e que apresentam efeito benéfico à saúde humana, além da nutricional (BIESALSKI et al., 2009).

Inúmeros relatos na literatura indicam a presença de compostos bioativos em espécies de passiflora. Ácidos graxos poli-insaturados, fibras, peptídeos e proteínas, vitaminas antioxidantes, carotenoides, alcaloides e compostos fenólicos foram identificados em diversas partes da planta, inclusive nos frutos (LAM; NG, 2009; ZERAIK et al., 2010; SAKALEM; NEGRI; TABACH, 2012; RAMAIYA et al., 2013; PERTUZATTI et al., 2015; PEREIRA et al., 2017; VASCO-CORREA; ZAPATA, 2017).

1.1.2.1. Fibras

Foram relatados na literatura a presença de fibras em diversos compartimentos de passifloras. Chau & Huang (2004) analisando a semente da *Passiflora edulis* encontraram teor de 64,8 g/100g b.s. de fibra totais, quase em sua totalidade, constituída de fibra insolúvel (64,1 g/100g b.s.) e concluíram que as sementes são boas fontes de fibras apresentando a celulose como composto majoritário e também pectina e hemicelulose.

Enquanto isso, elevadas quantidades de fibras solúveis foram identificadas na casca da *Passiflora edulis f. flavicarpa* onde a pectina extraída apresentou 85,4 e 89,4 g de ácido galacturônico/100g de pectina (VASCO-CORREA; ZAPATA, 2017).

1.1.2.2. Compostos fenólicos

Flavonoides da classe das flavonas foram identificados no maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims), entre elas a apigenina, diosmetina e luteolina. Característicos das espécies de *Passifloras*, as flavonas ocorrem geralmente na forma C-glicosiladas (mono-C-glycosil, di-C-glycosil- and O,C-diglycosil) ligadas principalmente à hexose e pentoses conforme descrito na Tabela 1 (NEGRI; SANTI; TABACH, 2012; SAKALEM; NEGRI; TABACH, 2012a; SPÍNOLA; PINTO; CASTILHO, 2015; FARAG et al., 2016a).

Outras classes observadas são os ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico (feruloilquínico, rosmarínico) principalmente ligados à glicose na *P. sidifolia* e *P. bahiensis*. Enquanto para *P. coccínea* foram identificados derivados de procianidinas, na forma de dímeros e trímeros formados por epicatequina e catequina e também as proantocianidinas constituídas por (epi)afzelequina ou (epi)galocatequina (SAKALEM; NEGRI; TABACH, 2012a; SPÍNOLA; PINTO; CASTILHO, 2015; FARAG et al., 2016a)

Tabela 1- Principais compostos fenólicos identificados em espécies de *Passifloras* por ordem de aparição.

COMPOSTO	ESPÉCIES									TOTAL
	<i>P. sidifolia</i> ¹	<i>P. quadrangularis</i> ¹	<i>P. bahiensis</i> ¹	<i>P. coccinea</i> ¹	<i>P. vitifolia</i> ¹	<i>P. incarnata</i> ^{2,3}	<i>P. edulis</i> ³	<i>P. ambigua</i> ³	<i>P. subpeltata</i> ³	
Flavonas										
Pinocembrina glucuronido										1
Flavonas-O-glicosilada										
Apigenina-7-O-diglucosideo										2
Luteolina-O-deoxihexosideo triacetato										1
Flavonas-C-glicosilada										
Orientina										4
Vitexina										4
Apigenina-C-hexosideo-metil eter										2
Isovitexina										2
Apigenina-8-C-deoxihexoside										1
Isoorientina										1
Isoschaftosideo										1
Luteolina-8-C-deoxihexosideo										1
Flavonas-di-C-glicosilada										
Apigenina-6,8-di-C-glicosideo										4
Luteolina-6,8-Di-C-glucosideo										2
Apigenina-6-C-ramnosil-8-C-arabinosideo										1
Chrysina-6,8-C-Di-hexoside										1
Luteolina-6-C-deoxihexosideo-8-C-pentosideo										1
Flavonas-C-O-glicosilada										
Vitexina-7-O-glucosideo										3
Chrysina-C-deoxihexosideo-O-hexosideo										2
Luteolina-6-C-quinovosideo/fucosideo										2
Luteolina-C-deoxihexosideo-2"-O-hexosideo										2
Luteolina-C-deoxihexosideo-O-deoxihexosideo										2
Orientina-7-O-glucosideo										2
Apigenin-6-C-glucosideo-8-C-rabinosideo										2

COMPOSTO	ESPÉCIES									TOTAL
	<i>P. sidifolia</i> ¹	<i>P. quadrangularis</i> ¹	<i>P. bahiensis</i> ¹	<i>P. coccinea</i> ¹	<i>P. vitifolia</i> ¹	<i>P. incarnata</i> ^{2,3}	<i>P. edulis</i> ³	<i>P. ambigua</i> ³	<i>P. subpeltata</i> ³	
Vitexina-2"-O-glucosideo										2
Vitexina-2"-O-xilosideo										2
Apigenina-C-deoxihexoside-O-(Dideoxi)hexosideo										1
Apigenina-C-deoxihexoside-O-hexoside										1
Apigenina-C-hexosil-O-P-coumaroil hexosideo										1
Chrysin-C-hexosil-6"-O-deoxihexosideo										1
Isoorientina-2"-O-glucosideo										1
Isoorientina-4'-O-glucosideo										1
Isoorientina-4'-O-ramnosideo-metil eter										1
Isovitexina-2"-O-glucosideo										1
Luteolin-8-C-6"deoxi-3"-Hexulosideo-2"-O-ramnosideo										1
Luteolina-C-hexosideo-O-Deoxihexosideo										1
Orientina-2"-O-xilosideo										1
Orientina-2"-O-ramnosideo										1
Flavonas -di-O-glicosiladas										
Apigenina-O-deoxihexosideo-O-deoxihexulosideo										1
Luteolina-3'-O-Di-ramnosideo- 7-O-ramnosideo										1
Luteolina-7-O-Di-ramnosideo 3-O-glucosideo										1
Proantocianidinas										
Procianidina dímero B1										1
Procianidina trímero C1										1
Propelargonidina trímero										1
Propelargonidin trímero										1
Quadrangulosideo										1
Ácidos fenólicos										
Ácido Feruloilquínico										1
Diglucosideo										1
Ácido Rosmarinico Diglucoside										1

FONTE: ¹Sakalem et al., 2012; ²Negri; Santi; Tabach, 2012; ³ Farag et al., 2016.

Devido a ocorrência desses compostos bioativos no maracujá, são observados grande números de relatos na literatura científica de efeitos benéficos da ingestão de passifloras à saúde, os quais serão apontados a seguir.

1.1.3. Atividades biológicas reportadas à ingestão de passifloras

Tradicionalmente a ingestão de passifloras tem sido associada à efeitos sedativos, ansiolíticos e contra distúrbios de modo e sono. Efeitos antidepressivos do extrato de *Passiflora incarnata* foram avaliados no modelo bem estabelecido de captação sináptica da serotonina e teste de natação forçada. Entende-se que desordens depressivas são comumente atribuídas ao desequilíbrio de neurotransmissores serotoninérgicos. Um dos mecanismos de tratamento consiste em inibir a recaptação da serotonina nos neurônios, aumentando assim os níveis extracelulares. O extrato combinado das partes aéreas de *P. incarnata* (flores, folhas e/ou frutos) na concentração de 50 µg/ml e *Hypericum perforatum* (2,7% de hyperforin) apresentaram menor IC₅₀ (9,7 µg/ml) em inibir a captação de serotonina quando comparado ao *Hypericum perforatum* isolado (1,1% de hyperforin) com 88,2 µg/ml (FIEBICH et al., 2011).

Outros trabalhos *in vivo* aplicado em humanos também encontraram resultados positivos. Em estudo randomizado, duplo-cego e placebo-controlado com 60 pacientes, indicou que a administração do extrato do maracujá (*Passiflora incarnata*) em pacientes cirúrgicos apresentou uma significativa redução dos níveis de ansiedade, comprovado por uma escala de avaliação numérica (MOVAFEGH et al., 2008).

Esses efeitos podem estar associados aos flavonoides encontrados nessas espécies. O extrato de *P. edulis* contendo lucenina-2, vicianina-2, isoorientina, isovitexina e luteolina-6-C-glicosiladas apresentaram efeito ansiolíticos (LI et al., 2011). A crisina, flavona encontrada em algumas espécies de passifloras, apresentou efeito agonista parcial dos receptores benzodiazepínicos (BROWN et al., 2007) e sugere-se que o efeito sedativo da apigenina (extrato de *P. quadrangulares*) envolve o sistema gabadrenérgico (GAZOLA et al., 2015).

Porém outras propriedades terapêuticas têm sido investigadas recentemente como, por exemplo, a atividade anti-inflamatória e capacidade

antioxidante. O extrato aquoso de *P. edulis* e *P. alata* reduziram a migração leucocitária e a formação de exsudato no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos além de diminuir os níveis plasmáticos de proteína C reativa (VARGAS et al., 2007).

Outros trabalhos com humanos reforçam os achados em modelos animais. A ingestão oral de 150 mg de extrato da casca de *P. edulis* Sims (maracujá-roxo) diariamente no período de 60 dias por indivíduos com osteoartrite em estudo randomizado, placebo controlado e duplo-cego, reduziu a rigidez e dores associadas, segundo auto relato. Sugerindo que os efeitos podem ser devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (FARID et al., 2010). Ainda, a ingestão oral de 150mg de extrato da casca do maracujá-roxo durante quatro semanas a pacientes asmáticos reduziu a prevalência de sibilância pulmonar, tosse e falta ar (WATSON et al., 2008).

Efeito na redução do ganho de peso corporal também foram observados em ratos, onde a administração por gavagem de 130 mg/kg de peso durante 30 dias de farinha de casca de *P. edulis* levou a um ganho de peso aproximadamente 22% menor que o grupo controle (FIGUEIREDO et al., 2016). Em um estudo recente, da própria faculdade, também mostrou que a administração concomitante de dieta hiperlipídica e extratos dos compostos fenólicos de *P. edulis* e *P. setacea* reduziu o ganho de peso corporal, melhorou os marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo (SANTANA, 2015).

Foram realizados poucos estudos acerca do potencial biológico do maracujá em modelos *in vivo*. Contudo, dos flavonoides relatados para espécies de passifloras, a apigenina apresentou, dentre outras atividades biológicas, potencial anti-inflamatório. Em um estudo utilizando em modelo de artrite-reumatoide induzida em ratos por adjuvante completo de Freund (ACF), observou-se que a administração da apigenina, nas concentrações 20 e 40 mg/kg de peso, reduziram o volume da pata; os níveis de citocinas inflamatórias, principalmente IL-1 β , e no exame histopatológico exibiu efeito protetor para a infiltração de célula inflamatória sinovial, lesão de cartilagem articular, degeneração de células epiteliais e edema do tecido sinovial comparado com o grupo controle (CHANG et al., 2015).

Ainda, foi observado redução de marcadores pró-inflamatórios (TNF- α , MCP-1 e NO) com adição de diferentes concentrações de luteolina (0,1 – 20 μ M)

em cocultura de adipócitos e macrófagos, modelo que considera a influência do tecido adiposo no estado inflamatório (ANDO et al., 2009).

Além dos flavonoides, o ácido ferúlico isolado ou associado a atorvastatina apresentaram efeito hipolipidêmico, hepatoprotetor e anti-inflamatório (Redução da expressão do NF κ B) em ratos mantidos com dieta hiperlipídica (KESH et al., 2013).

Diante desse quadro, observa-se que além do conhecido efeito sedativo e ansiolítico atribuído às passifloras, há um forte indicativo que sua ingestão possa atenuar o processo inflamatório e de estresse oxidativo observados em síndromes metabólicas, alguns associados à obesidade, e assim reduzir o risco de desenvolvimento de doenças crônicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Foi utilizado o fruto da espécie *P. tenuifila* Killip, disponibilizado pela Dr^a. Ana Maria Costa, pesquisadora da EMBRAPA-Cerrados e membro da rede Passitec. Para a caracterização do fruto *in natura* foram utilizados frutos de três lotes com as respectivas datas de colheita: 29.08.16 (lote 1); 27.12.16 (lote 2); 15.05.17 (lote 3). Os frutos (aproximadamente n=100) foram colhidos em estágio totalmente desenvolvido, mas ainda verde, até o maduro. No laboratório, foram separados nos estádios verde e maduro, adotando como critério a coloração da casca.

Para a obtenção da farinha de maracujá (FM), os frutos congelados foram liofilizados e triturados pela empresa Sublimar produtos liofilizados LTDA – ME (Tatuí/SP) seguindo o preconizado pelas boas práticas de fabricação e Procedimento operacional padronizado (Anexo I).

2.2. Métodos

2.2.1. Caracterização física e físico-química dos frutos de *P. tenuifila* Killip

2.2.1.1. Peso, diâmetro longitudinal e equatorial dos frutos

O peso dos frutos (n=10) de cada lote e estágio de maturação foi determinada utilizando balança analítica (Shimadzu, modelo AY220; Kyoto, Japan) e expresso em grama. Os diâmetros equatorial e longitudinal foram medidos utilizando paquímetro digital com precisão de 0,01 mm (Starrett, modelo 799A-6/150; Massachusetts, EUA) e os resultados expressos em mm. Para a mensuração do diâmetro longitudinal adotou-se o diâmetro do fruto no sentido do ponto de inserção do pecíolo no fruto até o ápice do fruto. O diâmetro equatorial foi aferido na maior medida do diâmetro do fruto, perpendicular ao seu comprimento.

2.2.1.2. Cor da casca dos frutos

Para a avaliação da cor das cascas foram selecionados três frutos de cada lote e estádio. Utilizou-se o Colorímetro (Konica-Minolta CR-400; EUA). Realizou-se três medições na casca (uma na região equatorial e duas na região polar do fruto) para determinar os valores L* (luminosidade, que varia de branco a preto), a* (intensidade de vermelho/verde) e b* (intensidade de amarelo e azul).

2.2.1.3. Teor de sólidos solúveis totais

Os sólidos solúveis totais dos frutos foram avaliados através de refratômetro digital com precisão de $\pm 0,2\%$ °Brix (KRÜSS optronic, modelo DR201-95; Hamburgo, Alemanha), com escala graduada em °Brix. Os teores foram corrigidos pela temperatura.

2.2.2. Composição centesimal

2.2.2.1. Umidade

Foram pesados 3,0 g de amostra triturada (em triplicata), em cadinhos de porcelana previamente tarados, e em estufa a 105 °C até peso constante. (AOAC, 2000). Os resultados foram expressos em g/100g.

2.2.2.2. Cinzas

Foram pesadas 3,0 g de amostra (triplicata) em cadinhos de porcelana previamente tarados e aquecidos em mufla a 550 °C. As amostras foram carbonizadas e, em seguidas, incineradas em mufla a 550 °C, até a eliminação completa do carvão, restando um resíduo branco (AOAC, 2000) Os resultados foram expressos em g/100g.

2.2.2.3. Proteína total

Foi analisado pelo método de micro-Kjeldal. Aproximadamente 60 ± 2 mg de amostra (em triplicata) foram digeridas em bloco digestor (Büchi, Kjeldigester K-449; Flawil, Suíça) e destilado em destilador de nitrogênio (Büchi, KjeldMaster K-375; Flawil, Suíça). A porcentagem de nitrogênio total e a % de proteínas foram

calculadas adotando como fator de conversão 6,25. Os resultados foram expressos em g/100g.

2.2.2.4. Lipídios totais

A extração e determinação foram feitas com 3 g de amostra (triplicata). A extração da gordura foi efetuada com éter de etílico por aproximadamente 6 h em extrator de Soxhlet. Os resultados foram expressos em g/100g.

2.2.2.5. Carboidratos Totais

A concentração de carboidratos totais foi calculada por diferença (AOAC, 2000). Os resultados foram expresso em g/100g.

2.2.2.6. Fibra alimentar

A fibra alimentar foi determinada usando o método AOAC gravimétrico não enzimático 993.21 para Alimentos e Produtos Alimentícios com $\leq 2\%$ de Amido (AOAC, 2000).

2.2.2.7. Avaliação nutricional

Após a composição centesimal, foi calculada a quantidade de calorias e nutrientes por 100 gramas de amostra.

2.2.3. Determinação de açúcares solúveis

Os açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) foram quantificados de acordo com a metodologia descrita por Cordenunsi, Shiga, & Lajolo, (2008). Amostra foram homogeneizadas com solução de etanol:água (80:20, v/v) no termomixer por 15 minutos à 80 °C, e centrifugado à 15294 g/10 min e o sobrenadante recuperado em balão de 2 ml. A extração foi repetida mais duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados, secos em Centrivap (Labconco CentriVap Benchtop Centrifugal; Missouri, EUA), ressuspensos em água ultra-pura e filtrados em membrana PVDF de 0,22 μ m para análise por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência – HPAEC (Dionex, DX500) com detecção amperométrica pulsada (PAD), utilizando-se uma coluna PA1 (Dionex). A fase móvel foi constituída de de NaOH 20 mM com fluxo constante de 1,0 mL/min a

30 °C. A quantificação foi realizada a partir de curvas de calibração de glicose, frutose e sacarose e os resultados expressos em mg/g de amostra.

2.2.4. Determinação de ácidos orgânicos

Utilizou-se metodologia proposta por Souza (2017), com modificações. As amostras foram homogeneizadas com água ultra-pura por um minuto em homogeneizador Potter (Glas-Col, modelo 099C K4424; Indiana, EUA), centrifugados à 12.857 g por 10 min. e filtrados em membrana PVDF de 0,22 µm. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Hewlett Packard Series 1100) utilizando coluna SUPELCOGEL C-610H (30 cm x 7.8 mm) e fase móvel em condição isocrática composta por ácido fosfórico 0,1 % (w/v), com fluxo de 0,5 mL/minuto. A detecção foi realizada a 210 e 240 nm. A quantificação e identificação foram realizadas a partir das curvas de calibração dos ácidos ascórbico, cítrico e málico. Os resultados foram expressos em mg/g b.u.

2.2.5. Determinação de aminas bioativas

Nove aminas bioativas (espermidina, agmatina, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, histamina e serotonina) foram determinadas de acordo com o método descrito por Bandeira, Evangelista, & Gloria (2012). As aminas foram extraídas de 3 g de amostra com ácido tricloroacético a 5%, em seguida, foram agitadas por 5 minutos à 250 rpm e centrifugadas a 8422 x g por 20 minutos a 4 °C. Estes passos foram repetidos duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados e filtrados através de papel filtro qualitativo e através de membrana HAWP (0,45 µm, Millipore Corp., Milford, Massachusetts, EUA).

As aminas foram separadas por CLAE Par iônico e quantificadas, após derivação pós-coluna com o-ftalaldeído, fluorometricamente com excitação a 340 nm e emissão de 450 nm. Utilizou-se um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD com injetor automático SIL-20AHT (Shimadzu, Kyoto, Japão) conectado a um detector espectrofluorométrico RF-510 AXL e a um controlador CBM-20A. A coluna e a pré-coluna utilizadas foram Novapack® C18 (3,6 x 300 mm) (Waters, Milford, EUA). As duas fases móveis foram: A – tampão de acetato de sódio (pH 4,9) com 15 mmol/L de octanossulfonato de sódio e B – acetonitrila, a uma vazão

de 0,8 mL/min, seguindo o gradiente: 0 min (3% de B), 21 min (20%), 22 min (5%), 25min (5%), 40 min (24%); 45 min (24%), 50 min (35%) e 51 min (3%) e reequilíbrio nas condições iniciais por mais 9,0 min. O volume de injeção foi de 10 µL. Os níveis de aminas foram determinados por interpolação em curvas de calibração externas construídas com soluções padrão das nove aminas.

2.2.6. Determinação de fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro*

2.2.6.1. Extração

A amostra do fruto *in natura* e da farinha de maracujá foram homogeneizadas por um minuto utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH; Kriens-Luzern, Suíça) em metanol 70%. Em seguida os extratos foram mantidos em banho ultrassom (Ultrasonic cleaner 8892E-DTH; Cole-Parmer, Illinois, USA) por 60 min, sendo posteriormente filtrados com papel filtro qualitativo 80g/m² (Nalgon, Referência 3400; Itupeva, São Paulo). As extrações foram realizadas em triplicata e os extratos hidrometanólicos obtidos foram armazenados à -20°C até a realização das análises de fenólicos totais e capacidade antioxidante.

2.2.6.2. Quantificação de Fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais foi realizada pelo método de Swain & Hillis, (1959), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico (AG) como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Hewlett Packard, modelo 8453) no comprimento de onda de 765 nm. Os resultados foram expressos como mg AG eq./g.

2.2.6.3. Capacidade antioxidante *in vitro*

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada pelos métodos *Oxygen Radical Assay Capacity* (ORAC) segundo protocolo descrito por Prior et al. (2003) e pelo método sequestro do radical α,α -difetil- β -picrilhidrazina (DPPH) proposto por Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995).

2.2.6.3.1. *Método Oxygen radical assay capacity (ORAC)*

Para análise de ORAC todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mM, pH 7,1. Foram utilizadas: solução de fluoresceína 40 nM (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e 2,2'-azobis 153 mM (2-amidinopropano) dihidroclorato AAPH (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). Aliquotas de 25µL de tampão (branco), ou 25µL de solução Trolox (curva de calibração) ou 25µL de extrato, devidamente diluída quando necessário, foram distribuídas em placa de 96 poços seguidas da adição automática de 150µL de solução de fluoresceína e incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, a reação foi iniciada pela adição de 25µL de AAPH seguido de agitação por 10 segundos. O decaimento da intensidade de fluorescência (485 nm ex / 525 nm em) foi realizado a cada 1 minuto durante 60 minutos de reação. A leitura de fluorescência foi realizada utilizando-se leitor de microplaca multidetecção Synergy H1 (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) (CAO; ALESSIO; CUTLER, 1993).

A capacidade antioxidante foi obtida através do cálculo da área abaixo da curva de uma amostra subtraindo-se da área correspondente à do branco e utilizando-se curva padrão de trolox (nas concentrações de 12,5 a 100 µM). Os resultados foram expressos em µmol equivalente de Trolox/g. A análise foi realizada em triplicata.

2.2.6.3.2. *Método DPPH*

Foi preparada uma solução metanólica de DPPH (0,05 mM) de modo que apresentasse absorvância aproximada de 0,4 em comprimento de onda de 517 nm. As leituras foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 poços, no qual cada poço foi preenchido com 200 µL da solução de DPPH, 40 µL de metanol como branco, ou o mesmo volume para a solução-padrão de Trolox para a curva de calibração ou extratos das amostras, devidamente diluídos, quando necessário. A leitura de absorvância foi realizada a 517 nm, após 20 minutos de incubação protegido da luz, utilizando-se leitor de microplaca multidetecção Synergy H1 (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, & BERSET, 1995).

A curva de calibração foi preparada com uma solução de Trolox em diferentes concentrações (20 – 70 µM) e suas respectivas porcentagens de descolorimento. Os cálculos utilizaram a seguinte fórmula:

$$\% \text{ descolorimento do DPPH} = \frac{A(\text{Branco}) - A(\text{Amostra})}{A(\text{Branco})} \times 100$$

Onde, A(Branco) refere-se à absorbância do branco (metanol); A(Amostra) refere-se à absorbância da amostra. Os resultados foram expressos em µmol equivalente de Trolox/g.

2.2.7. Quantificação e identificação de flavonoides e ácidos fenólicos do fruto *in natura* e da FM (*P. tenuifolia* Killip)

2.2.7.1. Extração e separação em fase sólida

A extração e separação em SPE foi de acordo com Hassimotto, Genovese, & Lajolo (2005). Amostra do fruto *in natura* e da FM foram homogeneizadas por um minuto utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça) em 100 mL metanol/água (70:30 v/v) e filtradas à vácuo em funil de büchner. O sedimento foi recuperado e realizado mais duas re-extrações com 50 mL de metanol/água (70:30 v/v). Os extratos obtidos foram concentrados em rotaevaporador (Rotavapor® 120, Büchi, Flawil, Suíça) à temperatura de 40 °C até a remoção do metanol e ressuspensos com água. As extrações foram realizadas em duplicata.

O extrato obtido anteriormente foi passado em coluna com 1g de poliamida (CC 6, Macherey-Nagel, Germany) e pré-condicionada com metanol e água destilada. Após aplicação do extrato, a coluna foi lavada com água e a eluição dos compostos fenólicos foi feita com metanol P.A. Os eluatos assim obtidos foram completamente secos em rotaevaporador a 40 °C sob vácuo, ressuspensos em metanol grau HPLC e filtrados com membrana de PVDF (22 µm) para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo (CLAE/DAD) e *Liquid Chromatography - Electrospray Ionization / Multi-Stage Mass Spectrometry* (LC-ESI-MS/MS).

2.2.7.2. Cromatografia líquida - *Electrospray Ionization* / *Multi-Stage Mass Spectrometry* (LC-ESI-MS/MS)

Para identificação de flavonoides e ácidos fenólicos seguiu-se metodologia proposta por Teixeira et al. (2015) com modificações. Utilizou-se HPLC Prominence (Shimadzu, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas *ion trap*, Esquire HCT (Bruker Daltonics, Alemanha) com interface de ionização por *electrospray* (ESI). Para separação utilizou-se coluna Prodigy 5 μ ODS₃ (250x4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido) com fluxo de 0,75 mL/min e temperatura de corrida 25 °C. Utilizou-se fase móvel composta por: A – água: ácido fórmico (99,5:0,5, v:v) e B – acetonitrila:ácido fórmico (99,5:0,5, v:v), seguindo o gradiente: 0 min (10% de B), 2 min (10%), 5 min (25%), 30 min (35%), 41 min (40%), 42 min (50%), 43 min (90%), 44 min (90%) e 45 min (10%). O detector de massas foi operado no modo negativo com energia de ionização de 3000V e modo *full scan* entre *m/z* 100-1000. A identidade dos compostos foi realizada pela comparação do espectro de massas obtido com dados de literatura. Para a confirmação da identidade, se comparou com o tempo de retenção de padrões comerciais.

2.2.7.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo (CLAE/DAD)

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada através de CLAE em cromatógrafo modelo Infinity 1260 (Agilent Technologies), equipado com injetor automático, bomba quaternária e detector com arranjo de diodo (DAD), controlado pelo software próprio da Agilent. As condições de separação foram as mesmas utilizadas para a LC-ESI-MS/MS, descrito anteriormente (item 2.2.7.2). A corrida foi monitorada nos comprimentos de onda de 270, 328, 370 e 525 nm. Para quantificação foram utilizados os padrões dos flavonoides apigenina, luteolina, isovitexina, quercetina, epigallocatequina, Procianidina B e do ácido fenólico ácido clorogênico (Extrasynthese; Lion, França e Sigma, Chemical Co., St. Louis, EUA).

2.3. Análise dos produtos da clivagem de proantocianidinas

Foi utilizado o método da catálise ácida na presença de fluroglucinol (KENNEDY; JONES, 2001). As amostras de *P. tenuifila* Killip foram vortexadas com metanol acidificado com 0,1N de HCL contendo ácido ascórbico (10 mg/ml) e fluroglucinol (50 mg/ml). Em seguida foram incubadas à 50 °C por 20 minutos.

Os tubos contendo a amostra foram colocados em banho de gelo e para interromper a reação foram adicionados 1 ml de Acetato de sódio à 40 mM. As amostras foram centrifugadas e filtradas com filtro PVDF (0,22 µm) e injetadas em HPLC modelo Infinity 1290 (Agilent Technologies) acoplado a HCT-Ultra Ion Trap MS (Bruker Daltonics). Foi utilizada a coluna Pursuit XRs 5 C18 (250x4,0mm) (Agilent Technologies), com fluxo de 0,8 ml/min, sob temperatura controlada de 25 °C. As fases móveis foram compostas por: A – água/ácido fórmico (99:1, v/v) e B – acetonitrila, seguindo o gradiente: 0 min (3% de B), 5 min (9%); 15 min (16%); 45 min (50%); 47 min (90min); 52 min (3%) e 57 (3%).

O detector de massas foi operado no modo negativo e *full scan* entre *m/z* 100-1200. A pressão do nebulizador foi de 65 psi e temperatura do capilar de 350 °C. A identidade dos compostos foi realizada pela comparação do espectro de massas obtido com o de padrões comerciais e/ou dados de literatura. Para a confirmação da identidade, comparou-se com o tempo de retenção de padrões comerciais.

2.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como estatísticas descritivas (média ± desvio padrão). Para teste de diferença entre as médias foi utilizada ANOVA one-way e Teste de Tukey como *post-hoc*.

Análise de Componentes Principais foi realizada para visualizar relação entre o estágio de maturação do fruto de *P. tenuifila* Killip e teor de flavonoides utilizando o MetaboAnalyst version 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) (CHONG; YAMAMOTO; XIA, 2019).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização físico-química e composição centesimal de maracujá-alho

O maracujá-alho (*P. tenuifila* Killip), diferente do maracujá doce (*Passiflora alata* Curtis) ou azedo (*P. edulis* Sims), é comumente consumido inteiro, tanto verde quanto em estágio maduro. Assim, o fruto inteiro foi analisado nos seus diferentes parâmetros nutricionais e características físicas. A caracterização física e físico-química dos três lotes de maracujá (*P. tenuifila* Killip), em dois estádios, verde e maduro, é apresentada na tabela 2.

A massa média do fruto é uma característica importante para exploração comercial do fruto, pois, verifica-se uma correlação positiva entre o fruto e da polpa (NEGREIROS et al., 2007). A massa média do maracujá-alho foi de $10,41 \pm 4,01$ g, variando entre 7,17 e 14,71 g. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os dois estádios de maturação, porém, os frutos do lote 3 foram significativamente menores que os demais. Essa variação pode ser considerada normal visto que foram encontradas massa média de 12,58 g ($10,63$ - $14,07$ g) e 8,0 g ($5,7$ - $11,6$ g) para frutos cultivados no Ceará e Bahia, respectivamente (JUNGHANS et al., 2012; SILVEIRA et al., 2015).

A média do diâmetro longitudinal e equatorial para os três lotes foi de $38,92 \pm 4,69$ mm e $34,97 \pm 4,50$ mm, respectivamente, não sendo observada diferença significativa entre os estádios verde e maduro. Resultados próximos também foram encontrados para o maracujá-alho cultivado no Ceará (42,19 e 38,63 mm) (SILVEIRA et al., 2015), mas inferiores quando comparadas com outras espécies mais populares de passiflora. Para o maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener) foi observado massa e diâmetro longitudinal de 79,37 g e 75,3 mm, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2017), enquanto para o maracujá-doce (*P. alata* Curtis) valores de 210,29 g e 96 mm, respectivamente (MELETTI et al., 2003). O índice de conformidade do fruto (relação DL/DE) encontrado foi 1,11 indicando que o fruto pode ser classificado como oval assim como o relatado para o mesmo maracujá (SILVEIRA et al., 2015).

Tabela 2- Características físicas e físico-químicas do fruto maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) em dois estádios de maturação*

Parâmetros físico-químicos			Lote 1		Lote 2		Lote 3	
			Verde	Maduro	Verde	Maduro	Verde	Maduro
Massa (g)			14,71±3,50 _{a,A}	13,02±3,05 _{a,A}	12,70±4,30 _{a,A}	10,88±3,06 _{a,A}	7,17±1,82 _{a,B}	7,64±1,98 _{a,B}
Diâmetro (mm)								
	Longitudinal		42,37±3,20 _{a,A}	40,72±4,06 _{a,A}	42,16±5,28 _{a,A}	40,36±3,45 _{a,A,B}	34,55±3,35 _{a,A}	36,80±3,21 _{a,B}
	Equatorial		38,87±3,47 _{a,A}	37,83±2,75 _{a,A}	36,39±4,49 _{a,A}	35,88±5,09 _{a,A,B}	31,03±3,24 _{a,B}	32,55±2,66 _{a,B}
Sólidos solúveis totais (°Brix)			21,37±1,57 _{a,A}	23,55±0,07 _{a,A}	21,10±0,70 _{a,A}	20,80±2,84 _{a,A}	20,90±0,26 _{a,A}	21,10±0,52 _{a,A}
Colorimetria								
	L		20,41±2,55 _{a,A}	36,30±13,18 _{b,A}	20,65±7,29 _{a,A}	36,30±5,13 _{b,A}	14,22±4,27 _{a,A}	36,66±6,58 _{b,A}
	a		-4,61±2,72 _{a,A}	17,22±6,04 _{b,A}	3,15±4,10 _{a,B}	31,99±3,35 _{b,B}	4,89±3,05 _{a,B}	28,22±3,18 _{b,B}
	b		11,35±2,06 _{a,A}	24,67±9,62 _{b,A}	12,26±4,79 _{a,A}	25,05±3,66 _{b,A}	7,51±3,70 _{a,A}	24,81±4,30 _{b,A}

* Resultados expressos em média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente entre os frutos verde e maduro do mesmo lote (p<0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem significativamente entre frutos do mesmo estágio nos diferentes lotes.

O teor de sólidos solúveis totais (SST) dos frutos variou entre 20 a 23 °Brix, valores próximo ao referenciado na literatura (24,58 °Brix) para o mesmo maracujá (FORTALEZA et al., 2005). Chama a atenção o elevado teor quando comparado às outras espécies de maracujá, entre eles o maracujá azedo amarelo e o maracujá roxo (*P. edulis* Sims) no estágio totalmente maduro apresentando SST de 16,57 e 17,4 °Brix, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2017). Vale ressaltar que frutos com elevados SST são geralmente os preferidos para o consumo *in natura* (SANTOS et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2017).

Não foi observada diferença significativa no SST entre os frutos verdes e maduros (Tabela 2), resultado similar ao observado para o maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener) (COELHO; CENCI; RESENDE, 2010).

As variações nas características físicas e químicas, principalmente quanto a massa e as dimensões do fruto, observadas para o lote 3, podem ser decorrentes de diferenças nas condições ambientais de cultivo (chuva, temperatura, época do ano) (GRECO; PEIXOTO; FERREIRA, 2014).

Como esperado, houve diferença significativa nos parâmetros colorimétricos observados entre o estágio verde e maduro. Os frutos do estágio verde, apresentaram maior luminosidade ($\Delta L = 17,99$), maior coloração verde ($\Delta a = 24,67$) e menor coloração amarela ($\Delta b = -14,47$) comparado ao maduro. Provavelmente devido ao maior teor de clorofila e de carotenoides nos frutos verdes e amarelos, respectivamente. Os frutos ainda imaturos do maracujá-alho apresentaram aproximadamente 4,5 vezes maior teor de clorofila total quando comparado aos frutos maduros enquanto o teor de carotenoides aumentou ao longo do desenvolvimento do fruto (SOZO, 2014).

A composição centesimal dos três lotes de maracujá-alho, bem como do fruto liofilizado transformado em farinha (FM) utilizado no experimento biológico, estão apresentados na Tabela 3. A umidade variou entre 72 a 75%, não sendo observada diferença significativa entre os estágios de maturação, e similares ao descrito para o maracujá-alho de 80% (SPINOSA, 2016). A manutenção do teor de umidade durante a maturação do maracujá também foi observada para o maracujá-roxo (*Passiflora edulis* Sims *edulis*) (SOUZA et al., 2016). A farinha de maracujá apresentou umidade de aproximadamente 6% (Tabela 3).

O conteúdo de cinzas ($1,66 \pm 0,04$ g/100 g), carboidratos totais (15,27 g), proteínas ($1,55 \pm 0,04$ g/100 g) e lipídios ($1,63 \pm 0,04$ g/100 g) foram semelhantes aos encontrados por Spinosa (2016) para o maracujá-alho. Houve diferença estatística para o teor de cinzas e lipídios ($p < 0,05$), com maior conteúdo no estágio maduro. O aumento do teor de lipídios pode ser explicado pelo aumento da massa de sementes, compartimento do fruto com maior percentual de lipídios, que ocorre com o desenvolvimento do fruto (LIMA et al., 2010).

A fibra alimentar total foi de 11,62g / 100g, composta predominantemente por fibra insolúvel (99%), portanto, os frutos são considerados fontes de fibras (BRASIL, 2012).

Tabela 3- Composição centesimal de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) *in natura* em dois estádios de maturação e da farinha de maracujá-alho (FM).^{†*}

Composição centesimal	Lote 1		Lote 2		Lote 3		FM
	Verde	Maduro	Verde	Maduro	Verde	Maduro	
Umidade %	72,73±0,52 ^{a,A}	74,13±0,50 ^{a,A,B}	75,18±1,14 ^{a,B}	75,14±0,27 ^{a,A}	74,26±0,63 ^{a,A,B}	73,46±0,34 ^{a,A}	6,14 ±0,35
Cinzas	1,32±0,02 ^{a,A}	1,09 ±0,01 ^{b,A}	1,14±0,02 ^{a,B}	1,42 ±0,02 ^{b,B}	1,00 ±0,02 ^{a,C}	1,13±0,03 ^{b,A}	4,41±0,14
Carboidrato total	20,83±0,09 ^{a,A}	18,94±0,74 ^{a,A}	18,46±1,15 ^{a,A}	16,25±0,37 ^{a,B,C}	19,86±0,63 ^{a,A}	18,65±0,25 ^{a,C}	64,67±0,60
Fibra alimentar	10.25	12.18	11.92	15.20	10.84	9.34	45,37
Solúvel	0.03±0.02 ^{a,A}	0.09±0.00 ^{a,A}	0.5±0.14 ^{a,B}	0.07±0.02 ^{b,A}	ND	0.55±0.04 ^B	1,41±0,40
Insolúvel	10.22±0.51 ^{a,A}	12.09±1.03 ^{a,A,B}	11.42±1.41 ^{a,A}	15.13±2.12 ^{b,A}	10.84±1.69 ^{a,A}	8.79±1.51 ^{a,B}	43,95±2,47
Proteínas	120.35±0.09 ^{a,A}	116.20±2.30 ^{a,A}	110.41±4.45 ^{a,B}	114.27±0.12 ^{a,A}	112.92±2.14 ^{a,A,B}	121.48±1.48 ^{b,A}	9,84±0,28
Lipídios	3,08±0,05 ^{a,A}	3,35±0,05 ^{b,A}	3,14±0,01 ^{a,A}	4,23±0,07 ^{b,B}	2,79±0,08 ^{a,B}	4,11±0,03 ^{b,B}	15,28±0,00
VET (Kcal)	120,35±0,09 ^{a,A}	116,20±2,30 ^{a,A}	110,41±4,45 ^{a,B}	114,27±0,12 ^{a,A}	112,92±2,14 ^{a,A,B}	121,48±1,48 ^{b,A}	434,85±7,7 1

[†]Valores expressos como g/100 g b.u para os frutos e g/100 g b.s. para a farinha de maracujá. * Resultados expressos em média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente entre os frutos verde e maduro do mesmo lote (p<0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem significativamente entre frutos do mesmo estágio nos diferentes lotes.

3.2. Perfil de ácidos orgânicos de maracujá-alho

A Figura 3 apresenta o teor de ácidos orgânicos dos três lotes da fruta *in natura* e da farinha. Os principais ácidos orgânicos identificados foram, na sequência, os ácidos cítrico> málico> tartárico> succínico> ascórbico. Houve variação no conteúdo dos ácidos entre os lotes, porém o conteúdo total variou entre 1,2 a 1,5 g/100 g b.u. Para o maracujá azedo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), o ácido cítrico foi quantificado como sendo o majoritário, seguido pelo ácido málico (OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, para o maracujá roxo, também foi encontrado o ácido cítrico como majoritário, porém com grande variação no teor, sendo reportado na literatura valores entre 161 mg/100 g b.u. e 5 g/100 g b.u. (GUTIÉRREZ, 2012; FRANCO et al., 2014).

Figura 3– Conteúdo de ácidos orgânicos do maracujá-alho (*Passiflora tenuifila Killip*) *in natura* em dois estádios de maturação.*

*Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente entre os frutos verde e maduro do mesmo lote ($p < 0,05$). Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem significativamente entre frutos do mesmo estágio nos diferentes lotes.

A proporção geralmente encontrada para o maracujá azedo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) e roxo (*Passiflora edulis* Sims) entre os ácidos málico e cítrico é 1:10 (GUTIÉRREZ, 2012; OLIVEIRA et al., 2014). Já para a *P. tenuifila* Killip foi de aproximadamente 1:1, podendo ser uma característica exclusiva dessa espécie. Vale ressaltar que entre os estádios de maturação há uma prevalência do ácido málico nos frutos verdes e do ácido cítrico nos frutos maduros (Figura 3).

A variação no teor de ácidos orgânicos pode estar relacionada com as variações ambientais durante o cultivo bem como aos processos fisiológicos decorrentes do amadurecimento dos frutos. Foi observado que uma variação no conteúdo de ácidos orgânicos, principalmente a ácido cítrico no maracujá, quando há uma diminuição na média de temperatura durante o cultivo (SHINOHARA et al., 2013).

O ácido ascórbico é um dos mais importantes ácidos orgânicos por estar associado a diversas funções fisiológicas além de elevada capacidade antioxidante (FANG et al., 2017). O teor de ácido ascórbico entre os lotes variou entre 6,14 a 55,21 mg/100 g b.u., onde os frutos do lote 2 e 3 foram classificados como elevado conteúdo de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2012).

A grande variabilidade no teor de ácido ascórbico no maracujá já foi descrita anteriormente. Entre oito espécies de maracujá, o conteúdo de ácido ascórbico variou entre 7 mg/100g b.u. a 32 mg/100g b.u. (*P. quadrangulares* e *P. edulis*, respectivamente), até mesmo dentro da mesma espécie foram relatados valores discrepantes (Ramaiya et al., 2013). Para o maracujá azedo foram encontrados teores entre 1,9-43,5 mg/100 g de fruta (FRANCO et al., 2014; PERTUZATTI et al., 2015).

Ainda, várias espécies de maracujá apresentam elevados teores de ácido ascórbico, podendo ser consideradas fontes. Para a polpa de *Passiflora cincinnata* observou-se teores de 237,82 mg/100g (SANTOS, ANDRADE, & GOUVEIA, 2017) enquanto *P. molíssima*, *P. tarminiana*, *P. quadrangulares* foram reportados teores de 61,5; 71,7 e 51,1 mg/100g de polpa (CONTRERAS-CALDERÓN et al., 2011).

Destaca-se ausência de ácido ascórbico na amostra liofilizada (Figura 4). O impacto do processo de liofilização sobre o teor de ácido ascórbico é conhecido. A liofilização de mangas levou a perda entre 91,81-94,48% do teor

de vitamina C. Essas perdas tão elevadas estão relacionadas à alta porosidade promovida pelo processo de liofilização, aumentando a superfície de contato do produto com o oxigênio, e à formação de grandes cristais de gelo durante o congelamento, resultando em grande destruição do tecido celular e, conseqüentemente, maior exposição do nutriente ao oxigênio (ALBERTON, 2014).

Figura 4— Cromatograma obtido por CLAE-DAD ($\lambda=240$ nm) do maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) *in natura* e liofilizado indicando a ausência de ácido ascórbico no material seco.

3.3. Açúcares solúveis de maracujá-alho

O teor de açúcares solúveis totais para os frutos de *maracujá-alho* variou entre 4,0 e 8,7g/100g com a tendência de redução do teor nos frutos maduros. A sacarose, frutose e glicose foram os açúcares majoritários encontrados no fruto (Figura 5), assim como reportado para os frutos do maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims) (OLIVEIRA et al., 2014). Observa-se a presença de glicose e frutose na proporção aproximada de 1:1 e a sacarose como açúcar majoritário o que é característico para as passifloras (ROMERO-RODRIGUEZ et al., 1994; DE OLIVEIRA et al., 2014).

Figura 5 – Conteúdo de açúcares solúveis de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) *in natura* em dois estádios de maturação.*

*Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente entre os frutos verde e maduro do mesmo lote ($p < 0,05$). Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem significativamente entre frutos do mesmo estágio nos diferentes lotes.

O teor de açúcares solúveis na farinha de maracujá-alho foi 8,59, 7,91 e 4,39 g/100 g b.s. de glicose, frutose e sacarose, respectivamente, mantendo a proporção entre os açúcares próximo ao encontrado para o lote 1.

3.4. Perfil de aminos bioativas

O conteúdo de aminos bioativas totais encontrado nos lotes de maracujá (*P. tenuifila* Killip) analisados foi inferior aos 7,53 mg/100g b.u. relatado para a polpa do maracujá (*P. edulis*). Em geral, as espécies de maracujá apresentam altos níveis de aminos bioativas. Mesmo o maracujá (*P. tenuifila* Killip), que apresentou menor teor que o maracujá azedo, ainda é muito alto quando comparado a outras frutas tropicais, como abacaxi (2,10 mg/100g), mamão (1,72 mg/100g) e goiaba (0,90 mg/100g) (SANTIAGO-SILVA; LABANCA; GLORIA, 2011).

Nove aminos foram analisadas, mas, apenas três foram detectadas no maracujá (*P. tenuifila* Killip) (Figura 6). A principal foi espermidina, variando de 3,1 - 3,8 mg/100g b.u. seguida por putrescina (1,2 - 3,2 mg/100g b.u.) e tiramina (0,03 - 0,1 mg/100g b.u.). No maracujá (*P. tenuifila* Killip), a contribuição de espermidina e putrescina para o teor total de amina foi de 64,9% e 35,1%, respectivamente, indicando um perfil diferente de maracujá azedo com 40,5% e 23,5% para as mesmas.

Figura 6- Perfil de aminos bioativas de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) *in natura* em dois estádios de maturação.*

*Put: putrescina, Esp: espermidina, Tir: tiramina.

3.5. Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de maracujá-alho

O conteúdo de fenólicos totais (FT) entre os lotes variaram entre 9,21 à 13,25 mg AG eq/g b.u. (Figura 7), não observado diferença entre os frutos verdes e maduros dentro do mesmo lote. Contudo os frutos do lote três apresentaram maiores teores que os demais.

Observa-se que os teores de FT encontrados para o maracujá-alho, independente do lote, foram superiores ao encontrado para a espécie mais popular de maracujá (*P. edulis*) (2,8mg AG eq/g b.u.) e também comparado com outras frutas tropicais como lichia (1,78mg AG eq/g b.u.); marolo (7,39 mg AG eq/g b.u.) e umbu (9,04 mg AG eq/g b.u.) (SOUZA ET AL., 2012; RUFINO, ALVES, & BRITO, 2010; SEPTEMBRE-MALATERRE et al., 2016).

Figura 7– Teor de fenólicos totais de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) *in natura* em dois estádios de maturação.

*Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente entre os frutos verde e maduro do mesmo lote ($p < 0,05$). Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem significativamente entre frutos do mesmo estágio nos diferentes lotes

O teor de FT do fruto liofilizado de *P. tenuifila* Killip, o qual foi utilizado no experimento biológico é apresentado na tabela 4. Valor muito próximo (22,84 AG eq/g b.s.) foi encontrado para o material liofilizado da *P. tenuifila* Killip cultivado no Ceará (SPINOSA, 2016).

Tabela 4– Fenólicos totais e capacidade antioxidante da farinha de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip).

	Farinha de maracujá
Fenólicos totais (mg AG eq/g b.s.)	24,99 $\pm$ 0,99
DPPH (mmol Trolox eq/g b.s.)	185,11 $\pm$ 10,07
ORAC (mmol Trolox eq/g b.s.)	384,42 $\pm$ 20,45

A capacidade antioxidante foi avaliada por dois métodos *in vitro*, métodos *DPPH* e *ORAC*. O primeiro é comumente utilizado para avaliar a capacidade de estabilizar espécies reativas. O DPPH• é um radical que rapidamente subtrai um elétron ou hidrogênio de alguma substância redutora, sendo assim, os resultados do ensaio podem demonstrar o potencial de compostos contra espécies reativas

de oxigênio como a hidroxila e o superóxido, presente em sistemas orgânicos (ABOZED et al., 2014).

Figura 8– Capacidade antioxidante pelo método de varredura do radical DPPH de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) *in natura*.*

*Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente entre os frutos verde e maduro do mesmo lote ($p < 0,05$). Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem significativamente entre frutos do mesmo estágio nos diferentes lotes

Não houve diferença significativa entre os frutos do mesmo lote, exceto para o terceiro (Figura 8), onde os maduros apresentaram significativamente maior capacidade antioxidante. Geralmente, a capacidade antioxidante apresenta uma grande correlação com o teor de fenólicos totais (KUMAR; SANDHIR; OJHA, 2014), fato também observado no presente estudo ($r^2=0,551$).

A capacidade antioxidante do maracujá-alho foi maior do que a encontrada para o maracujá azedo e granadilha (*P. ligularis*) (0,5 $\mu\text{mol Trolox/g b.u.}$), porém menor que a *P. molíssima* (70 $\mu\text{mol Trolox/g b.u.}$) (VASCO, RUALES, & KAMAL-ELDIN, 2008).

O método ORAC avalia a capacidade do antioxidante interromper a cadeia de reações radicalares, monitorando desta forma a inibição da oxidação induzida pelo radical peroxil (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Figura 9– Capacidade de absorção de radicais de oxigênio pelo método ORAC de maracujá- alho (*Passiflora tenuifila* Killip) *in natura*.*

*Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente entre os frutos verde e maduro do mesmo lote ($p < 0,05$). Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem significativamente entre frutos do mesmo estágio nos diferentes lotes.

A capacidade antioxidante variou entre 146,28 a 235,21 $\mu\text{mol Trolox eq/g b.u}$ (Figura 9). Os frutos do lote 1 e 2 não apresentaram diferença significativa. Independente do lote, a *P. tenuifila* Killip apresentou maiores valores de capacidade antioxidante que as frutas denominadas de *berries*, tais como blackberries (58,02 $\mu\text{mol Trolox/g b.u.}$); cranberries (88,88 $\mu\text{mol Trolox/g b.u.}$); blueberries (96,21 $\mu\text{mol Trolox/g b.u.}$); elderberreis (145 $\mu\text{mol Trolox/g b.u.}$) as quais são reconhecidas pela elevada capacidade antioxidante (HAYTOWITZ & BHAGWAT, 2010).

O material liofilizado apresentou valores maiores para o teor de FT e capacidade antioxidante que o fruto *in natura* (Tabela 4), e foi superior a farinha de casca de maracujá comercial (*P. edulis*), a qual apresentou 2,5 mg AG eq./g b.s. de fenólicos totais e 68,58 $\mu\text{mol Trolox/g}$ (CAZARIN et al., 2014).

De maneira geral, os frutos verdes e maduros apresentaram valores similares. Observa-se na literatura o impacto do estágio de maturação na composição e atividade antioxidante dos compostos fenólicos em frutos. Para frutos de espécies *Rosas ssp.*, comumente encontrado na Europa, Ásia, América do Norte e Oriente Médio, verificou-se uma redução no teor de flavonoides e ácidos fenólicos com o avanço da maturação (do estágio 1, início da mudança

de cor verde para o amarelo até estágio 4, fruto laranja escuro ou vermelho, dependendo da espécie) mas, com um aumento a partir do quinto estágio com o fruto completamente maduro (MILANEZ et al., 2018). Esses resultados sugerem que os dois estágios de *P. tenuifolia* Killip avaliados, mesmo apresentando cores de casca diferentes, estão em estágios próximos de maturação.

3.6. Identificação de flavonoides e ácidos fenólicos de frutos de maracujá-alho

O cromatograma dos compostos fenólicos de maracujá-alho é apresentado na Figura 10. O número do pico é correspondente ao composto descrito na tabela 5. Dezesete compostos foram tentativamente identificados (Tabela 5), entre eles um ácido fenólico. Os principais flavonoides identificados foram as flavonas luteolina e apigenina, os flavonóis quercetina, o flavan-3-ol galocatequina e a flavonona pinocembrina. As flavonas se encontram principalmente como C-glicosídeos, mas também como O-glicosídeos e flavonas metiladas, esta última não glicosilada. Os flavonoides C-glicosilados foram a maior classe de compostos identificados, o mesmo pode ser observado para outras espécies de passifloras (SAKALEM, NEGRI, & TABACH, 2012). Além destes, também foram identificados três proantocianidinas.

Os compostos majoritários foram as proantocianidinas, dentre elas o pico 10 (Figura 11a) apresentando íon molecular $[M-H]^-$ a m/z 591 e fragmentos MS2 a m/z 287 e m/z 303, característicos da fragmentação de um dímero de proantocianidina (epicatequina→catequina), conforme apresentado na figura 12 (ES-SAFI, GHIDOUCE, & DUCROT, 2007).

Figura 10- Cromatograma obtido por CLAE-DAD ($\lambda=270$ nm) do maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) (A) e ampliação do tempo 9 à 14 min (B).

Tabela 5 - Identificação de flavonoides e ácido fenólico por LC-ESI-MS de frutos de marucujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip).

Nº	Estrutura proposta	TR (min)	UV _{max}	[M-H]–	MS2/MS ³ (m/z)	Referência
1	Pinocembrina glucuronideo	9,1	215, 234, 280	431,42	385,26	Sakalem, Negri, & Tabach, 2012
2	Luteolina-6-C-glucosil-2"-O-ramnosídeo	9,7	215, 233, 273	593,48	473,28; 429,26; 357,27	Bezerra et al., 2016; Bravo et al., 2017
3	Isoorientina (Luteolina-6-C-hexosideo)	10,0	214, 233, 278	447,42	429,29; 357,27; 327,24	Sakalem, Negri, & Tabach, 2012
4	(+)-Galocatequina	10,8	214, 234, 278	305,33	287,18/151	Bresciani et al., 2015
5	Taxifolina-7-O-glucosideo	11,2	214, 233	465,48	303; 178,99; 151,00	Srisedka, Wongpornchai, & Rayanakorn, 2012
6	Ácido cafeoilquínico	11,6	214, 233, 278	352,43	/173,99; 130,09	Xue et al., 2016
7	Vicenina-2	13,8	215, 271, 341	593	575,35; 501,20; 382,29; 353,17	Negri et al., 2012
8	Luteolina-8-C-6"-deoxi-3"-hexulosideo-2"-O-ramnosídeo	14,1	214, 234	575,47	411,30; 429,31; 358,20; 473,40; 285,11	Sakalem, Negri, & Tabach, 2012 Farag et al., 2016

Continuação da tabela

9	5-hidroxi-3,4,7 trimetoxi-flavona	16,0	215, 234, 280	327,21	312,14; 296,11; 313,13	Simirgiotis et al., 2015
10	Dímero de procianidina	16,2	216, 235, 280	591,44	303,21; 287,21	Es-Safi, Ghidouche, & Ducrot, 2007
11	Isovitexina-2-O-ramnosídeo	16,7	214, 234	577,45	413,31; 457,36; 311,31	Ibrahim et al., 2015
12	Diosmetina (Luteolina-metil-éter)	17,9	215, 233, 345	299,23	284,10	Bertrams et al., 2013
13	Dímero de procianidina (epicatequina-epiafzelequina)	19,4	215,235, 281	561,54	543,13; 409,40; 287,25; 273,14	Lin et al., 2014
14	Dihidroquercetina	21,0	214, 234	303,29	285,15; 192,99	Ye et al., 2012
15	Dímero de procianidina digalato (tipo A)	23,7	214, 234, 280	879,80	727,57; 439,39	Rockenbach et al., 2012
16	Dimetoxiluteolina	25,6	214,234, 343	313,26	298,19	Simirgiotis et al., 2015 Martucci et al., 2014
17	Apigenina-8-C-deoxihexosídeo	26,6	214, 234	415,33	397,28; 311,19; 341,38	Farag et al., 2016

Figura 11 – Espectro de massas da procianidina dímero (A), procianidina dímero (epicatequina e epiafzelequina) (B) e galocatequina (C) identificadas por LC-ESI-MS em frutos de maracujá-alho.

Figura 12- Estrutura proposta para o pico 10. Monômeros de flavan-3-ol catequina e epicatequina que compõem o dímero de proantocianidina identificado. Estrutura proposta para o pico 10 e os principais pontos de fragmentação (B). Adaptado de Es-Safi, Guidouche & Ducrot (2007).

Outra proantocianidina (pico 13, tabela 5 e figura 11b) foi identificada como propelargonidina do tipo B (epicatequina→afzelequina) apresentando íon molecular a m/z 561 e fragmentos MS2 a m/z 543 $[M-H-18]^-$, indicando a perda de uma molécula de água produto comum da fragmentação de proantocianidinas, a m/z 409 $[M-H-152]^-$ que indica a quebra de todo anel B com os Carbonos C₂-C₃ do anel C da epicatequina, a m/z 287 $[M_E-3H]^-$ e 273 $[M_T-H]^-$, onde M_E e M_T correspondem a monômero de extensão e terminal, respectivamente, típicos de proantocianidinas do tipo B, além disso, o íon a m/z 273, sugere como unidade terminal a epiazfelectina (LIN et al., 2014).

O pico 2 (m/z 593) (Tabela 5 e Figura 10) apresentou fragmento MS2 abundante a m/z 473, indicando perda neutra de 120 Da (Figura 13) que é característico da fragmentação de um C-glicosídeo, provável hexose por apresentar os íons com a m/z 357 $[286+71]^-$ e 327 $[286+41]^-$ referente à aglicona com porções de açúcar que permanecem ligadas (120 Da + 41Da= hexose 161). Ainda, o íon com m/z 286 sugere a luteolina como aglicona. O composto foi identificado como luteolina-6-C glucosil-2'-O-rhaminosídeo pois o íon a m/z 575 $[M-H-18]^-$ indica ligação no carbono 6 nas flavonas C-glicosiladas e $[M-H-161-286]^-$ indica perda neutra de 146 Da, característico da perda neutra de uma unidade de ramnose (ABAD-GARCÍA et al., 2008; FERRERES et al., 2007).

Figura 13- Espectro de massas da luteolina-6-C- glucosil-2'-O-rhaminosideo identificada por LC-ESI-MS em frutos de maracujá-alho (A). Clivagem do resíduo de glicose, destacando a perda de 120 Da comum para C-glicosilado (B). Adaptado de Davis & Brodbelt (2004).

O composto 8 (tabela 5 e figura 10), identificado como luteolina-8-C-6"-desoxi-3"-hexulose-2"-O-rhamnosídeo (Figura 14), apresentou íon molecular a m/z 575 e fragmentos MS2 a m/z 429 $[M-H-146]^-$ perda de uma unidade de desoxihexose e íon m/z 411 $[M-H-146-18]^-$ corresponde a perda do açúcar desoxihexose e água, característica de uma ligação entre o açúcar (possível ramnose) e um grupo hidroxila não fenólico, mais provavelmente na posição 2"-O- de outra fração de açúcar indicando glicosilação de O-desoxihexose. O fragmento a m/z 285 indica como aglicona a luteolina, assim como a m/z 398 $[285+113]^-$ indica uma di-C-glucosídeo (BEZERRA et al., 2016; FARAG et al., 2016).

Figura 14- Espectro de massa da luteolina-8-C-6"-desoxi-3"-hexulose-2"-O-rhamnosídeo por LC-ESI-MS em frutos de maracujá-alho.

Outros três compostos foram identificados como luteolina-C-glicosídeo. O pico 3 (Figura 15a), identificado como isoorientina (luteolina-6-C-hexosídeo), apresentou $[M-H]^-$ a m/z 447 e fragmentos MS2 abundante a m/z 327 $[M-H-120]^-$ e m/z 357 $[M-H-90]^-$ característicos da quebra do anel da unidade de açúcar C-hexosídeo, enquanto o fragmento a m/z 429 $[M-H-18]^-$ sugere uma mono-C-glicosilação na posição 6 e o íon m/z 285 característico da luteolina (FARAG et al., 2016; SAKALEM, NEGRI, & TABACH, 2012).

A diosmetina, luteolina com um grupamento metil no carbono 4 (pico 12, figura 15b) apresentou íon molecular a m/z 299, gerando fragmento MS2 com m/z 284, uma perda neutra de 15 Da sugerindo a eliminação de um grupo metil (BERTRAMS et al., 2013). Outra luteolina metoxilada identificada foi a dimetoxiluteolina (pico 16, figura 15c) apresentando íon molecular a m/z 313 e fragmento MS2 a m/z 298 $[M-H-15]^-$ pela eliminação de um grupo metila e a aglicona ainda ligada a outro grupo metil (MARTUCCI et al., 2014).

Figura 15 - Espectro de massa da isoorientina (A); diosmetina (B) e dimetoxilluteolina (C) identificada por LC-ESI-MS em frutos de maracujá-alho.

Outra flavona comumente encontrada nas passifloras é a apigenina (SAKALEM, NEGRI, & TABACH, 2012), no maracujá-alho foram identificadas três compostos contendo a apigenina (Figura 16). O pico 7 (Tabela 5 e Figura 10) apresentou íon molecular a m/z 593 e fragmentos a m/z 575 $[M-H-18]^-$, 353 $[M-H-120-120]^-/[270-83]^-$ e 383 $[M-H-90-120]^-/[270-113]^-$ característicos da fragmentação de di-C-glicosil flavona e da apigenina. Comparando com os dados da literatura este composto foi caracterizado como apigenina-6,8-di-C-glucosil, também conhecido como vicenina-2 (NEGRI, SANTI, & TABACH, 2012;

SAKALEM, NEGRI, & TABACH, 2012). Enquanto o pico 17 com íon molecular a m/z 415 e fragmentos MS2 a m/z 397 $[M-H-18]^-$, 311 $[M-H-104]^-/[aglicona+41]^-$ e 341 $[aglicona+71]^-$ foi identificado como apigenina-8-C-deoxosídeo e o pico 11 com a m/z 577 e fragmento 413 $[M-H-146-18]^-$, resíduo de ramnose e água, 457 $[M-H-120]^-$ e 311 $[aglicona+41]^-$ sendo proposta a estrutura da isovitexina-2-ramnosídeo (FARAG et al., 2016; IBRAHIM et al., 2015).

Figura 16- Espectro de massa da vicenina-2 (A); apigenina-8-C-deoxosídeo (B) e isovitexina-2-ramnosídeo (C) identificada por LC-ESI-MS em frutos de maracujá-alho.

Outros compostos minoritários identificados estão apresentados na tabela 5 e seus respectivos espectros de massa encontram-se em anexo (Anexo II).

3.7. Identificação de Proantocianidinas

Para comprovar a presença de PA's que foram identificadas no maracujá *P. tenuifila* (Tabela 5 e Figura 10) e tentar elucidar a sua composição foi utilizado o método de catálise ácida na presença do fluroglucinol. As PA's são despolimerizadas sob aquecimento e na presença do ácido ascórbico e fluroglucinol levando a clivagem das ligações interflavan. As unidades terminais são liberadas como os flavan-3-ols correspondentes e as unidades extensoras reagem com fluroglucinol gerando um aduto estável (KARONEN et al., 2007).

O cromatograma obtido por CLAE-DAD ($\lambda=280$ nm) do maracujá-alho (*P. tenuifila* Killip) é apresentado na figura 17. Foram identificados sete compostos que estão descritos na Tabela 6. A análise do resultado corrobora com a identificação dos flavonoides previamente realizada (Tabela 5 e Figura 10), indicando a presença de adutos de epigallocatequina (Tabela 6) com m/z 429 (Pico 1, TR 6,7 min; Pico 2, TR 7,5 min) e (epi)catequina com m/z 412 (Pico 4, TR: 11,4 min; Pico 6, TR 20,8 min e Pico 7, TR 24,1 min) como monômeros constituintes das PA's encontradas na *P. tenuifila* Killip. O Pico número 3 (Tabela 6; m/z : 305; TR: 9,4 min) foi identificado como (epi)galocatequina, o qual também foi detectado na caracterização dos flavonoides da *P. tenuifila* Killip presente como monômero. Não foi observado monômeros de (epi)catequina no maracujá analisado (Tabela 5). A presença do pico 5 (Tabela 6; m/z 288, TR: 14,3 min) após a catalise ácida da *P. tenuifila*, tentativamente identificado como (epi)catequina, sugere esse monômero como unidade terminal de uma das PAs presentes. É possível que este seja constituinte do dímero de procianidina identificado na amostra (Tabela 5, composto 10).

Os respectivos espectros de massa dos picos identificados encontram-se no anexo III.

Tabela 6- Identificação de PAs de frutos de maracujá (*Passiflora tenuifila* Killip) por LC-ESI-MS através do método de catálise ácida na presença de fluroglucinol.

Número	Estrutura proposta	TR	UV _{max}	M-H	MS2
1	Aduto (epi)galocatequina pico #1	6,7	236	429 (428,68)	303 (302,50); 261 (260,35); 177 (176,21)
2	Aduto (epi)galocatequina pico #2	7,5	236/270	429 (428,65)	303 (302,47); 261 (260,42); 177 (176,22)
3	(Epi)gallocatequina	9,4	236	305 (304,51)	287 (286,20); 219 (218,28); 178 (178,20)
4	Aduto (epi)catequina pico #1	11,4	236/280	412,68	287 (286,47); 261 (260,41); 175 (174,20)
5	(Epi)catequina	14,3	242/278	288,46	245 (244,33); 205 (204,22); 179 (178,17)
6	Aduto (epi)catequina pico #2	20,8	244/278	412,72	287 (286,48); 175 (174,68)
7	Aduto (epi)catequina pico #3	24,1	278	412,72	287 (286,56); 261 (260,33); 175 (174,24)

Figura 17- Identificação de PA's pelo método de Fluroglucinólises, cromatograma obtido por CLAE-DAD ($\lambda=280$ nm) do maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) (A) e ampliação do tempo 6,5 à 24,5 min (B).

3.8. Quantificação de flavonoides e ácido fenólico de frutos de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip)

A Tabela 7 apresenta a concentração de flavonoides no maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) nos estádios verde e maduros dos três lotes analisados.

As flavonas representaram 12% dos compostos fenólicos no material liofilizado (87,98 mg/100g b.s.) destes, 69,05mg/100g b.s. e 12,70 mg/100g b.s. de luteolina total e apigenina total, respectivamente (Figura 19).

As proantocianidinas e seu monômero foram os compostos majoritários na FM, mostrou uma elevada concentração que correspondeu a 85% dos compostos identificados no maracujá-alho liofilizado (Figura 18), resultado semelhante observado para os lotes coletados nos diferentes períodos, seguido pela luteolina com 7 à 10%.

Embora para espécies comerciais de passifloras não tenham sido reportadas a presença de taninos conjugados, há relatos na literatura para espécies silvestres. O extrato hidroetanólico da *P. coccínea* apresentou dímeros de procianidina do tipo B1 e trímeros de procianidina e propelargonidina, sendo este último constituído de epiafzelequina. Enquanto para *P. tarminiana* foi identificado dímeros de epiazfelequina-epicatequina e procianidina tipo B1, assim como no presente estudo para o maracujá-alho (BRAVO et al., 2017; FARAG et al., 2016; SAKALEM, NEGRI, & TABACH, 2012).

A *P. mollissima* L. também apresentou como compostos majoritários os flava-3-ol (epicatequina, catequina e epiafzelequina) e seus dímeros e trímeros (proantocianidinas) sendo encontrado 276,7 mg/100g b.u. de proantocianidinas (VASCO, 2009), valor próximo aos encontrados para os lotes analisados do maracujá-alho com teores que variaram entre 244 e 374 mg/ b.u. (Tabela 6).

Por fim, assim como nos lotes de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) *in natura* analisados (Tabela 7), foram quantificados para a polpa da *Passiflora setacea* as flavonas isoorientina e isovitexina. Essa espécie apresentou ainda conteúdo majoritário do monômero epicatequina com aproximadamente três vezes maior que o conteúdo total de flavonas (SANCHEZ et al., 2020).

O elevado teor de proantocianidinas merece destaque devido aos efeitos biológicos já reportados como elevada capacidade antioxidante, anti-

inflamatório, anti-tumoral, indicando o potencial efeito biológico do consumo de maracujá *P. tenuifolia* Killip (PACKER; RIMBACH; VIRGILI, 1999; WANG et al., 2013; SAWYER et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

Tabela 7- Quantificação de flavonoides e ácido fenólico de frutos maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) *in natura*, resultado expresso em mg/100g b.u.

Compostos	Lote 1*		Lote 2**		Lote 3***	
	Verde	Maduro	Verde	Maduro	Verde	Maduro
Luteolina						
Luteolina-6-C-glucosil-2"-O-ramnosídeo	1,45±0,06	1,44±0,05	2,06±0,12	2,00±0,13	2,17±0,32	2,82±0,14
Isoorientina (Luteolina-6-C-hexosídeo)	0,44±0,08	0,30±0,12	0,52±0,01	0,75±0,18	1,21±0,59	1,13±0,59
Luteolina-8-C-6"deoxi-3"-hexulosídeo-2"-O-ramnosídeo	19,68±0,77	18,88±0,60	30,11±1,42	28,04±1,64	23,57±2,67	30,01±0,79
Diosmetina (Luteolina-metil-éter)	2,87±0,27	1,86±0,13	2,90±0,11	3,77±0,40	3,26±0,13	3,99±0,48
Dimetoxiluteolina	1,92±0,71	1,64±1,43	1,69±0,08	2,32±1,91	1,80±0,80	2,19±1,11
Apigenina						
Isovitexina-2-O-rhamnosídeo	2,98±0,22	3,10±0,05	3,08±0,15	5,64±7,91	3,69±0,33	5,25±0,37
Apigenina-8-C-deoxihexosídeo	0,96±0,04	0,98±0,03	1,49±0,07	0,86±0,04	1,08±0,15	1,43±0,11
Vicenina-2	2,88±0,17	3,24±0,09	14,05±19,06	4,57±0,68	3,55±0,17	4,45±0,34
Proantocianidinas e monômeros						
Dímero de Procianidina	243,63±14,14	167,31±3,68	212,79±9,15	214,88±21,95	136,17±8,22	180,68±39,29
Dímero de Procianidina (Epicatequina-Epiafzelequina)	93,50±11,55	116,65±2,17	140,38±6,15	148,10±20,86	99,78±7,99	141,61±26,83
Dímero de Procianidina digalato (tipo A)	6,97±0,89	6,06±0,13	9,35±0,33	11,33±0,92	8,95±0,42	10,55±2,32
(+)-Galocatequina	4,65±0,23	5,34±0,31	5,00±0,20	8,73±0,47	22,72±2,76	25,82±7,36

Continuação da Tabela 7

Taxifolina

Dihidroquercetina	4,47±1,21	5,55±1,68	7,03±0,26	6,97±2,15	4,85±1,36	6,75±2,48
Taxifolina-7-O-glucosídeo	0,34±0,05	0,42±0,06	0,81±0,07	0,50±0,09	0,55±0,05	1,13±0,12

Outros

5-hidroxi-3,4'7 trimethoxy-flavona	0,99±0,08	0,65±0,07	0,96±0,03	1,36±0,19	0,04±0,006	0,22±0,13
Pinocembrina glucuronídeo	2,02±0,12	2,20±0,20	2,19±0,07	2,40±0,14	2,28±0,24	3,11±0,08
Ácido cafeoilquínico	0,73±0,08	0,66±0,25	0,75±0,02	2,22±0,30	1,19±0,19	1,10±0,47

Proantocianidinas total	348,7	295,4	367,5	383,0	267,6	358,7
Luteolina total	26,36	24,12	37,29	36,87	32,00	40,14
Apigenina total	6,82	7,32	18,62	11,08	8,33	11,14
Taxifolin total	4,81	5,97	7,84	7,47	5,41	7,88
Outros	3,74	3,51	3,90	5,98	3,51	4,43

Colheita: * agosto/16; **dezembro/16; ***maio/17

Figura 18 - Participação dos flavonoides quantificados no extrato hidrometanólico de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip).

Figura 19 - Concentração (mg/100g b.s.) dos flavonoides presentes no extrato hidrometanólico de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip).

3.9. Análise de componente principal do perfil de compostos fenólicos da *P. tenuifila* Killip nos dois estádios de maturação analisados

A análise de componente principal foi realizada para comparar o perfil de flavonoides dos frutos no estágio verde e maduro dos três lotes analisados. Observa-se que a Análise de componentes principais (em inglês, Principal Component Analysis –PCA) corrobora com resultados anteriores mostrando pouca diferença entre os frutos verdes e maduros do mesmo lote, visto que tanto para o segundo como para o terceiro lote as regiões referentes a cada estágio se encontram enquanto os frutos verdes e maduros do primeiro lote apresentaram suas regiões próximas. No entanto, verifica-se pequena variação entre os lotes que pode estar associada a influência das condições climáticas sobre a produção de compostos fenólicos nas plantas.

A PCA revelou que os dois eixos respondem mais de 60% (39,8 e 21,6%, PC1 e PC2, respectivamente) das diferenças encontradas (Figura 20). O lote três correlacionou com maiores teores de isoorientina e galocatequina (Figura 21), enquanto os frutos maduros do lote 1 apresentaram maiores teores de flavonas metiladas (5-hidroxi-3,4'-trimetoxi-flavona e dimetoxiluteolina).

Figura 20– Componente principal 1 versus Componente principal 2 dos flavonoides de diferentes lotes e respectivos estádios de maturação do fruto de maracujá-alho (*Passiflora tenuifolia* Killip) *in natura*. Lotes 1, 2 e 3 coletados em agosto/2016, dezembro/2016 e maio/2017, respectivamente. Maracujá verde (V) e maduro (M).

Figura 21– Agrupamento dos compostos fenólicos com base na análise dos componentes principais de diferentes lotes e respectivos estádios de maturação do fruto de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) *in natura*. Lotes 1, 2 e 3 coletados em agosto/2016, dezembro/2016 e maio/2017, respectivamente. Maracujá verde (V) e maduro (M).

4. CONCLUSÕES

O maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) consumido tanto nos estádios verde e maduro, são caracterizados por expressivo potencial antioxidante e elevado conteúdo de fenólicos totais quando comparados com outras espécies de passiflora, sendo constituído majoritariamente de proantocianidinas e flavonas, principalmente luteolina C-glicosiladas, não apresentando diferenças entre os dois estádios.

O maracujá-alho foi considerando fonte em fibras alimentares, sendo majoritariamente constituída por fibra insolúvel, não observando diferença entre frutos do estádio verde e maduro. O teor de amins bioativas foi elevada quando comparado à outras frutas tropicais e próximo do teor do maracujá azedo amarelo (*P. edulis* Sims), espécie de passiflora com maior apelo comercial.

Observou-se variação no conteúdo de ácidos orgânicos e açúcares solúveis entre os frutos do mesmo estádio dos diferentes lotes avaliados, podendo estar associado as condições climáticas de cultivo, contudo, frutos do mesmo lote apresentaram valores próximos.

Assim, frente ao perfil de flavonoides e composição centesimal, ambos os estádios de maturação do fruto fornecem o mesmo aporte de flavonoides, podendo ser recomendado seu consumo após pleno desenvolvimento do fruto.

Referências bibliográficas

ABAD-GARCÍA, B. et al. New features on the fragmentation and differentiation of C-glycosidic flavone isomers by positive electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 22, p. 1834–1842, 2008.

ABOZED, S. S. et al. Total phenolic contents and antioxidant activities of various solvent extracts from whole wheat and bran. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, p. 63–67, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0570178314000104>>.

ALBERTON, A. C. M. **Caracterização da manga tomy atkins in natura e após a liofilização**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Núcleo de alimentos, curso Engenharia de alimentos, 2014.

ALEXANDRE, R. S. et al. Germinação de sementes de genótipos de maracujazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 12, p. 1239–1245, 2004.

ANDO, C. et al. Luteolin, a food-derived flavonoid, suppresses adipocyte-dependent activation of macrophages by inhibiting JNK activation. **FEBS Letters**, v. 583, p. 3649–3654, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.045>>.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. 17th. ed. Gaithersburg: AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 2000. v. 1

AUBERT, C. et al. Relationship between fruit density and quality parameters, levels of sugars, organic acids, bioactive compounds and volatiles of two nectarine cultivars, at harvest and after ripening. **Food Chemistry**, v. 297, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124954>>.

AYRES, A. S. F. S. J. et al. Monoaminergic neurotransmission is mediating the antidepressant-like effects of *Passiflora edulis* Sims fo. *edulis*. **Neuroscience Letters**, v. 660, p. 79–85, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2017.09.010>>.

BANDEIRA, C. M.; EVANGELISTA, W. P.; GLORIA, M. B. A. Bioactive amines in fresh, canned and dried sweet corn, embryo and endosperm and germinated corn. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1355–1359, 2012.

BERNACCI, L. C. et al. *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 566–576, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452008000200053&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

BERTRAMS, J. et al. Phenolic compounds as marker compounds for botanical

origin determination of German propolis samples based on TLC and TLC-MS. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 86, p. 143–153, 2013. Disponível em: <<http://pub.jki.bund.de/index.php/JABFQ/article/view/2410>>.

BEZERRA, A. G. et al. Phytochemical analysis of hydroethanolic extract of *Turnera diffusa* Willd and evaluation of its effects on astrocyte cell death. **Einstein**, v. 14, n. 1, p. 56–63, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082016000100056&lng=en&tling=en>.

BIESALSKI, H. K. et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, n. 11–12, p. 1202–1205, 2009.

BORGES, A L B; LIMA, A. A. Boletim 18 do Brasil Fruteiras Tropicais do Brasil. (A. Crisóstomo, L. A.; Naumov, Ed.) In: Adubando para alta produtividade e qualidade: fruteiras tropicais do Brasil, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009.

BOTANICAL GARDEN OF RIO DE JANEIRO. **Passiflora tenuifila** Killip. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB12566&action=print>>.

BRAGA, M. F.; BATISTA, A. D.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; VAZ, C. DE F.; SANTOS, E. C. DOS; SANTOS, F. C. Características agrônômicas, físicas e químicas de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip.) cultivado no Distrito Federal. In: Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro, IV., Planaltina, DF. **Anais...** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BRAVO, K. et al. *Passiflora tarminiana* fruits reduce UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 168, p. 78–88, 2017.

BRESCIANI, L. et al. (Poly)phenolic characterization of three food supplements containing 36 different fruits, vegetables and berries. **PharmaNutrition**, v. 3, p. 11–19, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phanu.2015.01.001>>.

CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, p. 303–311, 1993.

CAZARIN, C. B. B. et al. Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (*Passiflora edulis*). **Ciencia Rural**, v. 44, n. 9, p. 1699–1704, 2014.

CERVI, A. C.; DUNAISKI JUNIOR, A. PASSIFLORACEAE DO BRASIL: ESTUDO DO GÊNERO *Passiflora* L. SUBGÊNERO *Distephana* (JUSS.) KILLIP. **Estudos de Biologia**, v. 26, n. 55, p. 45–67, 2004.

CHANG, X. et al. Protective effect of apigenin on Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats via inhibiting P2X7/NF- κ B pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 236, p. 41–46, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000927971500191X>>.

CHAU, C. F.; HUANG, Y. L. Characterization of passion fruit seed fibres - A potential fibre source. **Food Chemistry**, v. 85, p. 189–194, 2004.

COELHO, A. A.; CENCI, S. A.; RESENDE, E. D. de. Qualidade do suco de maracujá-amarelo em diferentes pontos de colheita e após o amadurecimento. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 722–729, 2010.

CONTRERAS-CALDERÓN, J. et al. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2047–2053, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.003>>.

CORDENUNSI, B. R.; SHIGA, T. M.; LAJOLO, F. Non-starch polysaccharide composition of two cultivars of banana (*Musa acuminata* L.: cvs Mysore and Nanicão). **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 1, p. 26–31, 2008.

DE OLIVEIRA, G. A. et al. Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. **Food Research International**, v. 60, p. 154–162, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.051>>.

DE SOUZA, V. R. et al. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381–386, 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.191>>.

DE SOUZA, V. R. et al. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381–386, 2012b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.191>>.

DEMBITSKY, V. M. et al. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, p. 1671–1701, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.003>>.

DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387–398, 2015.

ES-SAFI, N. E.; GHIDOUCHE, S.; DUCROT, P. H. Flavonoids: Hemisynthesis,

reactivity, characterization and free radical scavenging activity. **Molecules**, v. 12, n. 9, p. 2228–2258, 2007.

FANG, T. et al. Variation of ascorbic acid concentration in fruits of cultivated and wild apples. **Food Chemistry**, v. 225, p. 132–137, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.014>>.

FARAG, M. a. et al. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of genus Passiflora leaves using a multiplex approach of UPLC-MS and NMR analyzed by chemometric tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 12, p. 3125–3143, 2016a.

FARAG, M. A. et al. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of genus Passiflora leaves using a multiplex approach of UPLC-MS and NMR analyzed by chemometric tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 3125–3143, 2016b.

FARID, R. et al. Oral intake of purple passion fruit peel extract reduces pain and stiffness and improves physical function in adult patients with knee osteoarthritis. **Nutrition Research**, v. 30, p. 601–606, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2010.08.010>>.

FERNÁNDEZ-ARROYO, S. et al. Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of Hibiscus sabdariffa aqueous extract. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1490–1495, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.040>>.

FERRERES, F. et al. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, p. 214–223, 2007.

FIEBICH, B. L. et al. Pharmacological studies in an herbal drug combination of St. John's Wort (Hypericum perforatum) and passion flower (Passiflora incarnata): In vitro and in vivo evidence of synergy between Hypericum and Passiflora in antidepressant pharmacological models. **Fitoterapia**, v. 82, n. 3, p. 474–480, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2010.12.006>>.

FORTALEZA, J. M. et al. Características físicas e químicas em nove genótipos de maracujá-azedo cultivado sob três níveis de adubação potássica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 124–127, 2005.

FRANCO, G. et al. Physicochemical properties of gulupa fruits (Passiflora edulis Sims) during pre and postharvest. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, v. 15, n. 1, p. 15–30, 2014. Disponível em: <www.redalyc.org/articulo.oa?id=81331357003>.

GAZOLA, A. C. et al. Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from passiflora quadrangularis pericarp. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, p. 158–163, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjph.2015.03.009>>.

GOMES, S. V. F. et al. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 28–35, 2017.

GRECO, S. M. L.; PEIXOTO, J. R.; FERREIRA, L. M. AVALIAÇÃO FÍSICA, FÍSICO-QUÍMICA E ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS DE 32 GENÓTIPOS DE MARACUJAZEIRO- AZEDO CULTIVADOS NO DISTRITO FEDERAL. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 360–370, 2014.

GUTIÉRREZ, L. M. F. **Caracterización fisiológica y bioquímica del fruto de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) bajo tres ambientes contrastantes**. 2012. 2012. Disponível em: <<http://www.bdigital.unal.edu.co/10595/>>.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2928–2935, 2005.

HAYTOWITZ, D.; BHAGWAT, S. USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. **US Department of Agriculture**, p. 10–48, 2010. Disponível em: <http://www.pureacaiberry.com/testimonials/ORAC_R2.pdf>.

HOLANDA, D. K. R. **Desenvolvimento e caracterização de sopa de vegetais e carne à base de maracujá silvestre (*Passiflora tenuifila* Killip) submetida ao processo de esterilização**. 2015. Universidade Federal do Ceará, 2015.

HUANG, Z. et al. Preliminarily exploring of the association between sugars and anthocyanin accumulation in apricot fruit during ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 248, p. 112–117, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.012>>.

IBRAHIM, R. M. et al. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 134–141, 2015.

JUNGHANS, T. G. et al. CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRES DE MARACUJAZEIRO POR MEIO DE DESCRITORES RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS E SEMENTES. In: XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2012.

KARONEN, M. et al. Reversed-phase HPLC-ESI / MS Analysis of Birch Leaf Proanthocyanidins after their Acidic Degradation in the Presence of Nucleophiles. **Phytochemical Analysis**, v. 18, p. 378–386, 2007.

KENNEDY, J. A.; JONES, G. P. Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1740–1746, 2001.

KESH, S. B. et al. Promising role of ferulic acid , atorvastatin and their

combination in ameliorating high fat diet-induced stress in mice. **Life Sciences**, v. 92, p. 938–949, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.03.015>>.

KONCZAK, I. et al. Antioxidant capacity and hydrophilic phytochemicals in commercially grown native Australian fruits. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1048–1054, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.060>>.

KUMAR, S.; SANDHIR, R.; OJHA, S. Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of Lantana camara leaves. **BMC Research Notes**, v. 7, p. 560, 2014. Disponível em: <<http://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-7-560>>.

LAM, S. K.; NG, T. B. Passiflin, a novel dimeric antifungal protein from seeds of the passion fruit. **Phytomedicine**, v. 16, p. 172–180, 2009.

LI, H. et al. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of Passiflora edulis “edulis” and Passiflora edulis “flavicarpa”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 1085–1090, 2011.

LIMA, H. C. De et al. Indicadores de maturação para definição de ponto de colheita do maracujá selvagem (Passiflora tenuifila). In: XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura, Natal. **Anais...** Natal: Embrapa Cerrados, 2010. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/23428/1/Resumo-Expandido-CBF-tenuifila-27ag-versao-final.pdf>>.

LIMA, G. C. et al. Passiflora edulis peel intake improves insulin sensitivity, increasing incretins and hypothalamic satietogenic neuropeptide in rats on a high-fat diet. **Nutrition**, v. 32, p. 863–870, 2016.

LIN, L. Z. et al. UHPLC-PDA-ESI/HRMSnprofiling method to identify and quantify oligomeric proanthocyanidins in plant products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 9387–9400, 2014.

LONGHI-WAGNER, H. M. et al. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP:HUCITEC, 2001. v. 1

MARTUCCI, M. E. P. et al. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: Application in the genus Vernonia Schreb. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

MELETTI, L. M. M. et al. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agrônômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (Passiflora alata Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 275–278, 2003.

MILANEZ, J. T. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of buriti fruits, during the postharvest, harvested at different ripening stages. **Scientia Horticulturae**, v. 227, p. 10–21, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423817305265>>.

MOVAFEGH, A. et al. Preoperative oral *Passiflora Incarnata* Reduces Anxiety in Ambulatory Surgery Patients : A Double-blind, Placebo-Controlled Study. **Anesthesia & Analgesia**, v. 106, n. 6, p. 1728–1732, 2008.

NEGREIROS, J. R. da S. et al. Relação entre características físicas e o rendimento de polpa de maracujá-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 546–549, 2007.

NEGRI, G.; SANTI, D. de; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1024–1034, 2012.

NERI-NUMA, I. A. et al. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, v. 103, n. October 2017, p. 345–360, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.053>>.

OLIVEIRA, A. B. de et al. Effects of organic vs. conventional farming systems on quality and antioxidant metabolism of passion fruit during maturation. **Scientia Horticulturae**, v. 222, p. 84–89, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.021>>.

OLIVEIRA, G. A. de et al. Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. **Food Research International**, v. 60, p. 154–162, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.051>>.

ORNELAS-PAZ, J. D. J. et al. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. **Food Chemistry**, v. 138, p. 372–381, 2013.

PACKER, L.; RIMBACH, G.; VIRGILI, F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*pinus maritima*) bark, pycnogenol. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 5–6, p. 704–724, set. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584999000908>>.

PEREIRA, M. G. et al. Assessment of subcritical propane, ultrasound-assisted and Soxhlet extraction of oil from sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis) seeds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 338–348, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.021>>.

PERTUZATTI, P. B. et al. Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) grown under different cultivation systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 259–263, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.031>>.

PERTUZATTI, P. B. et al. Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) grown under different cultivation systems.

LWT - Food Science and Technology, v. 64, p. 259–263, 2015b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.031>>.

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{fl})) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3273–3279, 2003.

RAMAIYA, S. D. et al. Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 1198–1205, 2013.

ROCKENBACH, I. I. et al. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSⁿ and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 848–855, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.001>>.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Passion fruits. In: BENJAMIN CABALLERO (Ed.). **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2nd. ed. [s.l.] Academic Press, 2003. p. 4368–4373.

ROMERO-RODRIGUEZ, M. A. et al. Composition of babaco, feijoa, passionfruit and tamarillo produced in Galicia (North-west Spain). **Food Chemistry**, v. 49, p. 23–27, 1994.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996–1002, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>>.

SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1219–1232, 2012a.

SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. **Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus**. 2012b. 22 2012.

SANCHEZ, B. A. O. et al. Pasteurization of Passion Fruit *Passiflora Setacea* Pulp To Optimize Bioactive Compounds Retention. **Food Chemistry**, Journal Pre-proofs, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2020.100084>>.

SANTANA, F. C. de. **Avaliação dos compostos bioativos presentes na semente de *Passifloras* spp. e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015.

SANTIAGO-SILVA, P.; LABANCA, R. A.; GLORIA, M. B. A. Functional potential of tropical fruits with respect to free bioactive amines. **Food Research**

International, v. 44, p. 1264–1268, 2011.

SANTOS, M. B. Dos et al. Caracterização e qualidade de frutos de umbu-cajá (*Spondias tuberosa* X *S. mombin*) provenientes do Recôncavo Sul da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1089–1097, 2010.

SANTOS, E.; ANDRADE, R.; GOUVEIA, E. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. **Food Bioscience**, v. 20, p. 56–61, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2017.08.005>>.

SAWYER, G. M. et al. Suppression of CCL26 and CCL11 generation in human alveolar epithelial cells by apple extracts containing procyanidins. **Journal of Functional Foods**, v. 31, p. 141–151, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.036>>.

SCHIASSI, M. C. E. V. et al. Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v. 245, n. October 2017, p. 305–311, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.104>>.

SEPTEMBRE-MALATERRE, A. et al. Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Réunion French Island. **Food Chemistry**, v. 212, p. 225–233, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.147>>.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of Antioxidant Activity. **Journal of Functional Foods**, p. 1–25, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>>.

SHINOHARA, T. et al. Effect of accumulated minimum temperature on sugar and organic acid content in passion fruit. **Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences**, v. 19, n. 2, p. 1–7, 2013.

SILVEIRA, M. et al. **Caracterização de frutos de maracujazeiro silvestre (*Passiflora tenuifila*)**. October 2015.

SIMIRGIOTIS, M. J. et al. Antioxidant capacities and analysis of phenolic compounds in three endemic nolana species by HPLC-PDA-ESI-MS. **Molecules**, v. 20, p. 11490–11507, 2015.

SOUZA, N. B. M. de et al. Composição de frutos de maracujá-roxo, *Passiflora edulis* Sims *edulis*, ao longo da maturação. In: IX Simpósio Ibérico de Maturação e Pós Colheita, Lisboa. **Anais...** Lisboa: Actas Portuguesas de Horticultura nº 28, 2016.

SOUZA, M. A. S. **Caracterização química de tomate roxo e estudo da metabolização de flavonoides in vitro e in vivo**. 2017. Universidade de São Paulo, 2017.

SOZO, J. S. **PERFIS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTOS , SEMENTES E CALOS CULTIVADOS in vitro DE Passiflora setacea E Passiflora tenuifila (Passifloraceae)**. 2014. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de ciências Biológicas, 2014.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD – ESI-MS n and screening for their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 14–30, 2015.

SPINOSA, E. de A. **Avaliação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante de sopa formulada com maracujá alho (Passiflora tenuifila Killip)**. 2016. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal do Ceará, Centro de ciências agrárias, Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de alimentos, 2016.

SRISEADKA, T.; WONGPORNCHAI, S.; RAYANAKORN, M. Quantification of Flavonoids in Black Rice by Liquid Chromatography-Negative Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 11723–11732, 2012. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf303204s>>.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. - The Quantitative Analysis of Phenolic Constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 63–68, 1959. Disponível em: </10.1002/jsfa.2740100110>.

TEIXEIRA, L. D. L. et al. Identification of Ellagitannins and Flavonoids from *Eugenia brasiliensis* Lam. (Grumixama) by HPLC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 5417–5427, 2015.

VARGAS, A. J. et al. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, p. 112–119, 2007.

VASCO-CORREA, J.; ZAPATA ZAPATA, A. D. Enzymatic extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) at laboratory and bench scale. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 280–285, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.024>>.

VASCO, C. **Phenolic compounds in Ecuadorian fruits**. 2009. 2009.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, p. 816–823, 2008.

WANG, C. et al. Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of *Passiflora edulis* Sims and their antidepressant-like effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 3, p. 812–817, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.010>>.

WATSON, R. R. et al. Oral administration of the purple passion fruit peel extract reduces wheeze and cough and improves shortness of breath in adults with asthma. **Nutrition Research**, v. 28, n. 3, p. 166–171, 2008.

XUE, M. et al. Stability and degradation of caffeoylquinic acids under different storage conditions studied by high-performance liquid chromatography with photo diode array detection and high-performance liquid chromatography with electrospray ionization collision-induc. **Molecules**, v. 21, p. 1–13, 2016.

ZERAIK, M. L. et al. Maracujá : um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459–471, 2010.

ZHANG, L. et al. Procyanidin, a kind of biological flavonoid, induces protective anti-tumor immunity and protects mice from lethal B16F10 challenge. **International Immunopharmacology**, v. 47, p. 251–258, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2017.04.007>>.

Seção II

EFEITO DO CONSUMO DE *Passiflora tenuifila* Killip EM INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS E OBESOS E PERFIL DOS METABÓLITOS DE FENÓLICOS EXCRETADOS

1. INTRODUÇÃO

A *Passiflora tenuifila* Killip é uma espécie nativa de maracujá encontrada na mata atlântica e cerrado brasileiro (CERVI, 1997; BRAGA et al., 2005; BOTANICAL GARDEN OF RIO DE JANEIRO, 2019). A caracterização dos compostos bioativos realizada inicialmente indicou que o fruto possui flavonoides da classe flavona C-glicosilada e principalmente flavan-3-ol e seus polímeros também conhecidos como proantocianidinas (PAs), sendo esta última classe incomum nas demais espécies de maracujá (SAKALEM; NEGRÍ; TABACH, 2012; FARAG et al., 2016).

Dos flavonoides identificados na *P. tenuifila* Killip, é sabido que as flavonas C-glicosiladas apresentam efeito antioxidante, hipocolesterolêmico e capacidade de modular a microbiota intestinal (CAZARIN et al., 2015; WONG et al., 2017). Enquanto que, os flavan-3-ol tem reconhecido papel cardioprotetor (NUNES et al., 2016).

Os mecanismos de ação desses compostos fenólicos não estão totalmente estabelecidos, assim como o seu metabolismo em humanos. Recentes trabalhos indicam que a microbiota intestinal apresenta relevante papel no aumento da biodisponibilidade desses compostos (CARDONA et al., 2013; MUROTA; NAKAMURA; UEHARA, 2018).

O efeito da fibras da casca do maracujá (*Passiflora edulis* Sims) sobre o metabolismo lipídico e glicídico é reconhecido (MACAGNAN et al., 2015; MARQUES et al., 2016; GOSS et al., 2018) entretanto, poucos estudos abordam o potencial biológico do consumo integral do fruto de maracujá em modelos *in vivo*.

Sabe-se também que a microbiota intestinal pode ser alterada pela obesidade e/ou outras comorbidades, somado a isso, a obesidade leva a alterações morfofisiológicas no trato gastrointestinal que podem gerar alteração na absorção e metabolização de compostos bioativos (BLOUIN; WARREN, 1999a; MALLMANN, 2012).

Contudo, estudos que avaliam a absorção dos compostos fenólicos em seres humanos focam principalmente em indivíduos com peso adequado e pouco sabe-se a respeito da influência da obesidade sobre a biodisponibilidade desses compostos.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do consumo integral de um maracujá nativo brasileiro (*P. tenuifila* Killip) em indivíduos eutróficos e obesos além de comparar o perfil de excreção dos metabólitos oriundos dos compostos fenólicos na urina. Vale destacar que esse é o primeiro trabalho acerca do potencial biológico da *P. tenuifila* Killip em modelo experimental com humanos.

1.1. Obesidade e as alterações morfofuncionais que afetam a absorção

A obesidade é resultante do desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético que pode eventualmente gerar um excesso no armazenamento de energia na forma de gordura (LOIS; KUMAR, 2009). Esse acúmulo de energia ocorre por meio da hipertrofia e/ou hiperplasia dos adipócitos, a primeira, resultante de proliferação e subsequente diferenciação de pré-adipócitos, enquanto a segunda, pelo excessivo armazenamento de lipídios intracelular frequentemente visto no tecido adiposo (SIRIWARDHANA et al., 2013).

O Excesso de peso está associado a um conjunto de distúrbios aterogênicos que compõem a síndrome metabólica (SM) essa, por sua vez, é considerada uma condição progressiva para o desenvolvimento de comorbidades como a diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (LOIS; KUMAR, 2009; ARNOLD et al., 2016).

Além do baixo grau de inflamação, a obesidade leva a alterações morfofisiológicas que podem levar a alteração na absorção e metabolização de compostos bioativos. A literatura aponta diferenças nos parâmetros farmacocinéticos entre obesos e eutróficos como no volume de distribuição (Vd) e no clearance (CL) além de alterações no metabolismo de enzimas fase I e II (BLOUIN; WARREN, 1999b; MALLMANN, 2012). As alterações na composição corporal, do fluxo sanguíneo local e da concentração de proteínas plasmáticas são apontados como os responsáveis pelas alterações na farmacocinética desses indivíduos. Os obesos apresentam maior proporção de massa gorda se

comparado aos indivíduos saudáveis, com mesma idade, gênero e altura. Além disso, alteração na composição corporal também leva a alteração no fluxo sanguíneo, pois com aumento da massa adiposa, observa-se diminuição do fluxo (CHEYMOL, 2000).

Também pode ser observada alterações na permeabilidade intestinal, principalmente para moléculas com maior peso molecular que utilizam o transporte paracelular. O aumento da permeabilidade no intestino em obesos pode estar ligado à alteração na microbiota intestinal. A disbiose pode aumentar a produção de endotoxinas e causar prejuízo na modulação do sistema endocanabinóide intestinal que por sua vez modula a permeabilidade. Em ambos os casos, a concentração de lipopolissacarídeos (LPS) plasmático aumenta, o que reduz a expressão de proteínas responsáveis pelo funcionamento das *tight junctions* entre os enterócitos e, conseqüentemente, aumenta a permeabilidade paracelular (TEIXEIRA et al., 2012).

Foi observado que uma proteína de 47 KDa conhecida como zonulina, participa do controle da permeabilidade intestinal (FASANO et al., 2000; MORENO-NAVARRETE et al., 2012). A concentração plasmática de zonulina é considerada como um marcador importante da permeabilidade intestinal (FASANO et al., 2000; SAPONE et al., 2006).

Essa proteína interage com receptores específicos na membrana plasmática dos enterócitos, o EGFR (zonulin transactivates epidermal growth factor receptor) através do PAR-2. Quando ativada a via da zonulina por meio de cascata dependente de proteína quinase C- α , ocorre a fosforilação das proteínas alvos como a zonulina occludens-1 e a miosina 1C além da polimerização de actina G e F. Esse quadro leva a um rearranjo dos filamentos de actina e conseqüentemente afrouxamento das *tight junctions* (FASANO et al., 1995, 2000; WANG et al., 2000; FASANO, 2012).

Nesse contexto o aumento da concentração de zonulina plasmática está associado com o aumento da permeabilidade intestinal. Em um estudo que propôs correlacionar fatores de risco para síndrome metabólica e a permeabilidade intestinal, observou-se associação significativa e positiva entre os níveis de zonulina e IMC e marcadores bioquímicos como insulina em jejum e resistência à insulina (HOMA-IR), triglicerídeos e AST (KIM et al., 2018),

reforçando a ideia que a obesidade leva ao aumento da permeabilidade à macromoléculas.

1.2. Metabolismo de compostos fenólicos e influência da microbiota intestinal na biodisponibilidade

Em geral, o metabolismo dos compostos fenólicos segue uma via comum no trato gastrointestinal. A digestão de uma pequena porção dos fenólicos pode ter início na boca. Enzimas β -glucosidases presentes no epitélio oral e nos dutos salivares bem como a própria microbiota oral tem papel na clivagem de flavonoides glicosilados (MALLERY et al., 2011; HAN et al., 2019). Sob a condição ácida no estômago, os flavonoides podem ser hidrolisados quimicamente, liberando as agliconas que podem ser quebradas gerando aldeídos ou ácidos fenólicos (HE et al., 2009; HAN et al., 2019). Estudos reportam ainda que no estômago pode ocorrer a absorção (FANG, 2014; ATNIP et al., 2017; HAN et al., 2019).

O intestino é o segmento em que a maior parte dos compostos são absorvidos. As células epiteliais intestinais expressam múltiplos transportadores que facilitam o transporte do lúmen aos vasos sanguíneos (HAN et al., 2019). Transportadores de hexoses sódio-dependente (SGLT-1), transportadores de glicose/frutose (GLUT2 e GLUT5), os transportadores de cassete de ligação de ATP (MRPs, MDR1, P-gp e BCRP) além dos transportadores de monocarboxilatos estão associados ao transporte de flavonoides (TOMÁS-BARBERÁN; GIL-IZQUIERDO; MORENO, 2009; FANG et al., 2019; HAN et al., 2019).

Os compostos fenólicos podem ser absorvidos no intestino delgado dependendo da sua estrutura, ligação ou não com açúcares e de sua solubilidade (DONOVAN et al., 2006; TOMÁS-BARBERÁN; GIL-IZQUIERDO; MORENO, 2009). Estruturas mais simples como os ácidos hidroxicinâmicos, quando estão em sua forma livre, são absorvidos no intestino delgado através de transportadores de ácidos monocarboxílicos, porém quando esterificados, há prejuízo na absorção sendo metabolizado principalmente pela microbiota intestinal. Os flavonoides em sua forma livre (agliconas) podem ser absorvidos por difusão passiva (Figura 1) (DONOVAN et al., 2006).

Porém grande parte dos flavonoides da dieta estão ligados à açúcares. Nesse caso, devem ser hidrolisados antes que ocorra sua absorção. Existem fortes evidências científicas que indicam a deglicosilação como uma etapa crucial na absorção dos flavonoides glicosilados (NÉMETH et al., 2003; SUZUKI; HARA, 2011; DUEÑAS et al., 2013; XIAO et al., 2016).

A clivagem com a subsequente liberação da aglicona pode ser resultado de β -glucosidases endógenas presentes no intestino delgado. A lactase-florizina hidrolase (LFH) está presente nas células epiteliais da borda em escova do intestino delgado e apresenta ampla especificidade para flavonoides β -glicosilados. Em outra via, os flavonoides-O- β -glicosilados são transportados para o interior dos enterócitos onde são clivados através de β -glucosidases citossólica (BGC) (DONOVAN et al., 2006; DEL RIO et al., 2013).

A contribuição de cada via para a absorção de flavonoides é relativa e pode depender da posição, quantidade e ou tipo de açúcares ligados. Por exemplo, a quercetina-3-glicosídeo não é clivada pelas β -glucosidases citossólica assim como moléculas maiores, como a quercetina-3,4-O-diglucosídeo que interagem mal com o transportador de açúcar. A quercetina-4-glicosídeo, por outro lado, é substrato para ambas as vias enquanto a rutina (quercetina 3-rutinosídeo) não é clivada pelas β -glucosidases precisando ser metabolizada pela microbiota intestinal (GEE et al., 2000; DAY et al., 2003; DONOVAN et al., 2006; JAGANATH et al., 2006; PORTO et al., 2014). Por fim, há grande variação na ação de β -glucosidases entre os indivíduos, o que pode gerar maior ou menor eficiência na absorção dos compostos fenólicos (NÉMETH et al., 2003).

Figura 1- Mecanismo proposto de absorção e metabolismo de flavonoides no intestino delgado.

FONTE: Próprio autor, utilizando banco de ilustrações Smart Servier Medical Art

LEGENDA – Flav: Flavonóides; **Flav-glic:** Flavonoides-glucosilados; **Gluc:** glucuronidado; **Met:** metilado; **Sult:** sulfatado; **LFH:** lactase-florizina hidrolase; **BGC:** β-glucosidases citossólicas; **SGLT1:** sodium-glucose transport proteins-1; **GLUT1/5:** glucose transporter-1/-5; **UGT:** uridine-5'-diphosphate glucuronosyl transferase; **SULT:** sulfotransferase; **COMT:** catechol-O-methyltransferase.

Ainda no citosol dos enterócitos as agliconas passam por metabolismo de fase II, onde esses compostos são sulfatados, glucuronidados e/ou metilados por meio da ação das sulfotransferases (SULTs), uridina-5'-difosfato glucuronosiltransferases (UGT) e catecol-O-metiltransferases (COMTs). Em seguida pode haver um efluxo desses compostos novamente para a o lúmen intestinal através dos mesmos sistemas de transportadores supracitados ou os metabólitos são transportados pela veia mesentérica até o fígado onde estão sujeitos à nova metabolização de fase II (DONOVAN et al., 2006; TOMÁS-BARBERÁN; GIL-IZQUIERDO; MORENO, 2009; DEL RIO et al., 2013).

Existe crescente percepção que os metabólitos nos hepatócitos podem ser re-glucuronidados em uma diferente posição ou sulfatados (DONOVAN et al., 2006). Como resultado os metabólitos, então, podem entrar na corrente sanguínea e serem distribuídos aos tecidos.

Os metabólitos de compostos fenólicos são tratados no organismos como xenobióticos, desta forma, não podem ser acumulados nos tecidos e em vez disso, são rapidamente removidos através da filtração renal ou excreção na bile (DONOVAN et al., 2006; CROZIER; DEL RIO; CLIFFORD, 2010a; DEL RIO et al., 2013).

Quando secretados na bile, os metabólitos sofrem a recirculação entero-hepática. Eles são secretados no duodeno onde estão sujeitos ao metabolismo da microbiota intestinal, podendo ser reabsorvidos pelas células intestinais principalmente do intestino grosso (SUZUKI; HARA, 2011). Este processo permite um longo contato dos polifenóis e seus metabólitos aos seus sítios de ação (TOMÁS-BARBERÁN; GIL-IZQUIERDO; MORENO, 2009).

O maior percentual dos flavonoides ingeridos na dieta atinge o intestino grosso, visto que a taxa de absorção desses compostos no intestino delgado é geralmente baixa. A quercetina é um dos compostos mais utilizados para avaliar o metabolismo dos flavonoides. Em um estudo onde foram administrados quercetina por via oral (10 mg/kg de peso) em ratos, observaram que aproximadamente 93% do composto ingerido alcançava o intestino grosso (CHEN et al., 2005). Nesse local, os compostos fenólicos ficam disponíveis à metabolização pela microbiota intestinal a qual possui elevados níveis de β -glucosidases e β -glucuronidases (SUZUKI; HARA, 2011).

Como anteriormente apontado, as espécies de maracujá apresentam majoritariamente flavonas do tipo C-glicosiladas (XIAO et al., 2016), as quais não são substratos para as glucosidades da borda em escova (LPH) e citossólicas (BGC), outra exceção é o metabolismo de flavan-3-ol e seus polímeros também conhecidos por proantocianidinas (PAs). Para essas duas classes será dado maior destaque a seguir.

1.3. Metabolismo das Flavonas-C-glicosiladas

A maioria dos flavonoides presentes nos alimentos existe principalmente como O-glicosídeos ainda assim, flavonoides-C-glicosilados representa um grupo de compostos disseminados em uma variedade de plantas. A quebra da ligação C-glicosídica é muito difícil por métodos químicos e enzimáticos, no entanto, é apontado na literatura que as bactérias intestinais podem clivar essa ligação (XIAO et al., 2016).

Diante disso, flavonas-C-glicosiladas como orientina, homoorientina, vitexina, isovitexina, comum nas espécies de passifloras, são pouco absorvidas no trato gastrointestinal. Essas flavonas são deglicosiladas e suas agliconas são degradadas a metabólitos menores, podendo então serem absorvidos (XIAO et al., 2016).

Em um trabalho onde avaliaram o metabolismo de flavonas-C-glicosiladas oriundas de folhas de bambu, foi administrado extrato contendo quatro flavonas-C-glicosiladas (1g/kg de peso) a ratos, via gavagem. Não foram detectados os compostos precursores na urina e plasma, muito embora, metabólitos oriundos do metabolismo da microbiota como floroglucinol, ácido hidrocafeico e clorético foram encontrados no trato gastrointestinal e nas fezes, indicando que a metabolização desses compostos pela microbiota pode ser resumida em deglicosilação e abertura do anel heterocíclico C (Figura 2) (ZHANG et al., 2007).

Figura 2 - Via proposta do metabolismo de homorientina.

Fonte: Adaptado de Zhang et al., 2007.

Alguns flavonoides-C-glicosilados sugerem que a deglicosilação parece não ser um pré-requisito para a absorção. A aspalatina e a notofagina, dihidrochalconas C-glicosiladas, foram encontradas em sua forma metilada e glucuronidada na urina e plasma de voluntários que consumiram chás com elevadas concentrações desses compostos (STALMACH et al., 2009).

Diferente do que ocorre com grande parte das flavonas com apenas uma C-glicosilação, as flavonas C-multiglicosiladas podem ser absorvidas sem metabolização no intestino, no entanto estão susceptíveis à circulação entero-hepática (XIAO et al., 2016). Em um estudo comparativo entre a absorção da apigenina-8-C-glucosídeo-2-O-xilosídeo e sua aglicona (apigenina), verificou no sangue portal a apigenina e a sua forma glucuronidada, enquanto a apigenina-di-glucosídeo foi encontrada sem alteração de fase II. Ao analisar a bile foi possível confirmar que a apigenina di-glucosídeo chegou ao fígado inalterada, mas retornou ao intestino através da circulação entero-hepática para reabsorção no íleo (ANGELINO et al., 2013).

Além de quantidade de açúcares ligados, observa-se que a posição de ligação também influencia. Uma cultura de *Eubacterium cellulosolvens*, encontrada no intestino humano, foi incubada com flavonas-6-C-glicosiladas (luteolina e apigenina-6-C-glucosídeo) e flavonas-8-C-glicosiladas (luteolina e apigenina-8-C-glucosídeo). Somente as flavonas-6-C-glucosídeo foram convertidas às suas agliconas, indicando que a posição de ligação C6,

caracterizada por dois grupos hidroxila próximos, parece ser essencial para deglicosilação, ao menos para algumas espécies de bactérias (BRAUNE; BLAUT, 2012).

1.4. Metabolismo de Flavan-3-ol e das proantocianidinas

Proantocianidinas (PAs), também conhecidas como taninos condensados, são oligômeros ou polímeros de flavan-3-ol ligados através de ligações interflavanas. As PAs do tipo-B estão ligadas pelos carbonos C4→C8 ou C4→C6, enquanto as do tipo-A contém uma ligação éter adicional entre C2→O-C7 ou C2→O-C5 (Figura 3). O tamanho molecular das PAs é conhecido como grau de polimerização (DP) sendo chamados de monômeros (DP1), dímeros (DP2), trímeros (DP3) e tetrâmeros (DP4). São considerados oligômeros, PAs com DP entre 2 e 4 e oligômeros com DP >4. A estrutura de uma PAs é composta por uma unidade terminal e todas as unidades acima são conhecidas como unidades de extensão. Para fins de nomenclatura, PAs compostas exclusivamente por +(-) catequina e +(-) epicatequina são chamadas de procianidinas. Quando há afzelequina e galocatequina são conhecidas como propelargonidinas e prodelfinidinas, respectivamente (OU; GU, 2014; PRASAIN; BARNES, 2014).

As PAs devem estar livres da matriz celular e solubilizada em fase aquosa para ser bioacessíveis. Ainda não está claro a influência da digestão gástrica sobre as PAs. Alguns autores afirmam que as PAs são decompostas sob pH ácido do estômago (PRASAIN; BARNES, 2014), porém, ao menos para os oligômeros (DP 2-4) estudos apontam estabilidade.

O primeiro trabalho que avaliou a absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) utilizando PA do tipo-B marcada com Carbono 14 administraram por via oral duas concentrações, 21 e 10,5 mg/kg de peso em ratos Wistar. Foram detectados metabólitos no plasma após 30 minutos do consumo, sugerindo que o dímero foi absorvido no estômago ou no intestino delgado, provavelmente na sua forma intacta (STOUPPI et al., 2010a).

Figura 3 - Estrutura dos principais flavan-3-ol, dímeros e trímero de PAs.

Fonte: Adaptado de Ou & Gu (2014).

Outros estudos *in vitro* e *in vivo* corroboram com o fato que oligômeros com DP <5 podem ser absorvidos. Dímeros, trímeros e tetrâmeros de PAs do tipo-A foram transportados através de camada de células Caco-2, contudo, em pequenas taxas, entre 0,6; 0,4 e 0,2%, respectivamente (OU et al., 2012). Também foi detectado PA do tipo-B no plasma humano após 30 minutos de consumo de 0,37g de cacau/kg de peso. A concentração alcançou seu valor máximo 120 minutos após ingestão, diminuindo até o nível basal após 6 horas do consumo (HOLT et al., 2002).

Independente da absorção ou não no trato gastrointestinal, é bem aceito que a maior parte das PAs atingem o intestino grosso onde são metabolizados e degradados aos seus respectivos monômeros, ou ácidos fenólicos através da ação da microbiota (OU; GU, 2014).

Diferente dos polímeros, os monômeros de flavan-3-ol apresentam elevada absorção na porção alta do trato gastrointestinal. Um trabalho recente onde oito homens ingeriram 207 μ mol de (-)-epicatequina marcada, detectaram 12 metabólitos entre epicatequina sulfatada, glucuronidada e/ou metilada no plasma alcançando pico de concentração máximo após 60 minutos. A epicatequina-3-glucoronideo representou 30% dos metabólitos absorvidos seguida por 3-metil-epicatequina-7-sulfato (20%) e epicatequina-3-sulfato (15%). Esse grupo de metabólitos direto da epicatequina foram excretados ao longo das primeiras 24 horas na urina, correspondendo a aproximadamente 20% (40,6 μ mol) de toda a epicatequina ingerida (OTTAVIANI et al., 2016).

Os monômeros ao alcançar o colón também podem ser metabolizados pelas bactérias intestinais. Os principais produtos, assim como para as PAs são metabólitos resultantes da fissão do anel no carbono 5 (RFA-C5) como as 5-4-hidroxifenil- γ -valerolactonas e ácidos- γ -hidroxivaléricos. Estes podem ser encontrados no plasma nas suas formas glucuronidadas, sulfatadas e/ou metiladas (OTTAVIANI et al., 2016; BORGES et al., 2018).

Devido ao maior tempo necessário para ação da microbiota, os metabólitos RFA-C5 levam maior tempo para alcançar a concentração máxima no plasma (T_{max}), aproximadamente 6 horas, seis vezes mais que os metabólitos de epicatequina de fase II. Eles também encontram-se maior tempo circulando. Enquanto metabólitos da epicatequina de fase II não foram encontrados após 24

horas da ingestão, os RFA-5C foram detectados na urina entre 0 e 48 horas após o consumo (OTTAVIANI et al., 2016).

Outro grupo de metabólitos oriundo da ação da microbiota são os derivados fissão do anel da cadeia lateral do carbono 3 e 1 (RFL-C3/1), são encontrados principalmente na forma ácido 3-(3'-hidroxifenil) hidracrílico e os derivados de ácidos benzóicos, ácido hipúrico e ácido 3'-hidroxihipúrico. Esse grupo são detectados na urina entre 0 e 48 horas após o consumo, com maiores concentrações entre as 12 e 48 horas, compreendendo 28% (57,7 μ mol) de toda a epicatequina marcada ingerida (OTTAVIANI et al., 2016).

1.5. A ação da microbiota sobre o metabolismo de compostos fenólicos

Como apontado anteriormente a microbiota intestinal é fundamental para a metabolização de várias classes de polifenóis, principalmente de flavonas C-glicosiladas e PAs. Estima-se que apenas entre 5 a 10% dos polifenóis são absorvidos diretamente no intestino delgado (CARDONA et al., 2013; MUROTA; NAKAMURA; UEHARA, 2018).

Chega no cólon flavonoides glicosilados não metabolizados bem como metabólitos conjugados que voltaram ao lúmen intestinal a partir do efluxo que ocorre nos enterócitos ou eliminados com a bile, esses compostos são então metabolizados pela microbiota resultando na liberação da aglicona ou são severamente metabolizados levando a produção de ácidos aromáticos ou, no caso dos metabólitos oriundo da recirculação entero-hepática, podem ser desconjugados e regenerados antes de serem reabsorvidos (CARDONA et al., 2013; MARÍN et al., 2015).

A microbiota contém vários tipos de enzimas capazes de modificar compostos encontrados nos alimentos. Além das hidrolases como glicosidases, glucuronidases, sulfatases, amidases e esterases, enzimas da microbiota intestinal podem catalisar vários tipos de reações incluindo oxidação, redução, descarboxilação, desmetilação, isomerização e clivagem do anel C (CAO et al., 2015; MUROTA; NAKAMURA; UEHARA, 2018). Por exemplo, os ácidos hidroxicinâmicos são comumente encontrados esterificado à açúcares, ácidos orgânicos e lipídios, não existem esterases endógenas capazes de quebrar essa

ligação. Dessa forma, o principal sítio de metabolização é a microbiota intestinal (MARÍN et al., 2015).

Clostridium e *Eubacterium* são os principais gêneros envolvidos no metabolismo de fenólicos. Algumas bactérias desses gêneros estão envolvidas com a quebra do anel C. No caso específico das flavonas C-glicosiladas, uma vez hidrolisadas, espécies como *Clostridium orbicindens* e *Enterococcus avium* quebram o anel C gerando floretina, derivados dos ácidos di-hidroxifenil-propionico, hidroxifenil-propionico e hidroxicinâmico, que são absorvido e depois excretado pela urina (MARÍN et al., 2015).

Alguns membros das famílias *Lachnospiraceae*, *Streptococcaceae* e *Enterococcaceae* apresentam enzimas capazes de quebrar ligações C-glicosídicas (Tabela 1). Um exemplo é a *Dorea longicatena*, pertencente à família *Lachnospiraceae*, destaca-se por ser uma das espécies dominantes da microbiota intestinal. Enquanto a *Eubacterium cellulosolvens* apresenta um sistema enzimático capaz de deglicosilar flavonas e isoflavonas tanto C- como O-glicosiladas (BRAUNE; BLAUT, 2016).

Reações de desmetilação em flavonas foram catabolizadas por enzimas presentes nas espécies *Eubacterium ramulus* e *Clostridium butyricum* e outras espécies do gênero *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* e *Blautia* possuem atividade O- β -glucosidase (BRAUNE; BLAUT, 2016).

Assim como demonstrado aqui para as flavonas C-glicosiladas, a microbiota é extremamente importante para o metabolismo de PAs. Estima-se que aproximadamente 50 à 80% das PAs ingeridas são degradadas pelas bactérias gastrointestinais (GU et al., 2007). Além disso, os principais biomarcadores para o consumo de flavan-3-ol e seus polímeros são os compostos 5-(hidroxifenil)- γ -valerolactona e ácido hidroxifenilvalérico sulfato, ambos derivados da ação bacteriana (BORGES et al., 2018).

O metabolismo microbiano atua catalisando reações de clivagem do anel-C e/ou oxidação do anel A das unidades de PAs. Observa-se também que as bactérias intestinais podem quebrar as ligações interflavanas convertendo por exemplo PA-tipo B2 em duas (-)- epicatequina. Entretanto essa rota é lenta e acontece com somente 10% do total ingerido. Os principais metabólitos a partir da metabolização da microbiota são os derivados da fissão do anel no carbono 5 (RFA-C5) como as 5-4-hidroxifenil- γ -valerolactonas e ácidos- γ -hidroxivaléricos

e também compostos fenólicos com baixo peso molecular como ácidos benzóicos, hipúrico e hidroxihipúrico (OU; GU, 2014).

A ação da microbiota sobre os monômeros de flavan-3-ol parece ser similar. (-)- epicatequina e PAs tipo B2 foram incubadas com a microbiota fecal humana durante 48 horas. Foram detectados cinco metabólitos comuns aos dois compostos: 1-(hidroxifenil)-3-(2',4',6'-tri-hidroxifenil) propan-2-ol; 5-(3',4'-di-hidroxifenil)- γ -valerolactona e três ácidos fenilvalérico (STOUPPI et al., 2010b).

Espécies do gênero *Corobacteriaceae* foram identificadas como catalizadoras de reação de clivagem do anel C e até de degradação produzindo γ -valerolactona e ácidos valéricos. A espécie *Lactobacillus plantarum* são capazes de quebrar ligações ester, reação importante para a metabolização dos ésteres de flavan-3-ol como a epicatequina-galato e a epigalocatequina (MARÍN et al., 2015; BRAUNE; BLAUT, 2016).

Além de aumentar a bioavaliabilidade dos compostos fenólicos, a microbiota pode contribuir com o aumento do efeito antioxidante. O metabólito 3,4-dihidroxifenil- γ -valerolactona, resultado direto da ação da microbiota intestinal, apresentou maior capacidade antioxidante que o seu composto precursor a epicatequina em métodos que avaliam a capacidade de estabilizar radicais e quelante dos metais (GRIMM; SCHÄFER; HÖGGER, 2004). Por fim muitos efeitos biológicos atribuídos aos compostos precursores são, na verdade, responsabilidade dos seus metabólitos. Redução de citocinas inflamatórias, inibição da proliferação celular e diminuição de pressão sanguínea são alguns dos efeitos já atribuídos aos fenil- γ -valerolactona (MENA et al., 2019).

Tabela 1 - Bactérias intestinais envolvidas no metabolismo de flavonas e flavan-3-ol.

Filo	Família	Espécie	Composto/Classe Flavonoide	Reação de conversão	OBS.:
Actinobacteria	Bifidobacteriaceae	<i>B. bifidum</i>	Flavonas	O-Deglicosilação	
		<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Flavonas	O-Deglicosilação	Possui atividade β -glusidase
		<i>Bifidobacterium infantis</i>	Flavan-3-ols	Clivagem produtos	Após a abertura do anel C gerar ácido 3,4 dihidroxifenil valérico, fenilpropionicos e hidroxi-benzoicos
	Coriobacteriaceae	<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	Flavan-3-ols	Dehidroxilação e clivagem produtos	Dehidroxilação de do anel C e B
		<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	Flavan-3-ols	Clivagem	Quebra do anel C
		<i>Asaccharobacter celatus</i>	Flavan-3-ols	Dehidroxilação e clivagem	Quebra do anel C
		<i>Eggerthella (Eubacterium) sp.</i>	Flavan-3-ols	Dehidroxilação e clivagem produtos	Quebra do anel C
		<i>Eggerthella (Eubacterium) sp.</i>	Flavan-3-ols	Clivagem	Quebra do anel C
		<i>Eggerthella lenta</i>	Flavan-3-ols	Dehidroxilação e clivagem produtos	Dehidroxilação de do anel C e B
		<i>Eggerthella lenta</i>	Flavan-3-ols	Clivagem	Quebra do anel C

Filo	Família	Espécie	Composto/Classe Flavonoide	Reação de conversão	OBS.:
		<i>Slackia equolifaciens</i>	Flavan-3-ols	Clivagem	Quebra do anel C
		<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>	Flavan-3-ols	Clivagem	Quebra do anel C
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides uniformis</i>	Flavonas	O-Deglicosilação	Possui atividade β -glusidase
	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Parabacteroides distasonis</i>	Flavonas	O-Deglicosilação	Possui atividade β -glusidase
	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	Flavonas	Demetilação	
		<i>Clostridium coccoides</i>	Flavan-3-ols	Clivagem produtos	
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcaceae</i>	-	Flavonas C-glicosiladas	C-Deglicosilação	
		<i>Enterococcus faecalis</i>	Flavonas	O-Deglicosilação	
	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium limosum</i>	Isoflavones	O-Deglicosilação O-demetilação	
	<i>Lachnospiraceae</i>	-	Flavonas C-glicosiladas	C-Deglicosilação	
		<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	Phorogucinol	Degradação → AGCC	
		<i>Blautia sp.</i>	Flavonas	O-Deglicosilação	

Filo	Família	Espécie	Composto/Classe Flavonoide	Reação de conversão	OBS.:
Firmicutes	Lachnospiraceae	<i>Dorea longicatena</i>	Flavonas C-glicosiladas	C-Deglicosilação	
		<i>Eubacterium ramulus</i>	Flavonas	Demetilação	
		<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	Flavonas C-glicosiladas	C-Deglicosilação	
	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus casei</i>	Flavonas	O-Deglicosilação	
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	Flavan-3-ols	Clivagem	
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	Flavan-3-ols	Hidrólise	
	Ruminococcaceae	<i>Flavonifractor plautii</i>	Phorogucinol	Degradação → AGCC	
		<i>Flavonifractor plautii</i>	Flavonas	Degradação → AGCC	
		<i>Flavonifractor plautii</i>	Flavan-3-ols	Quebra do anel C	
	Streptococcaceae	-	Flavonas C-glicosiladas	C-Deglicosilação	
		<i>Lactococcus lactis</i>	Flavonas	O-Deglicosilação	
Proteobactéria	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cloacae</i>	Flavonas	O-Deglicosilação	

Fonte: Braune; Blaut, 2016; Takagaki; Nanjo, 2016; Marín et al., 2015.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material

Foi utilizado o fruto da espécie *P. tenuifila* Killip, produzido no campo experimental da EMBRAPA-Cerrados (15° 36'13.02"S, 47° 43'17.34 O, Distrito Federal, Brasil) disponibilizado pela Dra. Ana Maria Costa, pesquisadora da EMBRAPA-Cerrados e membro da rede Passitec. Para a obtenção da farinha de maracujá (FM), um lote com aproximadamente 80kg de frutos congelados foram higienizados, liofilizados e triturados pela empresa Sublimar produtos liofilizados LTDA – ME (Tatuí/SP) seguindo o preconizado pelas boas práticas de fabricação e Procedimento operacional padronizado (Anexo 1).

Após a FM ser homogeneizada, foram preparados os sachês contendo a porção diária de consumo de FM (5g).

2.2. População de estudo

Foram recrutados indivíduos de ambos os gêneros, entre 18 e 59 anos de idade apresentado, de acordo com o índice de massa corpórea (IMC), eutrofia (peso adequado) ou obesidade. Para classificação do IMC utilizou-se os pontos de corte estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995), onde, indivíduos eutróficos apresentam IMC entre 18,5-24,9 Kg/m², obesos grau I, 30,0-34,9 Kg/m²; obeso grau II, 35,0-39,9 Kg/m² e obeso grau III, >40,0 Kg/m².

Adotou-se os seguintes critérios de inclusão: (a) não apresentar nenhum histórico de disfunção cardiovascular, gastrointestinal, hepático ou renal; (b) não ser alcoólatra; (c) não ser diabético; (d) não apresentar qualquer tipo de infecção; (e) não estar fazendo uso de suplementos vitamínicos, minerais, antibióticos, anti-ácidos ou medicamentos para diarreia ou constipação; (f) gostar de maracujá (g) as mulheres voluntárias não podem estar em período de gravidez, amamentação ou relatar terapia hormonal para menopausa.

Os voluntários foram recrutados no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (São Paulo/SP) entre fevereiro a junho de 2018. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências

farmacêuticas-USP (CAAE: 57619616.4c.0000.0067) (Anexo IV). Os participantes foram informados sobre os riscos e objetivos da pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos.

2.3. Delineamento experimental

O estudo foi realizado em parceria com o Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Os voluntários ingeriram diariamente durante 30 dias uma quantidade de FM equivalente à três frutos de *P. tenuifolia* Killip (Figura 4) que foram previamente fornecidos em embalagens individuais. Mesmo o fruto estando liofilizado, foi pedido que os voluntários mantivessem a amostra no freezer, para evitar qualquer desenvolvimento microbiano. Foi recomendado que a amostra fosse ingerida preferencialmente após o jantar. Os voluntários apresentaram-se no Ambulatório de Nutrição Clínica do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia após um jejum de 10h nos dias: 0 (basal), 15° e 30° de consumo do maracujá. Três dias anteriores à coleta de amostra (dia 0, 15 e 30), os indivíduos restringiram sua dieta evitando frutas cítricas (maracujá, laranja, tangerina e limão) e seus derivados, além de chá verde e preto, suco de uva ou uva e café (período de *washout*). No dia anterior a cada coleta, os voluntários receberam uma refeição padrão para ser consumida na noite como o jantar contendo: 150g de arroz branco, 150g de frango em cubos e 100g de vagem cozida (456 kcal, 53g de proteína, 46g de carboidrato e 7g de lipídios).

Nos encontros (dia 0, 15 e 30), após um jejum de 10h, os indivíduos, trouxeram a primeira urina da manhã armazenadas em frasco coletor, sob refrigeração, conforme orientação. Além disso, foram avaliados os parâmetros antropométricos: peso, altura, circunferência da cintura e composição corporal, esta última realizada nos dias 0 e 30 de consumo do maracujá.

Amostras de sangue foram coletas para exames bioquímicos (hemograma completo, colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, glicemia de jejum, insulina de jejum, ALT e AST) em tubo contendo EDTA (16 mL), fluoreto (2 mL) e sem anticoagulante (4 mL).

Nos mesmos dias, os voluntários também trouxeram uma amostra de fezes coletadas, no máximo, no dia anterior aos dias agendados. Previamente

os voluntários foram orientados quanto ao modo de coleta e a forma de armazenamento das amostras (armazenadas sob refrigeração até a entrega). Quando entregue, as amostras foram imediatamente fracionadas utilizando material estéril e estocadas à -80°C

O sangue foi centrifugado a 2.500 rpm/15 min/20°C para separação do plasma. Alíquotas de urina, plasma e fezes foram mantidas a -80 °C até sua análise.

Figura 4- Desenho experimental do estudo com destaque para os dias da coleta (dia 0, 15 e 30).

2.4. Parâmetros antropométricos

Foi realizada avaliação antropométrica dos voluntários nos dias 0 (basal), 15 e 30 de consumo do maracujá. Foi aferido o peso e altura utilizando balança digital com estadiômetro acoplado (max.: 200kg, precisão: 100g). Para avaliar a circunferência da cintura (CC) foi utilizada fita métrica inelástica, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca.

Para o cálculo do IMC foi adotado a equação: peso (Kg)/ Altura (m)² com pontos de corte estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995): eutrófico (18,5-24,9 Kg/m²), obesidade grau I

(30,0-34,9 Kg/m²), obesidade grau II (35,0-39,9 Kg/m²) e obesidade grau III (>40,0 Kg/m²).

A avaliação da composição corporal nos dias 0 (basal) e 30 foi realizada utilizando aparelho de bioimpedância tetrapolar (BIA 450 bioimpedance analyzer, Biodynamics Corporation, Washington, EUA). O teste foi realizado com os indivíduos em jejum e sempre no início do dia. Foram registrados os valores de Reatância (OHMS), Resistência (OHMS), % de gordura corporal, de massa magra e água além da estimativa da taxa metabólica basal –TMB (Kcal).

2.5. Análise do consumo alimentar

Ao longo do experimento, os indivíduos registraram o consumo alimentar habitual em dois momentos. O primeiro, representando o período anterior à intervenção (0d – basal) e o segundo, indicando a ingestão ao longo dos 30 dias de consumo do maracujá. Inicialmente o voluntário foi orientado quanto ao preenchimento do registro alimentar, enfatizando que o registro do tamanho da porção e o tipo de preparação eram necessários. Ao entregar o recordatório, este era avaliado por um nutricionista, integrante da pesquisa.

A avaliação do consumo alimentar foi realizada utilizando o software para cálculo de planos dietéticos Avanutri 4.0 (Avanutri Equipamentos de Avaliação Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) sendo avaliados o consumo de Carboidrato (g/dia), Proteína (g/dia), Lipídios (g/dia), Fibra (g/dia) e valor energético total – VET (Kcal). Por fim, verificou-se a contribuição dos macronutrientes no VET com os dados sendo expressos em percentual.

2.6. Parâmetros bioquímicos

A dosagem de glicemia de jejum foi realizada utilizando o método colorimétrico – QS (química seca) em amostra de plasma. Para o perfil lipídico, amostras de soro foram analisadas pelo método colorimétrico para o colesterol total e colorimétrico-QS para HDL-colesterol e triglicérides. O LDL-colesterol foi determinado pela equação de Friedwald. Os resultados foram expressos em mg/dL Essas análises foram realizadas pelo Centro Estadual de Análises Clínicas (CEAC), laboratório responsável pela análise de amostras do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

A dosagem de insulina foi realizada pela Divisão de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP. Foi utilizada a técnica de eletroquimioluminescência (ECLIA) em equipamento automatizado Cobas e 601 (Roche). O resultado foi expresso em $\mu\text{U/mL}$. O índice Homa-IR foi calculado a partir dos valores de glicemia e insulina de jejum, segundo a fórmula: $\text{insulina basal} \times \text{glicemia basal (mmol)} / 22,5$, sendo o resultado expresso em pontos percentuais (MATTHEWS et al., 1985).

2.7. Quantificação de marcadores do estresse oxidativo

2.7.1. Determinação de 8-isoprostano

Foi utilizado kit comercial de imunoensaio enzimático competitivo 8-isoprostane ELISA kit (Ref.: 516351, Cayman Chemical, Michigan, USA) para quantificação nas amostras de plasma coletadas no dia 0 e 30 do experimento. O preparo da amostra e a análise foram realizados conforme descrito no manual pelo fabricante, com os resultados expressos em ng/ml de plasma.

2.7.2. Determinação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG)

Foi quantificado 8-OHdG em amostras de urina coletadas no dia 0 e 30 do experimento. Utilizou-se o kit comercial de imunoensaio enzimático competitivo Highly Sensitive 8-OHdG Check ELISA (Jaica, Shizuoka, Japan). O preparo da amostra e a análise foram realizados conforme descrito no manual pelo fabricante. Os resultados foram expressos como ng/mg de creatinina.

2.7.3. Dosagem de zonulina plasmática

Para quantificar o marcador de permeabilidade intestinal, foi utilizado o Kit comercial de imunoensaio enzimático competitivo IDK Zonulin ELISA (Ref.: K 5601, Immundiagnostik AG, Benheim, Alemanha). O preparo da amostra e a análise foram realizados conforme descrito no manual pelo fabricante. Os resultados foram expressos como ng/ml de plasma.

2.7.4. Análise dos metabólitos de flavonoides excretado na urina através de UPLC-ESI-QTOF

2.7.4.1. Preparação das amostras de urina

As amostras de urina foram centrifugadas à 14.000 g, por 15 min à 4 °C, em seguida foram filtradas utilizando filtro PTFE de 0,22µm e diluídas cinco vezes utilizando água para LC-MS (Chromasolv, Ref.: 39253-1L-R, Fluka Analytical).

2.7.4.2. Análise das amostras no HPLC-ESI-QTOF

As amostras foram analisadas utilizando HPLC 1290 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) acoplado a iFunnel Q-TOF LC/MS 6550, (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) usando uma interface de eletropulverização com a tecnologia Jet Stream. A eluição do analito foi realizada em uma coluna Poroshell 120 C18; 2,7µm, 100x3,0 mm (Agilent, Califórnia, EUA) em fluxo de 0,4 ml/min e temperatura controlada de 30 °C. A fase móvel consistiu de: A – Água/ácido fórmico (99,9:0,1; v/v) e B – Acetonitrila/ácido fórmico (99,9:0,1; v/v), com tempo de corrida de 28 min seguindo o gradiente: 0 min (5% de fase B); 3 min (15%); 11 min (30%); 15 min (50%); 21 min (90%) 22 min (90%); 23 min (5%) e 28 min (5%).

Foi elaborada uma lista com os possíveis produtos da biotransformação para triagem dos metabólitos excretados de flavona C-glicosiladas, flavan-3-ol e proantocianidinas. A triagem foi realizada adotando a massa exata do composto investigado com pequena margem de variação (0,01 m/z). A identificação foi baseada em massa precisa e o padrão isotópico do composto. Os resultados foram expressos em área sob a curva, normalizados com o valor de creatinina urinária.

2.8. Análise estatística

Para teste de diferença entre as médias dos grupos foi utilizado o teste-*t* de Student (para dados paramétricos) e Mann-Whitney para os dados não

paramétricos realizados no software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Califórnia, EUA).

Para verificar diferenças entre os grupos (eutróficos e obesos) e o efeito do consumo do maracujá no perfil antropométrico e bioquímico foi utilizado o software SPSS, v. 22,0 (SPSS Inc., Illinois, EUA) realizando o método generalized estimating equation (GEE) que analisa o melhor tipo de distribuição que descreve a relação entre variável e resposta. Quando necessário foi utilizado o *post-hoc* Teste de Múltiplas comparações Sidak.

Análise componentes principais (PCA) foi utilizada para visualizar relações entre os indivíduos utilizando o Software MiniTab versão 18 (Minitab, LLC, Pensilvânia, EUA). Para todas as análises foi adotado grau de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização dos indivíduos participantes

Foram incluídos 42 indivíduos, 19 eutróficos e 23 obesos, sendo a maior parte do gênero feminino (76%) (Tabela 2). Os indivíduos obesos apresentaram maior idade. Quanto aos parâmetros antropométricos houve diferença significativa em todas as variáveis analisadas. Como esperado, os indivíduos obesos apresentaram maior peso e IMC. Doze 12 indivíduos (52%) foram classificados com obesidade grau 1, 7 (30%) apresentaram obesidade grau 2 e apenas 4 (17%), grau 3.

Proporção similar foi encontrada Em um estudo de coorte que acompanhou mais de 160 mil americanos onde 58, 26 e 16% dos obesos com idade entre 50-59 anos apresentaram obesidade grau 1, 2 e 3, respectivamente (CHENG et al., 2017).

Tabela 2- Principais características dos indivíduos participantes do estudo*.

Variável	Eutróficos	Obesos	<i>p</i> ^a
Gênero			
<i>Masculino</i> n (%)	3 (15,8%)	6 (26,1%)	
<i>Feminino</i> n (%)	16 (84,2%)	17 (73,9%)	
Idade (anos)	33 ± 9	43 ± 9	<0,0001
Peso (kg)	60,05 ± 4,44	96,44 ± 15,03	<0,0001
IMC (kg/m ²)	22,20 ± 1,35	35,43 ± 3,29	<0,0001
CC (cm)	77,89 ± 3,36	108,39 ± 9,09	<0,0001
Massa magra (%)	73,93 ± 5,32	61,80 ± 3,74	<0,0001
Massa gorda (%)	26,08 ± 5,33	38,20 ± 3,74	<0,0001
Água corporal	32,44 ± 4,38	44,21 ± 7,18	<0,0001
Taxa metabólica basal (Kcal)	1394,88 ± 198,06	1885,96 ± 278,65	<0,0001

* Resultados expressos em média ± desvio padrão.^a Teste *t-student* (dados paramétricos) e Teste Mann-Whitney (dados não-paramétricos).

A circunferência da cintura (CC) é recomendada pela Organização Mundial da Saúde como parâmetro que prediz o risco de desenvolvimento de doenças crônicas. Enquanto o IMC não considera a disposição e distribuição da massa gorda, a CC reflete a adiposidade abdominal que apresenta impacto direto na saúde (VISSCHER et al., 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011; CHENG et al., 2017; LESLIE, 2019).

Adotando os parâmetros recomendados pela WORLD HEALTH ORGANIZATION (2011), os indivíduos obesos participantes apresentaram um risco muito elevado para o desenvolvimento de doenças crônicas enquanto os eutróficos estavam abaixo do ponto de corte indicado para o risco.

Analisando a composição corporal (Tabela 2), verifica-se que o grupo eutrófico apresentou maior percentual de massa magra e menor de massa gorda quando comparado aos obesos. Adotando a classificação do percentual de gordura de POLLOCK e WILMORE (1993), a maior parte dos indivíduos eutróficos apresentaram percentual abaixo da média (n=8) ou na média (n=3) considerando o gênero e idade, enquanto a maioria dos obesos (n=15) apresentaram classificação muito ruim.

A taxa metabólica basal (TMB) é a quantidade de energia por unidade de tempo que uma pessoa precisa para manter o organismo funcionando em repouso, compreendendo aproximadamente 70% do total de energia utilizada (HENRY et al., 2018). Os obesos apresentaram maior TMB assim como reportado Em um recente estudo com mulheres brasileiras onde constataram que o aumento da TMB é proporcional ao IMC (SGAMBATO; WAHRLICH; ANJOS, 2019).

De acordo com a avaliação antropométrica observa-se diferença significativa entre os grupos, o que era esperado, sendo que os indivíduos obesos apresentaram maior IMC e TMB. Observando a composição corporal, os obesos apresentaram maior razão entre massa gorda e magra. A circunferência da cintura indicou maior proporção de gordura abdominal entre os indivíduos obesos. Todas essas informações sugerem que os indivíduos obesos apresentam risco à sua saúde.

3.1.1. Perfil bioquímico dos indivíduos participantes

Houve diferença significativa na concentração de glicemia em jejum dos eutróficos e obesos, contudo, ambas as populações apresentaram média dentro do valor de referência (Tabela 3). Os indivíduos obesos apresentaram concentração de insulina aproximadamente duas vezes maior que os indivíduos eutróficos o que teve grande impacto no índice HOMA-IR que é utilizado como marcador para resistência à ação da insulina. Foram estabelecidos como valores de referência para adultos brasileiros um índice de HOMA-IR <2,71 (GELONEZE et al., 2006). Dessa forma, apesar da população obesa não apresentar diagnóstico de diabetes, a elevada concentração de insulina e o alto índice HOMA-IR indica um quadro de resistência à ação da insulina.

Tabela 3- Parâmetros bioquímicos dos indivíduos participantes do estudo*.

Variável	Eutróficos	Obesos	p ^a	Valor de referência
Glicemia (mg\dl)	84,26 ± 5,39	95,61 ± 9,80	0,0007	70-99,0 ¹
Insulina (µU/mL)	7,79 ± 2,39	15,32 ± 5,14	<0,0001	6-27,0 ¹
HOMA-IR	1,64 ± 0,57	3,80 ± 1,31	<0,0001	<2,71 ²
LDL (mg\dl)	98,47 ± 29,08	113,65 ± 20,51	0,0982	<130 ³
HDL (mg\dl)	58,42 ± 12,91	45,30 ± 8,74	0,0058	≥40,0 ³
VLDL (mg\dl)	17,26 ± 4,88	24,13 ± 7,30	0,0086	<40,0 ⁴
Triglicérides (mg\dl)	87,00 ± 24,11	121,00 ± 36,87	0,0091	<150 ³
Colesterol total (mg\dl)	177,22 ± 39,0	183,17 ± 24,39	0,6158	>190 ³
ALT (U/L)	30,21 ± 7,84	40,83 ± 10,74	0,0073	10-40 ¹
AST (U/L)	21,89 ± 6,92	20,09 ± 5,92	0,7779	10-40 ¹

* Resultados expressos em média ± desvio padrão.^a Teste *t-student* (dados paramétricos) e Teste Mann-Whitney (dados não-paramétricos).¹Williamson; Snyder (2016); ²Geloneze et al. (2006); ³Faludi et al. (2017); ⁴Cysne et al. (2016).

Para a população eutrófica o índice calculado foi aproximadamente 1,5 enquanto os obesos apresentaram valores próximo à 4,0. Valores próximos ao índice HOMA-IR para a presente população foram obtidos também em um

estudo que investigou índices de resistência à ação da insulina em 1203 indivíduos adultos brasileiros. Os autores verificaram aumento do índice HOMA-IR com o aumento do IMC (GELONEZE et al., 2009).

A concentração plasmática de colesterol para ambos os grupos ficou dentro dos valores considerados desejáveis. Não houve diferença significativa na concentração de colesterol total entre eutróficos e obesos, no entanto, observando as frações de colesterol sérico verifica-se maior concentração de HDL-c para os indivíduos eutróficos e maiores concentrações de VLDL e triglicérides entre os obesos.

O perfil de colesterol muito próximo foi verificado para um grupo de mulheres obesas brasileiras com perfil e IMC similar ($34,8 \text{ kg/m}^2$) as quais apresentaram para colesterol total, LDL e HDL concentrações médias de 188,4; 123,6 e 48,3 mg/dL, respectivamente (DUARTE et al., 2019).

Quanto aos marcadores séricos de danos hepáticos (ALT e AST), ambas populações apresentaram, em média, valores na faixa da normalidade.

O perfil antropométrico e bioquímico observado para a população foi conforme o esperado. Indivíduos obesos apresentaram maior percentual de gordura corporal e um perfil bioquímico indicando resistência à ação da insulina e maior concentração plasmática de LDL-c. Apesar disso, essa população não apresentou comorbidades como diabetes e dislipidemia, porém ainda assim permanece o risco para o desenvolvimento visto que inúmeros trabalhos apontam associação entre IMC, percentual de gordura corporal e obesidade com o surgimento de diabetes tipo 2, hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares (JENSEN et al., 2014; YUMUK et al., 2015; BISCHOFF et al., 2017; BARAZZONI et al., 2018).

3.2. Consumo alimentar dos indivíduos ao longo do experimento

Foram analisados os recordatórios alimentares habituais no tempo basal (0d) que exemplifica o consumo da população antes da intervenção e recordatórios habituais do consumo referente ao período da intervenção (30d). Vale destacar que os indivíduos participantes foram estimulados a manter sua ingestão alimentar comum e a não iniciar nenhuma dieta ou atividade física ao longo do experimento. Após a conclusão do estudo, com base nos exames

bioquímicos, avaliação antropométrica e anamnese nutricional, os indivíduos foram encaminhados ao ambulatório de nutrição do IDPC para melhor orientação.

A tabela 4 mostra o perfil da ingestão de macronutrientes e o valor energético total (VET) dos indivíduos eutróficos e obesos entre o período basal e após 30 dias de consumo do maracujá. Não foi observada diferença significativa no consumo de macronutrientes entre os períodos avaliados.

Tabela 4 - Médias e desvio padrão das características de consumo de acordo com recordatório alimentar de 24h dos indivíduos eutróficos e obesos participantes.*

Nutriente	Eutróficos			Obesos		
	0d	30d	p	0d	30d	p ^a
Carboidratos (g)	197,83 ±142,00	196,21 ± 179,00	0,8738	186,65 ± 76,36	142,68 ± 46,47	0,1302
Proteínas (g)	168,52 ± 236,1	99,55 ± 62,63	0,2370	98,47 ± 27,66	105,69 ± 36,66	0,5052
Lipídios (g)	55,72 ± 26,13	41,18 ± 17,90	0,1642	56,61 ± 23,09	48,44 ± 28,71	0,3507
Fibras (g)	11,28 ± 6,57	9,74 ± 5,51	0,4969	10,63 ± 5,26	11,50 ± 4,80	0,6094
VET (Kcal)	1851± 1557	1280 ± 895	0,2345	1650 ± 510	1429 ± 416	0,2089

* Resultados expressos em média ± desvio padrão.^a Teste *t-student* (dados paramétricos) e Teste Mann-Whitney (dados não-paramétricos).

Baseado nas diretrizes da Organização Mundial da Saúde (AMINE et al., 2003) que estabelece uma referência para o consumo de macronutrientes e ingestão de fibras, observa-se que a maioria dos indivíduos obesos apresentaram um perfil alimentar hiperlipídico, o que pode justificar o maior IMC e o percentual de gordura corporal através do desbalanço energético entre a ingestão e o gasto (XU et al., 2017).

Verifica-se também que, independente do grupo, os indivíduos apresentaram um valor médio baixo de ingestão de fibras. É recomendado a ingestão de 25 g/dia de fibras (AMINE et al., 2003), os indivíduos apresentaram consumo médio em torno de 10 g/dia. Analisando qualitativamente os recordatórios observa-se baixo consumo do grupo alimentar frutas e verduras,

principais fontes de fibra em uma alimentação equilibrada (AMINE et al., 2003; LIU, 2013).

Observa-se também que o VET médio dos obesos foi menor que o do eutróficos. Esse resultado é incompatível com a TMB mensurada e com o percentual de gordura corporal dos indivíduos (Tabela 2). Esse fato já foi relatado na literatura (PRYER et al., 1997; DE SALVO; GIMENO, 2002; SLATTERY; EDWARDS; CAAN, 2002) sendo justificado por indivíduos obesos terem maior tendência em omitir o seu real consumo e/ou subestimar o tamanho da porção ingerida (PRYER et al., 1997; DE SALVO; GIMENO, 2002; FISBERG; MARCHIONI; COLUCCI, 2009).

3.3. Efeito da ingestão do fruto de *P. tenuifila* Killip sobre marcadores antropométricos e bioquímicos

A figura 5 apresenta o peso, IMC e a circunferência da cintura ao longo dos 30 dias de consumo de *P. tenuifila* Killip. Para todas as medidas antropométricas os indivíduos obesos apresentaram maiores médias quando comparado aos eutróficos. O consumo da porção diária de *P. tenuifila* Killip não foi suficiente para reduzir as medidas, indicando que a população obesa ainda está em risco de desenvolvimento de doenças associadas à obesidade.

É possível que a duração da suplementação não tenha sido suficiente para a visualização dos efeitos. Uma meta-análise sobre o efeito do consumo de fonte de flavan-3-ol em obesos, verificou a partir de 13 estudos que a suplementação em protocolos menores à quatro semanas por indivíduos com sobrepeso e obesidade não tiveram influência sobre o IMC, enquanto, protocolos com intervenção maior que quatro semanas, resultaram em significativa redução no IMC (GORJI et al., 2019).

É esperado que o aumento do consumo de frutas e vegetais tenha impacto no IMC. Um estudo com mais de 4300 participantes chineses com idade entre 18 e 65 anos, evidenciou que o aumento do consumo de 100g de frutas e vegetais foi associado com a perda de 211g de peso e uma redução de 0,94 kg/m² no IMC para homens e de 140g e 0,29 kg/m² para mulheres, respectivamente (YUAN et al., 2018).

Portanto, considerando os achados na literatura bem como analisando o comportamento dos parâmetros entre os indivíduos no presente estudo, é possível considerar que o consumo Em um maior prazo da porção de *P. tenuifila* Killip poderia afetar positivamente os parâmetros antropométricos.

Figura 5 – Efeito do consumo de *P. tenuifila* Killip sobre os marcadores antropométricos dos indivíduos eutróficos e obesos, suplementados durante 30 dias consecutivos.*

* Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão.

Adicionalmente foi avaliada a composição corporal após a intervenção de 30 dias (Figura 5). Assim como os parâmetros antropométricos (peso, IMC e CC), não houve diferença significativa no percentual de massa magra e gorda dos participantes. Também não foi observada alteração na classificação do percentual de gordura (POLLOCK; WILMORE, 1993).

Para a glicemia, insulina e o índice HOMA-IR (Figura 6) não foi encontrada diferença significativa após o consumo de *P. tenuifila* Killip. Apesar dos obesos apresentarem resistência à ação da insulina, o consumo do fruto *P. tenuifila* Killip não foi capaz ou o tempo da suplementação não foi suficiente para a melhora dos parâmetros.

Figura 6- Efeito do consumo de *P. tenuifila* Killip sobre a glicemia, insulina plasmática e índice HOMA-IR de indivíduos eutróficos e obesos, suplementados durante 30 dias consecutivos.*

*Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão.

Não houve diferença no perfil de lipídio sérico entre os eutróficos. Entretanto, houve redução significativa na concentração de LDL-c entre obesos ($p=0,023$) que refletiu também no colesterol total ($p=0,021$) (Figura 7). Os indivíduos que iniciaram a intervenção com elevada concentração de LDL-c (em média com 144,4 mg/dL) apresentaram redução de 10,66% na concentração após 30 dias de consumo de *P. tenuifolia* Killip, a intervenção foi responsável pela redução de LDL a valores dentro dos limítrofes desejados (em média, 129,0 mg/dL) para esse grupo.

O efeito do consumo de maracujá foi próximo a redução de 9% relatada na literatura para a ingestão de 2 a 2,4 g/dia de fitoesterol, classe com alegações nutricionais aprovadas pela European Food Safety Authority (EFSA) para redução significativa de LDL-c (SIALVERA et al., 2012).

De fato, a redução de LDL-c é de grande importância para o aumento da qualidade e expectativa de vida dessa população (LLOYD-JONES et al., 2017). Estudos demonstram que a redução de 3% progressiva a cada ano, em uma década reduz o risco de acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e amputação em 45, 10 e 27%, respectivamente (MOSTAFA et al., 2019).

O consumo de alimentos com flava-3-ol e proantocianidinas (PAs) tem sido associado a efeito cardioprotetor, hipolipidêmico e anti-inflamatório (HOOPER et al., 2008; NOWSHEHRI; BHAT; SHAH, 2015; NUNES et al., 2016). São reconhecidos diversos mecanismos de ação: inibição da colesterol esterase pancreática, redução da solubilidade do colesterol nas micelas e proteção do LDL contra oxidação (MORENO et al., 2003; SHAFIEE et al., 2003; NGAMUKOTE et al., 2011; NUNES et al., 2016; BERNATOVA, 2018).

Efeito hipocolesterolêmico similar ao presente estudo foi atribuído à ingestão de PAs. Um estudo randomizado, duplo-cego e placebo controlado onde 52 indivíduos com hipercolesterolemia foram suplementados durante oito semanas com extrato de semente de uva rico em PAs, foi observado a redução de 10,68 mg/dL na concentração do colesterol total e de 9,66 mg/dL do LDL (RAZAVI et al., 2013).

Figura 7- Efeito do consumo de *P. tenuifila* Killip sobre o perfil lipídico de indivíduos eutróficos e obesos, suplementados durante 30 dias consecutivos. *

*Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão.

3.4. Quantificação de zonulina plasmática: marcador de permeabilidade intestinal

Não foi observada diferença significativa entre a concentração plasmática de zonulina entre os indivíduos eutróficos e obesos. No período basal os grupos apresentaram em média 30,93 e 33,12 ng/ml para os eutróficos e obesos, respectivamente (Figura 8).

Trabalhos apontam que indivíduos obesos apresentam maior concentração de zonulina quando comparados a indivíduos com peso adequado (MORENO-NAVARRETE et al., 2012; KIM et al., 2018). Concentrações maiores foram verificadas para gestantes com sobrepeso (44,6 ng/ml) e obesas (48,9 ng/ml) (HOUTTU; MOKKALA; LAITINEN, 2018).

Como pode ser observado na figura 8b que apresenta o delta da concentração de zonulina plasmática entre o período basal e 30 dias, houve tendência de redução da concentração em ambos os grupos após 30 dias de ingestão de *P. tenuifila* Killip. A concentração de zonulina reduziu, em média 5,5% (1,68 ng/ml) para os indivíduos eutróficos e 6% (2,05 ng/ml) para os obesos. Apesar de não ter apresentado diferença significativa, o consumo de *P. tenuifila* Killip por somente 30 dias foi mais eficiente na redução da concentração de zonulina que a suplementação de probiótico associado ou não a fibra. Após 6 meses de consumo o grupo que ingeriu diariamente 10^{10} UFC de uma cepa probiótica associado à 12 g de fibra, apresentou redução média de 1,2 ng/ml. O mesmo valor foi observado também para o grupo que só ingeriu a cepa prebiótica (STENMAN et al., 2016).

Figura 8- Concentração de Zonulina Plasmática entre os indivíduos eutróficos e obesos (A)* e Variação da concentração entre o dia 30 e basal (B) suplementados com *P. tenuifila* Killip durante 30 dias consecutivos.

*Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão.

A não observância de diferença significativa na concentração de zonulina entre os indivíduos eutróficos e obesos avaliados pode indicar que apesar da obesidade presente, estes indivíduos encontram-se com bom estado de saúde.

3.5. Efeito do consumo de *P. tenuifila* Killip sobre marcadores do estresse oxidativo

Não houve diferença significativa entre os obesos e eutróficos na concentração plasmática de 8-isoprostano (Figura 9). Esse composto é formado a partir da peroxidação não enzimática do ácido araquidônico, sendo um importante biomarcador para avaliação da ação do estresse oxidativo sobre os ácidos graxos poli-insaturados que é um dos principais alvos das espécies reativas no organismo (MORROW et al., 1990; ROBERTS; MORROW, 2002).

O aumento de isoprostano está associado a diversas doenças crônicas e a um estado inflamatório (VAN 'T ERVE et al., 2017). O 8-isoprostano foi mensurado em indivíduos com diferentes níveis de asma e foi detectado um significativo aumento quando comparado aos indivíduos controle (MONTUSCHI et al., 1999), assim como para indivíduos obesos com elevada concentração de citocinas inflamatórias (PETERSON et al., 2016) ou gestantes com diabetes tipo II (KORB et al., 2019). Dessa forma indica-se que os indivíduos participantes podem não apresentar um quadro instalado de estresse oxidativo, inclusive os obesos.

Figura 9- Concentração do marcador 8-isoprostano no plasma de indivíduos eutróficos e obesos suplementados com *P. tenuifila* Killip durante 30 dias consecutivos.*

*Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão.

Não foi observada diferença significativa entre o tempo basal e 30 dias após o consumo de *P. tenuifila* Killip. O mesmo resultado foi encontrado após suplementação de elevada dose de vitamina C (1500 mg/dia) em indivíduos diabéticos. Após 3 semanas de tratamento, houve aumento da concentração plasmática de ácido ascórbico que faz parte do sistema não-enzimático contra as espécies reativas (FRANÇA et al., 2013), ainda assim, não houve redução dos níveis de 8-isoprostano (DARKO et al., 2002).

Da mesma forma a suplementação com vitamina C (500 mg/dia) e E (400 UI de tocoferol/dia) durante 2 meses não foi efetiva para reduzir a concentração de 8-isoprostano quando comparado ao grupo placebo (HUANG et al., 2002).

A não redução de 8-isoprostano no presente estudo pode ser devido ao curto tempo de intervenção. Estudos de longa duração com suplementação de compostos antioxidantes foram efetivos na redução de concentração de 8-isoprostano. A suplementação de α -tocoferol (1200 UI/dia) durante dois anos diminuiu a concentração de 8-isoprostano em pacientes com doença cardiovascular (DEVARAJ et al., 2009).

Em outro estudo, com suplementação de vitamina E (3200 UI/dia) durante 20 semanas só foi detectada redução significativa após a 16ª semana, na verdade, foi observado também uma tendência no aumento da concentração plasmática de 8-isoprostano até a 4ª semana (ROBERTS et al., 2007).

Um fator limitante do presente estudo foi a quantificação somente de um tipo de isoprostano (8-isoprostaglandina $F_{2\alpha}$) no entanto, são conhecidas quatro classes de isoprostano que podem ser formadas por diferentes vias endógenas a partir do ácido araquidônico (ROBERTS; MORROW, 2002). É verdade que a 8-isoprostaglandina $F_{2\alpha}$ é um dos principais tipos, contudo, outras formas podem ser detectadas no plasma (8-iso-15(R)-PGF $_{2\alpha}$; 15(R)-PGF $_{2\alpha}$; PF $_{2\alpha}$ -IV; ($\pm$) 5iPF $_{2\alpha}$ -VI e a ($\pm$)5-8,12-iso-iPF $_{2\alpha}$ -IV) (TASCHEREAU-CHARRON et al., 2018), as quais não foram analisadas nesse estudo.

Outro marcador do estresse oxidativo é o 8-OHdG formado a partir da oxidação do carbono 8 da Guanina, um dos eventos oxidativos mais comuns que resulta em lesão mutagênica (MAYNE, 2003; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). A quantificação de 8-OHdG é atualmente usada para avaliar as taxas de dano oxidativo ao DNA do corpo inteiro (MAYNE, 2003).

Não foi observada diferença na concentração de 8-OHdG na urina dos eutróficos e obesos (Figura 10). A ingestão de *P. tenuifolia* Killip por 30 dias foi responsável por reduzir significativamente a concentração do 8-OHdG na população estudada. Efeito similar foi obtido para indivíduos com peso adequado e sobrepeso fazendo uso de Metformina durante 3 meses (SOVA et al., 2013).

Essa redução é extremamente importante principalmente para a população acima do peso. Uma característica da obesidade é o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) as quais podem desencadear danos ao material genético. A associação entre obesidade e incidência de vários tipos de câncer é bem descrita na literatura (SETAYESH et al., 2018).

Figura 10- Concentração do marcador 8-OHdG na urina de indivíduos eutróficos e obesos suplementados com *P. tenuifolia* Killip durante 30 dias consecutivos.*

*Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão.

3.6. Perfil de excreção dos metabólitos de flavonoides na urina dos indivíduos eutróficos e obesos

Foram analisadas amostras de urina de 17 indivíduos eutróficos e 17 obesos, nos dois períodos (basal e 30 dias após o consumo diário de maracujá). A tabela 5 apresenta os 18 metabólitos de compostos fenólicos identificados na urina dos indivíduos.

Dos dezoito metabólitos de fenólicos encontrados na urina, seis metabólitos estão diretamente ligados ao metabolismo da flavan-3-ol e das proantocianidinas. Foi identificado o metabólito de metil-(epi)-catequina glucuronídeo que é um produto direto do metabolismo da (epi)-catequina. É factível considerar que metil-(epi)catequina-glucuronídeo é metabólito direto da absorção dos monômeros de flavan-3-ol encontrado no fruto *P. tenuifila* Killip. Os monômeros têm maior absorção no trato gastrointestinal alto. Vale a pena destacar, que foi encontrado (epi)-catequina como integrante de PAs encontradas no maracujá (*P. tenuifila* Killip). Estudos apontam que uma pequena fração das PAs são absorvidas diretamente passando por metabolização de fase II. O maior percentual ingerido é metabolizado pela microbiota intestinal (OU; GU, 2014).

Tabela 5- Metabólitos de compostos fenólicos encontrados na urina dos indivíduos participantes.

Nº	Metabólito	Fórmula	M-H Exato	M-H Encontrado	Rt	Sco re	Diff (pp m)
1	Ácido protocatecuico	C7H6O4	153.01 93		5,45 1	99,4 8	- 0,13
2	Metil (epi) catequina glucuronídeo	C22H24 O12	479.11 95		13,1 8	51,7 5	10.4 9
3	3,4 dihidroxifenil Valerolactona sulfato	C11H12 O7S	287.02 31	278.0233	5,25 9	98,8 8	- 0,68
4	Ácido 3- hidroxifenilacético	C8H8O3	151.04 01	151.0396	4,27 6	98,1 2	2,78
5	Ácido Hipúrico	C9H9NO 3	178.05 10	178.0512	4,88 6	99,4 7	-1,2
6	Ácido hidroxí- hipúrico	C9H9NO 4	194.04 59	194.0456	3,65 5	47,4 2	1,03
7	4-vinil guaiacol	C9H10O 2	149.06 08	149.0604	9,80 1	83,6 4	6,04
8	3,4,5trimetoxicin âmico	C12H14 O5	237.07 68	237.0769	4,88 6	99,1 6	- 0,27
9	Ácido 3,4- dihidroxifenil valérico	C11H14 O4	209.08 19	209.0794	9,18	77,6 1	11,8 1
10	3,4-dihidroxifenil valérico sulfato	C11H14 O7S	289.03 87	289.0386	3,87 6	75,2 6	0,2

11	Ácido vanílico sulfato	C8H8O7 S	246.99 18	246.9921	2,64 9	97,7 8	- 0,79
12	Ácido (Iso)ferúlico sulfato	C10H10 O7S		273.0076	4,60 4	97,0 6	- 1,02
13	3,4,5 trihidroxifenil valerolactona	C11H12 O5	223.06 12	223.0609	4,24 2	95,1 6	0,32
14	3',4',5'-trihidroxifenil-γ-valerolactona-O-metil-5'-O-glucoronídeo	C18H22 O11	303.01 80	303.0182	4,24 2	75,1 8	- 0,62
15	Luteolina	C15H10 O6	285.04 62	285.0439	9,98 2	65,9 1	- 11,18
16	Floroglucinol	C6H6O3	125.02 44	125.0244	3,06 7	99,1	0,04
17	Eriodictiol-metil-éter (Homoeriodictiol)	C16H14 O6	301.07 18	301.0695	13,6 54	85,2 5	7,25
18	Ácido benzoico	C7H6O2	121.02 95	121.0295	3,94 9	87,8 4	- 0,19

Geralmente os metabólitos direto da epicatequina são encontrados principalmente metilados devido à ação da enzima COMT. Em um estudo prévio sobre o perfil de metabólitos na urina de indivíduos que ingeriram chá rico em flavan-3-ol, verificou-se que os principais metabólitos conjugados identificados passaram por metabolização de fase II, sendo encontrado principalmente na forma metilada. Foi identificado na urina desses indivíduos o metabólito metil-(epi)catequina-glucoronídeo, assim como no presente estudo (SANG et al., 2008).

Cinco metabólitos identificados na urina dos indivíduos são da classe das fenil-γ-valerolactonas (3,4 dihidroxifenil Valerolactona sulfato; ácido 3,4-dihidroxifenil valérico, 3,4- dihidroxifenil valérico sulfato; 3,4,5 thihidroxifenil valerolactona; 3',4',5'-trihidroxifenil-γ-valerolactona-O-metil-5'-O-glucuronídeo) esses compostos são os principais produtos da metabolização de PAs pela microbiota e são oriundos da fissão no carbono 5 do flavan-3-ol (Figura 11) (OTTAVIANI et al., 2016; BORGES et al., 2018).

Figura 11 - Via proposta da metabolização de PAs e catequina gerando metabólitos direto e derivados fenil- γ -valerolactonas.

Adaptado de Sang et al. (2008); Sánchez-Patán et al. (2011) e Borges et al. (2018).

O metabólito com a maior área sob a curva (ASC) na urina dos indivíduos e que está associado ao metabolismo de flavan-3-ol e PAs foi o 3,4-dihidroxifenil-valerolactona sulfato (Figura 11), assim como no estudo que quantificou fenil-γ-valerolactonas na urina de indivíduos (BRINDANI et al., 2017). Frequentemente é reportado na literatura que os produtos de Fase II do 3,4-dihidroxifenil-valerolactona são os principais metabólitos de flavan-3-ol oriundos da fermentação da microbiota intestinal (CHEN; SANG, 2014).

Foram identificados também metabólitos ligados à flavona C-glicosilada. O eriodictiol pode ser derivado do metabolismo da luteolina através da hidrogenação e deglicosilação enquanto o floroglucinol é oriundo da abertura do anel C da luteolina, por exemplo (ZHANG et al., 2007). Esses metabólitos foram

encontrados na maioria das amostras de urina analisadas. A aglicona luteolina também foi detectada em algumas amostras de urina dos indivíduos.

Alguns ácidos fenólicos foram identificados nas amostras analisadas (Tabela 5). Os ácidos benzoicos podem ser produto da ação da microbiota sobre a fenil- γ -valerolactona (Figura 12). Monômeros de flavan-3-ol podem ser degradados à ácidos hidroxifenil valéricos que posteriormente podem ser oxidados à ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico e a 3-hidroxifenilpropiónico. O ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico pode ser convertido em ácido protocatecuico (também encontrado na urina dos indivíduos no presente estudo) e este, por sua vez pode dar origem ao ácido vanílico e vanílico (também encontrado na urina dos indivíduos no presente estudo). Por outra via (Figura 12), o ácido 3-hidroxifenilpropiónico pode ser metabolizado no fígado gerando ácido benzoico e cumárico, este último, por sua vez pode ser metilado e convertido em ácido ferúlico (GONTHIER et al., 2003).

Figura 12 - Via proposta da metabolização de flavan-3-ol gerando ácidos fenilvaléricos, hipúrico, benzoico e derivados.

Adaptado de Gonthier et al. (2003).

O ácido hipúrico foi o metabólito com maior concentração entre os dezoito identificados. Este ácido é gerado a partir da conjugação da glicina com o ácido 3-hidroxibenzoico no fígado e rins. É derivado principalmente de compostos fenólicos sendo esperado o aumento da concentração na urina de indivíduos que consomem dietas ricas em fenólicos (SPENCER et al., 2001; GONTHIER et al., 2003).

Para avaliar o efeito da suplementação do maracujá sobre o perfil de metabólitos excretados as amostras de urina dos voluntários foram analisadas em HPLC-ESI-QTOF. Na ausência de padrões comerciais, os resultados foram expressos em área sob a curva e normalizados pela concentração de creatinina. A normalização de metabólitos excretados pela creatinina é amplamente aplicada na literatura em diversos casos (PIERSE et al., 2004; CONE et al., 2009; ZAMORA-ROS et al., 2011).

O perfil de excreção dos metabólitos está apresentado na figura 13. Observa-se uma tendência de aumento dos metabólitos após o consumo do maracujá (*P. tenuifolia* Killip) para a maioria dos metabólitos identificados. Contudo, foi observada grande variação interindividual no perfil dos metabólitos excretados.

Essa grande variabilidade é reportada na literatura. Em um estudo que avaliou a metabolização de flavononas, encontrou grande variabilidade na concentração dos metabólitos excretados, os indivíduos foram então classificados como pobres, médios e elevados excretadores (VALLEJO et al., 2010).

Em outro recente estudo que avaliou a metabolização e excreção de PAs Em um total de 68 indivíduos, também observou-se grande variabilidade nas concentrações dos metabólitos sulfatados ou glucuronidados da dihidroxifenil valerolactona e hidroxifenilvalerolactona (CORTÉS-MARTÍN et al., 2019).

Os metabólitos com maior área sob a curva (ASC) foram os ácidos hipúrico e hidroxí-hipúrico, contudo não houve diferença significativa entre os tempos analisados. O ácido hipúrico é produzido a partir da quebra dos polifenóis através da ação da microbiota e por rotas orgânicas independente da degradação microbiana (CROZIER; DEL RIO; CLIFFORD, 2010b; PEREIRA-CARO et al., 2014), dessa forma, como é gerado de vários compostos fenólicos, é um importante marcador para o consumo de frutas e vegetais (GUERRA et al.,

2019). Como limitação, o presente estudo restringiu o consumo de fontes de flavonoides das classes flavonas e flavon-3-ol, porém a restrição de todo um grupo de alimentos frutas e verduras era impraticável, dessa forma a presença dos ácidos hipúricos e hidroxi-hipúricos podem não estar totalmente associadas ao consumo do fruto de *P. tenuifila* Killip.

Figura 13- Excreção de metabólitos de fenólicos na urina de indivíduos eutróficos e obesos suplementados com *P. tenuifila* Killip durante 30 dias consecutivos.

*Resultados expressos em média ± erro padrão.

(cont.)

*Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão.

(cont.)

*Resultados expressos em média ± erro padrão.

Quanto aos metabólitos de flavon-3-ol e seus polímeros, verifica-se que grande parte desses compostos foram extensivamente metabolizados pela microbiota. Não foi observada diferença significativa nos metabólitos ligados à fenil-γ-valerolactonas entre antes (0d) e após o consumo de maracujá (30d) para os eutróficos e obesos ($p > 0,05$). No entanto, o metabólito direto do monômero da epicatequina, o metil(epi)catequina glucuronídeo apresentou tendência de aumento na excreção no grupo obeso apresentando o valor de p próximo à significância ($p = 0,072$).

Enquanto os metabólitos associados à flavonas C-glicosiladas (erodictiol-metil-éter e floroglucinol) apresentaram tendência de aumento após os 30 dias, tanto para o grupo eutrófico e obeso, somente houve aumento significativo na excreção de luteolina no grupo obeso ($p = 0,0000$).

Verificou-se aumento significativo na excreção do ácido hidroxifenilacético ($p = 0,018$) e no ácido protocatecuico ($p = 0,040$) para o grupo obeso. Como apontado anteriormente esses metabólitos podem ser oriundos da extensa metabolização microbiana.

Comparando o perfil de excreção após 30 dias de consumo de *P. tenuifila* Killip, apesar da grande variabilidade interindividual, verifica-se que o grupo de indivíduos obesos apresentou maior tendência no aumento da excreção de metabólitos quando comparados aos eutróficos. Apesar da tendência de aumento da excreção de metabólitos observada para os obesos em detrimento dos eutróficos após 30 dias de consumo de *P. tenuifila* Killip para a maioria dos compostos identificados (Figura 13), foi observada aumento significativo apenas na excreção do metabólito 4 vinil-guaicol ($p = 0,022$) entre os obesos quando

comparado aos eutróficos. A não observância de diferença estatística entre os demais metabólitos pode ser causada pela grande variabilidade interindividual encontrada.

A análise dos componentes principais do perfil de metabólitos excretados entre o período basal e 30 dias após ingestão de *P. tenuifila* Killip do eutróficos e obesos (Figura 14), corrobora com os dados acima. Analisando o gráfico de dispersão com regressão linear de dois componentes principais, os quais juntos respondem quase 60% das diferenças encontradas, observa-se que após 30 dias de consumo de *P. tenuifila* Killip os indivíduos obesos apresentaram maior excreção de metabólitos. Verifica-se também um aumento mais discreto entre a quantidade de metabólitos excretados entre o período basal e após 30 dias para os indivíduos eutróficos.

Figura 14 – Análise dos componentes principais dos metabólitos de fenólicos excretados dividido por grupo e tempo

O aumento significativo da excreção de 4-vinil guaiacol somada à tendência de aumento da excreção da maioria dos metabólitos entre os indivíduos obesos, sugere que esse grupo apresentou maior metabolização dos compostos fenólicos após a intervenção.

4. CONCLUSÃO

Os indivíduos obesos apresentaram maior percentual de gordura corporal e circunferência da cintura o que indica aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas. Quanto ao perfil bioquímico os obesos apresentaram maior concentração de glicemia, insulina e índice HOMA-IR sugerindo resistência à ação da insulina. Além disso, apresentaram maior concentração de colesterol VLDL e menor de HDL. Apesar da diferença estatística ambos os grupos apresentaram, em média, concentrações dentro do limite desejável.

O consumo de maracujá *P. tenuifila* Killip por 30 dias foi responsável pela redução significativa do LDL e colesterol total entre os obesos. A redução nas concentrações de lipídios séricos foi maior entre os indivíduos que iniciaram a intervenção com esses parâmetros alterados.

Verificando a permeabilidade intestinal, percebe-se uma tendência na redução da concentração de zonulina plasmática. Apesar de não ser observado diferença significativa, o consumo de *P. tenuifila* Killip foi mais eficiente em um menor tempo de intervenção que outros achados na literatura.

Analisando os marcadores de estresse oxidativo percebe-se que a ingestão do maracujá reduziu significativamente a concentração de 8-OHdG, indicando maior proteção contra danos causados pelas espécies reativas sobre o DNA, promovendo assim menor risco de mutação.

Foram identificados 18 metabólitos oriundo dos compostos fenólicos na urina dos participantes. Dentre as principais classes, observa-se metabólitos de fase II de fenil- γ -valerolactonas, grupo associado à metabolização microbiana de flavan-3-ol e proantocianidinas e também de floroglucinol e o eridictiol ligados à metabolização de flavonas, além de ácidos fenólicos derivados principalmente do ácido benzoico. Apesar da grande variabilidade interindividual observou-se aumento da excreção principalmente de ácidos fenólicos entre os obesos.

O consumo de uma pequena porção de *P. tenuifila* Killip em um curto período foi capaz de melhorar parâmetros bioquímicos, do estresse oxidativo e na excreção de metabólitos de compostos fenólicos. Todos esses fatores somados sugerem que a ingestão de maracujá *P. tenuifila* Killip apresenta impacto positivo sobre a saúde.

Referências bibliográficas

AMINE, E. K. et al. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva: World Health Organization, 2003.

ANGELINO, D. et al. Caecal absorption of vitexin-2-O-xyloside and its aglycone apigenin, in the rat. **Food and Function**, v. 4, p. 1339–1345, 2013.

ARNOLD, M. et al. Obesity and cancer: An update of the global impact. **Cancer Epidemiology**, v. 41, p. 8–15, 2016.

ATNIP, A. A. et al. Time, concentration, and pH-dependent transport and uptake of anthocyanins in a human gastric epithelial (NCI-N87) cell line. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1–12, 2017.

BARAZZONI, R. et al. Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. **Eating and Weight Disorders**, v. 23, p. 149–157, 2018.

BERNATOVA, I. Biological activities of (–)-epicatechin and (–)-epicatechin-containing foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 666–681, 2018.

BISCHOFF, S. C. et al. Towards a multidisciplinary approach to understand and manage obesity and related diseases. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 4, p. 917–938, 2017.

BLOUIN, R. A.; WARREN, G. W. Pharmacokinetic considerations in obesity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 1, p. 1–7, 1999a.

BLOUIN, R. A.; WARREN, G. W. January 1999 Pharmacokinetic Considerations in Obesity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 1, p. 1–7, 1999b.

BORGES, G. et al. Absorption, metabolism, distribution and excretion of (–)-epicatechin: A review of recent findings. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 61, p. 18–30, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.002>>.

BOTANICAL GARDEN OF RIO DE JANEIRO. **Passiflora tenuifila Killip**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB12566&action=print>>.

BRAGA, M. F.; BATISTA, A. D.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; VAZ, C. DE F.; SANTOS, E. C. DOS; SANTOS, F. C. Características agronômicas, físicas e químicas de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip.) cultivado no Distrito Federal. In: Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro, IV., Planaltina, DF. **Anais...** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005.

BRAUNE, A.; BLAUT, M. Intestinal bacterium eubacterium cellulosolvens deglycosylates flavonoid c- and o-glucosides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 22, p. 8151–8153, 2012.

BRAUNE, A.; BLAUT, M. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 216–234, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2016.1158395>>.

BRINDANI, N. et al. Synthetic and analytical strategies for the quantification of phenyl-γ-valerolactone conjugated metabolites in human urine. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n. 9, p. 1–12, 2017.

CAO, H. et al. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 214–223, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.012>>.

CARDONA, F. et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 1415–1422, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>>.

CAZARIN, C. B. B. et al. Intake of Passiflora edulis leaf extract improves antioxidant and anti-inflammatory status in rats with 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 575–586, 2015.

CERVI, A. C. Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero Passiflora L., subgênero Passiflora. **Fontqueria**, v. 45, p. 1–92, 1997.

CHEN, H.; SANG, S. Biotransformation of tea polyphenols by gut microbiota. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 26–42, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.013>>.

CHEN, X. et al. Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 6, p. 892–901, 2005.

CHENG, M. et al. The modulatory effect of (-)-epigallocatechin 3-O-(3-O-methyl) gallate (EGCG3"Me) on intestinal microbiota of high fat diet-induced obesity mice model. **Food Research International**, v. 92, p. 9–16, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.008>>.

CHEYMOL, G. Effects of obesity on pharmacokinetics implications for drug therapy. **Clinical pharmacokinetics**, v. 39, n. 3, p. 215–231, 2000.

CONE, E. J. et al. Normalization of urinary drug concentrations with specific gravity and creatinine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 33, p. 1–7, 2009.

CORTÉS-MARTÍN, A. et al. The Human Metabolism of Nuts Proanthocyanidins does not Reveal Urinary Metabolites Consistent with Distinctive Gut Microbiota Metabotypes. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 63, p. 1–10, 2019.

CROZIER, A.; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 446–467, 2010a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.007>>.

CROZIER, A.; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 446–467, 2010b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.007>>.

CYSNE, A. C. et al. **Manual de Exames laboratoriais da red SUS-BH**. Belo Horizonte: Gerência de Comunicação Social Secretaria Municipal de Saúde, 2016.

DARKO, D. et al. Lack of effect of oral vitamin C on blood pressure, oxidative stress and endothelial function in Type II diabetes. **Clinical Science**, v. 103, p. 339–344, 2002.

DAY, A. J. et al. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: The role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 1199–1206, 2003.

DE SALVO, V. L. M.; GIMENO, S. G. A. Reprodutibilidade e validade do questionário de frequência de consumo de alimentos. **Revista de Saude Publica**, v. 36, n. 4, p. 505–512, 2002.

DEL RIO, D. et al. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–1892, 2013.

DEVARAJ, S. et al. Effect of high-dose α -tocopherol supplementation on biomarkers of oxidative stress and inflammation and carotid atherosclerosis in patients with coronary artery disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n. 5, p. 1392–1398, 2009.

DONOVAN, J. L. et al. Absorption and Metabolism of Dietary Plant Secondary Metabolites. In: CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. (Ed.). **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. 1. ed. [s.l.] Blackwell Publishing, 2006. p. 303–351.

DUARTE, G. B. S. et al. Consumption of Brazil nuts with high selenium levels increased inflammation biomarkers in obese women: A randomized controlled trial. **Nutrition**, v. 63–64, p. 162–168, 2019.

DUEÑAS, M. et al. Deglycosylation is a key step in biotransformation and lifespan effects of quercetin-3-O-glucoside in *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacological Research**, v. 76, p. 41–48, 2013.

FALUDI, A. et al. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção

da aterosclerose – 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 2, supl., p. 618–619, 2017.

FANG, J. Some anthocyanins could be efficiently absorbed across the gastrointestinal mucosa: Extensive presystemic metabolism reduces apparent bioavailability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 3904–3911, 2014.

FANG, Y. et al. Structure affinity relationship and docking studies of flavonoids as substrates of multidrug-resistant associated protein 2 (MRP2) in MDCK/MRP2 cells. **Food Chemistry**, v. 291, p. 101–109, 2019.

FARAG, M. a. et al. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of genus *Passiflora* leaves using a multiplex approach of UPLC-MS and NMR analyzed by chemometric tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 12, p. 3125–3143, 2016.

FASANO, A. et al. Zonula occludens toxin modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, in vitro. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 2, p. 710–720, 1995.

FASANO, A. et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. **Lancet**, v. 355, p. 1518–1519, 2000.

FASANO, A. Intestinal Permeability and Its Regulation by Zonulin: Diagnostic and Therapeutic Implications. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, p. 1096–1100, 2012.

FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. L.; COLUCCI, A. C. A. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 617–624, 2009.

FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreterologia**, v. 20, n. 5, p. 199–206, 2013.

GEE, J. M. et al. Intestinal Transport of Quercetin Glycosides in Rats Involves Both Deglycosylation and Interaction with the Hexose Transport Pathway. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 11, p. 2765–2771, 2000.

GELONEZE, B. et al. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population. IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 72, p. 219–220, 2006.

GELONEZE, B. et al. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 2, p. 281–287, 2009.

- GONTHIER, M. P. et al. Metabolism of dietary procyanidins in rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 8, p. 837–844, 2003.
- GORJI, Z. et al. The effect of green-coffee extract supplementation on obesity: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. **Phytomedicine**, v. 63, p. 1–28, 2019.
- GOSS, M. J. et al. Peel flour of *Passiflora edulis* Var. *Flavicarpa* supplementation prevents the insulin resistance and hepatic steatosis induced by low-fructose-diet in young rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 102, p. 848–854, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.137>>.
- GRIMM, T.; SCHÄFER, A.; HÖGGER, P. Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (Pycnogenol). **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 6, p. 811–822, 2004.
- GU, L. et al. Sorghum bran in the diet dose dependently increased the excretion of catechins and microbial-derived phenolic acids in female rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5326–5334, 2007.
- GUERRA, A. et al. Insights about urinary hippuric and citric acid as biomarkers of fruit and vegetable intake in patients with kidney stones: The role of age and sex. **Nutrition**, v. 59, p. 83–89, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.07.112>>.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231–255, 2004.
- HAN, F. et al. Digestion and absorption of red grape and wine anthocyanins through the gastrointestinal tract. **Trends in Food Science and Technology**, v. 83, p. 211–224, 2019.
- HE, J. et al. Stability of black raspberry anthocyanins in the digestive tract lumen and transport efficiency into gastric and small intestinal tissues in the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 3141–3148, 2009.
- HENRY, C. J. et al. Does basal metabolic rate drive eating rate? **Physiology and Behavior**, v. 189, p. 74–77, 2018.
- HOLT, R. R. et al. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 798–804, 2002.
- HOOPER, L. et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: A meta-analysis of randomized controlled trials. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 38–50, 2008.

HOUTTU, N.; MOKKALA, K.; LAITINEN, K. Overweight and obesity status in pregnant women are related to intestinal microbiota and serum metabolic and inflammatory profiles. **Clinical Nutrition**, v. 37, p. 1955–1966, 2018.

HUANG, H.-Y. et al. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 549–555, 2002.

JAGANATH, I. B. et al. 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.

JENSEN, M. D. et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: A report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines and the obesity society. **Circulation**, v. 129, n. 25 PART B, p. S102-138, 2014.

KIM, J. H. et al. Zonulin level, a marker of intestinal permeability, is increased in association with liver enzymes in young adolescents. **Clinica Chimica Acta**, v. 481, p. 218–224, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.03.005>>.

KORB, A. et al. Periodized exercise performed in aquatic or dry land environments improves circulating reactive species and 8-isoprostane levels without any impact on total antioxidant capacity in patients with type 2 diabetes mellitus. **Obesity Medicine**, v. 14, p. 1–6, 2019.

LESLIE, W. D. Estimating Waist and Hip Circumference from Routine Clinical DXA. **Journal of Clinical Densitometry**, p. 1–6, 2019.

LIU, R. H. Health-Promoting Components of Fruits and Vegetables in the Diet. **Advances in Nutrition**, v. 4, p. 384S–392S, 2013.

LLOYD-JONES, D. M. et al. 2017 Focused Update of the 2016 ACC Expert Consensus Decision Pathway on the Role of Non-Statin Therapies for LDL-Cholesterol Lowering in the Management of Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk: A Report of the American College of Cardiology Task Force. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 14, p. 1785–1822, 2017.

LOIS, K.; KUMAR, S. Obesity and diabetes. **Endocrinología y Nutrición**, v. 56, n. Supl 4, p. 38–42, 2009.

MACAGNAN, F. T. et al. Biological properties of apple pomace, orange bagasse and passion fruit peel as alternative sources of dietary fibre. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2015.

MALLERY, S. R. et al. Effects of human oral mucosal tissue, saliva and oral microflora on intraoral metabolism and bioactivation of black raspberry anthocyanins. **Cancer Prevention Research**, v. 4, n. 8, p. 1209–1221, 2011.

MALLMANN, J. P. **Impacto da obesidade na farmacocinática**. 2012. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

MARÍN, L. et al. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–18, 2015.

MARQUES, S. do S. F. et al. Evaluation of the effects of passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* fo. *flavicarpa*) on metabolic changes in HIV patients with lipodystrophy syndrome secondary to antiretroviral therapy. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, p. 420–426, 2016.

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412–419, 1985.

MAYNE, S. T. Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 933S–940S, 2003.

MENA, P. et al. Phenyl- γ -valerolactones and phenylvaleric acids, the main colonic metabolites of flavan-3-ols: Synthesis, analysis, bioavailability, and bioactivity. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 5, p. 714–752, 2019.

MONTUSCHI, P. et al. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 160, p. 216–220, 1999.

MORENO-NAVARRETE, J. M. et al. Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–5, 2012.

MORENO, D. A. et al. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. **Nutrition**, v. 19, p. 876–879, 2003.

MORROW, J. D. et al. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 9383–9387, 1990.

MOSTAFA, S. A. et al. Simulating the impact of targeting lower systolic blood pressure and LDL-cholesterol levels on type 2 diabetes complication rates. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 33, p. 69–74, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2018.09.017>>.

MUROTA, K.; NAKAMURA, Y.; UEHARA, M. Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 600–610, 2018. Disponível em: <<http://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467>>.

NÉMETH, K. et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. **European Journal of Nutrition**, v. 42, p. 29–42, 2003.

NGAMUKOTE, S. et al. Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed. **Molecules**, v. 16, p. 5054–5061, 2011.

NOWSHEHRI, J. A.; BHAT, Z. A.; SHAH, M. Y. Blessings in disguise: Bio-functional benefits of grape seed extracts. **Food Research International**, v. 77, p. 333–348, 2015.

NUNES, M. A. et al. Cardioprotective properties of grape seed proanthocyanidins: An update. **Trends in Food Science and Technology**, v. 57, p. 31–39, 2016.

OTTAVIANI, J. I. et al. The metabolome of [2-¹⁴C](–)-epicatechin in humans: Implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep29034>>.

OU, K. et al. Transport of cranberry A-type procyanidin dimers, trimers, and tetramers across monolayers of human intestinal epithelial caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 1390–1396, 2012.

OU, K.; GU, L. Absorption and metabolism of proanthocyanidins. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 43–53, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.004>>.

PEREIRA-CARO, G. et al. Orange juice (poly)phenols are highly bioavailable in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, p. 1378–1384, 2014.

PETERSON, S. J. et al. Oxidized HDL is a potent inducer of adipogenesis and causes activation of the Ang-II and 20-HETE systems in human obese females. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 123, p. 68–77, 2016.

PIERSE, N. et al. ANALYSIS OF REPEATED CROSS-SECTIONAL SURVEYS, OF PRE-SCHOOL RESPIRATORY SYMPTOMS AND TRAFFIC- RELATED AIR POLLUTION. **Epidemiology**, v. 15, n. 4, p. 65, 2004.

POLLOCK, M. I.; WILMORE, J. H. **Exercícios na saúde e na doença: Avaliação e prescrição para a prevenção e reabilitação**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1993.

PORTO, R. G. C. L. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Genipa Americana L. (Jenipapo) of the Brazilian Cerrado. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**, v. 3, n. 4, p. 1–13, 2014. Disponível em: <<http://jaesnet.com/vol-3-no-4-december-2014-abstract-4-jaes>>.

PRASAIN, J. K.; BARNES, S. Uptake and Metabolism of Dietary

Proanthocyanidins. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R.; ZIBADI, S. (Ed.). **Polyphenols in Human Health and Disease**. 1. ed. [s.l.] Academic Press, 2014. 1p. 553–560.

PRYER, J. A. et al. Who are the “low energy reporters” in the Dietary and Nutritional Survey of British Adults? **International Journal of Epidemiology**, v. 26, n. 1, p. 146–154, 1997.

RAZAVI, S. M. et al. Red grape seed extract improves lipid profiles and decreases oxidized low-density lipoprotein in patients with mild hyperlipidemia. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 3, p. 255–258, 2013.

ROBERTS, L. J. et al. The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, p. 1388–1393, 2007.

ROBERTS, L. J.; MORROW, J. D. Products of the isoprostane pathway: Unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 808–820, 2002.

SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the Passiflora genus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1219–1232, 2012.

SÁNCHEZ-PATÁN, F. et al. Synthesis, analytical features, and biological relevance of 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone, a microbial metabolite derived from the catabolism of dietary flavan-3-ols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 7083–7091, 2011.

SANG, S. et al. Human urinary metabolite profile of tea polyphenols analyzed by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry with data-dependent acquisition. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 1567–1578, 2008.

SAPONE, A. et al. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. **Diabetes**, v. 55, p. 1443–1449, 2006.

SETAYESH, T. et al. Impact of obesity and overweight on DNA stability: Few facts and many hypotheses. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 777, p. 64–91, 2018.

SGAMBATO, M. R.; WAHRLICH, V.; ANJOS, L. A. dos. Validity of basal metabolic rate prediction equations in elderly women living in an urban tropical city of Brazil. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 32, p. 158–164, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2019.03.003>>.

SHAFIEE, M. et al. Grape and grape seed extract capacities at protecting LDL against oxidation generated by Cu²⁺, AAPH or SIN-1 and at decreasing superoxide THP-1 cell production. A comparison to other extracts or

compounds. **Free Radical Research**, v. 37, n. 5, p. 573–584, 2003.

SIALVERA, T. E. et al. Phytosterols supplementation decreases plasma small and dense LDL levels in metabolic syndrome patients on a westernized type diet. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 22, p. 843–848, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2010.12.004>>.

SIRIWARDHANA, N. et al. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 613–623, 2013.

SLATTERY, M. L.; EDWARDS, S. L.; CAAN, B. Low-Energy Reporters: Evaluation of Potential Differential Reporting in Case-Control Studies. **Nutrition and Cancer**, v. 42, n. 2, p. 173–179, 2002.

SOVA, H. et al. Metformin decreases serum 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 2, p. 593–598, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.10.013>>.

SPENCER, J. P. E. et al. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: Gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 3, n. 6, p. 1023–1039, 2001.

STALMACH, A. et al. Bioavailability of C-linked dihydrochalcone and flavanone glucosides in humans following ingestion of unfermented and fermented rooibos teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7104–7111, 2009.

STENMAN, L. K. et al. Probiotic With or Without Fiber Controls Body Fat Mass, Associated With Serum Zonulin, in Overweight and Obese Adults—Randomized Controlled Trial. **EBioMedicine**, v. 13, p. 190–200, 2016.

STOUPPI, S. et al. In vivo bioavailability, absorption, excretion, and pharmacokinetics of [¹⁴C]procyanidin B2 in male rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 2, p. 287–291, 2010a.

STOUPPI, S. et al. A comparison of the in vitro biotransformation of (-)-epicatechin and procyanidin B2 by human faecal microbiota. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, p. 747–759, 2010b.

SUZUKI, T.; HARA, H. Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 5, p. 401–408, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.08.001>>.

TAKAGAKI, A.; NANJO, F. Biotransformation of (-)-epicatechin, (+)-epicatechin, (-)-catechin, and (+)-catechin by intestinal bacteria involved in isoflavone metabolism. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 199–202, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2015.1079480>>.

TASCHEREAU-CHARRON, A. et al. F 2 -isoprostanes and fatty acids profile in early pregnancy complicated by pre-existing diabetes. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 135, p. 115–120, 2018.

TEIXEIRA, T. F. S. et al. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. **Nutrition Research**, v. 32, p. 637–647, 2012.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GIL-IZQUIERDO, A.; MORENO, D. A. Bioavailability and metabolism of phenolic compounds and glucosinolates. In: MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. (Ed.). **Designing Functional Foods: Measuring and Controlling Food Structure Breakdown and Nutrient Absorption**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2009. p. 194–229.

VALLEJO, F. et al. Concentration and solubility of flavanones in orange beverages affect their bioavailability in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6516–6524, 2010.

VAN 'T ERVE, T. J. et al. Classifying oxidative stress by F2-isoprostane levels across human diseases: A meta-analysis. **Redox Biology**, v. 12, p. 582–599, 2017.

VISSCHER, T. L. S. et al. A comparison of body mass index, waist-hip ratio and waist circumference as predictors of all-cause mortality among the elderly: The Rotterdam study. **International Journal of Obesity**, v. 25, p. 1730–1735, 2001.

WANG, W. et al. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 4435–4440, 2000.

WILLIAMSON, M. A.; SNYDER, L. M. **Wallach: Interpretação de exames laboratoriais**. 10. ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

WONG, T. Y. et al. Apigenin and luteolin display differential hypocholesterolemic mechanisms in mice fed a high-fat diet. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1000–1007, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.131>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee**. [s.l.: s.n.]v. 854

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Waist Circumference and Waist-Hip Ratio: Report of a WHO Expert Consultation**. Geneva: World Health Organization, 2011.

XIAO, J. et al. Advance on the Flavonoid C-glycosides and Health Benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. S29–S45, 2016.

XU, C. X. et al. Gender disparity in the associations of overweight/obesity with occupational activity, transport to/from work, leisure-time physical activity, and

leisure-time spent sitting in working adults: A cross-sectional study. **Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 9, p. 401–407, 2017.

YUAN, S. et al. The association of fruit and vegetable consumption with changes in weight and body mass index in Chinese adults: a cohort study. **Public Health**, v. 157, p. 121–126, 2018.

YUMUK, V. et al. European Guidelines for Obesity Management in Adults. **Obesity Facts**, v. 8, p. 402–424, 2015.

ZAMORA-ROS, R. et al. Comparison of 24-h volume and creatinine-corrected total urinary polyphenol as a biomarker of total dietary polyphenols in the Invecchiare InCHIANTI study. **Analytica Chimica Acta**, v. 704, p. 110–115, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.035>>.

ZHANG, Y. et al. Metabolism of flavone C-glucosides and p-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 484–494, 2007.

CARACTERÍSTICAS DA MICROBIOTA INTESTINAL EM INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS E OBESOS APÓS INGESTÃO DO FRUTO DE *P. tenuifila* Killip

1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal refere-se a toda população de microrganismos que reside no intestino, é composta por vírus, protozoários, fungos e principalmente bactérias. Estima-se que em um adulto há 10^{14} de bactérias colonizando o trato gastrointestinal (POSSEMIERS et al., 2011; ANLU et al., 2019). Contudo, elas não estão distribuídas de forma homogênea. A boca abriga uma contagem de 10^8 a 10^{10} UFC de bactéria/ g de saliva. A concentração é reduzida no estômago (10^3 UFC/ g de suco gástrico), no duodeno e jejuno (10^2 - 10^4 UFC/ g de conteúdo e em seguida há um grande aumento no íleo e colón 10^{10} e 10^{14} UFC/g de conteúdo, respectivamente (HAKANSSON; MOLIN, 2011).

Apesar dos elevados números, a diversidade microbiana é limitada. Apenas oito divisões bacterianas foram identificadas até o momento. A microbiota intestinal é dominada pelas *Firmicutes* e *Bacteroidetes* que juntas com a *Actinobacteria*, compreendem mais de 90% das 1000 espécies identificadas (POSSEMIERS et al., 2011; ANLU et al., 2019).

Milhares de anos de coevolução criaram uma dependência mútua e eficaz entre humanos e sua microbiota (GOWD et al., 2019) a ponto de atualmente ser conhecida como um “órgão separado” devido a sua capacidade metabólica cem vezes maior que o fígado (POSSEMIERS et al., 2011). É bem estabelecido que a microbiota tem importante papel na digestão e metabolização de uma gama de compostos químicos o que sugere a atuação em importantes rotas para a saúde como por exemplo, inflamação e função imune (KRANICH; MASLOWSKI; MACKAY, 2011; NASH et al., 2018; LI et al., 2020).

Dessa forma, a alteração da microbiota pode ter grande impacto à saúde do hospedeiro. Pesquisas indicam que há diferenças entre a composição da microbiota do obeso em comparação a do eutrófico (LEY et al., 2005; LEY et al., 2006) e que esta, tem papel na inflamação e no aumento da permeabilidade

intestinal, quadro característico da obesidade (CAO et al., 2019; MONK et al., 2019).

O papel que a microbiota tem no aumento da bioavaliabilidade e da bioeficácia dos compostos fenólicos é bem reconhecido. Mais recentemente, foi descoberta que os substratos fenólicos ingeridos e os produzidos pela microbiota são responsáveis por modular alterações na mesma através de efeitos prebióticos seletivos e de atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas. A essa relação foi dado o nome de “relação de duas vias” onde fica claro a ideia de causa-efeito tanto dos compostos fenólicos sobre a microbiota e vice-versa (CARDONA et al., 2013; NASH et al., 2018).

Estudos *in vitro* e com humanos apontam que a ingestão de compostos fenólicos pode inibir alguns grupos de bactérias enquanto estimula outros (PETERSON et al., 2018; XUE et al., 2019; ZHOU et al., 2020).

Recentemente, estudos demonstraram o impacto de compostos bioativos como fibra, antocianinas e monômeros de flavan-3-ol sobre a ecologia intestinal (DUDA-CHODAK et al., 2015; CHENG et al., 2017; YAN et al., 2018), porém são escassos estudos de intervenção com humanos que avaliam o efeito do consumo de alimentos ricos em proantocianidinas (PAs) sobre a microbiota intestinal.

Diante disso, esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do consumo diário do fruto do maracujá *P. tenuifolia* Killip, rico em fibra e flavonoides, principalmente PAs sobre a composição da microbiota intestinal de indivíduos eutróficos e obesos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A população de estudo e o desenho experimental foram descritos no item 2.2 e 2.3, na seção II em “Efeito do consumo de *Passiflora tenuifolia* Killip em indivíduos eutróficos e obesos e perfil dos metabólitos de fenólicos excretados”.

2.1. Extração de DNA, preparação e sequenciamento da biblioteca de amplicons do gene rRNA 16S

Amostras de fezes foram coletadas através de swab conforme descrito por Christoff et al. (2019a). A extração do DNA foi realizada pela Neoprospecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Brasil), utilizando a plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, Califórnia). A preparação seguiu o protocolo Bacterial NGS Sequence (CHRISTOFF et al., 2017). Em resumo, a região V3/V4 do gene rRNA 16S foi amplificada utilizando os primers 341F (CCTACGGGRSGCA-GCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (WANG; QIAN, 2009; CAPORASO et al., 2012). A amplificação do DNA foi feita por um protocolo de PCR em duas etapas, ambos em triplicata usando Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, EUA) com as seguintes condições para o PCR 1: 95 °C por 5 min, 25 ciclos de 95 °C por 45 seg, 55 °C por 30 seg e 72 °C por 45 seg e uma extensão final de 72 °C por 2 min e para o PCR 2: 95 °C por 5 min, 10 ciclos de 95 °C/45seg, 66 °C por 30s e 72 °C por 45s e uma extensão final de 72 °C por 2 min. O resultado da amplificação foi purificado com AMPureXP beads (Beckman Coulter, Brea, EUA). A preparação da biblioteca (fixação dos adaptadores TruSeq e quantificação de qPCR) foi realizada usando o Protocolo de Preparação de Biblioteca Illumina 16S (Nota Técnica Illumina 15044223 Rev. B). As bibliotecas de rRNA 16S foram sequenciadas usando o MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., EUA) com o kit V2, 300 Cycles, single-end com 300 pb e concentração final de 12 pM, sempre gerando amplificadores de tamanho de 283pb adequados para análise. A cobertura de 50.000 leituras foram definidas para cada amostra sequenciada (CHRISTOFF et al., 2019b).

2.2. Bioinformática

Foi retirado os *barcodes* e as sequência dos primers, em seguida os dados de sequenciamento das amostras foram processados utilizando o software Quantitative Insights on Microbial Ecology (QIIME) (CAPORASO et al., 2010). Inicialmente, foram removidos *reads* menores que 400 pares de bases. Depois quimeras foram analisadas usando usearch61 (EDGAR et al., 2011) e retiradas da biblioteca. As sequencias remanescentes foram agrupadas em OTU's e alinhadas utilizando a biblioteca greengenes (MCDONALD et al., 2012), adotando 99% de similaridade. A abundância relativa das bactérias foi performada principalmente em relação à Filo, Família, Gênero e, quando possível, espécie.

Para calcular a alpha diversidade, utilizou a estimativa de riqueza de Chao1 (CHAO; CHIU, 2005) e os índices de diversidade de Shannon e Simpson (SHANNON, 1948; PYLRO et al., 2014). Para observar as diferenças relacionadas à beta diversidade entre os grupos, foi plotado o gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) baseada nas matrizes de distâncias construídas de diversidade filogenética Weighted e Unweighted-Unifrac (LOZUPONE; KNIGHT, 2005; NAVAS-MOLINA et al., 2015).

2.3. Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software SPSS versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Para verificar diferenças entre os grupos (eutróficos e obesos) e o efeito do consumo do maracujá na composição da microbiota foi utilizado o método generalized estimating equation (GEE) que ao invés de assumir que os dados foram gerados seguindo uma determinada distribuição, analisa o melhor tipo que descreve a relação entre covariáveis e resposta. Quando necessário foi utilizado o *post-hoc* Teste de Múltiplas comparações Sidak, adotando $p < 0,05$ como significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 15, observa-se a grande variabilidade interindividual do perfil de filos encontrado entre os participantes do estudo. Essa grande variabilidade já foi prevista na literatura. Uma das maiores coorte que investiga a composição da microbiota humana encontrou elevada variação no perfil de filo da microbiota intestinal. Analisando amostras de 242 indivíduos saudáveis verificou-se grande variabilidade entre os filos dominantes *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, enquanto outros indivíduos apresentaram elevada abundância de filos como *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* (HUTTENHOWER et al., 2012).

Foram bem descritos na literatura que fatores como idade, perfil de saúde, dieta, gênero e inclusive fatores sociais como nível de escolaridade afetam a composição da microbiota intestinal (HUTTENHOWER et al., 2012; DUDA-CHODAK et al., 2015; SHREINER; KAO; YOUNG, 2015).

A redução do filo *Bacteroidetes* e aumento de *Firmicutes* e, por conseguinte, o aumento da razão de *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) foi encontrado em indivíduos obesos quando comparados aos eutróficos (ANLU et al., 2019). Contudo não foi possível observar um comportamento específico associado aos indivíduos eutróficos e obesos do presente estudo. Como pode ser observado na figura 16, a análise de componentes principais da abundância dos filos não demonstrou uma boa separação entre os grupos obesos e eutróficos. Vale ressaltar que essa alteração na microbiota de indivíduos obesos é acompanhada das alterações metabólicas e das comorbidades associadas ao processo de obesidade (DUDA-CHODAK et al., 2015; DAO; CLÉMENT, 2018), o que necessita de tempo para sua evolução. No presente estudo, foram recrutados indivíduos obesos com bom estado de saúde e ausência de comorbidades o que pode justificar a proximidade do perfil de filos entre as duas populações analisadas.

Assim como o presente estudo, outros apontam que não existe uma assinatura taxonômica clássica associada à obesidade. Em um estudo onde foram utilizados dados do Human Microbiome Project e do MetaHIT além de estudos menores que examinaram a microbiota de obesos e eutróficos, não encontraram associação entre o estado nutricional e o perfil de microbiota nem com o índice *Firmicutes/Bacteroidetes* (FINUCANE et al., 2014)

Figura 15- Variação Interindividual do percentual de filos nos dias 0, 15 e 30 de suplementação de maracujá

Figura 16- Análise de componentes principais dos filos no período basal e dispersão dos indivíduos eutróficos e obesos.

Observando a razão *F/B* (Tabela 6), a população no período basal apresentou em média $6,69 \pm 9,98$ enquanto isolando somente os indivíduos obesos, a razão ficou em média $8,30 \pm 14,26$ não sendo observada diferença estatística ($p=0,38$) entre os indivíduos eutróficos e obesos participantes. Valores próximos aos encontrados para a população obesa estudada foram observados para eutróficos saudáveis. Em um estudo que avaliou a microbiota de 154 adolescentes e adultos americanos observaram razão *F/B* de 7,30 para os indivíduos eutróficos (TURNBAUGH et al., 2009).

Quanto ao perfil de filos encontrados na microbiota intestinal (Figura 17a), observa-se que os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram os majoritários, juntos representaram 94% do total. Dentre os filos minoritários, *Actinobacteria* representou 3% seguido por *Proteobacteria* e *Tenericutes*. Filos como *Thermi*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *TM6* e *TM7* somados, representaram somente 0,14% do total.

A grande abundância dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* está bem caracterizada na literatura em diferentes populações (FRANK et al., 2007; CHANG et al., 2015; RUENGSSOMWONG et al., 2016). Em um estudo onde caracterizou a microbiota de 20 coreanos saudáveis, os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* representaram 94,8% do total. Para indivíduos japoneses, a participação dos dois filos é menor (85%), porém, ainda muito significativa (NAM et al., 2011; KASAI et al., 2015). A população do presente estudo apresentou maior proporção de *Firmicutes* que os 61% registrados para indivíduos americanos (NAM et al., 2011).

A figura 17b mostra as onze famílias mais abundantes. Destas, seis são do filo *Firmicutes*: *Lactobacillaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Christensenellaceae* e a mais abundante a *Ruminococcaceae* com 48% do total. As famílias *Bacteroidaceae*, *Porphyrococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae* representantes do filo *Bacteroidetes*, somadas apresentaram 20% da abundância. A *Bifidobacteriaceae* foi a única representante das *Actinobacteria* dentre as majoritárias. Famílias com abundância relativa $\leq 0,1\%$ representaram 7% do total.

Tabela 6- Perfil de filos nos dias 0, 15 e 30 de suplementação de maracujá ^a.

FILO	0d	15d			30d		
	Média±DP (Min-Máx)	Média±DP (Min-Máx)	W	P ^a	Média±DP (Min-Máx)	W	P
Actinobacteria	3,02±3,92 (0,10-21,40)	2,71±2,63 (0,13-12,50)	1,289	0,256	2,50±2,79 (0,13-11,73)	15,06 0	0,000 *
Bacteroidetes	19,60±11,71 (1,40-55,84)	19,70±10,14 (4,61-39,61)	2,644	0,104	20,06±10,97 (1,67-53,54)	1,704	0,192
Firmicutes	73,94±11,68 (40,99-90,67)	73,64±9,65 (53,23-87,17)	5,363	0,021 *	73,01±11,84 (37,00-89,42)	7,925	0,005 *
Proteobacteria	2,18±3,09 (0,07-19,75)	2,66±4,59 (0,34-29,08)	0,200	0,655	3,35±7,31 (0,14-42,25)	6,503	0,011 *
Tenericutes	0,39±0,46 (0,00-1,48)	0,60±0,88 (0,00-3,56)	4,127	0,042 *	0,38±0,51 (0,00-2,32)	6,987	0,008 *
Verrucomicrobia	0,73±1,45 (0,00-7,15)	0,56±0,93 (0,00-4,05)	6,541	0,011 *	0,49±1,07 (0,00-5,53)	0,104	0,747
Outros	0,14±0,24 (0,00-1,18)	0,13±0,22 (0,00-1,22)	0,141	0,707	0,21±0,50 (0,00-2,72)	4,655	0,031 *
Razão F/B	6,69±9,98 (1,00-64,82)	5,65±4,49 (1,35-18,82)	2,14	0,143	4,92±3,58 (0,69-19,78)	2,99	0,084

^a Teste de Múltiplas comparações Sidak; * p≤0.05.

Figura 17- Abundância relativa dos filos(A), famílias (B) e gêneros (C) no período basal

Ao nível gênero, a maior parte das sequências foram distribuídas em 16 gêneros (Figura 17c). Nove destes são pertencentes ao filo *Firmicutes* (*Blautia*, *Coprococcus*, *Dialister*, *Dorea*, *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Oscillospira*, *Roseburia*, *Ruminococcus*), um ao filo *Verrucomicrobia* (*Akkermansia*), dois *Bacteroidetes* (*Parabacteroides*, *Prevotella*) e dois *Proteobacteria* (*Sutterella*, *Succinivibrio*). O gênero mais abundante na população pesquisada foi o *Faecalibacterium* com 23% da abundância total, valores menores foram observados para a população americana (9,4%), chinesa (8,3%), japonesa (5,9%) e coreana (11,6%) (NAM et al., 2011).

Para avaliar o efeito do consumo do fruto *P. tenuifolia* Killip foi utilizado o teste generalised estimating equation (GEE) que adota o melhor tipo de distribuição que descreve as respostas, característica favorável para análise estatística de dados não-paramétricos.

A análise estatística foi realizada levando em consideração o IMC e a idade dos participantes, assumindo-as como covariáveis. É bem relatado na literatura o impacto dessas variáveis sobre o perfil da microbiota. A redução da abundância de *Ruminococcus* e *Blautia spp.* e o aumento do número de *Escherichia* foi observado por exemplo em indivíduos mais velhos quando comparados aos mais jovens (JEFFERY; O'TOOLE, 2013), enquanto crianças obesas apresentaram a microbiota dominada por *Prevotella spp.* contrapondo-se a elevada proporção de *Ruminococcus spp.* em crianças com menores IMC (MAYA-LUCAS et al., 2019).

Observa-se que o consumo do fruto *P. tenuifolia* Killip reduziu significativamente a abundância do filo *Firmicutes* ao longo do tempo (Tabela 6). O mesmo aconteceu com *Actinobacteria* após 30 dias de consumo do maracujá. Em contrapartida houve aumento de *Proteobacteria* e de filos com menores representatividade (outros).

Na figura 18, é possível acompanhar o efeito do consumo do maracujá ao longo do tempo. Calculando o delta da abundância entre o dia basal (0d) e os dias 15 e 30 de consumo de maracujá, verifica-se a redução do primeiro e segundo quartil (que correspondem aos indivíduos com redução da abundância) e o aumento do terceiro e quarto quartil. O mesmo comportamento foi verificado para os filos com diferença estatística (*Proteobacteria* e outros). Em

contrapartida a figura 18 demonstra também o aumento do primeiro e segundo quartis dos filós *Firmicutes* e *Actinobacteria*.

Figura 18- Variação de filós entre os dias 0d-15d e 0d-30d de suplementação de maracujá.

Comportamento parecido foi descrito na literatura, onde foram verificadas a estabilidade da microbiota de 37 indivíduos ao longo do tempo e verificaram que o filo *Bacteroidetes* foi significativamente mais estável enquanto *Firmicutes* e *Proteobacterias* foram significativamente menos estáveis (FAITH et al., 2013).

O efeito do consumo do fruto *P. tenuifila* Killip pode ser resumido na redução da abundância de *Firmicutes* e aumento da população de bactérias de outros filos que compõem a microbiota. Apesar da redução de *Firmicutes* em detrimento de outros filos, não houve redução significativa na razão *F/B* (Tabela 6).

Dentre as famílias o consumo de maracujá aumentou a abundância de *Lachnospiraceae* (Tabela 7). Em uma revisão sobre Doença Inflamatória Intestinal (DII), essa família teve a redução associada como um importante biomarcador para desenvolvimento da DII (BERRY; REINISCH, 2013).

De fato, o aumento de *Lachnospiraceae* foi observado em um estudo que mapeou a microbiota de crianças com DII em estado de remissão (PAPA et al., 2012) enquanto outra pesquisa apontou a redução da concentração nas fezes de pacientes portadores de Doença de Crohn quando comparado à indivíduos saudáveis (KANG et al., 2010). Dessa forma o aumento da abundância dessa família pode estar associado à diminuição do estado inflamatório intestinal, condição também associada à obesidade. Vale destacar também que bactérias dessa família são produtoras de butirato, um dos principais ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos a partir da fermentação da microbiota intestinal e que possui relação com a redução de doenças crônicas (PRASAD; BONDY, 2019). Observa-se também redução de outra família produtora de AGCC, a *Bifidobacteriaceae*, contudo, a participação dessa família sobre a abundância total é pequena em todos os tempos avaliados.

Analisando o nível gênero (Tabela 8) verifica-se que a tendência de aumento de *Lachnospira*, em específico, foi o responsável pela maior abundância da família *Lachnospiraceae*. O consumo de *P. tenuifila* Killip não foi capaz de aumentar a população de gêneros reconhecidos como anti-obesogênicos (CAO et al., 2019) como *Akkermansia* e *Bifidobacterium*. Vale ressaltar que a abundância desses gêneros na população analisada já são maiores que os referenciados para população saudável chinesa (0,2%; 1,8%) e americana (1,4%; 0,6%, respectivamente) (NAM et al., 2011)

Tabela 7- Perfil de Família nos dias 0, 15 e 30 de suplementação de maracujá ^a.

FAMÍLIA	0d	15d			30d		
	Média±DP (Min-Máx)	Média±DP (Min-Máx)	W	P ^a	Média±DP (Min-Máx)	W	P
Bacteroidaceae	13,67±11,18 (1,11-48,39)	13,68±10,59 (0,82-38,78)	2,456	0,117	13,03±10,51 (0,90-45,96)	2,376	0,123
Bifidobacteriaceae	2,63±4,08 (0,01-21,66)	2,36±2,76 (0,05-12,92)	1,990	0,158	2,20±2,84 (0,00-12,27)	20,68 0	0,000 *
Christensenellaceae	2,05±4,42 (0,02-27,73)	2,47±3,41 (0,02-13,43)	0,280	0,597	1,75±3,60 (0,00-21,31)	0,049	0,825
Clostridiaceae	1,16±1,30 (0,12-8,32)	1,34±1,18 (0,08-5,89)	1,481	0,224	1,12±0,98 (0,17-5,16)	0,109	0,741
Erysipelotrichaceae	2,23±3,49 (0,05-17,17)	1,90±2,22 (0,06-7,90)	-	-	1,90±2,75 (0,06-12,36)	-	-
Lachnospiraceae	18,13±10,99 (5,18-51,67)	18,28±9,03 (6,58-44,14)	2,683	0,101	20,16±8,97 (6,65-43,64)	4,089	0,043 *
Lactobacillaceae	0,30±0,75 (0,00-3,68)	0,25±0,92 (0,00-5,79)	2,486	0,115	0,17±0,53 (0,00-2,40)	3,472	0,062
Porphyromonadaceae	1,41±1,74 (0,00-9,73)	1,24±1,09 (0,01-5,11)	0,299	0,585	1,23±1,21 (0,04-6,54)	2,155	0,142
Prevotellaceae	3,13±5,85 (0,01-23,08)	3,97±7,74 (0,01-30,22)	0,303	0,582	4,96±8,98 (0,00-35,97)	0,414	0,520
Rikenellaceae	1,93±1,69 (0,04-6,50)	1,77±1,44 (0,02-6,18)	0,151	0,698	1,75±1,46 (0,02-5,93)	0,369	0,543
Ruminococcaceae	46,80±11,51 (22,97-69,47)	46,39±10,25 (26,19-66,97)	3,400	0,065 *	45,33±12,25 (10,48-68,98)	2,688	0,101
Outros	6,88±3,67 (1,67-16,96)	6,66±3,49 (0,84-19,59)	2,119	0,145	6,50±3,59 (1,68-16,66)	0,259	0,611

^a Teste de Múltiplas comparações Sidak; * p≤0.05.

Tabela 8- Perfil de Gênero nos dias 0, 15 e 30 de suplementação de maracujá ^a.

GÊNERO	0d		15d		30d	
	Média±DP (Min-Máx)	Média±DP (Min-Máx)	W	P ^a	Média±DP (Min-Máx)	W P
Ruminococcus	1,75±2,41 (0,04-12,96)	1,34±1,31 (0,10-4,33)	0,736	0,391	1,33±1,81 (0,12-7,68)	0,001 0,970
Akkermansia	2,41±4,72 (0,00-23,85)	1,80±3,35 (0,00-17,45)	7,531	0,006 *	1,43±3,00 (0,00-12,88)	0,945 0,331
Bifidobacterium	6,08±8,68 (0,01-43,14)	5,79±6,37 (0,16-22,68)	1,970	0,160	4,65±6,00 (0,01-28,53)	2,085 0,149
Blautia	4,03±4,87 (0,71-26,02)	3,12±2,40 (0,49-12,14)	0,007	0,934	3,79±4,80 (0,65-27,01)	3,945 0,047 *
Coprococcus	3,77±3,51 (0,15-19,15)	4,55±3,80 (0,18-14,26)	0,976	0,323	5,06±4,93 (0,05-21,81)	2,228 0,136
Dialister	5,42±6,40 (0,00-26,10)	4,37±5,88 (0,01-26,84)	0,624	0,429	4,30±4,78 (0,00-17,21)	0,130 0,719
Dorea	1,68±1,23 (0,24-5,30)	1,71±1,35 (0,22-6,17)	0,106	0,744	1,42±1,05 (0,19-4,48)	0,127 0,721
Faecalibacterium	22,31±12,83 (1,31-52,90)	22,07±9,81 (2,71-44,13)	1,056	0,304	22,61±11,38 (0,22-47,60)	2,187 0,139
Lachnospira	2,25±4,09 (0,00-23,50)	3,36±5,57 (0,11-33,76)	7,440	0,006 *	3,97±4,98 (0,04-19,70)	0,089 0,766
Oscillospira	3,56±2,50 (0,25-10,60)	3,98±2,42 (0,09-9,08)	3,462	0,063	3,73±2,70 (0,34-10,45)	0,217 0,642
Parabacteroides	3,94±5,22 (0,00-31,13)	2,99±2,55 (0,02-9,64)	0,163	0,687	2,88±3,30 (0,08-19,37)	5,241 0,022 *
Prevotella_A	5,67±9,79 (0,02-38,59)	6,26±10,62 (0,03-39,65)	6,324	0,012 *	7,77±13,39 (0,01-60,11)	2,796 0,095

GÊNERO	0d		15d		30d		
	Média±DP (Min-Máx)	Média±DP (Min-Máx)	W	P^a	Média±DP (Min-Máx)	W	P
Roseburia	3,37±4,03 (0,02-16,20)	3,86±5,22 (0,13-21,60)	6,750	0,009 *	3,86±5,34 (0,10-26,53)	0,001	0,982
Sutterella	1,05±1,05 (0,00-4,55)	1,29±1,73 (0,00-8,06)	0,497	0,481	1,67±1,50 (0,00-6,40)	0,296	0,586
Succinivibrio	1,01±5,24 (0,00-32,92)	1,49±7,40 (0,00-46,36)	17,03 3	0,000 *	2,43±10,58 (0,00-57,54)	2,717	0,099
Outros	14,99±7,64 (3,04-32,85)	14,66±7,57 (2,84-33,96)	0,246	0,620	13,57±9,70 (3,43-51,83)	0,815	0,367

^a Teste de Múltiplas comparações Sidak; * p≤0.05.

Analisando o perfil de microbiota dos indivíduos participantes, foram identificados uma família (*Lachnospiraceae*), dois gêneros (*Eggertella*, *Blautia*) e sete espécies (*Bacteroides uniformis*, *Clostridium butyricum*, *Eggerthella lenta*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium adolescentes*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterobacter cloacae*) com importância reconhecida na metabolização de flavonoides das classes flavonas e flavan-3-ol e seus polímeros.

Desse total, a família *Lachnospiraceae* aumentou 11,2% sua abundância entre o período basal e 30 dias de consumo, enquanto o gênero *Blautia* aumentou em média 18,6% nos indivíduos eutróficos. Espécies da família *Lachnospiraceae* apresentam enzimas capazes de quebrar C-glicosilação de flavonas (BRAUNE; BLAUT, 2016), classe de flavonas encontrada principalmente em espécies de maracujá (SAKALEM; NEGRI; TABACH, 2012).

Para analisar a alpha diversidade foi calculado os índices Chao1, Shannon e Simpsom além de avaliar o total de unidades taxonômicas operacionais (OTU's) e a diversidade filogenética.

Não foi observada diferença significativa na alpha diversidade entre os indivíduos eutróficos e obesos em todos os parâmetros analisados. É esperado que a obesidade esteja associada com menores valores de alpha diversidade. Em um estudo que avaliou a microbiota de 633 eutróficos e 494 obesos alemães foi verificado menores taxas de diversidade filogenética para a segunda população (THINGHOLM et al., 2019). De fato, a partir de uma metanálise que investigou a relação entre obesidade e microbiota, apontou que o índice de Shannon e o número de OTU's observadas apresentaram consistente correlação com a obesidade (SZE; SCHLOSS, 2016).

A não observância de diferença estatística entre os indivíduos eutróficos e obesos analisados, corrobora com os dados encontrados para a abundância relativa. Ambos indicaram que a população obesa estudada apresenta perfil de microbiota similar aos eutróficos.

Avaliando o efeito do consumo de *P. tenuifila* Killip observa-se aumento significativo ($p < 0,05$) nos cinco índices analisados para 15 dias e uma tendência na manutenção do aumento após 30 dias de consumo de *P. tenuifila* Killip. Quando analisa a alpha diversidade separado por grupo (Tabela 9) verifica-se que o aumento ocorreu entre os indivíduos eutróficos.

Tabela 9–Índice de alpha diversidade entre os dias 0, 15 e 30 de suplementação de maracujá, separados por grupo*.

Alpha diversidade	Eutrófico						Obeso				
	0d	15d		30d			0d	15d		30d	
	Média±DP (Min-Máx)	Média±DP (Min-Máx)	<i>p</i>	Média±DP (Min-Máx)	<i>p</i>		Média±DP (Min-Máx)	Média±DP (Min-Máx)	<i>p</i>	Média±DP (Min-Máx)	<i>p</i>
Chao1	13402,87± 5384,77 (1740,09- 21250,10)	15810,02± 4321,99 (4524,46- 22313,00)	0,0 13 *	14874,87± 6204,63 (4216,04- 23572,21)	0,2 99		12538,48± 3717,84 (6003,23- 18658,56)	13448,96± 4449,63 (6160,65- 21056,42)	0,3 50	13693,43± 4352,07 (5164,21- 20148,90)	0,8 97
Simpson	0,98±0,01 (0,97-0,99)	0,98±0,01 (0,97-0,99)	0,0 10 *	0,98±0,01 (0,95-0,99)	0,7 24		0,98±0,01 (0,97-0,99)	0,98±0,01 (0,96-0,99)	0,0 63	0,98±0,01 (0,95-0,99)	0,9 36
Shannon	5,65±0,49 (4,51-6,42)	5,89±0,40 (5,02-6,67)	0,0 04 *	5,78±0,50 (4,70-6,49)	0,2 96		5,56±0,41 (4,91-6,30)	5,59±0,39 (4,83-6,25)	0,0 69	5,62±0,45 (4,75-6,15)	0,6 79
OTU's observadas	7815,47±3 451,19 (843,00- 13047,00)	9430,56±3 150,66 (2030,00- 14786,00)	0,0 16 *	8468,44±3 950,36 (2064,00- 14927,00)	0,5 07		6829,52±2 194,60 (2946,00- 10961,00)	7399,77±2 822,65 (2948,00- 14343,00)	0,3 53	7738,85±2 723,31 (2884,00- 12840,00)	0,7 71
Diversidade filogenética	179,61±87 ,91 (22,18- 311,83)	223,13±85 ,45 (36,69- 383,79)	0,0 01 *	196,90±99 ,97 (39,84- 373,07)	0,4 20		156,03±54 ,58 (66,05- 239,06)	170,51±62 ,82 (83,37- 300,73)	0,1 99	172,34±62 ,13 (48,74- 285,24)	0,9 57

A análise da beta diversidade pode ser observada na figura 19 onde encontra-se a PCoA construída a partir das matrizes de distancias Unifrac “weight” (que considera a abundância das espécies observadas na distribuição espacial) e “unweight” (que adicionalmente considera a presença ou ausência de espécies) (LOZUPONE et al., 2007; CORTEZ et al., 2019).

Após comparar o índice de beta diversidade dos grupos ao longo da intervenção observou-se que o consumo de *P. tenuifila* Killip não alterou seus valores, observando $p > 0,05$ tanto para Unifrac “weight” como para “unweight”

Figura 19 - Índice de beta diversidade entre os dias 0, 15 e 30 de suplementação de maracujá, separados por eutróficos (A) e obesos (B)*.

* PERMANOVA, $p \leq 0.05$.

4. CONCLUSÃO

O perfil da microbiota dos indivíduos eutróficos e obesos avaliado no presente estudo foram similares o que reforça a inexistência de um perfil de microbiota clássico para os obesos. A disbiose comumente associada à obesidade, na verdade, está relacionada a um conjunto de situações que envolve presença de comorbidades e alterações metabólicas, sendo, portanto, necessário tempo para seu estabelecimento.

A ingestão do fruto de maracujá (*P. tenuifila* Killip) durante 30 dias foi capaz de modular a microbiota de indivíduos eutróficos e obesos inclusive no nível filo, reduzindo a abundância de *Firmicutes* em detrimento do aumento significativo de outros filos. Essa redução, porém, não foi suficiente para diminuir a razão *Firmicutes/Bacteroidetes*.

A ingestão de *P. tenuifila* Killip foi responsável pelo aumento de bactérias da família *Lachnospiraceae* as quais estão associadas à redução da inflamação local e síntese de ácidos graxos de cadeia curta. Avaliando o perfil da microbiota responsável pela metabolização de compostos fenólicos como flavonas C-glicosiladas, flavan-3-ol e PAs, classes com metabolização quase exclusivamente dependente da fermentação bacteriana intestinal, verificou-se que o consumo do fruto teve impacto positivo na família e gênero capazes de metabolizar essas classes de flavonoides.

Referências bibliográficas

ANLU, W. et al. Using herbal medicine to target the “microbiota-metabolism-immunity” axis as possible therapy for cardiovascular disease.

Pharmacological Research, v. 142, p. 205–222, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.02.018>>.

BERRY, D.; REINISCH, W. Intestinal microbiota: A source of novel biomarkers in inflammatory bowel diseases? **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, p. 47–58, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.005>>.

BRAUNE, A.; BLAUT, M. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 216–234, 2016.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2016.1158395>>.

CAO, S.-Y. et al. Dietary plants, gut microbiota, and obesity: Effects and mechanisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 92, p. 194–204, 2019.

CAPORASO, J. G. et al. CORRESPONDENCE QIIME allows analysis of high-Intensity normalization improves color. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 336–337, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth0510-335>>.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, p. 1621–1624, 2012.

CARDONA, F. et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 1415–1422, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>>.

CHANG, X. et al. Protective effect of apigenin on Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats via inhibiting P2X7/NF- κ B pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 236, p. 41–46, 2015. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000927971500191X>>.

CHAO, A.; CHIU, C.-H. Species Richness: Estimation and Comparison. In: KOTZ, S. et al. (Ed.). **Encyclopedia of Statistical Sciences**. [s.l.] Wiley Online Library, 2005. p. 7909–7916.

CHENG, M. et al. The modulatory effect of (-)-epigallocatechin 3-O-(3-O-methyl) gallate (EGCG3"Me) on intestinal microbiota of high fat diet-induced obesity mice model. **Food Research International**, v. 92, p. 9–16, 2017.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.008>>.

CHRISTOFF, A. P. et al. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. **Neoprosperta Microbiome Technologies**, n. May 2017, p. 1–5, 2017.

CHRISTOFF, A. P. et al. NeoSampleZ : coleta e transporte de amostras de fezes em. **Neoprosecta Microbiome Technologies**, v. 1, p. 1–4, 2019a.

CHRISTOFF, A. P. et al. End-to-end assessment of fecal bacteriome analysis: from sample processing to DNA sequencing and bioinformatics results.

bioRxiv, p. 1–22, 2019b. Disponível em:

<<http://biorxiv.org/content/early/2019/05/24/646349.abstract>>.

CORTEZ, R. V. et al. Microbiome and its relation to gestational diabetes.

Endocrine, v. 64, p. 254–264, 2019.

DAO, M. C.; CLÉMENT, K. Gut microbiota and obesity: Concepts relevant to clinical care. **European Journal of Internal Medicine**, v. 48, p. 18–24, 2018.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.10.005>>.

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

EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194–2200, 2011.

FAITH, J. J. et al. The long-term stability of the human gut microbiota. **Science**, v. 341, p. 44–54, 2013.

FINUCANE, M. M. et al. A taxonomic signature of obesity in the microbiome? Getting to the guts of the matter. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–5, 2014.

FRANK, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 34, p. 13780–13785, 2007.

GOWD, V. et al. Dietary polyphenols to combat the metabolic diseases via altering gut microbiota. **Trends in Food Science & Technology**, v. 93, p. 81–93, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.005>>.

HAKANSSON, A.; MOLIN, G. Gut microbiota and inflammation. **Nutrients**, v. 3, p. 637–687, 2011.

HUTTENHOWER, C. et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, p. 207–214, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nature11234>>.

JEFFERY, I. B.; O'TOOLE, P. W. Diet-microbiota interactions and their implications for healthy living. **Nutrients**, v. 5, n. 1, p. 234–252, 2013.

KANG, S. et al. Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 16, n. 12, p. 2034–2042, 2010.

KASAI, C. et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. **BMC Gastroenterology**, v. 15, p. 1–10, 2015.

KRANICH, J.; MASLOWSKI, K. M.; MACKAY, C. R. Commensal flora and the regulation of inflammatory and autoimmune responses. **Seminars in Immunology**, v. 23, p. 139–145, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2011.01.011>>.

LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **PNAS**, v. 102, n. 31, p. 11070–11075, 2005.

LEY, R. E. et al. Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, p. 1022–1023, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v444/n7122/abs/4441021a.html>>.

LI, F. et al. Inflammation inhibition and gut microbiota regulation by TSG to combat atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 247, p. 1–10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112232>>.

LOZUPONE, C. A. et al. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1576–1585, 2007.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228–8235, 2005.

MAYA-LUCAS, O. et al. The gut microbiome of Mexican children affected by obesity. **Anaerobe**, v. 55, p. 11–23, 2019.

MCDONALD, D. et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **ISME Journal**, v. 6, p. 610–618, 2012.

MONK, J. M. et al. Navy bean supplemented high-fat diet improves intestinal health, epithelial barrier integrity and critical aspects of the obese inflammatory phenotype. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 70, p. 91–104, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.04.009>>.

NAM, Y. Do et al. Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1–15, 2011.

NASH, V. et al. The effects of grape and red wine polyphenols on gut microbiota – A systematic review. **Food Research International**, v. 113, p. 277–287, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.019>>.

NAVAS-MOLINA, J. A. et al. Advancing our understanding of the human

microbiome using QIIME. **Methods in Enzymology**, v. 531, p. 531–371, 2015.

PAPA, E. et al. Non-invasive mapping of the gastrointestinal microbiota identifies children with inflammatory bowel disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–12, 2012.

PETERSON, C. T. et al. Effects of Turmeric and Curcumin Dietary Supplementation on Human Gut Microbiota: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study. **Journal of Evidence-Based Integrative Medicine**, v. 23, p. 1–8, 2018.

POSSEMIERS, S. et al. The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. **Fitoterapia**, v. 82, p. 53–66, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.012>>.

PRASAD, K. N.; BONDY, S. C. Dietary fibers and their fermented short-chain fatty acids in prevention of human diseases. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 17, p. 1–5, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2018.09.001>>.

PYLRO, V. S. et al. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 30–37, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.018>>.

RUENG SOMWONG, S. et al. Microbial community of healthy Thai vegetarians and non-vegetarians, their core gut microbiota and pathogen risk. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1723–1735, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27381339>>.

SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. **Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the Passiflora genus**. 2012. 22 2012.

SHANNON, C. E. “A Mathematical Theory of Communication”. **The Bell System Technical Journal**, v. 27, p. 379–423, 1948.

SHREINER, A. B.; KAO, J. Y.; YOUNG, V. B. The gut microbiome in health and disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 31, n. 1, p. 69–75, 2015.

SZE, M. A.; SCHLOSS, P. D. Looking for a Signal in the Noise: Revisiting and the Microbiome. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 1–10, 2016.

THINGHOLM, L. B. et al. Obese Individuals with and without Type 2 Diabetes Show Different Gut Microbial Functional Capacity and Composition. **Cell Host & Microbe**, v. 26, p. 1–13, 2019.

TURNBAUGH, P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, p. 480–484, 2009. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nature07540>>.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. 1–9, 2009.

XUE, M. et al. Propolis modulates the gut microbiota and improves the intestinal mucosal barrier function in diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 1–13, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109393>>.

YAN, Y. et al. Effects of anthocyanins from the fruit of *Lycium ruthenicum* Murray on intestinal microbiota. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 533–541, 2018.

ZHOU, L. et al. Antioxidant activity of high purity blueberry anthocyanins and the effects on human intestinal microbiota. **LWT - Food Science and Technology**, v. 117, p. 1–12, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108621>>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização dos compostos bioativos de frutas nativas é uma forma de prospectar novas fontes de compostos benéficos à saúde. O maracujá *P. tenuifila* Killip, espécie nativa do cerrado brasileiro com pouco apelo comercial e consumido somente pela população local, é rico em fibra insolúvel além de apresentar elevada concentração de compostos fenólicos, principalmente da classe flavon-3-ol e seus polímeros, também conhecidos como proantocianidinas. Vale destacar que essa classe de flavonoide é bastante atípica no perfil das espécies de maracujá (*Passiflora* spp.), demonstrando ser um grande diferencial para a *P. tenuifila* Killip.

A ingestão diária por somente 30 dias de uma porção equivalente a três frutos por indivíduos com peso adequado e obesos, demonstrou grandes benefícios à saúde. O consumo da *P. tenuifila* Killip, mesmo sem alteração na composição da dieta e nem aumento da atividade física, foi responsável pela redução da concentração de colesterol total e LDL sérico dos indivíduos obesos, tendo consequências positivas para a qualidade de vida dos mesmos.

Foi observado ainda tendência na redução de um importante biomarcador de permeabilidade intestinal, o que está associado na literatura à redução do processo inflamatório, quadro que acompanha, por exemplo, a obesidade. Além disso, houve redução significativa no biomarcador do estresse oxidativo que está associado à dano da estrutura do DNA e por conseguinte, a mutações.

O consumo do maracujá *P. tenuifila* Killip aumentou a excreção de metabólitos na urina produzidos a partir da metabolização de flavonas-C-glicosiladas e flavan-3-ol. Foi observado nesse sentido a grande participação da microbiota intestinal no aumento da bioavaliabilidade desses compostos. Vale destacar que a avaliação do metabolismo de compostos fenólicos por indivíduos obesos é escassa na literatura, sendo um grande diferencial do presente estudo. Foi observado que indivíduos obesos apresentaram aumento na concentração de metabólitos de fase II de ácidos fenólicos, principalmente derivados do ácido benzoico enquanto o mesmo não foi observado para a população eutrófica, demonstrando assim a importância de verificar o impacto da obesidade sobre a absorção de compostos fenólicos.

Por fim, a ingestão do maracujá *P. tenuifolia* Killip foi capaz de modular a microbiota reduzindo a abundância relativa de filos associados a obesidade e aumentando a proporção de família associada a redução de inflamação local e ao metabolismo de compostos fenólicos.

Esses resultados demonstram que pequenas alterações no perfil da ingestão alimentar, como por exemplo, a adição de uma pequena porção de fonte de compostos bioativos, podem apresentar grande impacto positivo à saúde.

Anexos

Anexo I - Procedimento Operacional Padronizado para o preparo da farinha liofilizada de maracujá-alho, fornecido pela Sublimar Produtos Liofilizado.

Sublimar Produtos Liofilizados

Documento Nº: POSAL052

SISTEMA DE QUALIDADE

Rev:01

Página 1 de 1

20/10/2016

PROCEDIMENTO OPERACIONAL

Procedimento Operacional Padronizado – Maracujá

Ingredientes:

- Maracujá;
- Start Clor.

Utensílios:

- Balde;
- Escova;
- Tábua;
- Faca;
- Espátula;
- Liquidificador
- Bandejas.

Modo de preparo:

- Lavar os maracujás em água corrente com o auxílio de uma escova;
- Deixar os maracujás inteiramente imersos em solução clorada 0,5% por 15 minutos;
- Lavar novamente os maracujás em água corrente para retirada de sujidades e de cloro;
- Retirar com o auxílio de uma faca as partes impróprias do fruto;
- Cortar o maracujá em formas de cubos;
- Com o auxílio de uma espátula colocar em liquidificador e triturar;
- Acomodar em bandejas de inox; e
- Congelar em freezer por 24 horas e liofilizar em seguida.

Anexo II - Espectro de massa dos flavonoides minoritários identificados por LC-ESI-MS em frutos de maracujá-alho.

Pico 1 - pinocebrina glucuronideo ($T_r = 9,1$ min)

Pico 5 - taxifolina-7-*O*-glucosideo ($T_r = 11,2$ min)

Pico 6 - taxifolina-7-*O*-glucosideo ($T_r = 11,6$ min)

Pico 9 - 5-hidroxi-3,4'-trimetoxi-flavona ($T_r = 16,0$ min)

Pico 14 - taxifolina ($T_r = 21,0$ min)

Pico 15 - procianidina digallato do tipo A ($T_r = 23,7$ min)

Anexo III - Espectro de massa das PAs de frutos *P. tenuifila* por LC-ESI-MS através do método de catálise ácida na presença de fluroglucinol

1. Aduto (Epi)galocatequina Pico #1

2. Aduto (Epi)galocatequina Pico #1

3. (Epi)galocatequina

4. Aduto (Epi)catequina aduct Pico #1

5. (Epi)catequina

6. Aduto (Epi)catequina aduct Pico #2

7. Aduto (Epi)catequina aduct Pico #3

Anexo IV – Parecer consubstanciado do CEP, aprovando o experimento em humanos

USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Investigação metabólica da ingestão de maracujá (*Passiflora tenuifolia*)

Pesquisador: Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 57619616.4.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.058.256

Apresentação do Projeto:

O consumo de frutas está associado à redução do risco de inúmeras doenças crônicas por serem ricas em compostos bioativos como os polifenóis. Recentemente, estudos tem dado ênfase na investigação desses compostos nos subprodutos vegetais, tais como casca, semente e bagaço, onde por vezes encontram-se maiores quantidades que nas partes comestíveis. No caso da semente de maracujá (*Passiflora setacea*) já foi demonstrado efeito cicatrizante e anti-inflamatório associados aos compostos fitoquímicos presentes, como por exemplo, os flavonoides. Contudo para alcançar o efeito biológico esperado em tecidos ou órgão específico, os polifenóis devem estar livres da matriz alimentar e disponíveis na circulação sistêmica após a absorção no sistema digestório, estando dessa forma, susceptíveis a condições que podem afetar sua estabilidade, biodisponibilidade e bioatividade. Somado a isso, devido à ação dos compostos fenólicos em inúmeras vias metabólicas, faz-se necessário a aplicação de técnicas mais abrangentes de investigação do seu efeito biológico no organismo como, a metabólica. Diante disso, o presente projeto visa comparar a biodisponibilidade de fenólicos do maracujá (*P. tenuifolia*) entre obesos e eutróficos e avaliar o efeito a médio prazo de sua ingestão, através de uma abordagem metabólica. Para tanto, a semente de maracujá será inicialmente caracterizada quanto ao seu perfil de flavonoides (CLAE/DAD e LCESI-MS/MS) e quanto ao seu potencial antioxidante (DPPH,

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfcr@usp.br

ORAC). Posteriormente, será realizado um estudo de biodisponibilidade dos compostos fenólicos (Etapa 1) onde indivíduos eutróficos e obesos irão ingerir uma quantidade a ser estabelecida de farinha de maracujá, seguida de coleta de urina. Por fim, para avaliar o efeito, a médio prazo, da ingestão de maracujá (Etapa 2), indivíduos eutróficos (n=25) e obesos (n=25) deverão ingerir diariamente, por 30 dias, uma quantidade de farinha de maracujá em pó liofilizada, equivalente ao consumo aproximado de 3 frutos. Será realizada coleta de amostra (sangue, urina e fezes) nos dias 1, 15 e 30 da suplementação. O sangue e urina serão analisados por CLAE-DAD e LC-ESIMS/MS para a quantificação e identificação de metabólitos decorrentes da ingestão da semente de maracujá. Será analisado o microbioma a partir das amostras das fezes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estudo comparativo da biodisponibilidade de fenólicos de maracujá (*P. tenuifolia*) entre obesos e eutróficos e avaliação do efeito a médio prazo de sua ingestão, através de uma abordagem metabolômica.

Objetivo Secundário:

- Caracterizar os compostos fenólicos do fruto inteiro do maracujá;
- Comparar a biodisponibilidade dos compostos bioativos encontrados no maracujá (*P. tenuifolia*) entre indivíduos obesos e eutróficos;
- Investigar o efeito da ingestão de maracujá (*P. tenuifolia*) no metaboloma de indivíduos adultos obesos e comparar com o grupo controle (indivíduos eutróficos).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisa é considerada de risco mínimo, pois a coleta de urina e fezes é considerado um procedimento não invasivo. Para a coleta de sangue, será realizada com agulha ou se preferir pelo uso de um acesso para evitar as várias picadas (no primeiro experimento) e apenas uma picada (no segundo experimento). Neste procedimento, o indivíduo poderá sentir algum desconforto provocado pela picada da agulha no local da punção.

Pessoas mais sensíveis poderão ficar com a pele arroxeadas (pequeno hematoma) por até 48 h. A respeito do risco de ingestão de maracujá (*P. tenuifolia*) espera-se risco mínimo para o consumo uma vez que este é consumido normalmente com a polpa. Além disso, em estudo toxicológico da ingestão de 10g de farinha de casca de maracujá (*P. Edulis flavicarpa*), três vezes ao dia, durante oito semanas, por indivíduos adultos (n=36), não foi verificada alteração em hemogramas e nos marcadores de função hepática e renal (MEDEIROS et al., 2009).

Benefícios:

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

Continuação do Parecer: 2.058.256

O consumo de farinha de maracujá (*P. tenuifolia*) pode trazer diversos efeitos benéficos no metabolismo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

tratasse de um projeto já aprovado por este CEP e que foi adaptado para uma parceria com o Hospital Dante Pazzanese, foram retirados alguns experimentos e nada de novo foi incluído.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

os TCLEs são redigidos dentro das normas em linguagem simples, claro, sob forma de convite conforme as exigências.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências ou listas de inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado ad referendum.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_914274 E3.pdf	05/05/2017 11:58:47		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_infraestrutura_dante.pdf	05/05/2017 11:48:10	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	Instrucoes_voluntarios_etapa_2_dante.docx	05/05/2017 11:01:00	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	Instrucoes_voluntarios_etapa_1_dante.docx	05/05/2017 11:00:42	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	motivo_adendo_3.pdf	05/05/2017 10:59:35	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	Fluxogramas_dante.pdf	05/05/2017 10:58:58	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	cfr_dante.pdf	05/05/2017 10:58:25	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_etapa2_dante.docx	05/05/2017 10:57:43	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfcf@usp.br

USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.058.256

Ausência	TCLE_etapa2_dante.docx	05/05/2017 10:57:43	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_etapa1_dante.docx	05/05/2017 10:57:01	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	Declaracoes_cep_dante.pdf	04/05/2017 13:27:05	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_pesquisadores_dante.pdf	04/05/2017 13:25:40	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_coparticipante_dante.pdf	04/05/2017 13:24:32	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_dante.doc	04/05/2017 13:23:32	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	Carta_adendo_2.pdf	13/03/2017 12:33:17	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_p_ten_19_59a.docx	13/03/2017 12:31:49	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	Adendo_motivo_alt_p_tenuifila.pdf	27/09/2016 17:38:40	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	Instrucoes_voluntarios_etapa_2_p_tenuifila.docx	27/09/2016 17:30:17	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	Instrucoes_voluntarios_etapa_1_p_tenuifila.docx	27/09/2016 17:17:49	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_p_tenuifila.docx	27/09/2016 17:16:30	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_etapa2_p_tenuifila.docx	27/09/2016 17:16:04	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_etapa1_p_tenuifila.docx	27/09/2016 17:15:52	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	Carta_correcao_pos_parecer.pdf	17/08/2016 15:45:39	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Cronograma	Cronograma_HU_atualizado.pdf	17/08/2016 13:15:35	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Orçamento	Orcamento_HU_atualizado.pdf	17/08/2016 13:03:49	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_etapa_1_atualizado.docx	17/08/2016 12:58:59	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Declaração de	Declaracao_instituicao_infraestrutura	06/07/2016	Neuza Mariko	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfct@usp.br

USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.058.256

Instituição e Infraestrutura	.pdf	15:38:52	Aymoto Hassimotto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Descricao_declaracao_pesquisadores.pdf	06/07/2016 15:34:48	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_execucao_HU.pdf	30/06/2016 16:36:38	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada_PLATAFORMA BRASIL.pdf	27/06/2016 17:11:02	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 11 de Maio de 2017

Assinado por:
Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepf@usp.br

Anexo V – Currículo Lattes

26/11/2019

Currículo Lattes

Imprimir
currículo

José Thiago do Carmo Santos

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1036388452043939>

Última atualização do currículo em 26/11/2019

Resumo informado pelo autor

Doutorando do programa de pós-graduação Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Universidade de São Paulo). Nutricionista graduado pela Universidade Federal de Sergipe (2012) e mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Sergipe (2015). Foi bolsista de Iniciação Científica (PIBIC-UFS) por dois anos e pela apresentação oral recebeu menção honrosa no Prêmio Destaque de Iniciação Científica da UFS (2011). Foi monitor em disciplinas durante a graduação, mestrado e doutorado. Desenvolve pesquisa na área de Ciência dos Alimentos com ênfase na investigação da capacidade antioxidante de frutas tropicais, metabolismo dos compostos fenólicos e metabólica.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome José Thiago do Carmo Santos

Dados pessoais

Nascimento 21/05/1991 - Aracaju/SE - Brasil

CPF 043.665.055-09

Formação acadêmica/titulação

2015 Doutorado em Ciências dos Alimentos.

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

Orientador: Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2013 - 2015 Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil

Título: Propriedades funcionais de Jenipapo (*Genipa americana* L.):

Compostos bioativos e capacidade antioxidante, Ano de obtenção: 2015

Orientador: Elma Regina Silva de Andrade Wartha

Co-orientador: Ana Mara de Oliveira e Silva

Bolsista do(a): Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe

2009 - 2012 Graduação em Nutrição Bacharelado.

Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil

Título: Caracterização de farinhas de casca e de sementes de Abóbora

(*Cucurbita moschata*) e aplicação como ingredientes em bolo

Orientador: Elma Regina Silva de Andrade Wartha

Formação complementar

2017 - 2017 Curso de curta duração em Curso Teórico-Prático de segurança em laboratório. (Carga horária: 9h).

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

2017 - 2017 Curso de curta duração em Curso Teórico-Prático de segurança em laboratório. (Carga horária: 9h).

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

2013 - 2013 Curso de curta duração em Alimentação e Nut. nas Doenças Assoc. à Gestação. (Carga horária: 15h).

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - TeleSaúde UERJ, UERJ-TELESSAÚDE, Brasil

2013 - 2013 Curso de curta duração em Boas práticas nos serviços de alimentação. (Carga horária: 40h).

Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, SEBRAE, Brasil

2013 - 2013 Curso de curta duração em Promoção da Alimentação Saudável no Ambiente Escol. (Carga horária: 15h).

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - TeleSaúde UERJ, UERJ-TELESSAÚDE, Brasil

2013 - 2013 Curso de curta duração em Aconselhamento nut. da Obesidade na infância e (Carga horária: 15h).

https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impvcv.trata

1/5

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - TeleSSaúde UERJ, UERJ-TELESSAÚDE, Brasil

- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Educação alimentar e nutricional. (Carga horária: 4h).
Universidade Federal de Sergipe, UFS, Sao Cristovao, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Perfil dos bairros de Aracaju a partir de indicado. (Carga horária: 6h).
Universidade Federal de Sergipe, UFS, Sao Cristovao, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Obesidade e Diabetes na Nutrigenômica. (Carga horária: 4h).
Universidade Federal de Sergipe, UFS, Sao Cristovao, Brasil
- 2011 - 2011** Extensão universitária em Curso Inglês Intermediário. (Carga horária: 60h).
Diretório Central dos Estudantes da Universidade Federal de Sergipe, DCE/UFS, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Marcas e indicações geográficas.. (Carga horária: 4h).
Universidade Federal de Sergipe, UFS, Sao Cristovao, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Patentes: Proteção e Informação Tecnológica. (Carga horária: 4h).
Universidade Federal de Sergipe, UFS, Sao Cristovao, Brasil
- 2010 - 2010** Extensão universitária em Curso de Inglês Básico. (Carga horária: 60h).
Diretório Central dos Estudantes da Universidade Federal de Sergipe, DCE/UFS, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Educação Alimentar. (Carga horária: 10h).
Serviço Social da Indústria, SESI, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Sergipe - UFS

Vínculo institucional

- 2014 - 2014** Vínculo: Monitoria - Estágio docência , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitor na disciplina de Fundamentos de Análise de Alimentos (NUTR008) da matriz curricular do curso de Nutrição Bacharelado, tendo como principais atribuições: Atividade docente, preparo de material didático, aulas práticas e correção de trabalhos e provas. Ministrou a aula "Determinação do conteúdo mineral em alimentos" no dia 14/05/2014 dentro da disciplina Fundamentos de Análise de Alimentos (NUTR008) da matriz curricular do curso de Nutrição Bacharelado.
- 2013 - 2015** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrando , Carga horária: 40, Regime: Integral
Outras informações:
Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos. Bolsista FAPITEC-SE/CAPEs
- 2012 - 2013** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitor da disciplina Tecnologia de Alimentos Aplicada à Nutrição da grade curricular do curso de Nutrição Bacharelado.
- 2011 - 2012** Vínculo: Bolsista Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Programa de Bolsa de Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial
- 2010 - 2011** Vínculo: Bolsista Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Programa de Bolsa de Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

- 03/2013 - 06/2015** Pesquisa e Desenvolvimento, Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de alimentos - PROCTA

Linhas de pesquisa:
Caracterização química de frutos regionais , Compostos bioativos e Atividade antioxidante
- 07/2010 - 07/2012** Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Núcleo de Nutrição

Linhas de pesquisa:
Aproveitamento de subprodutos de vegetais

2. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

- 2018 - Atual** Vínculo: Representante , Enquadramento funcional: Representante discente no Comitê de Pesquisa, Regime: Parcial
Outras informações:
Representante discente no Comitê de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
- 2017 - 2018** Vínculo: Representante , Enquadramento funcional: Representante discente no CEP, Regime: Parcial
Outras informações:
Representante discente no Comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
- 2017 - 2017** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitor Programa de Aperfeiçoamento do Ensino , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitor na Disciplina: Bioquímica de alimentos (FBA0413) do curso de Farmácia-Bioquímica da Universidade de São Paulo.
- 2015 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Doutorando , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

- 09/2015 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Linhas de pesquisa:

Metabólica , Caracterização de compostos bioativos do maracujá

3. Centro de Edafologia y Biología Aplicada del Segura - CSIC - CEBAS

Vínculo institucional

- 2018 - 2018** Vínculo: Intership (Estágio) , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 40, Regime: Integral
Outras informações:
Estágio de curto período no Grupo de Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales (CEBAS-CSIC, Murcia, Espanha), sob supervisão do pesquisador Dr. Francisco A. Tomás-Barberán. Principais atividades realizadas: - Adaptação de metodologia para identificação e quantificação de flavanonas e antocianinas utilizando HPLC-DAD-MS ESI Single Quadrupole; - Identificação de metabólitos fenólicos (principalmente derivados de proantocianidinas e flavona C-glicosiladas) em urina de voluntários após o consumo durante 30 dias de maracujá (*Passiflora tenuifolia*), utilizando HPLC-Q-TOF-MS; - Identificação e quantificação de proantocianidinas poliméricas, através do método de floroglucinólise em amostras de frutos de maracujá (*Passiflora tenuifolia*) nos estágios de maturação verde e maduro.

Linhas de pesquisa

1. Aproveitamento de subprodutos de vegetais
2. Caracterização química de frutos regionais
3. Compostos bioativos e Atividade antioxidante
4. Caracterização de compostos bioativos do maracujá
5. Metabólica

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. QUECAN, B. X. V.; **SANTOS, J. T. C.**; RIVERA, M. L. C.; HASSIMOTTO, N. M. A.; ALMEIDA, F. A.; PINTO, U. M. Effect of Quercetin Rich Onion Extracts on Bacterial Quorum Sensing. *Frontiers in Microbiology*. , v.10, p.1 - 16, 2019.
2. SANTANA, DANIELLE GOMES; OLIVEIRA, ALAN SANTOS; SOUZA, MARÍLIA TRINDADE DE SANTANA; **SANTOS, JOSÉ THIAGO DO CARMO**; HASSIMOTTO, NEUZA MARIKO AYMOTO; SILVA, ANA MARA DE OLIVEIRA E; GRÉSPAN, RENATA; CAMARGO, ENILTON APARECIDO *Vaccinium macrocarpon* Aiton Extract Ameliorates Inflammation and Hyperalgesia through Oxidative Stress Inhibition in Experimental Acute Pancreatitis. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. , v.2018, p.1 - 13, 2018.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. FIGUEIREDO, A. V. D.; SANTOS, J. T. C.; SOARES, F. M.; SILVA, M. F. O. E.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.
Aceitação sensorial de brigadeiros à base de macaxeira (Manihot esculenta Crantz) In: XXIV Congresso brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2014, Aracaju.
XXIV Congresso brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos., 2014.
2. SANTOS, J. T. C.; SILVA, A. M. O. E.; SANTOS, C. G. C.; SANTANA, F. C.; MANCINI FILHO, J.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.
Avaliação da atividade antioxidante da casca e polpa de Jenipapo (Genipa americana L.) utilizando métodos in vitro distintos In: XXIV Congresso brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2014, Aracaju.
XXIV Congresso brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos., 2014.
3. CAMPOS, I. C. C.; SANTOS, J. T. C.; BATISTA, M. C. A.; OLIVEIRA NETO, M. A.; BLANK, A. F.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.
Bolo formulado com farinha de batata doce rosada (Ipomoea batatas L.) In: XXIV Congresso brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2014, Aracaju.
XXIV Congresso brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos., 2014.
4. SANTOS, V. A. F. O.; ROCHA, K. R. A.; ALEXANDRE, A. P. S.; SANTOS, J. T. C.; BATISTA, M. C. A.; CAMPOS, I. C. C.; SANTANA, E. R. L.; SILVA, M. A. A. P.
Lexicon e perfil sensorial de chocolates em barra In: XXIV Congresso brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2014, Aracaju.
XXIV Congresso brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos., 2014.
5. CAMPOS, I. C. C.; BATISTA, M. C. A.; SANTOS, J. T. C.; JESUS, R. M.; BLANK, A. F.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.
Perfil Mineral e composição centesimal da farinha de batata doce branca (Ipomoea batatas L.) In: XXIV Congresso brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2014, Aracaju.
XXIV Congresso brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos., 2014.
6. BATISTA, M. C. A.; CAMPOS, I. C. C.; SANTOS, J. T. C.; SANTANA, E. R. L.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; PAGANI, A. A. C.
Quantificação da clorofila, carotenóides e colorimetria em alface (Lactuca sativa) convencional e hidropônica durante o armazenamento refrigerado In: XXIV Congresso brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2014, Aracaju.
XXIV Congresso brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos., 2014.
7. BATISTA, M. C. A.; CAMPOS, I. C. C.; SANTOS, J. T. C.; SILVA, J. V.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.
Aceitação de bolo enriquecido com farinhas de casca e de semente de abóbora por escolares, como alternativa na merenda escolar In: III Simpósio Internacional de Plantas medicinais e Nutracêuticos, 2012, Aracaju.
III International Symposium on Medicinal and Nutraceutical Plants., 2012.
8. SANTOS, J. T. C.; CAMPOS, I. C. C.; BATISTA, M. C. A.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.
Bolo enriquecido com farinha de casca e de semente de abóbora: Perfil mineral e conteúdo de compostos bioativos In: 22º Encontro de Iniciação Científica, 2012, São Cristóvão.
Livro de Resumos: Ciências da vida., 2012.
9. BATISTA, M. C. A.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; CAMPOS, I. C. C.; SANTOS, J. T. C.; SILVA, J. V.
Bolo enriquecido com farinhas de casca e de semente de abóbora: Análise sensorial In: IV Encontro de iniciação em desenvolvimento tecnológico e inovação, 2012, São Cristóvão.
IV Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação: Livro de resumos. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, POSGRAP, CINTEC, 2012.
10. CAMPOS, I. C. C.; WARTHA, E. R. S. A.; BATISTA, M. C. A.; SANTOS, J. T. C.
Bolo enriquecido com farinhas de casca e de sementes de abóbora: Perfil mineral e conteúdo de compostos bioativos In: IV Encontro de iniciação em desenvolvimento tecnológico e inovação, 2012, São Cristóvão.
IV Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação: Livro de resumos. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, POSGRAP, CINTEC, 2012.
11. CAMPOS, I. C. C.; BATISTA, M. C. A.; SANTOS, J. T. C.; OLIVEIRA-NETO, M. A.; BLANK, A. F.

Bolo formulado com farinha de batata doce branca (*Ipomoea batatas* L.): avaliação sensorial In: III Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutracêuticos (3ISMNP), 2012, Aracaju.

III International Symposium on Medicinal and Nutraceutical Plants., 2012.

12. SANTOS, J. T. C.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; FIGUEIREDO, A. V. D.

Informações nutricionais contidas nos rótulos de biscoitos comercializados em Aracaju/SE In: IV Simpósio em Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2012, João Pessoa.

IV Simpósio em Ciências e Tecnologia de Alimentos., 2012.

13. SANTOS, J. T. C.; CAMPOS, I. C. C.; BATISTA, M. C. A.; SILVA, J. V.; JESUS, R. M.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.

Perfil mineral das farinhas de casca e semente de abóbora In: III Simpósio Internacional de Plantas medicinais e Nutracêuticos, 2012, Aracaju.

III International Symposium on Medicinal and Nutraceutical Plants., 2012.

14. SANTOS, J. T. C.; CAMPOS, I. C. C.; BATISTA, M. C. A.; SILVA, J. V.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.

Bolo de farinha de casca e semente de abóbora: Composição centesimal e caracterização química In: 21º Encontro de Iniciação Científica, 2011, São Cristóvão.

Livro de Resumos., 2011.

15. BATISTA, M. C. A.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, J. V.; CAMPOS, I. C. C.; **SANTOS, J. T. C.**

Bolo produzido com farinha de casca e semente de abóbora: Análise sensorial In: III Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação, 2011, São Cristóvão.

III Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação: Livro de resumos. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, POSGRAP, CINTEC, 2011.

16. CAMPOS, I. C. C.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, J. V.; BATISTA, M. C. A.; **SANTOS, J. T. C.**

Elaboração de bolo utilizando farinhas de casca e de semente de abóbora: Composição centesimal e caracterização química In: III Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação, 2011, São Cristóvão.

III Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação: livro de resumos. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, POSGRAP, CINTEC, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. SILVA, J. V.; SANTANA, F. C.; SANTOS, J. T. C.; CAMPOS, I. C. C.; BATISTA, M. C. A.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.
Composição centesimal e caracterização química das farinhas de casca e de sementes de abóbora In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011, Recife.
III SICTA - Recife, 2011., 2011.
2. SILVA, J. V.; SANTOS, J. T. C.; NARAIN, N.; CAMPOS, F. M.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, M. A. A. P.
Conteúdo de beta-caroteno e vitamina A em farinhas de casca e semente de abóbora (*Cucurbita moschata*) In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011, Recife.
III SICTA - Recife, 2011., 2011.

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. SANTOS, J. T. C.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.
Bolo enriquecido com farinha de casca e de semente de abóbora: Perfil mineral e conteúdo de compostos bioativos, 2012. (Relatório de pesquisa)
2. SANTOS, J. T. C.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.
Bolo de farinha de casca e semente de abóbora: composição centesimal e caracterização química, 2011. (Relatório de pesquisa)

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 26/11/2019 às 01:59:19.

Anexo VI – Ficha do aluno

26/11/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 9594733/1 - José Thiago do Carmo Santos

Email: j.thiago@usp.br
Data de Nascimento: 21/05/1991
Cédula de Identidade: RG - 3.409.678-7 - SE
Local de Nascimento: Estado de Sergipe
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Nutrição - Universidade Federal de Sergipe - Sergipe - Brasil - 2013
Mestrado: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (1) - Universidade Federal de Sergipe - Sergipe - Brasil - 2015

Curso: Doutorado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Bromatologia
Data de Matrícula: 15/09/2015
Início da Contagem de Prazo: 15/09/2015
Data Limite para o Depósito: 13/01/2020
Orientador: Prof(a). Dr(a). Neuza Mariko Aymoto Hassimotto - 15/09/2015 até o presente. Email: aymoto@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 11/09/2015
Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 15/09/2019 até 13/01/2020
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/11/2017
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 15/09/2015
Prorrogação em 21/08/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Prorrogação em 21/08/2019

Impresso em: 26/11/2019 01:11:52

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 9594733/1 - José Thiago do Carmo Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5722-2/4	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	19/10/2015	08/11/2015	60	4	100	A	N	Concluída
BTC5743-3/5	Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	09/03/2016	21/06/2016	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	10/03/2016	19/05/2016	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5754-1/3	Atualização em Ciências Farmacêuticas	26/09/2016	02/10/2016	30	2	100	A	N	Concluída
FBT5788-1/2	Aplicação de Alimentos Probióticos na Modulação de Imunidade de Mucosas	06/03/2017	26/03/2017	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5752-1/2	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	30/05/2017	12/06/2017	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBA5896-7/2	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição II	17/11/2017	25/01/2018	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5954-1/3	Redação de Trabalhos Científicos	07/05/2019	13/05/2019	15	1	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	21
Estágios:			
Total:	0	20	21

Créditos Atribuídos à Tese: 172

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria MEC nº 1.077, de 31.08.2012..

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 21/08/2019

Impresso em: 26/11/2019 01:11:52

Anexo VII – Informações para os membros de banca julgadoras

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1. Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1. Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora levará emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2. Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 05 de maio de 2017.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da CPG/FCF/USP