UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

EFEITO DA DIGESTÃO *IN VITRO* E FERMENTAÇÃO COLÔNICA *EX VIVO* COM PROBIÓTICO SOBRE OS COMPOSTOS BIOATIVOS DE UMA BEBIDA MISTA (DE MARACUJÁ, MAÇÃ E MEL)

Iris Batista Leite

Rio de Janeiro
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

EFEITO DA DIGESTÃO *IN VITRO* E FERMENTAÇÃO COLÔNICA *EX VIVO* COM PROBIÓTICO SOBRE OS COMPOSTOS BIOATIVOS DE UMA BEBIDA MISTA DE MARACUJÁ, MAÇÃ E MEL

Iris Batista Leite

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

Orientadores: Prof[a]. Dr[a]. Eliane Fialho de Oliveira
Prof. Dr. Leandro de Araújo Lobo

Rio de Janeiro
2018

Leite, Iris Batista

Efeito da digestão *in vitro* e fermentação colônica *ex vivo* com probiótico sobre os compostos bioativos de uma bebida mista de maracujá, maçã e mel/ Iris Batista Leite. - Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2018.

158 f.: 14 il.

Orientadores: Eliane Fialho de Oliveira e Leandro Araújo Lobo

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana, 2018.

Referências bibliográficas: f.52-73.

1. Bebida mista. 2. Digestão *in vitro*. 3. Fermentação *ex vivo*. 4. *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12. 5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. 6. PCR em tempo real 7. Nutrição - Tese. I. de Oliveira, Eliane Fialho. II. Lobo, Leandro de Araújo. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana..

EFEITO DA DIGESTÃO *IN VITRO* E FERMENTAÇÃO COLÔNICA *EX VIVO* COM PROBIÓTICO SOBRE OS COMPOSTOS BIOATIVOS DE UMA BEBIDA MISTA DE MARACUJÁ, MAÇÃ E MEL

Iris Batista Leite

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

Aprovada por:

_____

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

_____

Profª Drª Maria Lúcia Mendes Lopes, DSc
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Profª Drª, Karla Rodrigues Miranda, DSc
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Profª Drª Ana Luisa Kremer Faller, DSc (revisora)
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2018

Á Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me dar força e sabedoria para lidar com os obstáculos da vida e por me abençoar com todas as vitórias que já alcancei.

Agradeço aos meus pais pelo suporte que tem me dado por todos esses anos. À minha querida mãe Beth, por sempre me receber com todo amor e calma após um dia conturbado e de longos engarrafamentos. Sem a senhora, seria muito difícil chegar até aqui. A senhora sempre me escutou nos dias de choro e de sorrisos, sempre tentando ajudar ou entender meu projeto para poder contar para os amigos. Ao meu querido pai Fernando, que sempre me incentivou a buscar ser uma pessoa melhor e servir ao próximo. O senhor é meu exemplo de caridade. E mesmo quando estava trabalhando longe me ligava ao final do dia para saber como estava meu projeto e me lembrar de sempre agradecer a Deus. Sou grata à Deus por ter o privilégio de ter pais tão bons.

Ao meu namorado Uellington, que se mostrou paciente na maioria dos finais de semana onde tinha que estudar e por estar ao meu lado nessa caminhada. O seu abraço me acalentou nos momentos de desespero e sua compreensão te fez me esperar até tarde ao final de experimentos. Obrigada por me amar do jeito que sou.

Ao meu avô, irmãos, tias e primos pelo incentivo ao crescimento intelectual e espiritual. E por torcerem por mim, vibrando após cada etapa superada.

À minha amiga Julia Quarti que se preocupou comigo até o final dessa jornada me dando suporte e sempre me mostrando que eu sou capaz.

À minha amiga Kim Inada por sempre assentar minha ansiedade e me ajudar a qualquer momento. Você já me salvou muitas vezes com nosso amado CLAE. Você e a Julia foram minhas confidentes e sempre me deram conselhos em relação a minha vida além da bancada. Obrigada por serem tão pacientes e amorosas.

À minha amiga Camila Didini por sempre me ouvir e passar amostras no CLAE enquanto eu estava fazendo outras análises. Você foi a amizade revelação de 2017, obrigada por tudo.

À minha mãe científica, minha querida orientadora Eliane Fialho que é sempre tão generosa por se preocupar com minha vida além dos muros do CCS. Você é uma inspiração para mim, como mulher e como profissional.

À minha querida Chris Angel (Christiane Queiroz) por ter me ensinado tantas coisas e tão bem. Você sempre teve muita paciência e mesmo em Curitiba não deixou de me ajudar quando eu precisava.

À querida Mari (Mariana Monteiro) por toda ajuda que me deu durante meu mestrado. Toda vez que eu batia em sua porta ou mandava mensagem ou mandava email você fazia o possível para me ajudar.

Ao meu coorientador Leandro Lobo por sempre me ajudar e ter paciência com as minhas limitações na parte microbiológica do projeto. Sou muito grata por todo seu apoio.

À minha aluna de iniciação científica Carol Duque, que aceitou fazer parte desse projeto e me ajudou em tantos testes de experimentos.

À família LabAFs, em especial a Luciana Gomes e Patricia Severo por estarem ao meu lado meu auxiliando quando estavam no Fundão. À Denise Bouts pelas ótimas conversas e lanchinhos ao final da tarde. À Paula por me doar tantos dias no CLAE e me ajudar quando era preciso. À Ana Faller por ter contribuído com o melhoramento do meu projeto em tantos momentos. À Maria Lúcia por ser tão generosa comigo e me ajudar quando era necessário, como na análise de colorimetria. Ao Luan, Christian, Marcelo e Bianca por me ouvirem e me ajudarem com palavras de incentivo.

Ao pessoal do LBNA por me receberem tão bem em seu laboratório quando eu precisava fazer alguma análise. Em especial ao professor Daniel Perrone, por me permitir utilizar alguns equipamentos. Tenho uma dívida de cajuzinho eterna ao senhor pela sua generosidade. Ao Genilton por me ajudar em tantos momentos e pelas risadas descontraídas. À Ana Bia por me ajudar tantas vezes com a CLAE. À Nivea por me ensinar com tanta calma e detalhes a digestão *in vitro* e fermentação *ex vivo*, além de sempre me auxiliar mesmo por mensagem. E ao Fabrício, Ellen e Laís pelas conversas e ajuda durante o mestrado.

Ao pessoal do LA por me receberem em seu laboratório e me incluírem em suas reuniões e festas. Vocês tornaram meu final de mestrado mais agradável por tentarem me fazer sentir parte do grupo. Em especial à professora Regina Domingues por ser tão gentil e carinhosa comigo nas vezes em que fiz experimento em seu laboratório. À Mariana Oliveira pela ajuda na saga do crescimento da bactéria probiótica. À Mariana Maselo pela paciência em me ensinar a técnica de extração de DNA. À professora Karla por me esclarecer tantas dúvidas e me ajudar com a análise de PCR. Ao Felipe e Heide por me ajudarem com a análise de curva de crescimento das bactérias probióticas, vocês foram muito atenciosos. À Andressa Temperini, Karine, Eduardo, Leandro Carneiro, Mayara, Juliana, Scarlathe, Camilla, Giovanna, Renata, Clara, Joaquim e professora Eliane por sempre me ajudarem seja dando gás na jarra, seja explicando algo de micro que não era comum para mim.

Ao professor Marco Miguel e o técnico Antônio do LMA pelo auxílio com as bactérias probióticas utilizadas no estudo.

À professora Rosa Luchese da UFRRJ por nos ceder a bactéria *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 para as análises deste estudo.

Às minhas amigas Kamilla Bussinger, Isabela Vanelli e Fernanda Dal'mora por me incentivarem a seguir meus sonhos e pela amizade mesmo distante.

"Quem deseja ser um excelente estudante e um brilhante profissional precisa sacrificar alguns momentos de lazer, abandonar sua preguiça intelectual e contrair seu conformismo. Não há escolhas sem perdas. Quem não estiver preparado para perder o irrelevante não estará apto a conquistar o essencial. — Augusto Cury"

Esta frase me acompanhou quando eu estudava para entrar no mestrado, e é com esta frase que eu termino este grande sonho.

RESUMO

LEITE, IRIS BATISTA. Efeito da digestão *in vitro* e fermentação colônica *ex vivo* com probiótico sobre os compostos bioativos de uma bebida mista de maracujá, maçã e mel. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

EFEITO DA DIGESTÃO *IN VITRO* E FERMENTAÇÃO COLÔNICA *EX VIVO* COM PROBIÓTICO SOBRE OS COMPOSTOS BIOATIVOS DE UMA BEBIDA MISTA DE MARACUJÁ, MAÇÃ E MEL

Pesquisas envolvendo doenças crônicas não transmissíveis possuem grande relevância no Brasil e no mundo pelo aumento de sua prevalência. Com a finalidade de auxiliar na redução do risco destas doenças, uma dieta balanceada contendo frutas e hortaliças vem se mostrando de grande importância, em parte, devido à presença de compostos bioativos (CBAs). Entretanto, os CBAs presentes nestes alimentos, ao passarem pelo trato digestório, sofrem modificações estruturais gerando diferentes metabólitos, em reações que contam com a participação direta da microbiota intestinal. Nesse sentido, a bebida mista composta pela associação de maracujá, maçã e mel foi elaborada como modelo de preparação rica em CBAs para estudar estas modificações. A bebida mista foi digerida *in vitro* por meio de uma mistura de tampões, enzimas digestórias, em tempo e temperatura adequados para mimetizar o processo digestivo. Em cada fase da digestão *in vitro* foi avaliado o teor de compostos fenólicos totais, a capacidade antioxidante por FRAP e TEAC e o perfil dos compostos fenólicos por CLAE-DAD-EM. Com o extrato obtido da fase intestinal foi realizada a fermentação colônica *ex vivo,* com ou sem adição da bactéria probiótica *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12. Durante a fermentação, foi realizada a análise do perfil dos compostos fenólicos, nos tempos 0, 4 e 24 horas, e do perfil da microbiota intestinal no tempo de 24 horas. Observamos que, durante a digestão *in vitro,* houve um aumento no teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante. Os compostos fenólicos encontrados na bebida mista foram o ácido gálico, ácido 5-cafeoilquínico, quercetina e rutina, sendo o ácido 5-cafeoilquínico o composto majoritário. No início da digestão (fase oral) o ácido gálico não foi mais encontrado sendo identificado, em contrapartida, o ácido 3-cafeoilquínico. Ao final da digestão (fase intestinal), o ácido 5-cafeoilquínico apresentou um aumento de 105% em seu teor enquanto eu o ácido 3-cafeoilquínico se

manteve relativamente estável durante todas as fases. Quercetina e rutina tiveram uma diminuição de 32 e 36%, respectivamente. A fermentação *ex vivo* foi realizada com a doação de fezes de 3 voluntários. O perfil da microbiota intestinal (Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobactéria, Gama-Proteobactéria) dos voluntários foi analisado sendo observado perfis distintos entre os doadores, resultando na variação identificada entre os compostos nos tempos de fermentação analisados. De modo geral, a rutina não foi encontrada durante a fermentação, em nenhum voluntário, e os teores de ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3-cafeoilquínico e quercetina diminuíram, sendo a quercetina o composto majoritário. A fermentação *ex vivo,* com adição da bactéria probiótica, gerou resultados diferentes entre os voluntários, principalmente em relação à quercetina. A *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 parece alterar o perfil da microbiota tornando-a favorável para a hidrólise destes CBAs. Dessa forma, o uso de uma mistura de ingredientes, na preparação de uma bebida mista, pode aumentar o aporte de compostos fenólicos, mas este perfil pode ser modificado ao longo da digestão gastrointestinal, pela ação da microbiota intestinal podendo esta ser impactada pela adição de bactéria probiótica.

Palavras-chave: digestão *in vitro*, fermentação *ex vivo*, compostos fenólicos, *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12, bebida mista.

ABSTRACT

EFFECT OF *IN VITRO* DIGESTION AND *EX VIVO* COLONIC FERMENTATION WITH PROBIOTIC ON THE BIOACTIVE COMPOUNDS OF A MIXED BEVERAGE OF PASSION FRUIT, APPLE AND HONEY

Surveys involving chronic non-communicable diseases are of great relevance in Brazil and the world by increasing their prevalence. In order to help reduce the risk of these diseases, a balanced diet containing fruits and vegetables has been shown to be of great importance, partly due to the presence of bioactive compounds (CBAs). However, the CBAs present in these foods, when passing through the digestive tract, undergo structural modifications generating different metabolites, in reactions that rely on the direct participation of the intestinal microbiota. In this sense, the mixed beverage composed by the association of passion fruit, apple and honey was elaborated as a rich preparation model in CBAs to study these modifications. The mixed beverage was digested *in vitro* by means of a mixture of buffers, digestion enzymes, in time and temperature suitable to mimic the digestive process. In each phase of *in vitro* digestion the total phenolic compounds content, the antioxidant capacity by FRAP and TEAC and the phenolic compounds profile by HPLC-DAD-MS were evaluated. With the extract obtained from the intestinal phase the colonic fermentation *ex vivo* was carried out, with or without addition of the probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12. During the fermentation, the profile of the phenolic compounds at 0, 4 and 24 hours, and the profile of the intestinal microbiota were analyzed in the 24 hour time. We observed that, during *in vitro* digestion, there was an increase in total phenolic compounds content and antioxidant capacity. The phenolic compounds found in the mixed beverage were gallic acid, 5-caffeoylquinic acid, quercetin and rutin, with 5-caffeoylquinic acid being the major compound. At the beginning of the digestion (oral phase), gallic acid was no longer found and 3-caffeoylquinic acid was identified. At the end of the digestion (intestinal phase), 5-caffeoylquinaic acid showed a 105% increase in its content while 3-caffeoylquinic acid remained relatively stable during all phases. Quercetin and rutin had a decrease of 32 and 36%, respectively. *Ex vivo* fermentation was performed with the donation of feces from 3 volunteers. The profile of the intestinal microbiota (Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Ɣ-Proteobacteria) of the

volunteers was analyzed, and distinct profiles were observed among the donors, resulting in the identified variation among the compounds at the fermentation times analyzed. In general, the rutin was not found during fermentation in any volunteer, and the contents of 5-caffeoylquinic acid, 3- caffeoylquinic acid and quercetin decreased, with quercetin being the major compound. *Ex vivo* fermentation, with addition of probiotic bacteria, generated different results among the volunteers, mainly in relation to quercetin. A *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 appears to alter the microbiota profile making it favorable for the hydrolysis of these CBAs. Thus, the use of a mixture of ingredients in the preparation of a mixed beverage may increase the supply of phenolic compounds, but this profile can be modified along gastrointestinal digestion by the intestinal microbiota action, which may be impacted by the addition of bacteria probiotic.

Keywords: *in vitro* digestion, ex vivo fermentation, phenolic compounds, *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12, mixed beverage.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1. Doenças Crônicas Não Transmissíveis..... 3
2.2. Consumo de frutas e hortaliças e DCNTs..... 4
2.3. Compostos Fenólicos..... 6
2.4. Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos..... 8
2.5. Microbiota gastrointestinal e compostos fenólicos..... 9
3. JUSTIFICATIVA..... 11
4. OBJETIVOS..... 11
4.1. Objetivo geral 11
4.2. Objetivos específicos 11
5. MATERIAL E MÉTODOS 12
5.1. Aquisição dos ingredientes e preparo da bebida mista..... 12
5.2. Análise das coordenadas colorimétricas..... 13
5.3. Teor de sólidos solúveis (TSS)..... 14
5.4. Determinação de compostos fenólicos totais..... 14
5.5. Análises da capacidade antioxidante (CA)..... 14
5.5.1. *Ferric reduction antioxidant power assay* (FRAP)..... 15
5.5.2. Capacidade de captura do radical DPPH..... 15
5.5.3. Capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC)..... 15
5.6. Análise qualitativa dos méis – Hidroximetilfurfural (HMF)..... 16
5.7. Análise de aceitação sensorial..... 16
5.8. Análise de compostos fenólicos por CLAE-DAD/MS..... 17
5.9. Digestão simulada *in vitro*..... 17
5.10. Determinação de compostos fenólicos totais e análises da capacidade antioxidante..... 19
5.11. Determinação da bactéria probiótica para a fermentação *ex vivo*..... 19
5.12. Fermentação colônica *ex vivo*..... 20
5.12.1 Voluntários..... 20
5.12.2 Condições experimentais..... 21
5.13. Análise de compostos fenólicos e seus metabólitos..... 22
5.14. Extração de DNA..... 22

5.15. Análise da microbiota fecal por PCR em tempo real..... 23
5.16. Análise estatística..... 24

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 25
6.1. Análise das coordenadas colorimétricas..... 25
6.2. Teor de sólidos solúveis (TSS)..... 26
6.3. Determinação de compostos fenólicos totais (CFT)..... 27
6.4. Análises da capacidade antioxidante (CA) pelo método de FRAP, DPPH e TEAC..... 28
6.5. Análise qualitativa do mel - Formação de hidroximetilfurfural (HMF)..... 30
6.6. Ficha técnica da preparação..... 30
6.7. Análise de aceitação sensorial..... 31
6.8. Determinação de compostos fenólicos totais após a digestão *in vitro* (fases oral, gástrica e intestinal)..... 32
6.9. Análises da capacidade antioxidante (CA) pelos métodos de FRAP e TEAC após a digestão *in vitro* (fases oral, gástrica e intestinal)..... 35
6.10. Perfil dos compostos fenólicos na bebida mista e após sua digestão *in vitro* (fases oral, gástrica e intestinal)..... 36
6.10.1. Ácido gálico..... 37
6.10.2. Ácido 5-cafeoilquínico e 3-cafeoilquínico..... 37
6.10.3. Quercetina e rutina..... 39
6.11. Determinação das bactérias probióticas utilizadas no estudo..... 39
6.12. Perfil dos compostos fenólicos na fermentação colônica *ex vivo* com e sem adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12..... 41
6.12.1 Efeito do tempo de fermentação sobre teores dos compostos fenólicos.. 41
6.12.1.1. Ácido 5-cafeoilquínico e 3-cafeoilquínico..... 41
6.12.1.2. Quercetina..... 43
6.12.1.3. Todos os compostos..... 45
6.12.2. Efeito da adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 sobre os teores dos compostos fenólicos..... 45

7. CONCLUSÕES..... 48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 53

9. ANEXOS..... 72
Anexo A – Questionário da análise de aceitação sensorial..... 73
Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) referente à análise sensorial..... 74
Anexo C – Escala de Bristol..... 76
Anexo D – Instrução para doação espontânea de fezes..... 77
Anexo E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) referente à doação de fezes..... 79
Anexo F – Cromatograma da bebida mista de maracujá, maçã e mel..... 81
Anexo G – Cromatograma da fase oral da digestão *in vitro*..... 82
Anexo H – Cromatograma da fase gástrica da digestão *in vitro*..... 83
Anexo I – Cromatograma da fase intestinal da digestão *in vitro*..... 84
Anexo J – Cromatogramas do tempo 0 da fermentação *ex vivo* do voluntário 1.... 85
Anexo K – Cromatogramas do tempo de 4 horas da fermentação *ex vivo* do voluntário 1..... 86
Anexo L – Cromatogramas do tempo de 24 horas da fermentação *ex vivo* do voluntário 1..... 87
Anexo M – Cromatogramas do tempo 0 da fermentação *ex vivo* com adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 1..... 88
Anexo N – Cromatogramas do tempo de 4 horas da fermentação *ex vivo* com adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 1 89
Anexo O – Cromatogramas do tempo de 24 horas da fermentação *ex vivo* com adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 1 90
Anexo P – Cromatogramas do tempo 0 da fermentação *ex vivo* do voluntário 2.... 91
Anexo Q – Cromatogramas do tempo de 4 horas da fermentação *ex vivo* do voluntário 2..... 92
Anexo R – Cromatogramas do tempo de 24 horas da fermentação *ex vivo* do voluntário 2..... 93
Anexo S – Cromatogramas do tempo 0 da fermentação ex vivo com adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 2..... 94
Anexo T – Cromatogramas do tempo de 4 horas da fermentação *ex vivo* com adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 2..... 95
Anexo U – Cromatogramas do tempo de 24 horas da fermentação *ex vivo* com 96

adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 2.....
Anexo V – Cromatogramas do tempo 0 da fermentação *ex vivo* do voluntário 3... 97
Anexo W – Cromatogramas do tempo de 4 horas da fermentação *ex vivo* do voluntário 3..... 98
Anexo X – Cromatogramas do tempo de 24 horas da fermentação *ex vivo* do voluntário 3..... 99
Anexo Y – Cromatogramas do tempo 0 da fermentação *ex vivo* com adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 3..... 100
Anexo Z – Artigo submetido a revista *Journal of Food Science and Technology* 101

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABPM	Associação Brasileira de Produtores de Maçã
ABTS	2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) de diamônio
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
bs	base seca
CA	Capacidade Antioxidante
CEASA-RJ	Central de Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cv	Cultivar
DAD	Detector de arranjo de diodo
DCNTs	Doenças crônicas nãotransmissíveis
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalente de ácido gálico
EM	Espectrômetro de massas
Fc	Fator de correção
FRAP	*Ferric Reducing Ability of Plasma*
GBD	*Global Burden of Disease*
GSH	Glutationa reduzida
HMF	Hidroximetilfurfural
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LA	Laboratório de Anaeróbios
LabAFs	Laboratório de Alimentos Funcionais
LBNA	Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos
LMA	Laboratório de Microbiologia de Alimentos
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
MRS	DeMan, Rogosa e Sharpe
N_2	Gás nitrogênio
NHB	*National Honey Board*
PL	Peso líquido

OMS	Organização Mundial da Saúde
Ox-LDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PB	Peso Bruto
PPO	Polifenol Oxidase
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SDS 20%	Dodecil Sulfato de Sódio 20%
subsp	subespécie
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TE	Tris e EDTA
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1	Fluxograma das análises.....	13
Tabela 1.	Composição do fluido salivar artificial (por 1000 mL de solução).....	18
Tabela 2.	Composição do fluido gástrico artificial (por 1000 mL de solução).....	18
Tabela 3.	Composição do fluido intestinal artificial (por 1000 mL de solução).....	19
Tabela 4.	Composição do meio rico em nutrientes utilizado para a diluição das fezes (por 1000 mL de meio).....	21
Figura 2.	Esquema de coleta de amostras para análise de compostos fenólicos por CLAE-DAD-EM.....	22
Tabela 5.	Iniciadores dos filos analisados no PCR em tempo real.....	23
Figura 3.	Ficha técnica de preparação da bebida mista de maracujá, maçã e mel.....	25
Figura 4	Teor de sólidos solúveis em bebidas mistas controle (c), acrescidas de mel laranjeira (l), eucalipto (e), silvestre (s) ou assa-peixe (a-p). Letras diferentes indicam que houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	27
Figura 5	Compostos fenólicos totais em bebidas mistas controle (c), acrescidas de mel laranjeira (l), eucalipto (e), silvestre (s) ou assa-peixe (a-p). Valores expressos em miligrama equivalente de ácido gálico por 100 mL de amostra (mg EAG / 100mL). Letras diferentes indicam que houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	28
Tabela 6.	Capacidade antioxidante pelos métodos de FRAP, DPPH e TEAC em bebidas mistas controle, acrescidas de mel laranjeira, eucalipto, silvestre ou assa-peixe.....	29
Tabela 7.	Correlação de Pearson entre as análises de teor de sólidos solúveis, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante (FRAP, DPPH e TEAC).....	31
Figura 6	Ficha técnica de preparação da bebida mista de maracujá, maçã e mel.	31
Tabela 8.	Pontuação reportada pelos consumidores (n=101) para a bebida mista de maracujá, maçã e mel.....	32

Figura 7. Compostos fenólicos totais da bebida mista durante as fases da digestão *in vitro* (oral, gástrica e intestinal). 34

Figura 8. Capacidade antioxidante pelos métodos de FRAP (A) e TEAC (B) das fases da digestão *in vitro* (oral, gástrica e intestinal)..... 35

Tabela 9. Teores (µg / 100 g bs) de compostos fenólicos da bebida mista e após a digestão *in vitro* (oral, gástrica e intestinal)..... 37

Figura 9. Percentual de ácido 5-cafeoilquínico nos tempos 0 h e 24 h incubados com *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 (A), *Lactobacillus acidophilus* (B) e *Lactobacillus plantarum* (C)..... 40

Figura 10. Percentual de ácido 5-cafeoilquínico no tempo de 24h incubados com *Lactobacillus acidophilus* (L.A), *Lactobacillus plantarum* (L.P) e *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 (B.A)..... 41

Tabela 10. Quantidade (µg/100 g bs) de ácido 5-cafeoilquínico na fermentação colônica *ex vivo* de três voluntários com e sem adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12..... 42

Tabela 11. Quantidade (µg/100 g bs) de ácido 3-cafeoilquínico na fermentação colônica *ex vivo* de três voluntários com e sem adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12..... 43

Tabela 12. Quantidade (µg/100 g bs) de quercetina na fermentação colônica *ex vivo* de três voluntários com e sem adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12..... 44

Tabela 13. Somatório dos teores (µg / 100 g bs) de ácido 5-cafeoilquínico, 3-cafeoilquínico e quercetina na fermentação colônica *ex vivo* dos três voluntários, sem adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12..... 45

Figura 11 Comparação entre os tempos da fermentação *ex vivo* (0h, 4h, 24h) sem (■) e com adição da bactéria probiótica (■) nos voluntários 1 (A), 2 (B) e 3 (C)..... 46

Figura 12. Comparação entre o tempo de 24 horas da fermentação *ex vivo* sem (■) e com adição da bactéria prociótica (■) nos filos *Bacteroidetes* (A), *Firmicutes* (B), *Actinobactéria* (C) e Gama-Proteobactéria (D)..... 48

Figura 13. Representação esquemática da via metabólica da rutina e quercetina presentes na bebida mista de maracujá, maçã e mel. As setas vermelhas 50

representam a diminuição do teor dos compostos em comparação com a bebida mista. As setas tracejadas indicam possíveis vias metabólicas, já descritas na literatura, mas não observados no presente trabalho. O símbolo ⊘ indica metabólitos descritos na literatura, mas não identificados no presente estudo.....

Figura 14. Representação esquemática da via metabólica do ácido 5-cafeoilquínico presente na bebida mista de maracujá, maçã e mel e ácido 3-cafeoilquínico presente a partir da saliva. As setas vermelhas ou verdes representam, respectivamente, a diminuição ou aumento do teor dos compostos em comparação com a bebida mista ou saliva no caso do ácido 3-cafeoilquínico. As setas tracejadas indicam possíveis vias metabólicas, já descritas na literatura, mas não observados no presente trabalho. O símbolo ⊘ indica metabólitos descritos na literatura, mas não identificados no presente estudo. O símbolo ⚠ indica metabólito descrito na literatura, mas não havíamos padrão comercial..... 52

1. INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) destacam-se como um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo, onde cerca de 74% dos óbitos no Brasil são devido as doenças cardiovasculares, cânceres, Diabetes Mellitus e enfermidades respiratórias crônicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Tais doenças têm respondido por grande parte das mortes antes dos 70 anos de idade e pela diminuição de qualidade de vida dos indivíduos (SCHMIDT et al, 2011).

Diversos estudos epidemiológicos sugerem que uma dieta balanceada, incluindo o consumo de frutas, hortaliças e seus produtos derivados, contribui para a redução do risco de desenvolvimento de DCNT (DEL RIO et al, 2013; SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015; TURATI et al, 2015). Esses efeitos positivos são atribuídos à presença de compostos bioativos (CBA), os quais podem ser classificados como substâncias não nutrientes, presentes em pequenas quantidades, mas com capacidade de influenciar atividade fisiológica ou celular resultando em beneficios para a saúde (DEL RIO et al., 2013). Dentre os compostos bioativos, a classe dos compostos fenólicos se destaca por serem amplamente encontrados em plantas, sendo essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agentes antipatogênicos, protetores de radiação UV e contribuírem para pigmentação (JAGANATH e CROZIER, 2009; DEL RIO et al., 2013). A associação de diferentes fontes alimentares ricas em nutrientes e compostos bioativos é interessante e uma bebida contendo maçã, maracujá e mel atende a essa finalidade. A alimentação diária prevê o consumo de diferentes compostos fenólicos por meio da associação de ingredientes em preparações culinárias, podendo ser estas fontes importantes de CBA na dieta.

A maçã (*Malus domestica*) é uma fruta rica em compostos fenólicos, como a quercetina e o ácido clorogênico (ZARDO et al., 2013; ALARCÓN-FLORES et al., 2015) e sua bioatividade contra diversas doenças parece estar relacionada à presença desses compostos (BOYER e HAI-LUI 2004; BELLION et al., 2008; SERRA et al., 2012; HUNG et al., 2015). No período de 2014/2015 no Brasil, sua produção chegou a 1,163 milhões de toneladas e consistiu basicamente em duas variedades: a Gala, com 55% da produção total e a Fuji, com 40% (ABPM, 2015). O seu suco é considerado um dos principais produtos na indústria processadora de maçã (SEBRAE NACIONAL, 2016).

O maracujá-amarelo ou maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims) é natural da América

do Sul e é amplamente cultivado em países tropicais e subtropicais. O suco é o principal produto derivado do maracujá e a espécie citada é a mais utilizada em preparações devido ao seu aroma e sabor intensos (MELLETI, 2011). No ano de 2013, o Brasil produziu cerca de 838 mil toneladas do fruto, sendo considerado o maior produtor e consumidor mundial desse fruto (IBGE, 2013).

Este fruto é fonte de ácido ascórbico, com teores que variam de 0,016 a 0,020 g de ácido ascórbico / 100 g peso fresco (SEMA e MAITI, 2006; RAMAIYA et al., 2013) podendo ser considerado fonte de acordo com o *The Natural Food Hub*. Além de ser fonte de vitamina C, a literatura indica a presença de compostos fenólicos, como rutina e ácido p-cumárico (MACORIS et al., 2012; SPÍNOLA et al., 2015) podendo ter potencial neuroprotetor (TAL et al., 2016).

Algumas frutas e hortaliças, como a maçã, banana e batata, durante o pré-preparo e manuseio, podem sofrer escurecimento enzimático pela ação da polifenol oxidase (PPO). Esta enzima catalisa a reação na presença de oxigênio e converte compostos fenólicos em pigmentos de coloração escura. Para evitar este processo, e inibir a ação da polifenol oxidase, utilizam-se agentes que agem reduzindo o-quinonas para difenóis incolores ou que reagem irreversivelmente com as o-quinonas para formar produtos incolores estáveis (OMS-OLIU et al., 2006). O ácido ascórbico é muito utilizado para prevenir este fenômeno devido a sua habilidade em reduzir a o-quinona à difenóis, ou seja, retorna a reação ao substrato fenólico (MCEVILY et al., 1992). Logo, o maracujá torna-se um ingrediente interessante para ser adicionado à preparações, por ser fonte de vitamina C e assim evitar o escurecimento enzimático.

O mel com sua variedade de cores e sabores é um edulcorante nutritivo utilizado para adoçar alimentos e bebidas, como sucos. A frutose é predominante na maioria dos méis, fazendo com que ele seja ligeiramente mais doce do que o açúcar refinado, em média 1 a 1,5 vezes mais doce (em peso seco). Este produto, além de conferir sabor adocicado às bebidas, agrega valor nutricional devido ao seu conteúdo de vitaminas e minerais (DA SILVA et al., 2016) e também de compostos bioativos, como o ácido p-cumárico e caféico (TRAUTVETTER et al., 2009; MONIRUZZAMAN et al., 2013). Devido à composição o mel tem sido associado com propriedades antinflamatória, antimicrobiana e antioxidante (YAGHOOBI et al., 2013).

Muitos estudos foram realizados com os extratos destes alimentos individualmente,

sendo em sua maioria estudos *in vitro* ou com o uso de linhagens celulares. Apesar de importantes, estes estudos apresentam limitações uma vez que os compostos bioativos que alcançam os tecidos muitas vezes não são os mesmos encontrados nas matrizes alimentares. Ao serem ingeridos, passam por diversos processos, dentre eles a digestão, absorção e metabolização com a possibilidade de gerar outros compostos/metabólitos com maior ou menor bioatividade (NOOR et al., 2014; DE MOURA et al., 2015; SOUSA et al., 2016). Métodos de digestão *in vitro* são eticamente superiores, mais rápidos e menos dispendiosos do que técnicas *in vivo* (COLES et al., 2005) sendo então uma alternativa aos estudos com animais e humanos. A digestão simulada *in vitro* normalmente abrange as fases oral, gástrica e intestinal, as quais tentam simular fisiologicamente as condições no organismo humano, dentre elas: a presença de enzimas digestivas em suas concentrações/atividade adequadas, pH, tempo de digestão e concentrações de sais (MINEKUS et al., 2014).

A fermentação colônica também é importante, pois as bactérias contidas na microbiota intestinal contribuem com as modificações estruturais dos compostos fenólicos gerando diversos metabólitos de baixo peso molecular que, se absorvidos, podem ser até mais ativos do que os compostos originais (CARDONA et al., 2013). Os probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas são capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo e consistem em sua maioria de cepas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (ANVISA, 2002; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Estima-se que cerca de 90-95% do total de polifenóis ingeridos são metabolizados no intestino grosso, onde estas bactérias podem ser responsáveis por ações enzimáticas como deglicosilação, fissão do anel aromático, desidroxilação, desmetilação e descarboxilação tornando-os mais absorvíveis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Doenças Crônicas Não Transmissíveis

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) são o resultado de uma combinação de fatores genéticos, fisiológicos, ambientais e comportamentais e apresentam longo curso de desenvolvimento (OMS, 2017). Estima-se que 70% das mortes em todo o mundo tem como

causa uma DCNT, ocorrendo na faixa etária de 30 a 69 anos. Dentre as mais prevalent destacam-se as doenças cardiovasculares, com cerca de 17,7 milhões de pessoas acometidas por ano, seguidas de câncer (8,8 milhões), doenças respiratórias (3,9 milhões) e diabetes (1,6 milhão) (GBD, 2016).

No Brasil, as DCNTs também constituem problema de saúde de grande relevância, correspondendo a aproximadamente 75% das causas de morte (MALTA et al., 2017). As doenças cardiovasculares são definidas como distúrbios do coração e vasos, e foram responsáveis por 31,2% das mortes no Brasil em 2015. Os tumores de próstata, para homens, e de mama, para mulheres, se tornaram as principais causas de morte por câncer (FRANÇA et al., 2017). O diabetes mellitus encontra-se entre as cinco principais doenças que levaram à óbito mulheres e entre as dez doenças para homens em 2015, com um aumento de 162,6 % entre 1990 e 2015.

Entre os principais fatores de risco relacionados ao aumento da incidência de DCNTs estão o tabaco, inatividade física, uso prejudicial do álcool e dietas não saudáveis, sendo estes os principais alvos de intervenção (GBD, 2016).

2.2. Consumo de frutas e hortaliças e DCNTs

Hábitos alimentares vêm sendo extensivamente estudados como fator para redução do risco de DCNT, em especial dietas ricas em alimentos vegetais. Zhao et al. (2017) avaliaram 25 estudos epidemiológicos sendo observada associação inversa entre o consumo de frutas e doenças cardiovasculares em 16 deles. Du et al. (2016) demonstraram que o consumo de frutas *in natura* estava associado à diminuição do risco de doenças cardiovasculares na China. Estima-se que uma dieta com baixa ingestão de frutas seja o terceiro fator de risco mais importante de doenças cardiovasculares, após aumento da hipertensão arterial sistêmica e tabagismo (EZZATI e RIBOLI 2013). Os mecanismos cardioprotetores das frutas não estão totalmente esclarecidos, mas sua capacidade de eliminação de radicais livres é considerada como principal, sendo esta correlacionada com o conteúdo de compostos bioativos, como os fenólicos (FU et al., 2011).

Turati et al. (2015) revisaram a relação entre o consumo de legumes e frutas e o risco para catorze tipos de câncer, incluindo mais de 10.000 casos. Foi observado que o consumo de 1 porção / semana de legumes crucíferos (couves, couve-flor, brócolis, couve de bruxelas e

nabo) possui relação inversa com câncer de cavidade bucal e faringe, esôfago, coloretal, mama e rim. Esses vegetais são fonte de glicosinolatos, compostos que contém enxofre e que são considerados CBAs. Indivíduos que consumiam 4 ou mais porções/semana de frutas cítricas, comparados aos que consumiam apenas 1 porção, apresentavam menor associação com a incidência de diversos tipos de câncer como o de estômago, colorretal e laringe.

Bazzano et al. (2008) acompanharam 71.346 mulheres por 18 anos e observaram que o consumo de três porções/dia de frutas e hortaliças tinha associação inversa com o desenvolvimento de diabetes mellitus.

Konta et al. (2014) avaliaram o efeito da polpa de maracujá em ratos espontaneamente hipertensos administrando por 5 dias doses de 6, 7 ou 8 g/kg peso. Eles observaram que a maior dose reduziu significativamente a pressão arterial sistólica, aumentou os níveis de glutationa reduzida (GSH) e reduziu substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sugerindo que o efeito anti-hipertensivo da polpa de maracujá amarelo, pelo menos em parte, pode ser devido a sua capacidade antioxidante. Ademais, os compostos fenólicos presentes no maracujá, tal como a quercetina apresentam efeito anti-hipertensivo quando administrados isoladamente (DUARTE et al., 2001).

De Sousa et al. (2012) avaliaram o perfil lipídico e estresse oxidativo de ratos Wistar após a administração de 1.000 mg de suco de maracujá/kg peso por 28 dias. Foi observado aumento da concentração de colesterol em lipoproteínas de alta densidade (HDL-c), diminuição do colesterol em lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e da concentração de ácidos graxos livres em comparação com o grupo controle, além da diminuição de TBARS, indicando efeitos benéficos sobre o perfil lipídico e a peroxidação lipídica.

Hodgson et al. (2016) investigaram, durante 15 anos, a associação entre a ingestão de maçã e a mortalidade por todas as causas e por doenças específicas em mulheres com mais de 70 anos. Eles observaram que uma maior ingestão de maçã está associada com menor risco de mortalidade total e por câncer. As mulheres que consumiram > 100g de maçã/dia tiveram um risco de mortalidade total 35% menor comparado com aquelas que consumiram <5 g de maçã/dia. Os componentes da maçã que já foram associados aos seus benefícios sobre doenças crônicas e seus fatores de risco são os flavonóides e as fibras dietéticas (MINK et al., 2007; STREPPEL et al., 2008).

Serra et al. (2012) avaliaram o efeito da suplementação dietética com 20% (p/p de uma dieta enriquecida com colesterol a 2%) de três variedades de maçãs (Bravo de Esmolfe,

Malápio Serra e Golden) por 30 dias em ratos Wistar machos. A variedade de maçã Bravo de Esmolfe foi capaz de diminuir significativamente a concentração sérica de triglicerídeos, colesterol total, LDL-c e Ox-LDL, com reduções de 27,2%, 21,0%, 20,4%, 20,0%, respectivamente, em relação ao grupo sem suplementação. Eles atribuem a redução desses parâmetros e seu potencial antioxidante à composição química variada da fruta, apresentando CBAs e nutrientes, dentre eles a catequina, epicatequina, procianidina B1 e β-caroteno.

Gallus et al. (2005) analisaram dados de estudos multicêntricos caso-controle realizados entre 1991 e 2002 na Itália, que incluíram 598 pacientes com câncer incidente da cavidade oral e faringe, 304 do esôfago, 460 da laringe, 1.953 do coloretal, 2.569 da mama, 1.031 do ovário e 1.294 da próstata. O grupo de comparação incluiu um total de 6.629 pacientes admitidos na mesma rede de hospitais sem doenças neoplásicas. Eles verificaram que os indivíduos que consumiam pelo menos 1 maçã/dia (166 g) tinham risco reduzido de desenvolverem os cânceres analisados.

Abdulrhman et al. (2013) avaliaram os efeitos metabólicos do consumo de 0,5 mL de mel/kg de peso corporal ao dia por 12 semanas em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. Eles observaram diminuição da glicemia de jejum, triglicerídeos, colesterol total, LDL-c, aumento de péptido C em jejum e peptídeo C pós-prandial. Muhammad et al. (2013) também verificaram que o consumo de 70 g de mel/dia diminuiu significativamente o colesterol total, LDL-c e triglicerídeos; e aumentou o HDL-c de 70 indivíduos saudáveis no período de 4 semanas. .

Owoyele et al. (2011) investigaram os efeitos da ingestão de 2, 6 e 10 g de mel/kg peso sobre inflamações agudas e crônicas e produção de óxido nítrico (NO) em 100 ratos Wistar. Eles observaram possível efeito antiinflamatório do mel por meio da inibição da liberação de NO nos tecidos e melhora da cicatrização de feridas. Compostos fenólicos geralmente exibem atividades antioxidantes, sendo o NO uma espécie reativa que pode ser eliminada diretamente por polifenóis como os flavonoides, podendo ser atribuído este efeito antiinflamatório à presença desses compostos no mel (Soler et al., 1995; Van Acker et al., 1995).

2.3. Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, com aumento de sua síntese em condições de estresse como,

infecções, rupturas teciduais, radiações UV, dentre outros (NACZK e SHAHIDI, 2004). Os produtos de origem vegetal, como hortaliças, frutas e bebidas, como sucos de frutas, chás e vinhos, são as principais fontes dietéticas de compostos fenólicos (BALASUNDRAM et al., 2006).

Os compostos fenólicos são caracterizados por apresentarem uma ou mais hidroxilas ligadas diretamente a um anel benzênico (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006). A atividade antioxidante desses compostos depende do número e disposição das hidroxilas na molécula de interesse e sua capacidade de sequestrar radicais livres ocorre por meio da doação de átomos de hidrogênio presentes em hidroxilas posicionadas ao longo de seu anel aromático (RICE-EVANS et al., 1997; SHAHIDI E AMBIGAIPALAN, 2015).

Os polifenois correspondem a um grupo com aproximadamente 10.000 compostos, que são agrupados em classes de acordo com sua estrutura química. Eles podem ser divididos em não-flavonoides (ácidos fenólicos, coumarinas, estilbenos, taninos**)** e flavonoides (flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, antocianidina, isoflavonas e chalconas) (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

Este dois grupos apresentam-se como conjugados solúveis em água (glicosídeos) e sob formas insolúveis (NARDINI e GHISELLI, 2004). Na natureza, os ácidos fenólicos podem ser encontrados principalmente na forma insolúvel ou também denominados conjugados, enquanto os flavonoides apresentam-se como glicosídeos com um ou mais açúcares ligados por um grupo OH (OH- glicosídeo) ou por ligações carbono- carbono (C-glicosídeos) (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014). Estudos *in vitro* têm demonstrado que os compostos fenólicos insolúveis possuem capacidade antioxidante significativamente maior em comparação com os compostos fenólicos livres e solúveis (CHANDRASEKARA e SHAHIDI, 2010).

A alimentação é capaz de fornecer diferentes classes de compostos fenólicos desde que sejam providas de uma variedade de frutas, legumes e bebidas a partir de produtos vegetais, como os sucos de fruta. Estes são frequentemente vistos como bebidas saudáveis pelos consumidores ao serem comercializados como fontes naturais e saudáveis de vitaminas, minerais e substâncias antioxidantes. As misturas de frutas ou hortaliças em um único produto apresentam uma série de vantagens, como a possibilidade de combinar aromas e sabores, além da soma de componentes nutricionalmente diferentes, como os compostos fenólicos (SHAHIDI e ALASALVAR, 2016).

Estudos relataram que a combinação de ingredientes em uma única bebida elevava o

teor de compostos fenólicos totais e sua capacidade antioxidante. Gironés-Vilaplana *et al.* (2012) observaram que a adição de 5% de uma *berry* conhecida como maqui (*Aristotelia chilensis*) ao suco de limão elevou o teor de fenólicos do suco em 4 vezes (62,97 ± 1,83 e 279,84 ± 5,15 mg EAG/100 ml, para suco de limão sem e com a adição de maqui, respectivamente, além de aumentar 8 vezes a capacidade antioxidante (2,03 ± 0,21 e 10,94 ± 0 24 mM Trolox, para suco de limão e adicionado de maqui, respectivamente). Porto et al. (2017) observaram que a adição de 50% de beterraba ao suco de laranja melhorava o conteúdo de compostos fenólicos (448 ± 19 para 484 ± 50 µg EAG/mL) e a atividade antioxidante (1.408 ± 245 para 2.083 ± 89 µg Trolox / mL) da bebida. Swada et al. (2016) observaram que a adição de 50% de suco de morango ao suco de mamão papaya promovia aumento da atividade antioxidante de 8,74 ± 0,098 para 12,67 ± 0,061 µmol Trolox/g. A combinação de frutas e ou hortaliças pode, portanto, resultar em um produto com maior teor de compostos bioativos e maior benefício à saúde, do que quando são processadas individualmente.

2.4. Bioacessibilidade e biodisponibilidade dos compostos fenólicos

Para que os CBAs exerçam efeitos fisiológicos sistêmicos é necessário, no entanto, compreender as modificações que os mesmos sofrem até alcançarem os tecidos alvos. Anterior ao processo digestório, os CBAs sofrem os efeitos do processamento ao qual os alimentos são submetidos, podendo resultar em mudanças na eficiência de sua liberação da matriz alimentar. Posteriomente ao consumo, podem ser alterados ao longo de todo o trato digestório até alcançar seus alvos celulares (REIN et al., 2013). A biodisponibilidade de um composto refere-se à fração que é digerida, absorvida e utilizada no metabolismo normal (PALAFOX-CARLOS et al., 2011). A bioacessibilidade seria a quantidade de um determinado composto bioativo ou nutriente que se torna disponível para absorção, no trato digestório, após sua ingestão (STAHL et al., 2002; PARADA e AGUILERA, 2007).

Alguns fatores podem alterar a biodisponibilidade dos compostos presentes nos alimentos, tais como: a complexidade da matriz alimentar, a estrutura química do composto e a ingestão concomitante com outros alimentos, além de fatores individuais como o esvaziamento gástrico e trânsito intestinal (OLIVEIRA e BASTOS, 2011; DOMÍNGUEZ-

AVILA et al., 2017). Levando todos esses fatores em consideração, a absorção dos compostos fenólicos é baixa, alcançando concentrações de metabólitos no plasma nas faixas de nM até μM. O tempo para atingir a concentração plasmática máxima varia de 30 minutos a várias horas, dependendo do local de absorção e do composto ingerido (MANACH et al., 2005; OLIVEIRA e BASTOS, 2011).

A maioria dos compostos fenólicos consumidos permanece vinculado a componentes da matriz alimentar, predominantemente fibra alimentar, ésteres ou glicídeos e não estão facilmente acessíveis para digestão e absorção no trato digestório (ARRANZ et al., 2010). As formas agliconas, não associada à glicosídeos, podem ser absorvidas já no intestino delgado e foi observado que alguns compostos podem ser absorvidos no estômago (KONISHI et al. 2006; LAFAY e GIL-IZQUIERDO, 2008). As formas conjugadas são hidrolisadas por enzimas intestinais ou pela microbiota colônica antes de serem absorvidas (MANACH et al. 2004; CROZIER et al., 2010).

Durante a absorção, os polifenóis são conjugados pelos enterócitos no intestino delgado e depois no fígado. Este processo inclui reações de metilação, sulfatação e glicuronidação, com o objetivo de tornarem os compostos mais hidrofílicos para que, após passarem pela circulação sistêmica, possam ser eliminados via excreção urinária. Os compostos fenólicos que são secretados pela via biliar no duodeno são submetidos à ação de enzimas bacterianas, especialmente β-glicuronidases, no segmento distal do intestino, podendo ser reabsorvidos ou chegarem ao cólon (MANACH et al., 2004).

2.5. Microbiota gastrointestinal e compostos fenólicos

Na microbiota gastrointestinal são encontrados fungos, vírus, *archaea* e bactérias, sendo estas últimas os principais microrganismos presentes (BACKHED et al., 2005; REYES et al., 2010). Estudos do projeto microbioma humano estimaram que a microbiota intestinal humana coletiva possui cerca de 1.150 espécies de bactérias. Biópsias da mucosa intestinal e amostras fecais e colônicas humana revelaram a presença de 9 filos distintos, os Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria,

Spirochaetes e Lentisphaerae. Os filos Firmicutes e Bacteroidetes correspondem a 90% das bactérias na microbiota intestinal (BACKHED et al., 2005; ECKBURG et al., 2005; TURNBAUGH et al., 2007).

No processo para tornar os polifenóis disponíveis para absorção, cerca de 90 a 95% são extensivamente metabolizados no intestino grosso pela microbiota intestinal. O metabolismo dos polifenóis pela microbiota envolve a clivagem das ligações glicosídicas e a degradação do esqueleto heterocíclico. Os metabólitos gerados, em sua maioria de baixo peso molecular, são então absorvidos e podem exercer efeitos sistêmicos. Com isso, a microbiota intestinal contribui para o aumento da biodisponibilidade dos compostos fenólicos (CARDONA et al., 2013; PIMPÃO et al., 2014).

Esses metabólitos gerados também podem afetar a microbiota intestinal alterando o equilíbrio Bacteroidetes/Firmicutes. Como os membros do filo Firmicutes expressam um número menor de enzimas que liberam açúcares do que o filo Bacteroidetes. Esta molécula de açúcar após ser liberada pode ser utilizada como substrato energético por estas bactérias. Sugere-se, portanto, que a ingestão de diferentes polifenóis possa remodelar a microbiota intestinal influenciando a razão entre os dois filos (LEE et al., 2006; HERVERT-HERNÁNDEZ et al., 2009; MAHOWALD et al., 2009).

Dentre as bactérias presentes no cólon, as classificadas como probióticas seriam de extrema importância para este processo, visto que, além de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo elas poderiam, por ações enzimáticas como deglicosilação, fissão do anel aromático, desidroxilação, desmetilação e descarboxilação dos compostos bioativos, gerar compostos mais bioacessíveis e biodisponíveis, os metabólitos (AURA, 2008; BOWEY et al., 2003). As cepas de bactérias probióticas mais utilizadas em enriquecimento de alimentos e suplementos pertencem ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (SOCCOL et al., 2010). Dessa forma, a interação entre compostos fenólicos e a microbiota intestinal parece ser mutualmente positiva, a microbiota podendo aumentar a biodisponibilidade de fenólicos e estes podendo ser utilizados como substrato energético seletivo de algumas espécies

3. JUSTIFICATIVA

Uma alimentação inadequada está entre os principais fatores de risco para desenvolver doenças crônicas não-transmissíveis. Ao contrário, uma dieta rica em frutas e hortaliças, principais fontes de compostos bioativos, como os compostos fenólicos, parece exercer efeito protetor. A ação sistêmica dos compostos fenólicos, no entanto, depende da sua biodisponibilidade e dos metabólitos que alcançarão de fato a circulação. A digestão simulada *in vitro* é um modelo experimental importante para compreender o comportamento dos compostos bioativos em alimentos durante os processos digestório e fermentativo, visando esclarecer sua interação com a microbiota intestinal.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

- Investigar o efeito da digestão *in vitro* e da fermentação colônica *ex vivo* com probiótico sobre os compostos fenólicos de uma bebida mista de maracujá, maçã e mel.

4.2. Objetivos específicos

Para a bebida mista de maracujá, maçã e mel:

- Elaborar a ficha técnica;
- Realizar análise sensorial;
- Determinar e quantificar os compostos fenólicos;
- Analisar a capacidade antioxidante;
- Avaliar o efeito das diferentes fases da digestão *in vitro* (oral, gástrica e intestinal) sobre os compostos fenólicos;
- Verificar o impacto da fermentação colônica *ex vivo* sobre o conteúdo de compostos fenólicos e seus metabólitos;
- Avaliar o efeito da fermentação colônica *ex vivo* com probiótico sobre o conteúdo de compostos fenólicos e seus metabólitos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Aquisição dos ingredientes e preparo da bebida mista

As amostras de maracujá-azedo (*Passiflora edulis*, cv. Sims.), provenientes do estado de Santa Catarina, foram adquiridas no período da safra (março de 2016) na Central de Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro - CEASA-RJ. Os frutos foram lavados e despolpados, embalados a vácuo e armazenados a -20 °C até o preparo da bebida mista.

As amostras de maçã gala (*Malus domestica* cv. Borkh) foram adquiridas em estabelecimentos comerciais na cidade de Magé-RJ e Rio de Janeiro-RJ sendo lavadas e sanitizadas em solução de hipoclorito de sódio a 100 ppm durante 15 minutos.

Os méis florada de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) e silvestre foram adquiridos em estabelecimento comercial no bairro de Irajá, na cidade do Rio de Janeiro-RJ. Os méis florada de laranjeira (*Citrus aurantium*) e assa-peixe (*Vernonia brevifolia*) foram adquiridos em estabelecimentos comerciais na cidade de Magé-RJ.

A bebida mista foi preparada utilizando uma diluição de 1:6,8 (polpa de maracujá:água), o que corresponde à 25 g de polpa de maracujá azedo com caroço, 50 g de maçã com casca, 9 g de mel e 140mL de água filtrada (Deliza *et al*., 2005). Os ingredientes foram batidos em liquidificador e coados. Uma bebida controle foi elaborada sem a adição de nenhum tipo de mel. A partir da bebida mista as etapas seguintes foram realizadas conforme fluxograma **(Figura 1)**.

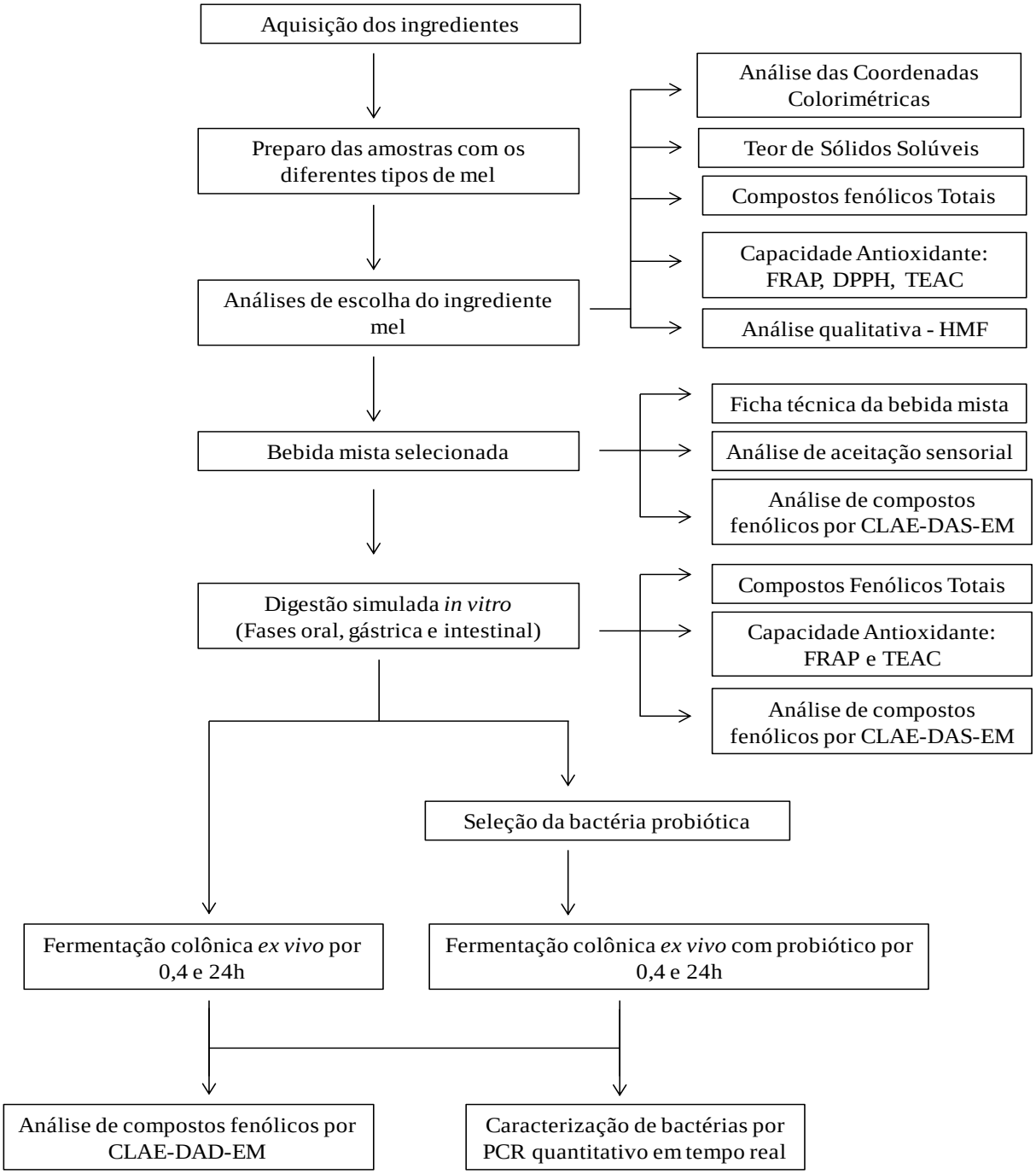


Figura 1. Fluxograma das análises.

5.2. Análise das coordenadas colorimétricas

Foi utilizado um colorímetro CR-400 (Konica Minolta), calibrado com base em iluminante D65, observador 2º e com a placa de cerâmica branca fornecida pelo fabricante.

Em alíquota de 15 mL, obtem-se, em triplicata, as seguintes coordenadas colorimétricas do sistema CIELab*: *L**, que representa a luminosidade refletida pela amostra e varia entre zero (completamente escuro) e 100 (completamente claro; *a**, que representa o espectro de vermelho (valores positivos) a verde (valores negativos); e *b**, que representa o espectro de amarelo (valores positivos) a azul (valores negativos) (KONICA MINOLTA, 1998).

Foi realizada uma comparação entre a bebida controle (sem adição de mel) e as bebidas adicionadas de mel utilizando a fórmula de ΔE* que indica a magnitude da diferença total de cor:

$$\Delta E^* = ((L^*1-L^*2)^2 + (a^*1-a^*2)^2+(b^*1-b^*2)^2)1/2$$

5.3. Teor de sólidos solúveis (TSS)

A determinação dos teores de sólidos solúveis foi realizada com refratômetro Eppendorf 2763 e os resultados expressos em °Brix de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz (IAL, 2005).

5.4. Determinação de compostos fenólicos totais

Os teores de compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de *Folin-Ciocalteau*, conforme descrito por Singleton et al. (1999). Em tubos de ensaio, 100 µL da bebida foram misturados com 700 µL de água Milli-Q, 50 µL de reagente *Folin-Ciocalteau* e 150 µL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 20%. Após a homogeneização, a mistura foi mantida a 40 ºC por 30 minutos e pipetados 300 µL de cada tubo de ensaio em microplaca de 96 poços. A absorbância da solução foi medida a 765 nm e a quantificação realizada pela curva padrão de ácido gálico, sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 mL. Cada bebida foi analisada em triplicata.

5.5. Análises da capacidade antioxidante (CA)

5.5.1.*Ferric reduction antioxidant power assay* (FRAP)

Este ensaio baseia-se na metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) com pequenas modificações, no qual o poder de redução do ferro por extratos de alimentos é avaliado. Previamente foram preparadas soluções estoque, de tampão de acetato de sódio (300 mM, pH:3.6); 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (10 mM em HCl a 40 mM) e $FeCl_3$ (20 mM). A solução de ensaio (FRAP) foi preparada, no momento da análise, com uma mistura de 20 mL do tampão acetato, 2 mL da solução de TPTZ 10 mM e 2 mL da solução de $FeCl_3$ e, em seguida, aquecida a 37 °C. Para a reação, foram adicionados 20 µL da bebida mista a 180 µL da solução de FRAP por 6 minutos em ambiente escuro. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 593nm e os resultados expressos em mmol Fe^{+2}/100 mL.

5.5.2. Capacidade de captura do radical DPPH

A determinação da CA medida pela captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi realizada de acordo com o método descrito por Duan et al. (2007) com adaptações. A solução de DPPH a 100 µM foi preparada utilizando metanol a 80%. A leitura da solução de DPPH na ausência da amostra foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm a fim de verificar a absorbância entre 0,8 e 1,1. Em tubos de ensaios foram colocados 0,1 mL de cada amostra e 4,9 mL da solução de DPPH 100 µM. Os tubos foram agitados manualmente e mantidos no escuro por 30 minutos para a realização das leituras a 517nm.

Para cálculo da CA foi determinado o percentual de inibição do radical DPPH segundo a fórmula:

$$CA\ (\%) = (A_0 - A_{30}) * 100/A_0$$

Onde, A_0 representa a absorbância da solução de DPPH medida no tempo inicial, e A_{30} é a absorbância de cada amostra 30 minutos após a adição da solução DPPH.

5.5.3. Capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC)

O ensaio de TEAC foi realizado de acordo com a metodologia adaptada de Re et al. (1999). O preparo da solução estoque do radical 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) de diamônio (ABTS) foi realizada pela reação entre persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) e ABTS por 12 a 16 h antes do uso. A solução estoque do radical ABTS foi diluída

(1:50) de forma que a leitura da absorbância da solução, a 720 nm, estivesse em 0,70 ± 0,02. Dez microlitros da bebida foram pipetados em placa de 96 poços e adicionados 190 µL da solução diluída do radical ABTS. A leitura da absorbância foi realizada à 720 nm e subtraída da absorbância do branco. A determinação da CA foi realizada utilizando-se uma curva padrão de Trolox e os resultados expressos em µmol de Trolox/100 mL.

5.6. Análise qualitativa dos méis – Hidroximetilfurfural (HMF)

O HMF pode ser determinado qualitativamente pela reação química chamada de Reação de Fiehe (ANDRADE, 2006). Foram pesados 5 g de cada mel em béquer de 50 mL, adicionados 5 mL de éter e a mistura foi agitada com o auxílio de um bastão de vidro. A camada etérea foi transferida para um cadinho e o éter evaporado em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionadas ao resíduo, cinco gotas de solução clorídrica de resorcina. Após 5 a 10 minutos, na presença de glicose comercial ou de mel superaquecido, há surgimento de coloração vermelha, indicando que o mel pode ter sido adulterado por um destes dois meios. Esta reação foi realizada em capela.

5.7. Análise de aceitação sensorial

A análise de aceitação sensorial da bebida mista de maracujá, maçã e mel foi realizada por um grupo de 101 consumidores (83 mulheres e 18 homens) com idade entre 17 e 63 anos, não-treinados, sendo estes funcionários, estudantes e visitantes da Universidade Federal do Rio de Janeiro **(Anexo A)**. Foram avaliados os seguintes atributos: avaliação global, aroma, sabor e utilizando uma escala hedônica de 0 (“desgostei extremamente”) a 9 (“gostei extremamente”), além de perguntas sobre a frequência de consumo de bebidas mistas e mel. Por fim foi avaliada a intenção de compra por meio do emprego de escala nominal de cinco pontos, tendo como pontos superior e inferior as expressões “certamente não” e “certamente sim”, respectivamente, e como ponto central “talvez sim, talvez não”, de acordo com a metodologia descrita por Meilgaard et al. (2006). Vinte e cinco mililitros da bebida a aproximadamente 10 °C foram oferecidos, em copos plásticos com capacidade de 50 mL.

A análise sensorial foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital

Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ (N° 1.906.704). Todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo B**).

5.8. Análise de compostos fenólicos por CLAE-DAD-EM

Amostras de 1 mL da bebida mista com adição do mel selecionado foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi utilizado para as análises. O sistema de cromatografia líquida (Shimadzu®, Japão) incluiu uma bomba dupla LC-20AD, injetor automático SIL-20AHT, sistema CBM- 20A como controlador e degaseificador DGU-20A5, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A e um espectrômetro de massas quadrupolo LCMS-2020 com ionização eletrospray (ESI).

A separação cromatográfica dos compostos fenólicos foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa phenyl (5 µm, 250 mm × 4,6 mm, Phenomenex®). A fase móvel consistiu em gradiente das soluções de 1% ácido fórmico em água (eluente A) e acetonitrina (eluente B), com fluxo de 1,0 mL/min. Antes da injeção, a coluna foi equilibrada com 100% do eluente A. Após a injeção da amostra, essa proporção diminuiu para 95% de A em 10 minutos, 85% de A em 30 minutos, 40% de A em 55 minutos e 0% do eluente A até 60 minutos. Entre as injeções, intervalos de 10 minutos foram utilizados para re-equilibrar a coluna com 100 % do eluente A. Os compostos fenólicos foram monitorados por detector DAD de 190 a 370 nm (Wu et al., 2012). A identificação dos compostos foi realizada por comparação com o tempo de retenção e espectro de absorção do respectivo padrão e a quantificação realizada por calibração externa. Os dados de integração foram adquiridos pelo *software* LC solution (Shimadzu Corporation®, versão 1.25, 2009).

A inferface ESI foi operada em modo negativo para auxiliar na identificação dos compostos. As condições de operação foram: voltagem do detecto, 0 kV; temperatura de interface, 350 °C; temperatura da linha de dessolvação, 250 °C; fluxo de gás de nebulização, 1,5 L/min; bloco de calor, 200 °C; fluxo de gás de secagem, 1,5 L/min.

5.9. Digestão simulada *in vitro*

O modelo de digestão simulada *in vitro* foi realizado de acordo com metodologia descrita por Oomen et al. (2003), Fernández e Labra (2013) e Lee et al. (2016). A fim de

simular a fase oral, 6 mL de solução de saliva artificial **(Tabela 1)** foram adicionados à 2,0 g da bebida mista liofilizada e agitado por 1 minuto a 37 °C sob agitação orbital a 260 rpm.

Tabela 1. Composição do fluido salivar artificial (por 1000 mL de solução).

Reagente	Quantidade
NaCl (g)	175,3
Uréia (g)	25,0
Ácido Úrico (mg)	15,0
α-amilase (mg)	290,0
Mucina (mg)	25,0

Na simulação da fase gástrica, os frascos provenientes da fase oral foram adicionados de 2,5 mL de fluido gástrico artificial contendo pepsina gástrica suína **(Tabela 2)** e o pH ajustado para 2,0 com HCl 1 M. Em seguida, os frascos foram selados com septo de borracha, a atmosfera modificada pela introdução de nitrogênio, e em seguida, incubados a 37 °C por 2 horas sob agitação orbital a 260 rpm.

Tabela 2. Composição do fluido gástrico artificial (por 1000 mL de solução).

Reagente	Quantidade
NaCl (g)	5,50
NaH_2PO_4 (g)	0,54
KCl (g)	1,64
$CaCl_2$ (g)	0,84
NH_4Cl (g)	0,62
Glicose (g)	1,30
Uréia (g)	0,17
Mucina (g)	6,00
Albumina bovina (g)	2,00
HCl concentrado (mL)	16,6
Pepsina gástrica suína (g)	5,28

Posteriormente, para simular a fase intestinal, foi adicionada solução $NaHCO_3$ 1 M para o ajuste do pH para 6,0 nas amostras provenientes do frasco da fase gástrica. Em seguida, foram adicionados 2 mL de fluido duodenal artificial contendo bile suína, pancreatina suína e albumina bovina **(Tabela 3)**, com auxílio de uma seringa para manter a anaerobiose do sistema reacional. Os frascos foram incubados a 37 °C por 2 horas sob agitação orbital a 260 rpm

Tabela 3. Composição do fluido intestinal artificial (por 1000 mL de solução).

Reagente	Quantidade
NaCl (g)	13,50
$CaCl_2$ (g)	0,41
$NaHCO_3$ (g)	7,98
KH_2PO_4 (g)	0,12
KCl (g)	1,024
$MgCl_2$ (g)	0,075
Uréia (g)	0,275
Pancreatina suína (g)	8,0
Bile suína (g)	50,0
Albumina bovina (g)	2,4
HCl concentrado (mL)	0,37

5.10. Determinação de compostos fenólicos totais e análises da capacidade antioxidante

Após cada fase da digestão (oral, gástrica e intestinal) foi realizada a análise de determinação de compostos fenólicos totais, conforme no 5.4. Para a determinação da capacidade antioxidante foram realizados o métodos de FRAP e TEAC de acordo com o descrito no item 5.5.

5.11. Determinação da bactéria probiótica para fermentação *ex vivo*

A avaliação da atividade de bactérias probióticas foi realizada utilizando três espécies: *Lactobacillus acidiphilus* (LA), *Lactobacillus plantarum* (LP) e *Bifdobacterium animalis subsp. lactis* BB12 (BA) com a finalidade de escolher a bactéria que seria capaz de hidrolisar o ácido 5-cafeoilquínico e gerar possíveis metabólitos. Em ambiente de anaerobiose (10 % H_2, 10 % CO_2, 80 % N_2) as bactérias foram inoculadas em meio deMan, Rogosa e Sharpe (MRS) e incubadas a 37 ^oC por 24h. Para o inóculo, foram diluídos 75 µL deste crescimento em 435 µL de meio MRS fresco. Em seguida, 20 µL desta diluição de bactérias foram adicionados a 3.820 µL de meio MRS e 160 µL de ácido 5-cafeiolquínico (concentração de 20 µg/mL). Foram realizados três controles: meio MRS sem inóculo (C1), meio MRS com cada espécie bacteriana separadamente (C2) e meio MRS com 5-cafeiolquínico (C3). Amostras foram coletadas nos tempos 0 e 24 h. Foram adicionados 100 µL de ácido tricloroacético 100 % a 500 µL da amostra e a mistura foi homogeneizada em vórtex e, em seguida, centrifugada por 5 minutos a 13000 $_x$ g. O sobrenadante final foi filtrado em membrana de 0,22 µm e as análises em CLAE foram realizadas conforme descrito no item 5.8 (Wu et al., 2012).

5.12. Fermentação colônica *ex vivo*

5.12.1. Voluntários

Três voluntários (uma mulher e dois homens) foram recrutados para doação espontânea de fezes. Os critérios de inclusão dos voluntários foram: faixa etária de 18 a 35 anos, índice de massa corporal dentro da faixa de eutrofia (18,5 a 24,9 kg / m^2), funcionamento intestinal regular (de duas evacuações ao dia a uma evacuação a cada dois dias, de consistência normal). A consistência das fezes foi auto-relatada de acordo com escala de Bristol que apresenta sete imagens e características descritivas das fezes de acordo com a forma e consistência (Martinez e Azevedo, 2012) **(Anexo C)**.

Foram excluídos voluntários com doenças gastrointestinais, DCNT, indivíduos que fazem uso de suplementos nutricionais, antiinflamatórios, antibióticos, probióticos, prebióticos ou simbióticos nos três meses anteriores à coleta das fezes.

Os voluntários foram orientados a não ingerirem, por pelo menos dois dias antes da coleta, alimentos ricos em compostos fenólicos (frutas em geral, hortaliças, sucos, bebidas

alcoólicas, chás, café, cereais integrais e mel) ou que pudessem conter bactérias probióticas (leite fermentado, kefir, kombucha). Foi orientada a realização de um registro dos alimentos nos dois dias pré-coleta **(Anexo D)**.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ (N° 1.906.704). Todos os voluntários assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) **(Anexo E)**.

5.12.2. Condições experimentais

O meio de cultura para fermentação *ex vivo* **(Tabela 4)** foi preparado de maneira pré-reduzida e esterilizado em anaerobiose (PRAS, do inglês *pre-reduced and anaerobically sterilized*). Para tal, o meio foi mantido sob fluxo constante de N_2 durante a distribuição em tubos com septos de borracha em uma prensa

Tabela 4. Composição do meio rico em nutrientes utilizado para a diluição das fezes (por 1000 mL de meio).

Reagente	Quantidade (g)
Peptona	2,0
Extrato de levedura	2,0
$NaHCO_3$	2,0
$CaCl_2$	0,01
NaCl	0,1
Pectina	2,0
Xilana	2,0
Goma arábica	2,0
Amido de batata	5,0
Caseína	3,0
Inulina	1,0

Uma alíquota (0,35 g) das fezes dos voluntários foi utilizada para a fermentação *ex vivo* sem bactérias probióticas ou com a adição de bactéria probiótica com o mínimo de 10^9 UFC/mL (Raimondi *et al*., 2015). As fezes foram diluídas no meio (10 mL), distribuídas em

tubos e adicionadas do extrato final obtido após o processo de digestão simulada *in vitro*. Essas etapas foram feitas em um sistema de tubo aberto sob cânula com fluxo constante de CO_2. Os tubos foram incubadas a 37°C em agitação orbital a 40 rpm em anaerobiose . Os tempos de incubação das amostras foram 0, 4 e 24 horas.

5.13. Análise de compostos fenólicos e seus metabólitos

Para a investigação das etapas oral, gástrica e intestinal da digestão simulada *in vitro* **(Figura 2)** e fermentação colônica *ex vivo,* experimentos paralelos independentes foram realizados, de maneira que somente as alíquotas relativas a cada etapa da digestão a ser investigada fosse retirada do sistem

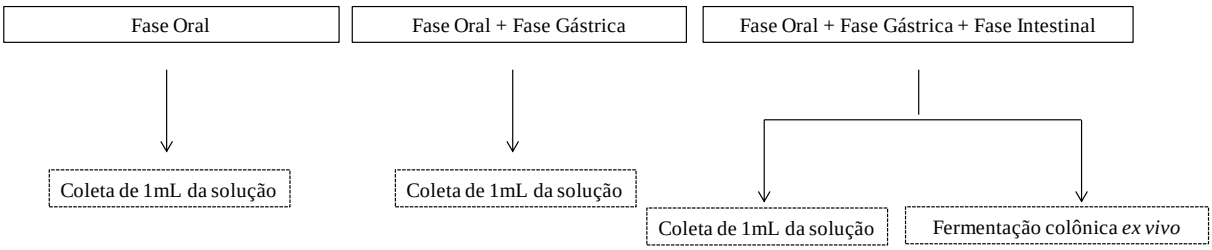


Figura 2. Esquema de coleta de amostras para análise de compostos fenólicos por CLAE-DAD-EM.

Após cada etapa da digestão *in vitro* (fase oral, gástrica e intestinal) e da fermentação colônica *ex vivo* (0, 4 e 24 horas), 1 mL do conteúdo dos frascos foi coletado. Foram adicionados 100 µL de ácido tricloroacético 100% a 500 µL da amostra e a mistura foi homogeneizada em vórtex e, em seguida, centrifugadas por 5 minutos a 13000 x g. O sobrenadante final foi filtrado em membrana 0,22 µm e armazenado a -20 °C até o momento das análises em CLAE, conforme descrito em 5.8.

5.14. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras dos voluntários após fermentação *ex vivo*, sem e com adição da bactéria probiótica, foi realizada após 24h conforme metodologia descrita por Kriegel et al. (2011), com modificações. Duzentos microlitros foram retirados a cada tempo

da fermentação *ex vivo* e coletados em criotubo contendo micro partículas de vidro (0,1 mm diâmetro). Posteriormente, à este criotubo foram adicionados 500 µL de tampão de lise 2x (NaCl 100mM, Tris 10mM, EDTA 100mM, proteinase K 0,2 mg/ mL) e 210 µl de SDS 20% em água RNAse *free*. As amostras foram vortexadas e mantidas em temperatura ambiente por 1 hora. Foram adicionados 500 µL de Fenol saturado com tampão Tris pH 8,0 e 500 µL de clorofórmio e homogeneizado. Os criotubos foram colocados em um agitador do tipo mini *bead beater* (*Biospect Products*) por 2 minutos e em seguida adicionado 15 mg de PVPP e vortexado por 1 minuto. As amostras foram centrifugadas por 3 minutos/ 4°C/ 13.000 rpm e a fase aquosa removida para um novo criotubo. À fase aquosa foram adicionados 200 µL de isopropanol -20 °C (1:1) e 20 µL de acetato de sódio 3 M (1:10) e incubada no gelo por 20 minutos. Após centrifugação (20 minutos/ 4 °C/ 13.000 rpm) o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 500 µL de etanol 100% (-20 °C), centrifugado (3 minutos/ 4 °C/ 13.000 rpm) e descartado o sobrenadante. Em seguida, as amostras foram adicionadas de etanol 70%, foi centrifugada (3 minutos/ 4°C/ 13.000 rpm) e o sobrenadanete descartado. O pellet foi novamente resuspendido, agora em 100 µL de Tris e EDTA (TE) com RNAse a 5mg/mL e incubado em banho seco a 45 °C por 30 minutos. Os tubos foram então mantidos a -80 °C até o momento da análise de PCR em tempo real.

5.15. Análise da microbiota fecal por PCR em tempo real

Os ensaios de PCR quantitativa em tempo real foram utilizados para quantificação relativa dos filos Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria e da classe Eubacteria e Ɣ-Proteobacteria na microbiota intestinal dos indivíduos do estudo através da amplificação de regiões dos genes *rss* que codificam a subunidade ribossomal rRNA 16S **(Tabela 5)**.

Para a quantificação relativa, a abundância dos diferentes filos e classe foram normalizadas pela determinação do ΔCt dos iniciadores universais para quantificação de bactérias totais presentes na amostra. Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela abaixo.

À uma mistura de reação contendo 6 µL de "SYBR green RT-PCR mix" (Life Technologies), foram adicionados 0,2 µM de cada iniciador e 4 µL de DNA. O volume total da reação foi ajustado com água para 12 µL. Foram utilizadas placas MicroAmp Optical 96-*well* (Life Technologies) vedadas com filme ótico adesivo MicroAmp® 96-*Well Optical*

Adhesive Film (Life Technologies). Cada amostra foi analisada em duplicata para cada par de iniciadores. Todas as corridas foram realizadas utilizando-se controles negativos sem adição de DNA (NTC, do inglês "Non-Template Control") para detecção de possível contaminação da reação.

Tabela 5. Iniciadores dos filos analisados no PCR em tempo real

Filo ou Classe	Iniciadores	Referência
Eubacteria	**F** [5´- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT – 3´]	**Ferreira et al. (2011)**
	R [5´- ATTACCGCGGCTGCTGGC – 3´]	
Filo Bacteroidetes	**F** [5´- CRAACAGGATTAGATACCCT – 3´]	**Gregoris et al. (2011)**
	R [5´- GGTAAGGTTCCTCGCGTAT – 3´]	
Filo Firmicutes	**F** [5´- TGAAACTYAAAGGAATTGACG – 3´]	**Gregoris et al. (2011)**
	R [5´- ACCATGCACCACCTGTC – 3´]	
Filo Actinobacteria	**F** [5´- TACGGCCGCAAGGCTA – 3´]	**Gregoris et al. (2011)**
	R [5´- TCRTCCCCACCTTCCTCCG – 3´]	
Classe ɣ-Proteobacteria	**F** [5´- TCGTCAGCTCGTGTYGTGA – 3´]	**Gregoris et al. (2011)**
	R [5´- CGTAAGGGCCATGATG – 3´]	

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento *StepOnePlus™ Real Time PCR System* (Life Technologies) programado para o seguinte ciclo: 50 °C / 2 min, 95 °C / 10 min; 95 °C / 30 s, 60 °C / 1 min (40 ciclos). Os resultados obtidos foram visualizados através do *StepOne™ Software* v 2.3 (Life Technologies).

5.16. Análise estatística

Os resultados, expressos como média ± desvio padrão, foram avaliados por meio de Análise de Variância simples (One-way ANOVA) seguido de teste de Tukey ou Teste T não-pareado, a 5% de significância ($p<0,05$), para a comparação das médias. Para estas análises foi utilizado o software GraphPad Prism® versão 6.0. Posteriormente, foi realizada correlação de Pearson entre as variáveis: sólidos solúveis, compostos fenólicos totais e atividades antioxidantes (FRAP, DDPH e TEAC).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Análise das coordenadas colorimétricas

O valor de *L** encontrado para a bebida controle foi 40,10 ± 0,00, para a bebida com o mel laranjeira, com o mel eucalipto, com o mel silvestre e com o mel assa-peixe foram 38,26 ± 0,007, 38,43 ± 0,007, 38,48 ± 0,006 e 38,37 ± 0,007, respectivamente, apresentando diferença estatística entre todas as amostras. Em comparação das quatro amostras, as amostras com os méis eucalipto e silvestre apresentaram os maiores valores, porém não diferindo estatisticamente conforme pode ser observado na **Figura 3A.**

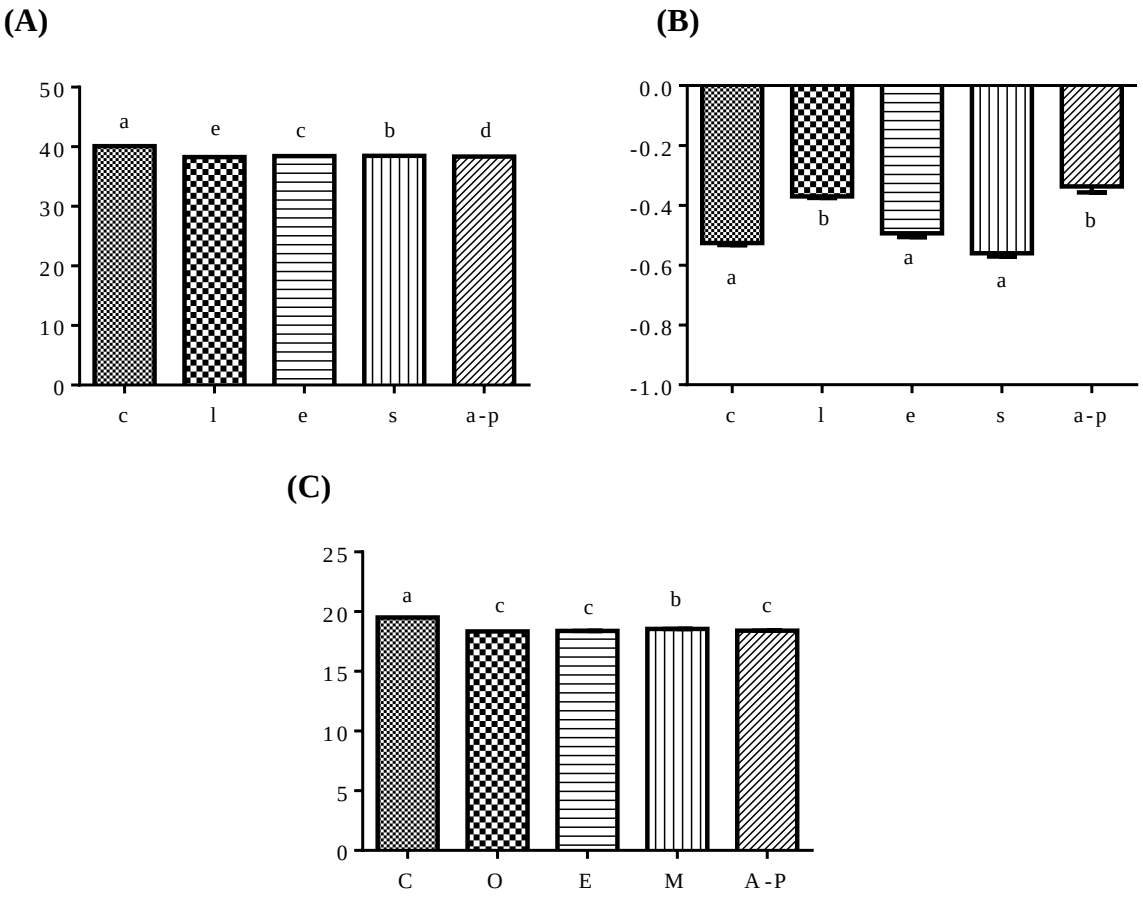


Figura 3. Coordenadas colorimétricas *L** (A), *a** (B) *e b** (C) em bebidas mistas controle (c), acrescidas de mel laranjeira (l), eucalipto (e), silvestre (s) ou assa-peixe (a-p). Letras diferentes indicam que houve diferença significativa pelo teste One-Way Anova a 5% de probabilidade.

.

O valor de *a** encontrado para a bebida controle foi -0,52 ± 0,007, para a bebida com o mel laranjeira foi -0,37 ± 0,006, para a bebida com o mel eucalipto foi -0,49 ± 0,01, para a bebida com o mel silvestre foi -0,56 ± 0,01 e para a bebida com o mel assa-peixe foi -0,34 ± 0,02. As amostras que diferiram do controle foram laranjeira e assa-peixe. E em comparação das quatro amostras com os diferentes tipos de mel, as amostras eucalipto e silvestre apresentaram os menores valores, não diferindo estatisticamente entre si conforme pode ser observado na **Figura 3B**.

Os valores de *b** encontrados para a bebida controle foi 19,51 ± 0,007, para a bebida com o mel laranjeira foi 18,35 ± 0,007, para a bebida com o mel eucalipto foi 18,38 ± 0,02, para a bebida com o mel silvestre foi 18,55 ± 0,009 e para a bebida com o mel assa-peixe foi 18,40 ± 0,012. As amostras que diferiram do controle foram laranjeira e assa-peixe. E em

comparação das quatro amostras com os méis, a amostra silvestre apresentou o maior valor estatisticamente conforme pode ser observado na **Figura 3C**

Os valores de ΔE*, que corresponde à diferença entre a bebida controle e a bebida com mel laranjeira, eucalipto, silvestre e assa-peixe foram: 2,18, 2,06, 2,02, 1,88 unidades CIE*Lab*, respectivamente. Estudos anteriores consideram uma faixa de 0,38 - 0,73 unidades CIE*Lab* como os valores limiares e mais de 1,75 unidades CIE*Lab* como acima do limiar, enquanto o valor superior a 5 unidades CIEL*ab* podem consideradas como visualmente distinguíveis (MELGOSA et al., 1997; OBÓN et al., 2009). Desta forma os valores obtidos neste estudo apresentam-se acima do limiar, porém não visualmente distinguíveis.

6.2. Teor de sólidos solúveis

O valor encontrado para a bebida controle foi de 4,33 ± 0,03, para a bebida com mel laranjeira foi de 7,93 ± 0,03, para a bebida com mel eucalipto foi de 8,2 ± 0,0, para a bebida com mel silvestre foi de 8,03 ± 0,03 e para a bebida com mel assa-peixe foi de 7,93 ± 0,03. Todas as amostras diferiram da bebida controle e entre as quatro amostras com os méis, a amostra eucalipto apresentou o maior valor conforme pode ser observado na **Figura 4**.

Os dados demonstram que a adição do mel aumentou o teor de sólidos solúveis em média 1,85 vezes (em média 3,7 °Brix), sendo esses sólidos principalmente açúcares

(CHITARRA e CHITARRA, 2005). O mel apresenta altos teores de açúcar (glicose e frutose) que correspondem juntas a aproximadamente 85% de sua composição (SILVA et al., 2003).

O teor de sólidos solúveis da bebida controle que consiste em maracujá, maçã e água é inferior ao teor de sucos integrais de maracujá e maçã, pois a adição de água dilui os sólidos solúveis (YAMAMOTO et al., 2015).

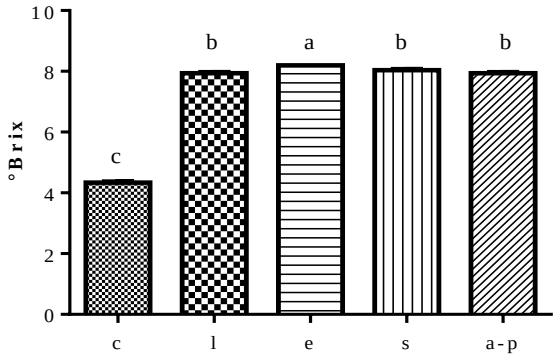


Figura 4. Teor de sólidos solúveis em bebidas mistas controle (c), acrescidas de mel laranjeira (l), eucalipto (e), silvestre (s) ou assa-peixe (a-p). Letras diferentes indicam que houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

6.3. Determinação de compostos fenólicos totais (CFT)

As análises foram realizadas com a bebida mista sem a adição de mel, chamada de bebida controle e as bebidas com adição dos méis: laranjeira, eucalipto, silvestre e assa-peixe. Os resultados foram expressos em mg EAG/100 mL de bebida mista, onde o resultado para a bebida controle foi de 127 ± 2,3 mg EAG/100 mL, para a bebida com mel laranjeira foi de 193,4 ± 4,63 mg EAG/100 mL, para a bebida com mel eucalipto foi de 167,9 ± 2,04 mg EAG/100 mL, para a bebida com mel silvestre foi de 195,1 ± 8,06 mg EAG/100 mL e para a bebida com mel assa-peixe foi de 205,6 ± 7,75 mg EAG/100 mL. Todas as amostras diferiram do controle e entre as quatro amostras com os méis, as que apresentaram os maiores valores, sem diferença estatística foram: laranjeira, silvestre e assa-peixe, conforme pode ser observado na **Figura 5**. Após a adição do mel, a bebida aumentou em média 1,55 vezes o seu teor de compostos fenólicos totais.

Toydemir et al. (2015) avaliaram o conteúdo de polifenóis totais de nove tipos de chás adicionados de mel de flores, dentre eles seis apresentaram aumento de até 1,69 vezes

Celep e Yeşilada (2017) observaram que após a adição de mel floral em amostras de café fresco e solúvel, houve aumento de 1,18 e 1,1 vezes, respectivamente, de polifenóis totais.

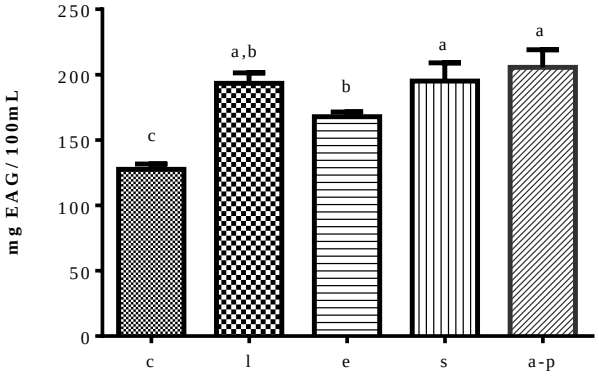


Figura 5. Compostos fenólicos totais em bebidas mistas controle (c), acrescidas de mel laranjeira (l), eucalipto (e), silvestre (s) ou assa-peixe (a-p). Valores expressos em miligrama equivalente de ácido gálico por 100 mL de amostra (mg EAG / 100mL). Letras diferentes indicam que houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ozdatlı et al. (2014) avaliaram o efeito da adição do mel sobre nove diferentes tipos de chá e observaram um aumento em média 11,2 vezes o conteúdo de compostos fenólicos, o que pode ser justificado pela interação entre os componentes do mel e os componentes dos chás. Pereira et al. (2015) avaliaram a adição de três tipos de mel, de coloração diferentes, à infusões e observaram em média um aumento de 1,2 vezes no teor de fenólicos, sendo o mel de coloração mais escura o que conferiu maior aumento. Sendo assim, a adição do mel se mostrou favorável para o aumento do conteúdo de compostos fenólicos destas bebidas.

6.4. Análises da capacidade antioxidante (CA) pelo método de FRAP, DPPH e TEAC

Na análise da capacidade antioxidante por FRAP, todas as amostras diferiram do controle e entre as quatro amostras com os méis, as que apresentaram os maiores valores, sem diferença estatística foram: laranjeira, silvestre e assa-peixe. A bebida mista com o mel eucalipto apresentou o menor valor diferente de todas as amostras analisadas, inclusive do controle **(Tabela 6).**

Na análise da capacidade antioxidante por DPPH, as bebidas contendo os méis

eucalipto ou assa-apeixe não apresentaram diferença significativa do controle e as bebidas que continham os méis laranjeira ou silvestre apresentaram diferença significativa da bebida controle, mas não diferiram entre si. Após a adição do mel, a bebida aumentou em média 1,66 vezes a sua capacidade antioxidante pelo radical DPPH (**Tabela 6)**.

Tabela 6. Capacidade antioxidante pelos métodos de FRAP, DPPH e TEAC em bebidas mistas controle, acrescidas de mel laranjeira, eucalipto, silvestre ou assa-peixe.

	Capacidade Antioxidante		
Bebida mista	FRAP (mmol Fe^{+2}/100 mL)	DPPH (% de inibição)	TEAC (µM Trolox/100 mL)
Controle	$109,73 \pm 0,45^{b}$	$5,27 \pm 0,59^{b}$	$38,83 \pm 0,51^{c}$
Laranjeira	$140,79 \pm 1,89^{a}$	$9,41 \pm 1,27^{a}$	$70,36 \pm 2,72^{a}$
Eucalipto	$97,91 \pm 4,91^{c}$	$6,76 \pm 0,67^{a,b}$	$50,43 \pm 3,71^{b}$
Silvestre	$149,88 \pm 6,10^{a}$	$10,13 \pm 2,38^{a}$	$71,25 \pm 2,72^{a}$
Assa-peixe	$139,12 \pm 5,45^{a}$	$8,82 \pm 0,85^{a,b}$	$74,68 \pm 1,89^{a}$

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as bebidas contendo os diferentes méis (One-Way Anova, $p<0,05$).

Toydemir et al. (2015) avaliaram a capacidade antioxidante pelo radical DPPH de nove tipos de chás adicionados de mel de flores, dentre eles, quatro apresentaram aumento de até 1,45 vezes. Pereira et al. (2015) também avaliaram o efeito da adição do mel sobre diferentes combinações de infusões e os resultados indicaram que a adição teve efeito sinérgico em todas as amostras, com um aumento, em média, de 2,5 vezes a capacidade antioxidante pelo radical DPPH e de 1,8 vezes quando avaliada pelo método FRAP.

Na análise de TEAC, todas as amostras diferiram do controle e entre as quatro amostras com os méis, aquelas que apresentaram os maiores valores sem diferença estatística entre si foram com os méis: laranjeira, silvestre e assa-peixe.

Ao correlacionar o teor de sólidos solúveis com a capacidade antioxidante e os compostos fenólicos totais, observou-se correlação negativa **(Tabela 7)**. O teor de sólidos solúveis foi inversamente proporcional ao teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante, por todos os métodos, o que pode ser devido a concentração de açúcar no mel que complexaria com possíveis compostos da bebida (ZHANG et al., 2009). A partir destes dados, o mel eucalipto foi excluído da escolha, pois a bebida que continha este mel apresentou os menores valores de compostos fenólicos totais e CA.

Tabela 7. Correlação de Pearson entre as análises de teor de sólidos solúveis, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante (FRAP, DPPH e TEAC).

	TSS	CFT	FRAP	DPPH	TEAC
TSS	1,00	-0,92	-0,83	-0,74	-0,94
CFT	-0,92	1,00	0,89	0,78	0,98
FRAP	-0,83	0,89	1,00	0,98	0,95
DPPH	-0,74	0,78	0,98	1,00	0,87
TEAC	-0,94	0,98	0,95	0,87	1,00

A correlação dos compostos fenólicos com os diferentes métodos de análise de capacidade antioxidante foi moderadamente positiva para o radical DPPH (R^2= 0,7802, p< 0,05) e fortemente positiva para as análises de FRAP (R^2 = 0,8859, p< 0,05) e TEAC (R^2= 0,9848 p< 0,05). Com este resultado escolhemos realizar a determinação da CA nas amostras de cada fase da digestão *in vitro* apenas por FRAP e TEAC.

6.5. Análise qualitativa do mel - Formação de hidroximetilfurfural (HMF)

O HMF é um composto orgânico facilmente extraído com éter. É então promovida a extração por solvente e ao reagir o HMF com a resorcina, há a formação de um complexo de cor vermelha. As amostras de mel laranjeira, eucalipto e silvestre apresentaram uma coloração amarelada, indicando presença de HMF, porém dentro do esperado, permitido em legislação. O mel assa-peixe apresentou coloração rosada indicando presença de HMF acima do permitido, indicando que o mesmo pode ter sido adulterado pela adição de açúcar ou aquecimento (CANO et al., 2005). Com o resultado desta análise, o mel assa-peixe foi descartado da escolha para seguimento das análises. Após as análises anteriores o mel O mel escolhido para seguimento das análises foi o silvestre por ser mais comercializado e de mais fácil acesso pela população (KOMATSU, *et al.* 2002)

6.6. Ficha técnica da preparação

Para o cálculo do peso bruto (PB) foi multiplicado o peso líquido (PL) pelo fator de correção (Fc). A maçã apresentou fator de correção 1,0, pois não ocorreu retirada da casca,

semente e caule para o preparo do suco, uma vez que foi utilizada apenas uma parte da fruta. Para os cálculos da quantidade total, o PB foi multiplicado pelo número de porções.

O custo unitário teve como fonte de valor de mercado o supermercado Pão de Açúcar (www.paodeacucar.com/ Acessado em: 06/12/2016) e refere-se ao custo da unidade utilizada na ficha técnica. Os cálculos para custo total de cada ingrediente foram obtidos pela multiplicação do custo unitário pela quantidade total. Por fim, o custo da porção refere-se ao somatório dos custos totais dos ingredientes **(Figura 6)**.

FICHA TÉCNICA DE PREPARAÇÃO								N°
PREPARAÇÃO: Bebida mista de maracujá, maçã e mel							Nº DE PORÇÕES: 1	
INGREDIENTES	UND	PER CAPITA			Quantidade Total	Medidas Caseiras	Custo Unitário *	Custo Total
		PL	FC	PB				
Água filtrada	L	0,140	1	0,140	0,140	½ copo americano	R$ 1,00	R$ 0,14
Polpa de maracujá azedo *in natura*	L	0,025	1	0,025	0,025	¼ copo americano	R$ 22,00	R$ 0,55
Maçã gala	Kg	0,050	1	0,050	0,050	½ unidade pequena	R$ 5,20	R$ 0,26
Mel	Kg	0,009	1	0,009	0,009	1 colher de sobremesa	R$ 53,00	R$ 0,48
TÉCNICA DE PREPARO								
1. Lavar e sanitizar a maçã com solução de hipoclorito de sódio à 100 ppm durante 15 minutos. 2. Lavar, cortar ao meio, retirar e reservar a polpa do maracujá. 3. Cortar a maçã em cubos com a casca. 3. Colocar em liquidificador a polpa de maracujá, a água e a maçã. 4. Coar o suco com peneira. 5. Adicionar o mel ao suco coado. * Fonte dos cálculos: Supermercado Pão de açúcar								
Custo Total					**Custo por Porção**			
R$ 1,43					R$ 1,43			

Figura 6. Ficha técnica de preparação da bebida mista de maracujá, maçã e mel.

6.7. Análise de aceitação sensorial

O resultado da análise de aceitação sensorial indica que a bebida mista de maracujá, maçã e mel apresentou boa aceitação pelos avaliadores, onde os atributos de avaliação global

e sabor obtiveram médias equivalentes a “gostei moderadamente” e os atributos de aroma ecor equivalente a “gostei muito” **(Tabela 8)**. Moreira (2010) observou que a adição do mel no néctar de goiaba não influenciou negativamente o atributo cor e em relação ao sabor o atributo apresentava-se dentro da faixa de aceitabilidade, assim como Silva et al. (2008) com o néctar de cajú adoçado com mel. No presente trabalho, o atributo sabor apresentou a menor nota. A partir dos comentários dos avaliadores pode-se inferir que esta nota está relacionada com o fato de que os mesmos esperavam sabor mais marcante do maracujá e que a bebida mista apresentava sabor suave, o que pode ser explicado pela diluição em água e adição da maçã. Em relação a avaliação global, Silva et al. (2008) e Moreira (2010) encontraram respostas entre “gostei ligeiramente” e “gostei muito”.

Tabela 8. Pontuação reportada pelos consumidores (n=101) para a bebida mista de maracujá, maçã e mel.

	Atributos			
	Cor	Aroma	Sabor	Avaliação Global
Bebida mista de maracujá, maçã e mel	8,02 ± 1,09	8,42 ± 0,77	7,53 ± 1,22	7,76 ± 0,91

O questionário da análise de aceitação sensorial **(Anexo A)** além de avaliar os atributos da bebida mista apresentava quatro perguntas relacionadas ao consumo da bebida. Ao serem questionados se consumiam algum tipo de bebida mista (mais de 1 ingrediente), 39,6 % dos avaliadores relataram que seu consumo era moderado tendo em sua maioria indicado a frequência de 2 vezes por mês. Apesar disso, o consumo de bebidas mistas à base de frutas misturadas aumentou significativamente nos últimos anos, tornando-se um dos setores da indústria alimentícia com maior crescimento em todo o mundo (SLOAN, 2005).

Sobre a frequência do consumo de mel, 37,62% dos avaliadores relataram que o mesmo era ocasional, tendo em sua maioria indicado a frequência de 5 vezes ao ano. Aos avaliadores que consomem o mel foi questionado seu uso em bebidas e 61,8 % relataram que não utilizam em bebidas. As bebidas mais relatadas pelos que adicionavam o mel foram o chá (31,42 %) e sucos (17,14 %). Por fim, foi investigada a intenção de compra do produto onde

61 % dos avaliadores indicaram a opção “possivelmente sim”.

Como pôde ser observado a frequência de consumo de mel pelos avaliadores é relativamente baixa. No ano de 2014 foi registrado um consumo médio anual de 49 g no Brasil, muito diferente de países como Estados Unidos (910 g/ano) e Suíça (1.500 g/ano) (MAPA, 2015). A maior parte do seu consumo é na forma habitual, pois grande parte da população o considera como um remédio natural (CHEUNG e GERBER, 2009). A utilização do mel em bebidas seria um meio de aumentar o consumo do mesmo. Silva et al. (2008) e Moreira (2010) encontraram resultados positivos para a intenção de compra do néctar de caju adoçado com mel e néctar de goiaba adoçado com mel, respectivamente. As categorias que apresentaram maior frequência foram “talvez comprasse/talvez não” e “provavelmente compraria”, similar ao encontrado no presente estudo onde a maioria dos avaliadores indicou que “possivelmente sim” comprariam o produto.

6.8. Determinação de compostos fenólicos totais após a digestão *in vitro* (fases oral, gástrica e intestinal)

As mudanças no conteúdo de compostos fenólicos da bebida mista ao longo do processo de digestão *in vitro* podem ser observadas na **Figura 7**. Os resultados foram: para a fase oral foi de 282,4 ± 10,6 mg EAG/100 g, para a fase gástrica foi de 351 ± 8,4 mg EAG/100 g e para a fase intestinal foi de 377,8 ± 6,8 mg EAG/100 g. Na fase gástrica ocorreu um aumento do conteúdo de compostos fenólicos de 1,24 vezes e na fase intestinal o aumento foi de 1,34 vezes. Apesar de ter ocorrido aumento no conteúdo de compostos fenólicos em ambas as fases, não houve diferença estatística entre elas.

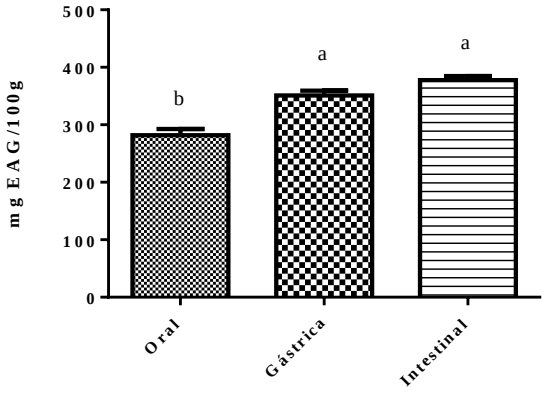


Figura 7. Compostos fenólicos totais da bebida mista durante as fases da digestão *in vitro* (oral, gástrica e intestinal). Letras diferentes indicam que houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura. Attri et al. (2017), avaliaram o teor de CFT e capacidade antioxidante de sucos de frutas e encontraram aumento significativo no teor de CFT nas fases gástrica e intestinal. Um dos sucos analisados aumentou os CFT 4,15 vezes após a fase gástrica e 4,4 vezes após a fase intestinal. Wootton-Beard et al. (2011) também observaram um aumento após a fase gástrica nos 23 sucos analisados, onde o maior aumento consistiu em 1,67 vezes e após a fase intestinal o maior aumento foi de 1,28 vezes. Jayawardena *et al.* (2015) avaliaram 22 sucos e dentre eles 2 apresentaram aumento significativo na fase gástrica e 15 apresentaram aumento na fase intestinal de até 1,21 vezes. No entanto, estudos com chocoberry, gengibre e manjericão, isolados ou combinados, mostraram resultados contrários, apresentando diminuição no conteúdo após as fases gástricas e/ou intestinal (BERMÚDEZ-SOTO et al., 2007; YANG et al., 2016).

O aumento de CFT ao longo da digestão simulada pode ser devido ao baixo pH e ação das enzimas digestivas, principalmente da fase gástrica, que seriam capazes de hidrolisar alguns compostos fenólicos ligados à carboidratos e proteínas da matriz alimentar (SAURA-CALIXTO et al., 2007). As discrepâncias entre os resultados encontrados e a literatura, por sua vez, podem ser por possíveis ações sinérgicas ou antagonistas dependendo da matriz alimentar ou das diferentes condições experimentais utilizadas (RICE-EVANS et al.,1997; MANACH et al., 2005; GAYOSO et al., 2016).

6.9. Análises da capacidade antioxidante (CA) pelo método de FRAP e TEAC após a digestão *in vitro* (fases oral, gástrica e intestinal)

Uma vez que a liberação dos compostos fenólicos da matriz alimentar é fundamental para a sua absorção, a simulação *in vitro* do trato digestório humano em condições controladas (pH, sais biliares, enzimas gástricas e pancreáticas, tempo e temperatura) é importante para verificar possíveis mudanças na estrutura química, as quais podem afetar sua biodisponibilidade, bem como a capacidade antioxidante e portanto, proporcionar para possíveis efeitos benéficos à saúde (FERNÁNDEZ-GARCIA et al., 2009; CARBONELL-CAPELLA et al., 2014).

Os resultados obtidos pelo método de FRAP foram expressos em mmol Fe^{+2}/100 g de bebida liofilizada. A fase oral apresentou o valor de 991,1 ± 20,13 mmol Fe^{+2}/100 g, para a fase gástrica foi de 1.309,0 ± 39,42 mmol Fe^{+2}/100 g, para a fase intestinal foi de 1.285,9 ± 71,4 mmol Fe^{+2}/100 g.

Os resultados obtidos pelo método de TEAC foram expressos em mmol Trolox/100g de bebida liofilizada. A fase oral apresentou o valor 1.890,1 ± 23,4 mmol Trolox/100 g, para a fase gástrica foi 2.454,8 ± 37,7 mmol Trolox/100 g e para a fase intestinal foi de 3.002,5 ± 86,6 mmol Trolox/100g. A fase intestinal apresentou a mesma CA que a fase gástrica pelo método FRAP, com um aumento de 1,32 e 1,30 vezes, respectivamente, em comparação com o início da digestão **(Figura 8A)**. E pelo método TEAC as fases diferiram entre si e o maior teor encontrado foi na fase intestinal, apresentando um aumento de 1,59 vezes **(Figura 8B)**.

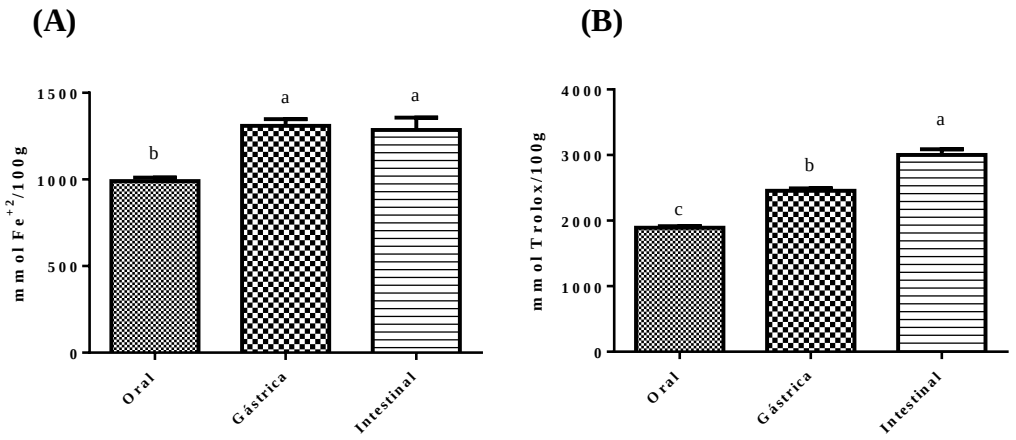


Figura 8. Capacidade Antioxidante pelos métodos de FRAP (A) e TEAC (B) das fases da digestão *in vitro* (oral, gástrica e intestinal). Letras diferentes indicam que houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ryan e Prescott (2010) avaliaram a CA após a digestão *in vitro* de 25 sucos e encontraram que para a análise de FRAP, 12 sucos apresentavam aumento, alcançando valores até 2,34 vezes maiores após a digestão. Jayawardena et al. (2015) analisaram 22 sucos e dentre eles, 21 apresentaram aumento na fase gástrica, sendo o maior valor de 1,55 vezes e na fase intestinal aproximadamente 2 vezes. Wootton-Beard et al. (2011) também observaram um aumento na CA após a fase gástrica nos 23 sucos analisados, onde o maior aumento consistiu em 1,67 vezes e após a fase intestinal, o maior aumento foi de 2,72 vezes. Attri et al. (2017) avaliaram a CA pelo método de TEAC de 6 sucos de duas marcas diferentes. Dois sucos apresentaram aumento na fase gástrica com valores até 21 vezes maior do que afase oral. Todos os sucos apresentaram aumento na CA na fase intestinal seguindo o mesmo padrão para compostos fenólicos totais.

Outros estudos que avaliaram a CA após a digestão *in vitro* encontraram uma diminuição na CA, o que pode ser devido ao tipo de análise empregada, como por exemplo, analisar a CA de compostos bioativos específicos e não a CA do conjunto de substâncias presentes na amostra. Quando os compostos passam por mudanças de pH e pela ação de enzimas digestivas, podem gerar outros compostos/metabólitos com formas estruturais diferentes e ao se analisar a capacidade em compostos específicos pode-se subestimar a CA (BERMÚDEZ-SOTO et al., 2007; YANG et al., 2016).

6.10. Perfil dos compostos fenólicos na bebida mista e após sua digestão *in vitro* (fases oral, gástrica e intestinal)

Foram encontrados quatro compostos fenólicos na bebida mista, sendo eles um derivado do ácido hidroxibenzóico (ácido gálico), um derivado do ácido hidroxicinâmico (ácido 5-cafeoilquínico) e dois derivados de flavonóis (quercetina e rutina). Nas fases oral, gástrica e intestinal foram encontrados dois derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido 5-cafeoilquínico e ácido 3-cafeoilquínico) e dois derivados de flavonóis (quercetina e rutina) (**Anexo F-I**).

Dentre os compostos encontrados na bebida mista, o maracujá pode ter contribuído no teor de quercetina, além da maçã (BOYER e HAI-LUI, 2004; KONTA et al., 2014). A maçã pode também ser responsável pelos teores de ácido 5-cafeoilquínico e ácido gálico (BOYER e HAI-LUI, 2004; MALEC et al., 2014) e o mel pode ser uma das fontes de ácido gálico, rutina

e quercetina (LIANDA et al., 2012). Tais contribuições demonstram que a mistura desses ingredientes é benéfica para o enriquecimento nutricional da bebida, visto que nenhum dos ingredientes utilizados na bebida mista, por si só, possui todos os compostos encontrados.

Ao final da digestão *in vitro* é possível verificar um aumento no teor total de compostos fenólicos quando comparado à bebida mista, sendo o ácido 5-cafeoilquínico o composto que estaria influenciando em maior escala este resultado **(Tabela 9)**.

Tabela 9. Teores (µg / 100 g bs) de compostos fenólicos da bebida mista e após a digestão *in vitro* (oral, gástrica e intestinal).

Composto	**Bebida mista**	**Oral**	**Gástrica**	**Intestinal**
Ácido gálico	2913,6±0,0^{B}			
Ácido 5-cafeoilquínico	3017,9±0,0^{cA}	4501,2±376,5 ^{bA}	5570,4±327,0^{aA}	6197,2±6,7^{aA}
Ácido 3-cafeoilquínico[1]		2925,7±138,3^{aB}	3157,2±332,6^{aB}	2543,5±116,5^{aB}
Quercetina	1878,7±0,0^{aD}	1227,3±15,1^{bC}	1734,2±222,2^{aC}	1303,2±83,8^{bC}
Rutina	2386,5±0,0^{aC}	2158,3±3,8^{aB}	1534,0±356,6^{bC}	1488,4±81,3^{bC}
Total	10.196,7	10.812,5	11.995,8	11.532,3

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as etapas (One-Way Anova, $p<0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre compostos (One-Way Anova, $p<0,05$).
[1] Os teores de ácido 3-cafeoilquínico foram calculados utilizando o ácido 5-cafeoilquínico como composto padrão.

6.10.1 Ácido gálico

O ácido gálico foi o segundo, em concentração, encontrado na bebida, entretanto, a partir do início da digestão *in vitro* (fase oral) ele não foi mais detectado **(Tabela 9)**.

Hossain et al. (2014) observaram que a saliva era capaz de proteger contra o dano ao DNA causado por pirogalol polifenóis, como o ácido gálico. O componente da saliva que demonstrou ser o principal responsável por se ligar ao pirogaloil, um polifenol, foi a α-amilase através da interação hidrofóbica com anéis aromáticos (GYÉMÁNT et al., 2009). Esta interação poderia, em parte, justificar a ausência deste composto já na fase oral.

6.10.2. Ácido 5-cafeoilquínico e 3-cafeoilquínico

O ácido 5-cafeoilquínico foi encontrado majoritariamente tanto na bebida mista quanto nas diferentes fases da digestão *in vitro* (oral, gástrica e intestinal). A bebida mista ao passar pela fase oral apresentou um aumento de 49% do composto, ao passar pela fase gástrica houve um acréscimo de 35 % e na fase intestinal um acréscimo de 21%, ou seja, ao final da digestão foi observado um aumento total de 105% do ácido 5-cafeoilquínico **(Tabela 9)**.

Rodríguez-Roque et al. (2013) também observaram aumento do ácido 5-cafeoilquínico após a fase gástrica. Os autores sugerem que a estabilidade fenólica dependa de alguns fatores, como as propriedade físico-químicas do composto além da sua interação com constituintes da dieta e constituintes da fase gástrica, uma vez que o pH e as enzimas presentes no estômago, como a pepsina, poderiam liberar o composto ligado a carboidratos da matriz alimentar (SAURA-CALIXTO et al., 2007).

O ácido cafeico é um composto que pode ser encontrado após a digestão *in vitro*, principalmente após a fase intestinal, devido à quebra do ácido 5-cafeoilquínico. Este composto não foi encontrado o que pode ser, em parte, devido à falta de atividade da esterase na pancreatina comercial utilizada ou pela ausência de atividade significativa de esterase do lúmen intestinal, o que foi observado em estudos com pacientes ileostomizados (OLTHOF et al., 2001; BERMÚDEZ-SOTO et al., 2007; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013).

O ácido 3-cafeoilquínico foi encontrado na fase oral da digestão simulada, se mantendo estável nas fases gástrica e intestinal. Nas três fases, ele foi o segundo composto que apresentou maiores teores **(Tabela 9)**.

Bermúdez-Soto et al. (2007) observaram a diminuição nos níveis de ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) e a formação de ácido neoclorogênico (ácido 3-cafeoilquínico) durante a fase intestinal e atribuiu essa alteração ao aumento do pH final. Não foi observado diminuição do ácido 5-cafeoilquínico concomitante ao aumento do ácido 3-cafeoilquínico,

O aparecimento do ácido 3-cafeoilquínico pode ser devido, em parte, à isomerização do ácido 5-cafeoilquínico e do ácido 4-cafeoilquínico (composto não encontrado durante a digestão deste estudo). Este fenômeno acontece em maior escala em pH básico (pH 7,0), porém também ocorre em pHs mais baixos (pH 3,0) (XIE et al., 2011).

Sendo assim, os valores encontrados podem ser devido a total isomerização do ácido 4-cafeoilquínico ao 3-cafeoilquínico e isomerização do ácido 5-cafeoilquínico, uma vez que não apresentou diminuição dos teores, provavelmente por liberação gradual da matriz

alimentar ao longo da digestão.

6.10.3 Quercetina e rutina

Após a fase oral, a quercetina teve diminuição de 37% e em seguida o teor se reestabeleceu, chegando a valores similares ao encontrado inicialmente na bebida mista. Na fase intestal houve um decréscimo de 32%, o que torna a sua concentração final equivalnete à da fase oral **(Tabela 9)**. A quercetina foi o composto minoritário encontrado na bebida mista e em todas as fases da digestão *in vitro*.

O aumento do teor de quercetina após a fase gástrica da digestão *in vitro* também foi observado por Hur et al. (2013) que realizaram a digestão simulada *in vitro* de extrato de cebola. Esse resultado pode estar relacionado à deglicosilação de outros flavonoides presentes na bebida mista, como a rutina, sendo a quercetina sua forma aglicona.

A redução da concentração de flavonoides no trato digestório, após a digestão intestinal, pode ser devida a alta instabilidade sob condições alcalinas (pH 7,4) prevalente no intestino delgado (BERMÚDEZ-SOTO et al., 2007). Não houve diferença significativa no teor da rutina entre a bebida mista e o primeiro estágio da digestão *in vitro*, a fase oral. Na fase gástrica houve um decréscimo de 36%, o qual se manteve na fase intestinal **(Tabela 9)**.

É possível observar uma relação inversa entre o teor de quercetina e rutina na fase gástrica**.** A rutina, também conhecida como quercetina-3-rutinosídeo, pode ter sido deglicosilada à quercetina aglicona, justificando sua diminuição a partir da fase gátrica (MANACH et al., 1997; LÓPEZ DE LACEY et al., 2012). A maioria da rutina encontrada na matriz alimentar passa intacta pelo lúmem intestinal, sem ser absorvida, alcançando o cólon de indivíduos saudáveis ou emerge no líquido ileal no caso de indivíduos com uma ileostomia, além de poder ser deglicosilada pelas bactérias colônicas (DAY e WILLIAMSON, 2001).

6.11. Determinação da bactéria probiótica utilizada no estudo

A atividade enzimática das bactérias probióticas é variável entre os gêneros, cepas e estirpes, assim como as atividades de glicosidase ou raminosidase, são específicas para cada substrato, atuando de modo diferente em compostos distintos (OTIENO et al., 2005;

AMARETTI et al., 2015). Assim, a eficiência da bioconversão deve ser testada para cada composto fenólico de interesse.

Para a escolha da bactéria probiótica a ser utilizada no estudo foi testada a eficácia da conversão do ácido 5-cafeoilquínico em seus metabólitos. Tal composto foi escolhido por ser o majoritário na bebida mista.

As bactérias probióticas testadas foram: *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum*. Trabalhos descritos na literatura demonstram a conversão do ácido 5-cafeoilquínico em seus metabólitos pelas três cepas (FRITSCH et al., 2016; RAIMONDI et al., 2015; KIM e BAIK, 2015).

Após 24 horas de incubação do ácido 5-cafeoilquínico com cada bactéria separadamente, apenas a *Lactobacillus acidophilus* não apresentou diferença significativa. As outras duas bactérias testadas apresentaram redução do teor de ácido 5- cafeoilquínico, porém não foram identificados os metabólitos do composto testado **(Figura 9)**.

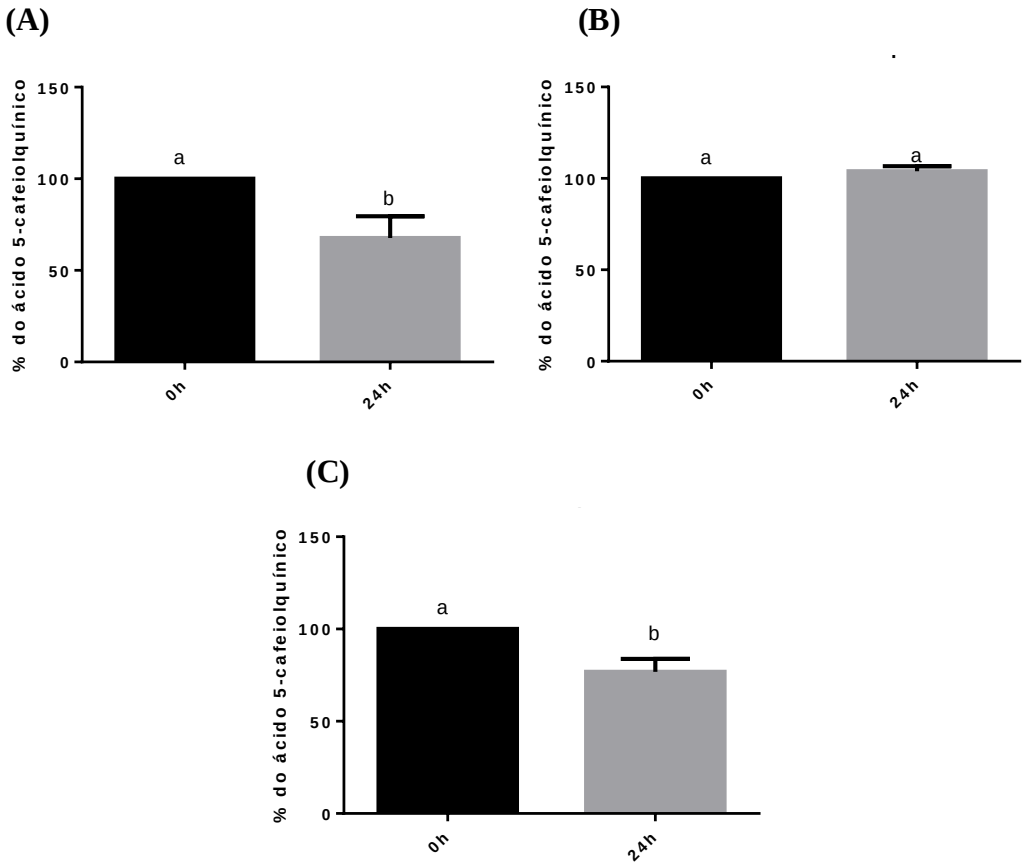


Figura 9. Percentual de ácido 5-cafeoilquínico nos tempos 0h e 24h incubados com *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 (A), *Lactobacillus acidophilus* (B) ou *Lactobacillus plantarum* **(C)**. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa pelo

teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao comparar as três bactérias probióticas em relação ao % do ácido 5-cafeoilquínico encontrado após 24 horas de incubação, o *Lactobacillus plantarum* e *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 não apresentaram diferença significativa (**Figura 10)**. Na análise da fermentação *ex vivo,* essa redução poderia ser analisada mais profundamente por meio da utilização do LC-EM para detectar possíveis metabólitos.

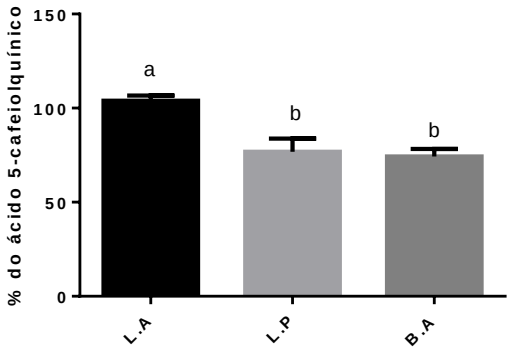


Figura 10. Percentual de ácido 5-cafeoilquínico no tempo de 24 h incubados com *Lactobacillus acidophilus* (L.A), *Lactobacillus plantarum* (L.P) e *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 (B.A). Letras diferentes indicam que houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A bactéria escolhida para seguimento das análises foi a *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12, pois além de reduzir o teor de ácido 5-cafeoilquínico é considerada uma bactéria probiótica com alegação de propriedade funcional ou alegação de saúde pelo órgão regulamentador no Brasil, enquanto a segunda ainda encontra-se na lista (ANVISA, 2002).

6.12. Perfil dos compostos fenólicos na fermentação colônica *ex vivo* com e sem adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12.

6.12.1. Efeito do tempo de fermentação sobre os compostos fenólicos

6.12.1.1. *Ácido 5-cafeoilquínico e 3-cafeoilquínico*

A quantidade de ácido *5*-cafeoilquínico não apresentou diferença significativa entre os tempos 0 e 4 horas. Após 24 horas de fermentação, a tendência foi de diminuição do composto **(Tabela 10).**

Tabela 10. Quantidade (µg/100 g bs) de ácido 5-cafeoilquínico na fermentação colônica *ex vivo* de três voluntários com e sem adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12.

Tempo de fermentação/ voluntário	**Sem probiotico**			**Com probiotico**		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3
0h	2.381,6 ± 633,9^{aA}	2.324,3 ± 377,1^{aA}	3.451,5 ± 159,7^{aA}	1.908,2 ± 0,0^{cB}	2.851,6 ± 0,0^{aA}	2.663,6 ± 0,0^{b}
4h	3.391,6 ± 761,0^{a,bA}	1.480,8 ± 47,6^{bA,B}	3.438,3 ± 484,0^{aA}	3.248,2 ± 260,3^{a,bA}	1.956,9 ± 857,3^{bA}	ND
24h	ND	1.383,3 ± 0,0^{B}	ND	360,6 ± 318,5 ^{aC}	ND	ND

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os voluntários do mesmo grupo (One-Way Anova, $p<0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tempos (Teste *t* não-pareado, $p<0,05$ ou One-Way Anova, $p<0,05$). V1: voluntário 1; V2: voluntário 2; V3: voluntário 3; ND: não detectado.

Na fermentação *ex vivo* com adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 foi possível observar uma maior variação entre os voluntários, principalmente após 4 horas de incubação. Em 24 horas, no entanto, também foi observado diminuição ou desaparecimento do composto **(Tabela 10)**.

Rechner et al. (2004) também observaram que, no período de 24 horas, o ácido 5-cafeoilquínico não é mais encontrado na fermentação das fezes de doadores. Eles verificaram que a velocidade de degradação do composto foi diferente para cada voluntário, o que poderia ser justificado pela composição da microbiota intestinal de cada indivíduo, semelhante aos

dados apresentados nesta dissertação.

O ácido 3-cafeoilquínico também apresentou padrão semelhante ao ácido 5-cafeoilquínico quanto a manutenção dos teores nos tempos de 0 e 4 horas de fermentação, além da diminuição ou não detecção após 24 horas de fermentação **(Tabela 11)**.

Tabela 11. Quantidade (µg/100 g bs) de ácido 3-cafeoilquínico na fermentação colônica *ex vivo* de três voluntários com e sem adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12.

Tempo de fermentação/ voluntário	**Sem probiotico**			**Com probiotico**		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3
0h	1.635,8 ± 0,0^{Aa}	1.076,5 ± 323,1^{aA}	1.531,5 ± 19,66^{aA}	1.489,4 ± 0,0^{aA}	953,1 ± 0,0^{cA}	1.019,6 ± 0,0^{b}
4h	1.909,8 ± 0,0^{aA}	759,3 ± 47,6^{cA,B}	1.459,4 ± 99,91^{bA}	1.611,8 ± 14,92^{a,bA}	689,2 ± 363,0^{bA}	ND
24h	484,9 ± 298,6^{aB}	481,4 ± 0,0^{aA}	ND	150,1 ± 185,0^{B}	ND	ND

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os voluntários do mesmo grupo (One-Way Anova, $p<0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tempos (Teste *t* não-pareado, $p<0,05$ ou One-Way Anova, $p<0,05$). V1: voluntário 1; V2: voluntário 2; V3: voluntário 3; ND: não detectado.

O teor de ácido 3-cafeoilquínico na fermentação com adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 apresentou padrão semelhante à fermentação sem bactéria probiótica, em que o teor se manteve estável entre o tempo 0 até 4 horas e houve diminuição ou não detecção após 24 horas **(Tabela 11)**.

Rechner et al. (2004) observaram que o primeiro estágio da metabolização do ácido 5-cafeoilquínico é a epimerização em ácido 3- e 4-cafeoilquínico, o que poderia justificar a manutenção do teor do 3-cafeoilquínico nas primeiras horas da fermentação. Nas horas subsequentes eles encontraram outros metabólitos do 5-cafeoilquínico, sendo eles o ácido cafeico e o ácido 3-(3-hidroxifenil)-propiônico. No presente estudo não foram encontrados esses compostos.

Os cromatogramas referentes aos dados acima se encontram nos **Anexos J-Y**.

6.12.1.2. *Quercetina*

Durante a fermentação, a quercetina apresentou padrão diferente entre os voluntários, mas após 24 horas de fermentação observa-se que há diminuição do teor **(Tabela 12)**. Para os voluntários 1 e 2 houve redução de 31,7% e 38,2%, respectivamente, enquanto que para o voluntário 3 a redução chegou a 58,9% do conteúdo observado no tempo 0h.

Tabela 12. Quantidade (µg/100 g bs) de quercetina na fermentação colônica *ex vivo* de três voluntários com e sem adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12.

Tempo de fermentação/ voluntário	**Sem probiotico**			**Com probiotico**		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3
0h	2.171,5 ± 533,3^{aB}	2.465,3 ± 803,5^{aA}	4.173,1 ± 148,7^{aA}	1.950,2 ± 0,0^{bB}	2.097,5 ± 0,0^{aA}	1.859,6 ± 0,0^{c}
4h	3.666,0 ± 18,6^{a,bA}	3.072,0 ± 423,1^{bA}	4.693,9 ± 76,9^{Aa}	2.695,8 ± 219,1^{a,bA,B}	2.199,5 ± 17,9^{bA}	ND
24h	1.483,3 ± 0,0^{aB}	1523,8 ± 739,0^{aA}	1713,7 ± 152,7^{aB}	2.230,1 ± 141,2^{aB}	1.591,6 ± 509,1^{aA}	ND

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os voluntários do mesmo grupo (One-Way Anova, $p<0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tempos (Teste *t* não-pareado, $p<0,05$ ou One-Way Anova, $p<0,05$). V1: voluntário 1; V2: voluntário 2; V3: voluntário 3; ND: não detectado.

Nas primeiras horas da fermentação é possível observar teores de quercetina superiores aos encontrados ao final da digestão *in vitro (*1.303,2 ± 83,8 µg / 100 g bs, conforme **(Tabela 9)**. Em contrapartida, durante a fermentação não foi encontrado o composto rutina. Estudos demonstram que a atividade da β-glicosidase pela microbiota intestinal pode resultar na clivagem da rutina liberando quercetina e sua posterior degradação

(MANACH et al., 1997; RECHNER et al., 2004; JAGANATH et al., 2009). Outros compostos glicosídeos de quercetina poderiam ter sido clivados pela β-glicosidase e β-raminosidase encontradas na microbiota intestinal, levando a esse aumento na concentração de quercetina aglicona (SCHNEIDER et al., 1999).

Outros compostos são gerados a partir da fissão do anel C da aglicona quercetina, como o ácido 3,4-dihidroxifenilacético, entretanto o mesmo não foi encontrado no presente estudo (JAGANATH et al., 2009).

Os cromatogramas referentes aos dados acima se encontram nos **Anexos J-Y**.

6.12.1.3. *Todos os compostos*

Ao agruparmos os resultados dos três voluntários nos diferentes tempos de fermentação conseguimos observar que, de modo geral, ocorre diminuição nos teores de todos os compostos, após 24 horas de fermentação **(Tabela 13)**.

Tabela 13. Somatório dos teores (µg / 100 g bs) de ácido 5-cafeoilquínico, 3-cafeoilquínico e quercetina na fermentação colônica *ex vivo* dos três voluntários, sem adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12.

Tempo de fermentação	**Compostos**			
	Ácido 5-cafeoilquínico	Ácido 3-cafeoilquínico	Quercetina	Total
0h	2.719 ± 660,6^{aA}	1.238 ± 430,5 ^{bA}	2.696 ± 742,1 ^{aA}	6.653
4h	2.970 ± 1.256^{aA}	1.299 ± 455,9^{bA}	3.592 ± 522,2 ^{aA}	7.861
24h	230,6 ± 564,7^{bB}	241,9 ± 296,7^{bB}	1.326 ± 739,1^{aB}	1.798,5

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os compostos (One-Way Anova, p<0,05). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tempos (One-Way Anova, p<0,05).

E se compararmos o teor de compostos fenólicos totais por CLAE da bebida mista (10.196 µg / 100 g bs) com o encontrado ao final de 24 horas (1.798 µg / 100 g bs), verifica-se uma diminuição de 82%. A quercetina apresentou maior influência no resultado final, diferente da análise no final da digestão, onde o ácido 5-cafeoilquínico possuía maior

representatividade no teor total.

6.12.2. Efeito da adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 sobre o teor dos compostos fenólicos e perfil da microbiota intestinal

Os três voluntários analisados demonstram padrões diferentes de metabolização dos compostos em relação ao efeito da adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 **(Figura 10)**.

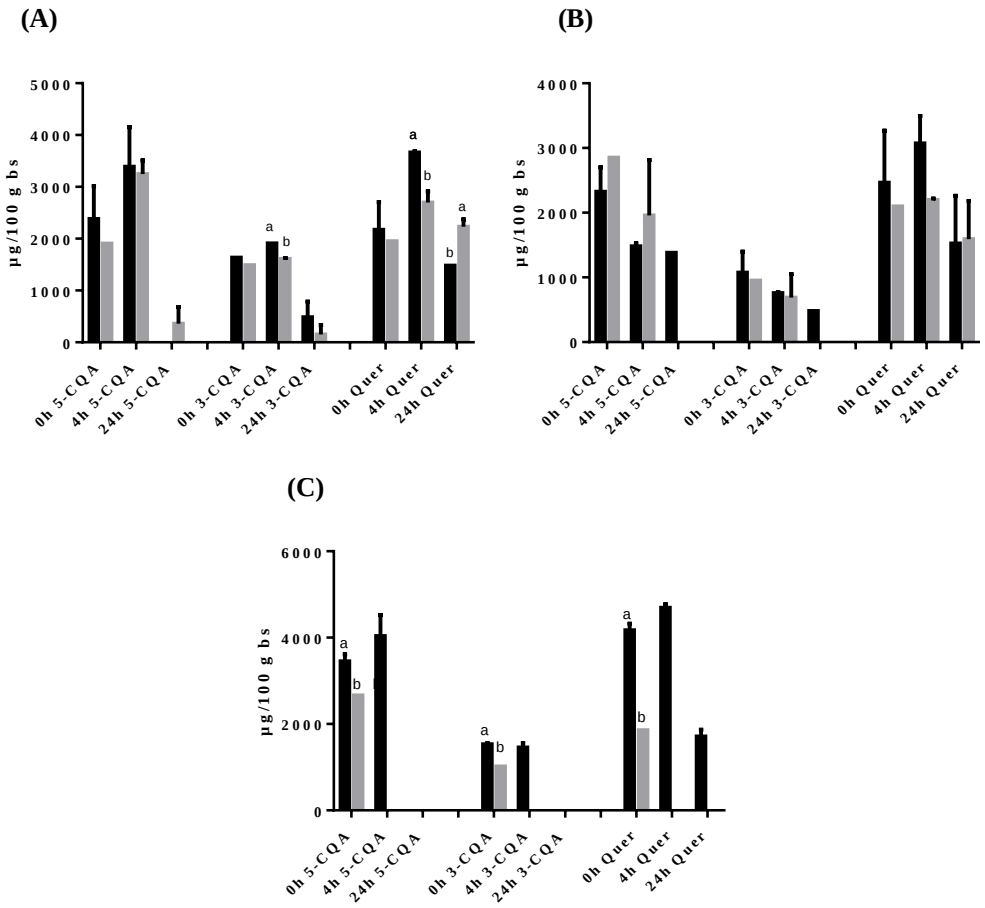


Figura 10. Comparação entre os tempos da fermentação *ex vivo* (0h, 4h, 24h) sem a adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 (■) e com adição (■) nos voluntários 1 (A), voluntário 2 (B) e voluntário 3 (C). 5-CQA: ácido 5-cafeoilquínico, 5-CQA: ácido 3-cafeoilquínico, Quer: quercetina. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa

pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No voluntário 1, após 24 horas com adição da *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 ainda detecta-se o ácido 5-cafeoilquínico e o ácido 3-cafeoilquínico após 4 horas de fermentação esta em menor quantidade do que sem a *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12. Em relação ao composto quercetina, a bactéria probiótica causou uma diminuição no teor no tempo de 4 horas e um aumento no tempo 24 horas quando comparado a fermentação sem a adição da bactéria **(Figura 10A)**.

No voluntário 2, os ácidos 5 e 3-cafeoilquínico não foram detectados na fermentação com a bactéria probiótica após 24 horas de fermentação, ao passo que sem a adição da bactéria probiótica eram detectados, apesar de em pequenas concentrações **(Figura 10B)**.

O voluntário 3 foi o que se mostrou mais sensível à fermentação com a adição da *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12. Em relação ao ácido 5-cafeoilquínico, com a adição do probiótico observamos uma diferença no tempo 0 hora comparado a fermentação sem a bactéria e não mais detectado após 4 horas de fermentação. O mesmo padrão foi observado com o ácido 3-cafeoilquínico e quercetina, comparativamente, apresentou um menor teor no tempo 0 hora na fermentação adicionada de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 e não foram detectada nos tempos subsequentes **(Figura 10C)**.

Observando os três voluntários, podemos verificar que o composto que mais se mostrou sensível a adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 foi a quercetina.

O tempo de 24 horas apresentou as maiores diferenças nos teores de quercetina e dos ácidos 5- e 3-cafeoilquínico. Nesse tempo de 24 horas foi analisada a variação relativa de quatro filos de bactérias: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobactéria e da classe Ɣ-Proteobactéria, sendo os três primeiros filos os mais dominantes no cólon (WALKER et al., 2014).

A fermentação adicionada de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 resultou em percentual maior dos filos Firmicutes e Actinobactéria e da classe Ɣ-Proteobactéria, com exceção do voluntário 2, que não apresentou diferença significativa para este filo. O filo Bacteroidetes não apresentou diferença significativa, com exceção do voluntário 3 onde podemos observar um percentual menor quando comparado a fermentação sem a adição da bactéria probiótica.

Huang et al. (2016) observaram que a quercetina era capaz de aumentar o percentual

do filo Firmicutes e Proteobactéria. O aumento transitório da quercetina pode ter influenciado a variação desses filos no tempo de 24 horas de fermentação adicionada de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 nos voluntários 1 e 2 **(Figura 11)**.

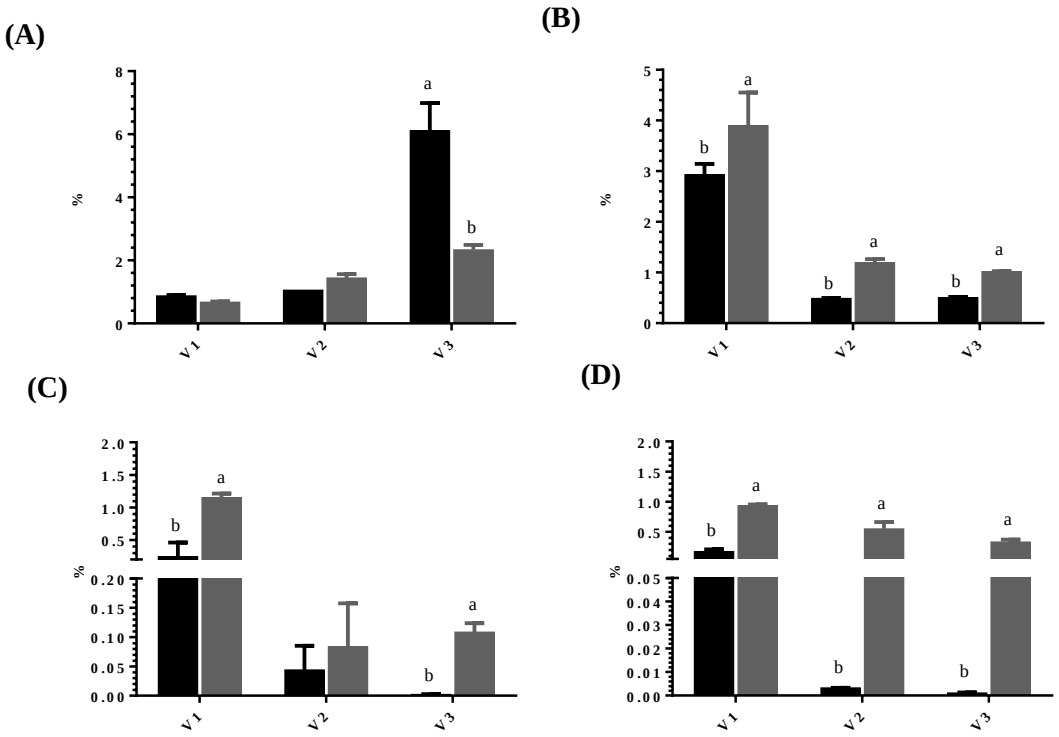


Figura 11. Comparação entre o tempo de 24 horas da fermentação *ex vivo* sem adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 (■) e com adição (■) nos filos Bacteroidetes (A), Firmicutes (B), Actinobacteria (C) e γ-Proteobacteria (D). Letras diferentes indicam que houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. V1: voluntário 1; V2: voluntário 2; V3: voluntário 3.

No filo Actinobactéria encontra-se o gênero *Bifidobacterium*. Wang et al. (2004) avaliaram as bactérias intestinais predominantes em amostras fecais e encontraram *Bifidobacterium longum, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium catenulatum* e *Bifidobacterium angulatum*. LoCascio et al.(2006) observaram que *Bifidobacterium longum* era capaz de diminuir o teor de quercetina, o que poderia justificar o desaparecimento deste composto no voluntário 3, visto que comparando o tempo de 24 horas de fermentação sem a adição de *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 e com a adição, este voluntário foi o que apresentou maior diferença **(Figura 11)**.

7. CONCLUSÕES

Inicialmente, para definição do mel a ser utilizado na elaboração da bebida mista, observamos que o mel da florada silvestre apresentou os maiores valores de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante por FRAP, DPPH e TEAC, além de ser mais comercializado e de mais fácil acesso pela população. A bebida mista foi composta de três ingredientes diferentes com distinto perfil de CBAs e nutrientes, o que leva ao aumento do aporte e da diversidade de compostos bioativos oferecidos.

Ao ser submetida à digestão *in vitro*, abebida mista de maracujá, maçã e mel silvestre, verificou-se um aumento no teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante por FRAP e TEAC. Esse aumento pode ser devido a liberação dos compostos da matriz alimentar ocasionado pela ação do pH e das enzimas digestivas utilizados, melhorando sua bioacessibilidade.

Em relação aos compostos fenólicos encontrados na bebida mista e nas fases da digestão *in vitro*, observamos que o ácido gálico foi o único CBA não encontrado em qualquer fase da digestão *in vitro*, o que pode estar relacionado com sua possível interação com a enzima alfa-amilase. O aumento no teor do ácido 5-cafeoilquínico, em todas as fases da digestão *in vitro*, pode estar relacionado à sua liberação da matriz alimentar, uma vez que pode estar associado a carboidratos. O processo digestório parece afetar de forma distinta cada composto fenólico, podendo ser positivo em alguns casos ao aumentar sua bioacessibilidade, porém atuar de forma negativa para outros ao ocasionar mudanças em suas estruturas, gerando metabólitos.

Na fermentação colônica *ex vivo* pode-se observar que há grande variabilidade na microbiota dos voluntários, observado pelas diferenças nos percentuais dos filos, o que reflete diretamente nas quantidades de fenólicos detectadas em cada indivíduo. No entanto, de maneira global, a fermentação colônica parece ter um impacto negativo sobre o teor de quercetina e ácidos 5 e 3-cafeoilquínico.

A adição da bactéria *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 parece influenciar a fermentação colônica, no entanto, esta também apresenta variações entre os indivíduos. Dependendo da interação desta com os demais microrganismos presentes na microbiota intestinal o impacto sobre os compostos fenólicos pode ser distinto e característico de cada pessoa

Com esses resultados podemos concluir que esta bactéria teve associações com as

diferentes espécies da microbiota dos voluntários e, possívelmente, outras bactérias foram responsáveis pela hidrólise dos compostos presentes na bebida mista. A composição da microbiota tem efeito direto no metabolismo de compostos durante a fermentação colônica, o que por sua vez irá afetar a capacidade da cepa probiótica em se manter e atuar durante a fermentação. Inversamente, *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 pode ter, por exemplo, modificado o perfil da microbiota, tornando-a favorável para a hidrólise dos compostos.

As modificações no perfil de compostos fenólicos presentes na bebida mista durante o processo de digestão e fermetação colônica podem ser observadas de forma resumida nas figuras 16 e 17. Os resultados obtidos do presente trabalho demonstram que os perfis quantitativo e qualitativo dos compostos encontrados na bebida mista são modificados durante o processo digestório, sendo importante, futuramente, a investigação dos metabólitos gerados individualmente para avaliar seus possíveis efeitos benéficos à saúde.

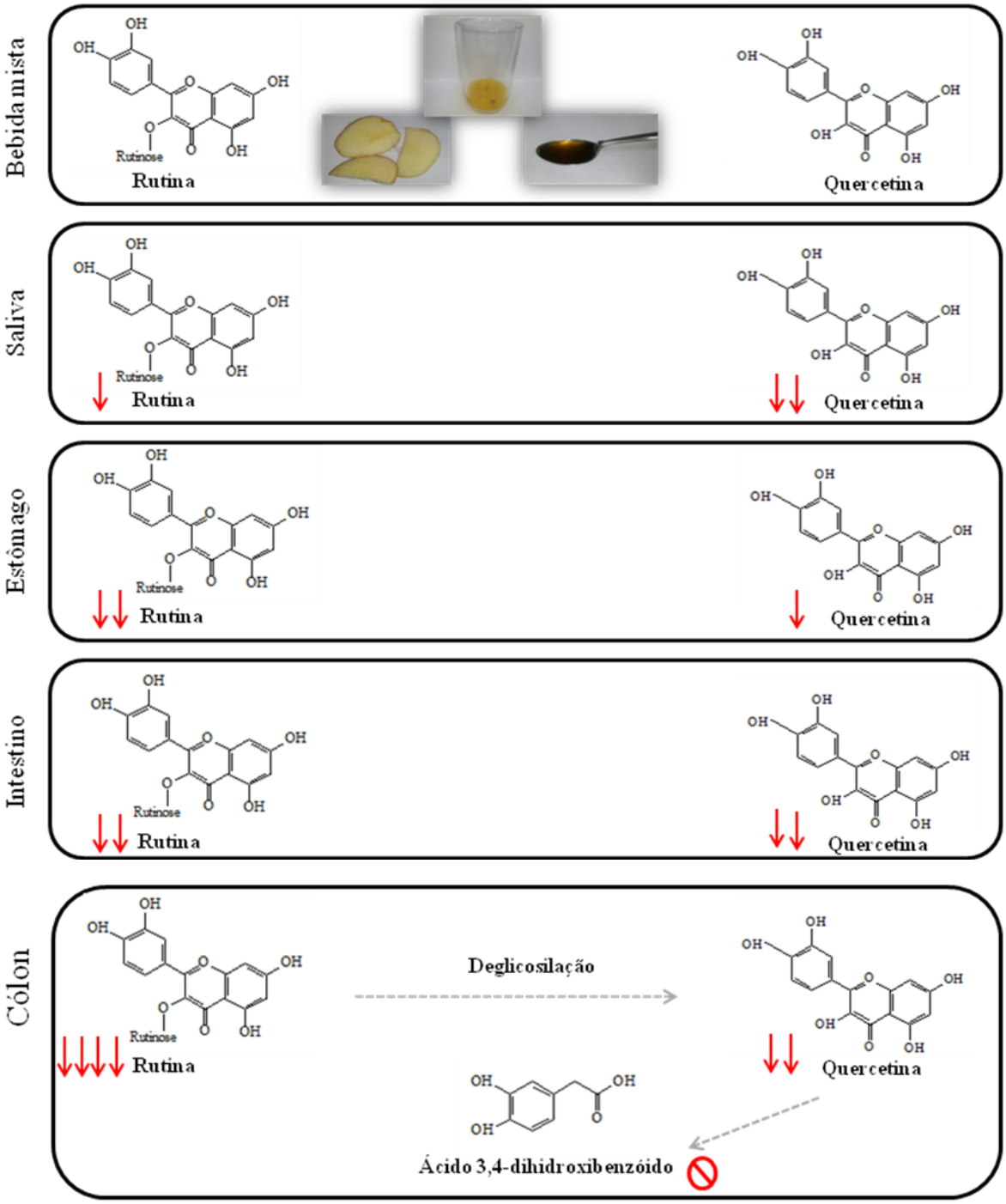


Figura 13. Representação esquemática da via metabólica da rutina e quercetina presentes na bebida mista de maracujá, maçã e mel. As setas vermelhas representam a diminuição do teor dos compostos em comparação com a bebida mista. As setas tracejadas indicam possíveis vias metabólicas, já descritas na literatura, mas não observados no presente trabalho. O símbolo indica metabólitos descritos na literatura, mas não identificados no presente estudo.

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

↑↑↑(125/100%) ↑↑(100/75%) ↑(75/50%)

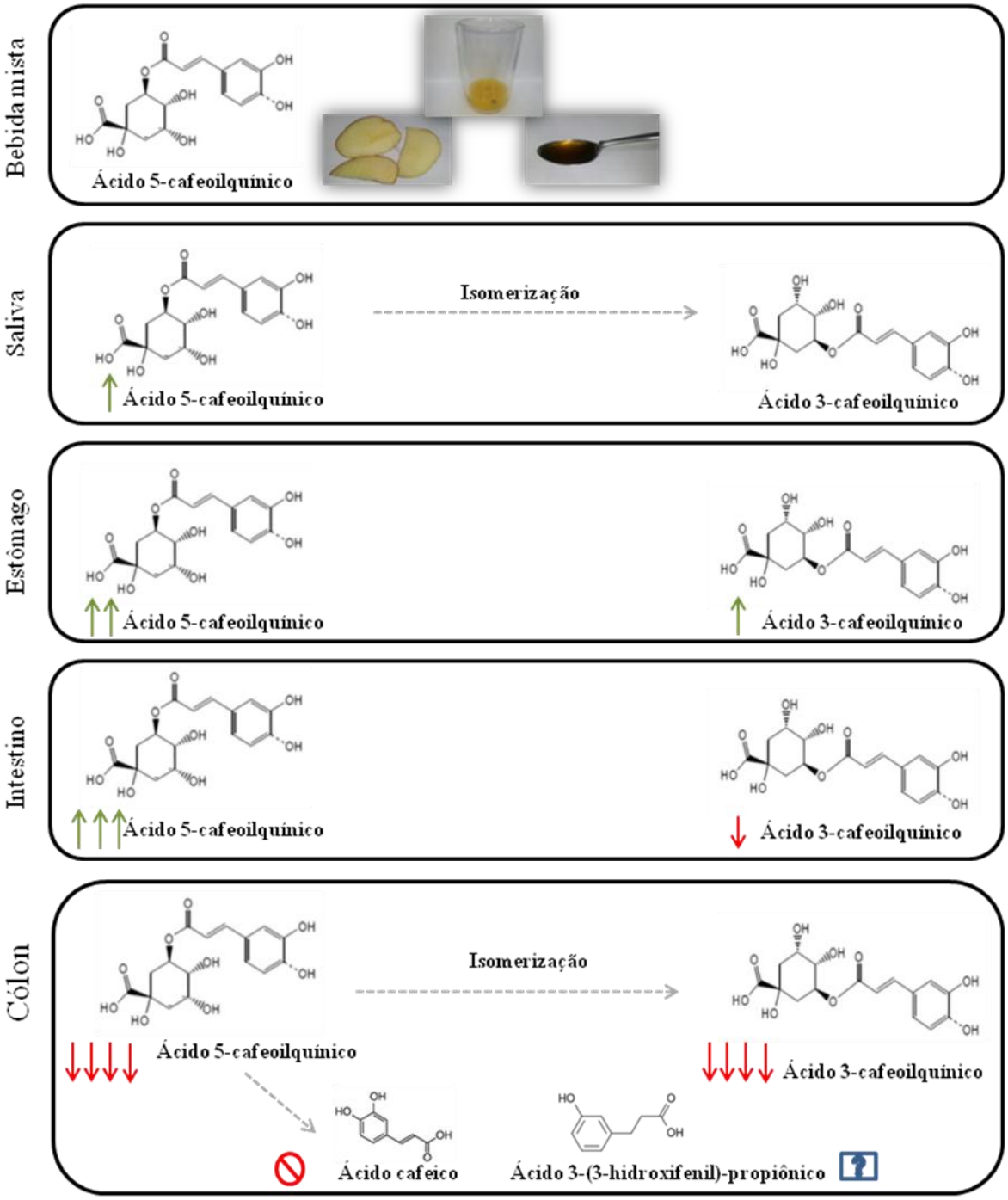


Figura 14 Representação esquemática da via metabólica do ácido 5-cafeoilquínico presente na bebida mista de maracujá, maçã e mel e e ácido 3-cafeoilquínico presente a partir da saliva. As setas vermelhas ou verdes representam, respectivamente, a diminuição ou aumento do teor dos compostos em comparação com a bebida mista ou saliva no caso do ácido 3-cafeoilquínico. As setas tracejadas indicam possíveis vias metabólicas, já descritas na literatura, mas não observados no presente trabalho. O símbolo ⊘ indica metabólitos descritos na literatura, mas não identificados no presente estudo. O símbolo ? indica metabólito descrito na literatura, mas não havíamos padrão comercial

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

↑↑↑ (125/100%) ↑↑ (100/75%) ↑ (75/50%)

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULRHMAN, M. M. et al. Metabolic effects of honey in type 1 diabetes mellitus: a randomized crossover pilot study. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 1, p. 66–72, 2013.

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

ALARCÓN-FLORES, M. I. et al. Evaluation of the presence of phenolic compounds in different varieties of apple by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 3, p. 696-709, 2015.

AMARETTI, A. et al. Hydrolysis of the rutinose-conjugates flavonoids rutin and hesperidin by the gut microbiota and bifidobacteria. **Nutrients,** v. 7, n. 4, p. 2788–2800, 2015.

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM K.R. Flavonoids chemistry, biochemistry and applications. Separation and quantification of flavonoids. **Taylor & Francis, New York**., 2006.

ANDRADE, E.C.B. Análise de alimentos. Uma visão química da Nutrição. São Paulo, **Livraria Varela**, 2006.

ANVISA (2002) Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 2**, de 07 de Janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde, 2002.

ARRANZ, S.; SILVAN, J.M.; SAURA-CALIXTO, F. (2010). Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: A study on the Spanish diet. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 11, p. 1646–1658, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ (ABPM). Anuário brasileiro da maçã 2015 – Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta Santa Cruz, 2015. 72 p. Disponível em: http://www.brazilianappleexporters.com/brazilianappleyearbook2015.pdf Acessado em: 25 de abril de 2016.

ATTRI, S. et al. Effect of *in vitro* gastric and pancreatic digestion on antioxidant potential of fruit juices. **Food Bioscience**, v. 17, p. 1-6, 2017.

AURA, A.M. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 3, p. 407-429, 2008.

BACKHED, F. et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307, p. 1915–1920, 2015.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203,2006.

BAZZANO, L. A. et al. Intake of Fruit, Vegetables, and Fruit Juices and Risk of Diabetes in Women. **Diabetes Care**, v. 31, n. 7, p. 1311-1317, 2008.

BELLION, P. et al.(2008). Antioxidant effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation products in the human colon carcinoma cell line caco-2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 310-6317, 2008.

BENZIE, I. F. F; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of

“antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERMÚDEZ-SOTO, M. J. ; TOMÁS-BARBERÁN, F. A., GARCÍA-CONESA, M. T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. **Food Chemistry**, v. 102, p. 865–874, 2007.

BOWEY, E.; ADLERCREUTZ, H.; ROWLAND, I. Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. **Food and Chemical Toxicology**, 41(5), 631–636, 2003.

BOYER, J.; HAI-LUI, R. Apple phytochemicals and their health benefits. **Nutrition Journal**, v. 3, p. 1–15, 2004.

CANO, C. B.; NAGATO, L. A. F., DURAN, M. C. Açúcares e produtos correlatos. In: Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4º ed. Brasília: ANVISA, 2005. cap. 7, p. 321- 343, 2005.

CARBONELL-CAPELLA, J.M. et al. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 155-171, 2014.

CARDONA, F. et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415-1422, 2013.**Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415-1422, 2013.

CELEP, E.; YEŞILADA, E. Influence of honey addition on the bioaccessibility of phenolic contents and antioxidant capacities of different coffee types. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 906-914, 2017.

CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Content of insoluble bound phenolics in millets and

their contribution to antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6706-6714, 2010.

CHEUNG, T. L.; GERBER, R. M. Consumo de mel de abelhas: análise dos comportamentos de comensais do Estado de Santa Catarina. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 39, n. 10, p. 22-31, 2009.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2. edição revisada e ampliada. **Embrapa Hortaliças (CNPH)** Lavras: UFLA, 2005.

COLES, L. T.; MOUGHAN, P. J.; DARRAGH, A. J. In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123–124, p. 421-444, 2005.

CROZIER, A.; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 446-467, 2010.

DA SILVA, P. M. et al. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 309-323, 2016.

DAY, A. J.; WILLIAMSON, G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: A review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. **The British Journal of Nutrition**, v. 86, p. S105–S110, 2001.

DE MOURA, C. F. G. et al. Apple juice attenuates genotoxicity and oxidative stress induced by cadmium exposure in multiple organs of rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. , p. 7-12, 2015.

DE SOUZA, M. D. A. S. et al. Effects of *Passiflora edulis* (yellow passion) on serum lipids and oxidative stress status of Wistar rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 1, p. 78-82, 2012.

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

DELIZA, R.; MACFIE, H.; HEDDERLEY, D. The consumer sensory perception of passion-fruit juice using free-choice profiling. **Journal of Sensory Studies**, v. 20, n. 1, p. 17-27, 2005.

DOMÍNGUEZ-AVILA, J. A. et al.Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. **Food & Function**, v. 8, p. 15–38, 2017.

DU, H. et al. Fresh Fruit Consumption and Major Cardiovascular Disease in China. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n.14, p. 1332-1343, 2016.

DUAN, X.; WU, G.; JIANG, Y. Evaluation of the antioxidant properties of litchi fruit phenolics in relation to pericarp browning prevention. **Molecules**, v. 12, p. 759–771, 2007.

DUARTE, J.; PEREZ-PALENCIA, R.; VARGAS, F. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, p. 117–124, 2001.

ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 2005.

EZZATI, M.; RIBOLI, E. Behavioral and dietary risk factors for noncommunicable

diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 369, p. 954–964, 2013.

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

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, p. 751-760, 2009.

FERREIRA, R. B. R. et al. The Intestinal Microbiota Plays a Role in *Salmonella*-Induced Colitis Independent of Pathogen Colonization. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e20338, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34p.

FRANÇA, E. B. et al. Cause-specific mortality for 249 causes in Brazil and states during 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. **Population Health Metrics**, v. 15, n.39, p. 1-17, 2017.

FRITSCH, C. et al. Phenolic acid degradation potential and growth behavior of lactic acid bacteria in sunflower substrates. **Food Microbiology**, v. 57, p. 178-186, 2016.

FU, L. et al. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry**, v. 129, p. 345–350, 2011.

GALLUS, S. et al. Does an Apple a day keep the oncologist away? **Annals of Oncology**, 16(11), 1841–1844, 2005.

GAYOSO, L. et al. Bioaccessibility of rutin, caffeic acid and rosmarinic acid: Influence of the gastrointestinal digestion models. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 428-438, 2016.

GBD 2015 Risk Factors Collaborators (2016). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1659-1724.

GIRONÉS-VILAPLANA, A. et al. A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. **LWT – Food Science and Technology**, 47(2), 279-286, 2012.

GREGORIS, T. B. et al.(2011). Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of Bacterial taxa. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, p. 351-356, 2011.

GYÉMÁNT, G. et al. Evidence for pentagalloyl glucose binding to human salivary α-amylase through aromatic amino acid residues. **Biochimica et Biophysica Acta—Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 2, 291–296, 2009.

HERVERT-HERNÁNDEZ, D. et al. Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 1, p. 119-122, 2009.

HODGSON, J. M. et al. Apple intake is inversely associated with all-cause and disease-specific mortality in elderly women. **The British Journal of Nutrition,** v. 115, n. 5, p. 860-867, 2016.

HOSSAIN, M. Z.; PATEL, K.; KERN, S. E. Salivary alpha-amylase, serum albumin, and myoglobin protect against DNA-damaging activities of ingested dietary agents *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 70, p. 114–119, 2014.

HUANG, J. et al. Different Flavonoids Can Shape Unique Gut Microbiota Profile *In Vitro*. **Journal of Food Science**, v. 81, p. H2273–H2279, 2016.

HUNG, C-H. et al. Apple polyphenol inhibits colon carcinoma metastasis via disrupting Snail binding to focal adhesion kinase. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 80-91, 2015.

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

IAL - Instituto Adolf Lutz . Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4.ed.,1018, 2005.

IBGE (2013). Produção Agrícola Municipal 2013. Acessado: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/. 25 abril 2016.

IBGE (2014). Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. (ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf).

JAGANATH, I. B.; CROZIER, A. Overview of health promoting compounds in fruits and vegetables. In: Fraga C, editor. Phenolic Compounds of Plant Origin and Health: The Biochemistry Behind Their Nutritional and Pharmacological Value. **Chichester, United Kingdom: Wiley**, 1–48, 2009.

JAGANATH, I. B. et al. *In vitro* catabolism of rutin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 8, p. 1180-1189, 2009.

JAYAWARDENA, N.; WATAWANA, M. I.; WAISUNDARA, Y. V (2015). The total antioxidant capacity, total phenolics content and starch hydrolase inhibitory activity of fruit

juices following pepsin (gastric) and pancreatin (duodenal) digestion. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 10, p. 349–357, 2015.

KIM, J-H; BAIK, S-H. Properties of recombinant novel cinnamoyl esterase from *Lactobacillus acidophilus* F46 isolated from human intestinal bacterium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 116, 9-15, 2015.

KONICA MINOLTA. Comunicação Precisa da Cor: controle de qualidade da percepção à instrumentalização. Konica Minolta Sensing, INC, Osaka, Japão, 1998.

KONISHI, Y.; ZHAO, Z.; SHIMIZU, M. Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 50, p. 7539–7543, 2006.

KONTA, E. M. et al. Evaluation of the antihypertensive properties of yellow passion fruit pulp (*Passiflora edulis Sims f. Flavicarpa Deg.*) in spontaneously hypertensive rats. **Phytotherapy Research: PTR**, v. 28, p. 28–32, 2014.

KRIEGEL, M. A. et al. Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 28, p. 11548-11553, 2011.

LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 301–311, 2008.

LEE, H. C. et al. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. **Research in Microbiology**, v. 157, n.9, p. 876-884, 2006.

LEE, S-J. et al. Development of novel *in vitro* human digestion systems for screening the bioavailability and digestibility of foods. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 113–121, 2016.

LIANDA, R. L. P. et al. Antioxidant activity and phenolic composition of brazilian honeys and their extracts. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 23, n. 4, p. 618-627, 2012.

LOCASCIO, R. G.; MILLS, D. A.; WATERHOUSE, A. L.Reduction of catechin, rutin, and quercetin levels by interaction with food-related microorganisms in a resting state. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2105–2112, 2006.

LÓPEZ DE LACEY, A. M. et al. Bioaccessibility of green tea polyphenols incorporated into an edible agar film during simulated human digestion**. Food Research International**, v. 48, p. 462–469, 2012.

MACORIS, M. S. et al. The influence of ripening stage and cultivation system on the total antioxidant activity and total phenolic compounds of yellow passion fruit pulp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 9, p. 1886–1891, 2012.

MAHOWALD, M. A. et al.(2009).Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 14, p. 5859-5864, 2009.

MALEC, M. et al. Polyphenol profiling of a red-fleshed apple cultivar and evaluation of the color extractability and stability in the juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 6944–6954, 2014.

MALTA, D. C. et al. Mortality due to noncommunicable diseases in Brazil, 1990 to 2015, according to estimates from the Global Burden of Disease study. **São Paulo Medical Journal**, v. 135, n. 3, p. 213-221, 2017.

MANACH, C. et al. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p.

230S– 242S, 2005.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANACH, C. et al (1997). Bioavailability of rutin and quercetin in rats. **FEBS Letters**, v. 409, n. 1, p. 12–16, 1997.

MAPA (2015). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Apicultura sustentável. Câmara Setorial do MEL. Brasília.

MARTINEZ, A. P.; AZEVEDO, G. R. Tradução, adaptação cultural e validação da Bristol Stool Form Scale para a população brasileira. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 20, n. 3, p. 583-589, 2012.

MCEVILY, A. J.; IYENGAR, R.; OTWELL, W. S. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 253-273, 1992.

MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V.; CAAR, B. T. Sensory evaluation techniques. **Boca Raton: CRC Press**., 4 ed., p. 448, 2006.

MELGOSA, M. et al. Suprathreshold color-difference ellipsoids for surface colors. **Color Research and Application**, v. 22, n. 3, p. 148–155, 1997.

MELLETI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. 083-091, 2011

MINEKUS, M. A. et al. standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SVS. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, VIGITEL 2016. Brasília: DF; 2017.

MINK, P. J. et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 3, p. 895–909, 2007.

MONIRUZZAMAN, M. Two-Year Variations of Phenolics, Flavonoids and Antioxidant Contents in Acacia Honey. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 14694-14710, 2013.

MOREIRA, P. X. Desenvolvimento e Estabilidade do Néctar de Goiaba adoçado com mel de Abelha: 2010. 74 f. **Trabalho de conclusão de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MUHAMMAD, M. M. Effects of natural honey on blood glucose and lipid profile in young healthy pakistani males. **Journal of Ayub Medical College** Abbottabad, v. 25, n. 3-4, p. 44-47, 2013.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n.1/2, p. 95-111, 2004.

NARDINI, M.; GHISELLI, A. Determination of free and bound phenolic acids in beer. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 137-143, 2004.

NHB - national honey board. honey - a reference guide to nature's sweetener. Longmont, Colorado (2005). Disponível em: **http://www.honey.com**. Acessado em: 27 abr. 2016.

NOOR, N. et al. Antitumour and antioxidant potential of some selected Pakistani honeys. **Food Chemistry**, v. 143, p. 362-366, 2014.

OBÓN, J. M. et al. Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by

spray drying and its application in food model systems. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 471-479, 2009.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 66–71, 2001.

OMS-OLIU, G. et al. Inhibition of Browning on Fresh-cut Pear Wedges by Natural Compounds. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 3, p. 216–224, 2006.

OOMEN, A. G. (2003). Development of an *In Vitro* Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. **Archieves of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 281-287, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Doenças crônicas não transmisíveis, 2017.

OTIENO, D. O.; ASHTON, J. F.; SHAH, N. E. Stability of β-glucosidase activity produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus spp*. in fermented soymilk during processing and storage. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 4, p. M236–M24, 2005.

OWOYELE, B. V.; ADENEKAN, O. T.; SOLADOYE, A. O. (2011). Effects of honey on inflammation and nitric oxide production in Wistar rats. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 9, n. 4, p. 447-452, 2011.

OZDATLI S. et al. Effect of honey supplementation on total antioxidant capacity of herbal teas. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 18, p. 147–52, 2014.

PALAFOX-CARLOS H. et al. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p.

6–15, 2011.

PARADA, J.; AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. R21-32, 2007.

PEREIRA, C. et al. Is honey able to potentiate the antioxidant and cytotoxic properties of medicinal plants consumed as infusions for hepatoprotective effects? **Food & Function**, v. 6, n. 5, p. 1435-42, 2015.

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

PORTO, M. R. A. et al. Physicochemical Stability, Antioxidant Activity, and Acceptance of Beet and Orange Mixed Juice During Refrigerated Storage. **Beverages**, v. 3, n. 3, p. 1-12, 2017.

RAIMONDI, S. et al. Role of Bifidobacteria in the Hydrolysis of Chlorogenic Acid. **Microbiology Open**, v. 4, n. 1, p. 41–52, 2015.

RAMAIYA D-S. 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**,93(5),1198–1205, 2013.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

RECHNER, A. R. et al. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 2, p. 212-25, 2004.

REIN, M. J. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to

bioefficacy. **British journal of clinical pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 588–602, 2013.

REYES, A. et al. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. **Nature**, v. 466, n. 7304, p. 334-338, 2010.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152−159, 1997.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 136, p. 206−212, 2013.

RYAN, L.; PRESCOTT, S. L.. Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an *in vitro* digestion. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1191–1197, 2010.

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GOÑI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 492-501, 2007.

SCHNEIDER, H. et al. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. **Archives of Microbiology**, v. 171, p. 81– 91, 1999.

SCHMIDT, M. I. et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **The Lancet**, v. 377, n. 9781, p. 1949-1961, 2011.

SEBRAE NACIONAL. O cultivo e o Mercado da maçã. Disponível em: **http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-da-maca,ea7a9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD**. Acessado em: 26 de abril de 2016.

SEMA, A.; MAITI, C. S. Status & Prospects of Passion Fruit Industry in Northeast India.

Central Institute of Horticulture, Medziphema-797 106, Nagaland, 2006.

SERRA AT. et al. Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties – correlation of response with composition. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2378–2386, 2012.

SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C. Handbook of Functional Beverages and Human Health. **Boca Raton**, FL: CRC Press, 2016.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.

SILVA, R. A. et al. Néctar de caju adoçado com mel de abelha: desenvolvimento e estabilidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 348-354, 2008.

SILVA, R. N. et al. Comparison methods for the determination of reducers sugars and total in honey. **Food Science and Technology**, v. 23, n.3, p. 337-341, 2003.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, M. R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1, p. 152–178, 1999.

SLOAN, A. E. Top 10 global food trends. **Food Technology**, v. 59, p. 20–32, 2005.

SOCCOL, C. R. et al. The potential of probiotics: a review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010.

SOLER, C. et al. Flavonoid patterns of French honeys with different floral origin. **Apidologie**, 26, 53–60, 1995.

SOUSA, J. M. et al.Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of

monofloral honeys produced by *Meliponini* in the Brazilian semiarid region. Food Research International, v. 84, p. 61-68, 2016.

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

STAHL, W. et al. Bioavailability and metabolism. **Molecular Aspects of Medicine**, 23(1-3), 39-100, 2002.

STREPPEL, M. T. et al. Dietary fiber intake in relation to coronary heart disease and all-cause mortality over 40 y: the Zutphen Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 4, p. 1119-1125, 2008.

SWADA, J. G. et al. Synergistic potential of papaya and strawberry nectar blends focused on specific nutrients and antioxidants using alternative thermal and non-thermal processing techniques. **Food Chemistry**, v. 199, p. 87–95, 2016.

TAL, Y. et al. The neuroprotective properties of a novel variety of passion fruit. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 359-369, 2016.

THE NATURAL FOOD HUB. Natural Food-Fruit Vitamin C Content. Disponível em: **http://www.naturalhub.com/natural_food_guide_fruit_vitamin_c.htm.** Acessado em: 27 Abril 2016.

TOYDEMIR, G. et al. (2015). Effects of Honey Addition on Antioxidative Properties of Different Herbal Teas. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 65, n. 2, p. 127-135, 2015.

TRAUTVETTER, S.; KOELLING-SPEER, I.; SPEER, K. Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. **Apidologie, Springer Verlag**, v. 40, n. 2, p. 140-150, 2009.

TURATI, F. et al. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 2, p. 102-110, 2015.

TURNBAUGH, P. J. et al. The human microbiome project. **Nature**, v. 449, p. 804–810, 2007.

VAN ACKER, S. A. et al. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 214, n. 3, p. 755-759, 1995.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Phenolic Compound Biochemistry (p.283). Dordretch:**Springer**, 2006.

WALKER, A. W. et al. Flint, Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 267-274, 2014.

WANG, R. F. et al. DNA microarray analysis of predominant human intestinal bacteria in fecal samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, n. 4, p. 223-234, 2004.

WOOTTON-BEARD, P. C.; MORAN, A.; RYAN, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. **Food Research International**, v. 44, p. 217–224, 2011.

WU, S. B. et al. Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7513−7525, 2012.

XIE, C. et al. Investigation of Isomeric Transformations of Chlorogenic Acid in Buffers and Biological Matrixes by Ultraperformance Liquid Chromatography Coupled with Hybrid Quadrupole/Ion Mobility/Orthogonal Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11078-11087, 2011.

YAGHOOBI, R.; KAZEROUNI, A.; KAZEROUNI, O. Evidence for Clinical Use of Honey in Wound Healing as an Anti-Bacterial, Anti-Inflammatory Anti-Oxidant and Anti-Viral Agent: A Review. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products,** v. 8, n. 3, p. 100–104, 2013.

YAMAMOTO LY. et al. Application of abscisic acid (S-ABA) to cv. Isabel grapes (*Vitis vinifera* × *Vitis labrusca*) for color improvement: Effects on color, phenolic composition and antioxidant capacity of their grape juice. **Food Research International**, v. 77, p. 572–83, 2015.

YANG, M. et al. Preliminary Analysis of *in vitro* Digestion and Bioactivity Assessment of Basil and Ginger in Human Liver Cancer Cell Line. **Journal of Biological Sciences**, v. 16, p. 202-214, 2016.

ZARDO, D. M. et al. Phenolic profile and antioxidant capacity of the principal apples produced in Brazil. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, n. 5, p. 611-620, 2013.

ZHANG J. et al. Anti-cancer, antidiabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloylglucose. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 9, p. 1–27, 2009.

ZHAO, C-N. et al. Fruits for Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 1-29, 2017.

ANEXOS

Anexo A – Questionário da análise de aceitação sensorial

Nome:_____ Data:_____/___/_____

Idade: anos Sexo: ( )Feminino ( )Masculino

Avalie a amostra utilizando a escala:

9. Gostei extremamente
8. Gostei muito
7. Gostei moderadamente
6. Gostei ligeiramente
5. Não gostei nem desgostei
4. Desgostei ligeiramente
3. Desgostei moderadamente
2. Desgostei muito
1. Desgostei extremamente

	Nota
Avaliação Global	
Cor	
Aroma	
Sabor	

Comentários:_____

Costuma consumir sucos mistos (mais de um ingrediente)?

( ) Nunca.
( ) Ocasionalmente: _____ vezes ao ano.
( ) Moderadamente:_____ vezes ao mês.
( ) Frequentemente:_____ vezes por semana.

Consome algum tipo de mel?
( ) Nunca.
( ) Ocasionalmente: _____ vezes ao ano.
( ) Moderadamente:_____ vezes ao mês.
( ) Frequentemente:_____ vezes por semana.

Se você consome algum tipo de mel, costuma adicionar em alguma bebida?
( ) Não.
( ) Sim. Qual?_____

Caso este suco estivesse á venda em supermercados, você compraria?
( ) Certamente sim.
( ) Possivelmente sim.
( ) Talvez sim, talvez não.
( ) Possivelmente não
( ) Certamente não.

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) referende a análise sensorial

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Programa de Pós-graduação em Nutrição

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Trabalho de pesquisa: "Efeito da digestão *in vitro* e fermentação colônica sobre os compostos bioativos e capacidade antioxidante de um suco misto"

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) de uma pesquisa cujo objetivo é o desenvolvimento de um suco misto e que avaliará os mudanças que ocorrem após digestão simulada. Este estudo está sendo realizado pela nutricionista e mestranda do Programa de Pós-Graduação em Nutrição (UFRJ), Iris Batista Leite, sob orientação da Prof. Drª Eliane Fialho, ambas do Instituto de Nutrição Josué de Castro da UFRJ.

Sua participação consistirá em provar uma amostra do suco misto e responder ao teste sensorial de aceitação.

Esclarecemos que o procedimento não acarretará em desconfortos ou riscos ao participante. Esclarecemos, ainda, que não há benefício direto para o participante, e que você não terá despesas relacionadas à pesquisa, nem retorno financeiro (por exemplo, para pagamento de transporte e alimentação). A sua participação na pesquisa não é obrigatória e sua recusa não acarretará em nenhum prejuízo. Além disso, você poderá se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem constrangimentos, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo ou penalização, sem necessidade de justificativa.

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

- Iris Batista Leite - email: irisbleite@gmail.com – Telefone de contato: (21) 98705-0096
- Prof. Eliane Fialho - email: fialho@nutricao.ufrj.br - Endereço: Av. Carlos Chagas Filho, 373, Centro de Ciências da Saúde, bloco J, subsolo, sala 06. Cidade Universitária. Rio de Janeiro. Telefone de contato: 3938-6679

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ – Rua Professor Rodolpho Paulo Rocco, nº 255, sala 01D-46/1º andar. Cidade Universitária/Ilha do Fundão. Rio de Janeiro. Telefone (21) 3938-2480, de segunda a sexta-feira, das 8 às 15 horas ou através do email: cep@hucff.ufrj.br.

O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos e tem como objetivo proteger os direitos e a dignidade dos participantes da pesquisa.

Todos os dados fornecidos são considerados confidenciais, sendo totalmente garantido o sigilo das informações e sua privacidade. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a sua identificação e os resultados obtidos neste trabalho serão divulgados em revistas científicas da área.

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

Eu discuti com a nutricionista Iris Batista Leite sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei

uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinada pelo participante de pesquisa (ou seu representante legal) e pelo pesquisador. Além disso, estou ciente de que eu (ou meu representante legal) e o pesquisador deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

_____ Data: ____/____/____
Nome do Participante da Pesquisa.

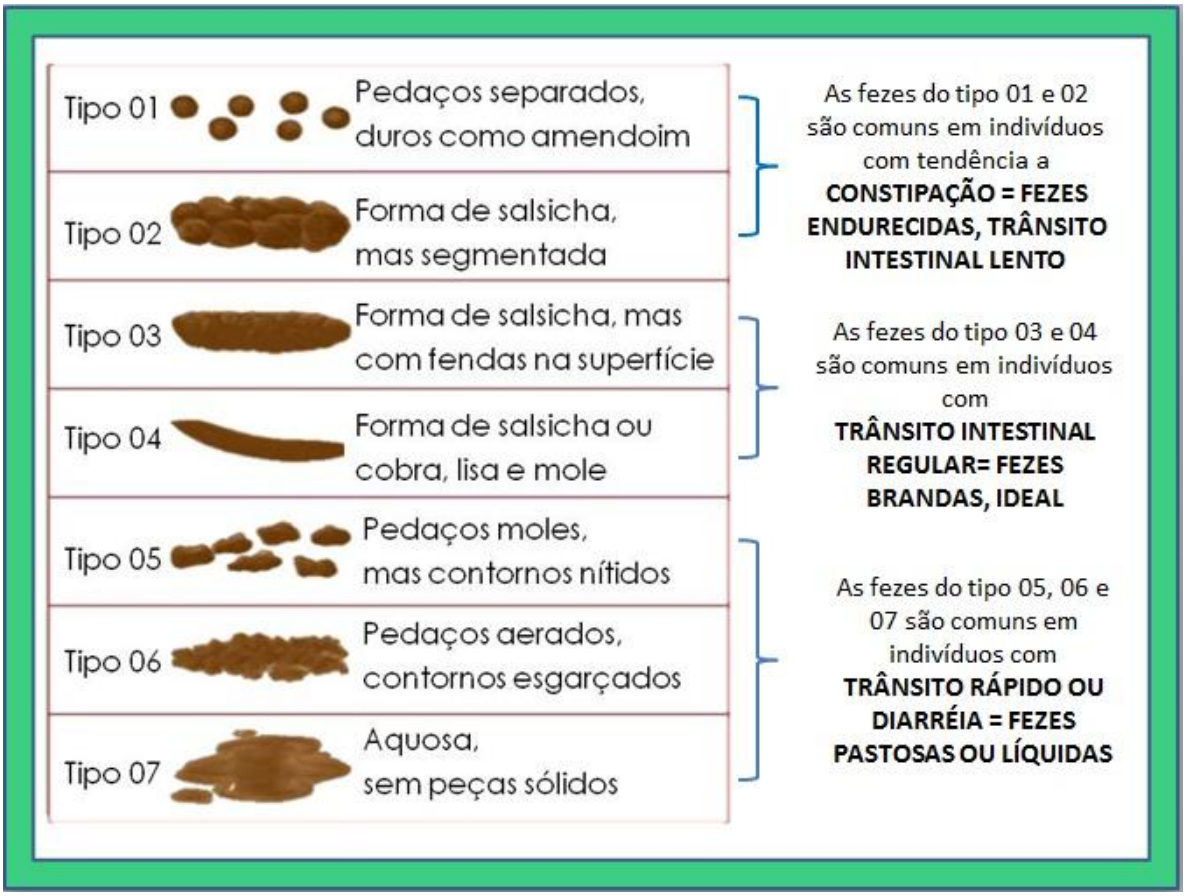
_____
Assinatura do Participante da Pesquisa

_____ Data: ____/____/____
Nome do Pesquisador

_____
Assinatura do Pesquisador

Rio de Janeiro, de de 2017.

Anexo C – Escala de Bristol



Anexo D - Instrução para doação espontânea de fezes

Instrução para doação espontânea de fezes

1° ETAPA: REGISTRO ALIMENTAR E RESTRIÇÃO DO CONSUMO DE ALIMENTOS

Nas 48 horas (2 dias) anteriores a coleta das fezes, você deve fazer um **REGISTRO ALIMENTAR**. Ou seja, anotar todos os alimentos que você consumir, bem como suas quantidades e horários de consumo. Além disso, durante esse tempo, você NÃO poderá consumir os seguintes alimentos:

- ✓ **Alimentos de origem vegetal**:

- **Frutas frescas ou secas** (nenhum tipo);
- **Verduras** (ex. alface, agrião, rúcula, couve, brócolis, couve-flor);
- **Legumes** (ex. abóbora, berinjela, abobrinha, chuchu, maxixe, pimentão, etc);
- **Raízes e tubérculos** (ex. batata, batata-doce, beterraba, cenoura, aipim, nabo, rabanete, etc.);
- **Leguminosas** (ex. feijões, lentilha, ervilha, grão de bico, soja, tremoço, etc.);
- **Cereais integrais** (ex. pão integral, arroz integral, macarrão integral, farinhas integrais, etc.);
- **Oleaginosas** (ex. amendoim, nozes, castanha do pará, castanha de caju, amêndoas, avelã, etc.)
- **Vinho** (nenhum tipo – ex. branco, tinto, seco, etc.);
- **Cerveja** (nenhum tipo – ex. claras ou escuras);
- **Chás** (nenhum tipo – ex. preto, verde, camomila, erva-cidreira, erva-doce);
- **Cacau** (ex. ***chocolate em barra*** – ex. branco, ao leite, meio amargo com diferentes concentrações de cacau; ***achocolatados em pó*** – Nescau, Toddy, cacau em pó, etc.);
- **Café**;
- **Produtos alimentícios contendo/ produzidos a partir destes ingredientes – exemplos:**
  - **Sucos de frutas e hortaliças e outras bebidas** que contém algum destes ingredientes (ex. chás gelados com sabor de fruta, refrigerantes de frutas, etc);
  - **Doce de frutas em calda, geleias, frutas cristalizadas ou secas** (ex. damasco, ameixa).
  - **Pães do tipo panettone e colomba** (contém frutas cristalizadas) ou **pães com adição de frutas** (ex. pão de cenoura);
  - **Bebidas lácteas e iogurte com adição de frutas;**
  - **Leites achocolatados e produtos com adição de chocolate** (ex. Frappucino mocha ou frappucino com adição de chocolate, Toddynho, Nescau pronto para beber, chocolate quente, bombons, brigadeiro, outros docinhos ou sobremesas com adição de chocolate);
  - **Bebidas à base de café** (ex. cappuccino, frapuccino, etc.) ou **sobremesas com adição de café** (ex. tiramisu).
  - **Barrinhas de cereais** (contém cereais integrais e oleaginosas)**;**

ALIMENTOS QUE SERÃO PERMITIDOS:

- **Carnes de boi, frango, peixe e frutos do mar** (desde que em preparações que não contenham os produtos da lista anterior);
- **Arroz branco**, **pão branco** e outros **cereais refinados** (ex. preparações com farinha de trigo branca, macarrão e massa não integral);
- **Leite e derivados** (queijos, requeijão, iogurte, bebidas lácteas – sem adição de frutas);
- **Doces** sem adição de alimentos da lista anterior (ex. leite condensado e doce de leite);

2ª ETAPA: COLETA DAS FEZES

A coleta das fezes deve ser realizada na noite anterior ou pela manhã do dia das análises em um coletor universal e mantido no congelador.

Qualquer dúvida entrar em contato.

Muito obrigada pela sua colaboração.

Iris Leite
(21) 98705-0096 (telefone ou Whatsapp)

Anexo E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) referende à doação de fezes

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Programa de Pós-graduação em Nutrição

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Trabalho de pesquisa: "Efeito da digestão *in vitro* e fermentação colônica sobre os compostos bioativos e capacidade antioxidante de um suco misto"

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) de uma pesquisa cujo objetivo é investigar as mudanças que ocorrem em componentes naturalmente presentes no suco misto quando em contato com fezes. Este estudo está sendo realizado pela nutricionista e mestranda do Programa de Pós-Graduação em Nutrição (UFRJ), Iris Batista Leite, sob orientação da Prof. Dr[a] Eliane Fialho, ambas do Instituto de Nutrição Josué de Castro da UFRJ.

Participando deste estudo, dois dias antes de uma coleta de fezes você será orientado a:

- Não consumir frutas em geral (principalmente maracujá e maçã), hortaliças, feijão preto, repolho roxo, sucos, iogurtes, bebidas alcoólicas, chás, café, cereais integrais e mel.

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

Esclarecemos que o procedimento de coleta de fezes não acarretará desconforto ou riscos para você. Lembramos que é muito importante a lavagem das mãos com água e sabão após a coleta das fezes para não adquirir ou transmitir nenhuma doença. Esclarecemos, ainda, que não há benefício direto para o participante, e que você não terá despesas relacionadas à pesquisa. Quando necessário, haverá o ressarcimento dos gastos que o participante e seu(s) acompanhante(s) terão ao participar da pesquisa. A sua participação na pesquisa não é obrigatória e sua recusa não acarretará em nenhum prejuízo. Além disso, você poderá se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem constrangimentos, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo ou penalização, sem necessidade de justificativa.

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

- Iris Batista Leite - email: irisbleite@gmail.com – Telefone de contato: (21) 98705-0096
- Prof. Eliane Fialho - email: fialho@nutricao.ufrj.br - Endereço: Av. Carlos Chagas Filho, 373, Centro de Ciências da Saúde, bloco J, subsolo, sala 06. Cidade Universitária. Rio de Janeiro. Telefone de contato: 3938-6679

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ – R. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, n.° 255 – Cidade Universitária/Ilha do Fundão - Sala 01D-46/1° andar - pelo telefone 3938-2480, de segunda a sexta-feira, das 8 às 16 horas, ou por meio do e-mail: cep@hucff.ufrj.br. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos e tem como objetivo proteger os direitos e a dignidade dos participantes da pesquisa.

Todos os dados fornecidos são considerados confidenciais, sendo totalmente garantido o sigilo das informações e sua privacidade. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a sua identificação e os resultados obtidos neste trabalho serão divulgados em revistas científicas da área.

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

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

_____ Data: ____/____/____

Nome do Participante da Pesquisa.

_____

Assinatura do Participante da Pesquisa

_____ Data: ____/____/____

Nome do Pesquisador

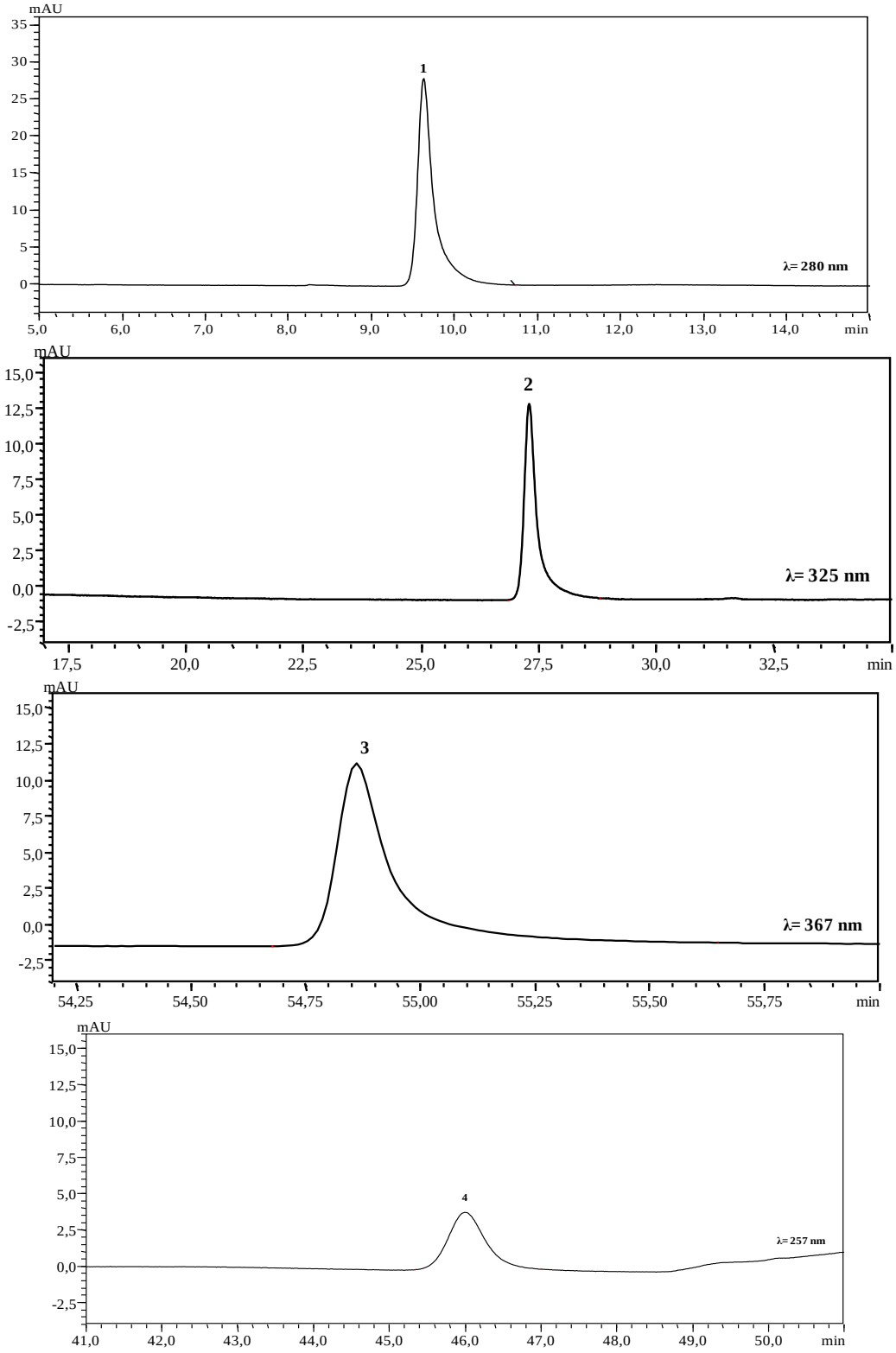
_____

Assinatura do Pesquisador

Rio de Janeiro, de de 2017.

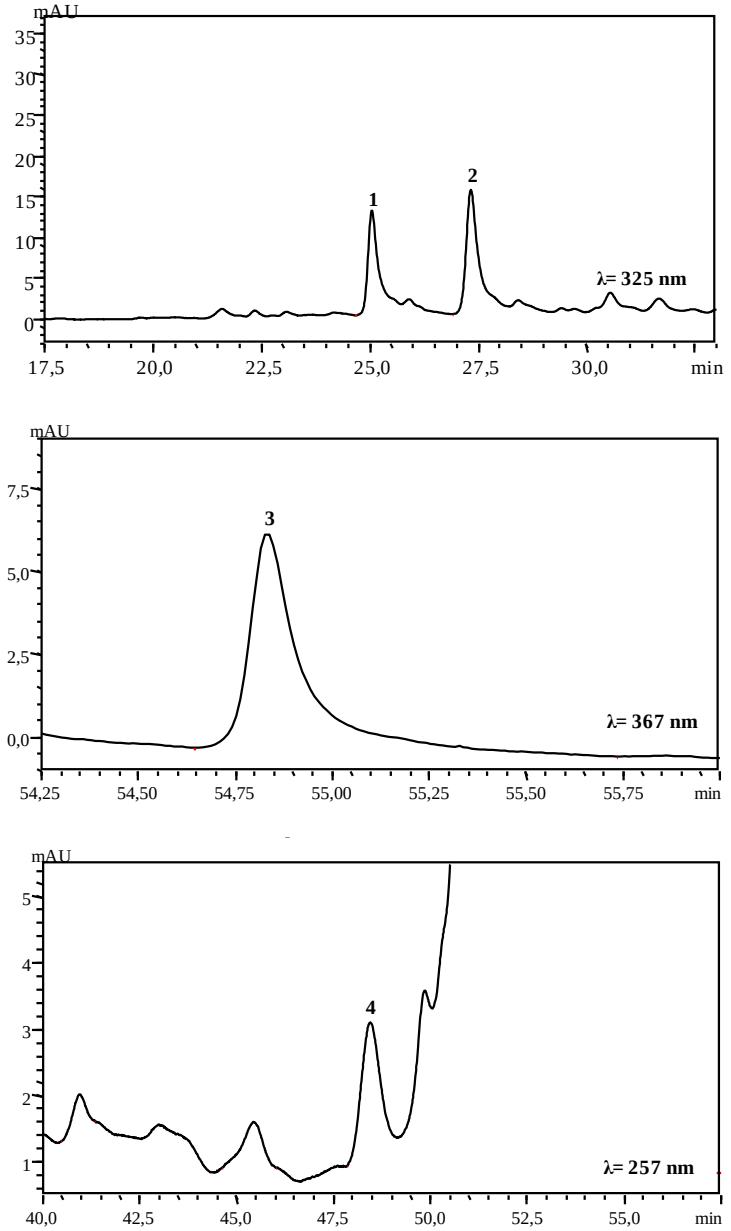
Anexo F – Cromatograma da bebida mista de maracujá, maçã e mel

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da bebida mista. Composto identificado: ácido gálico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3)** e rutina **(4)**.



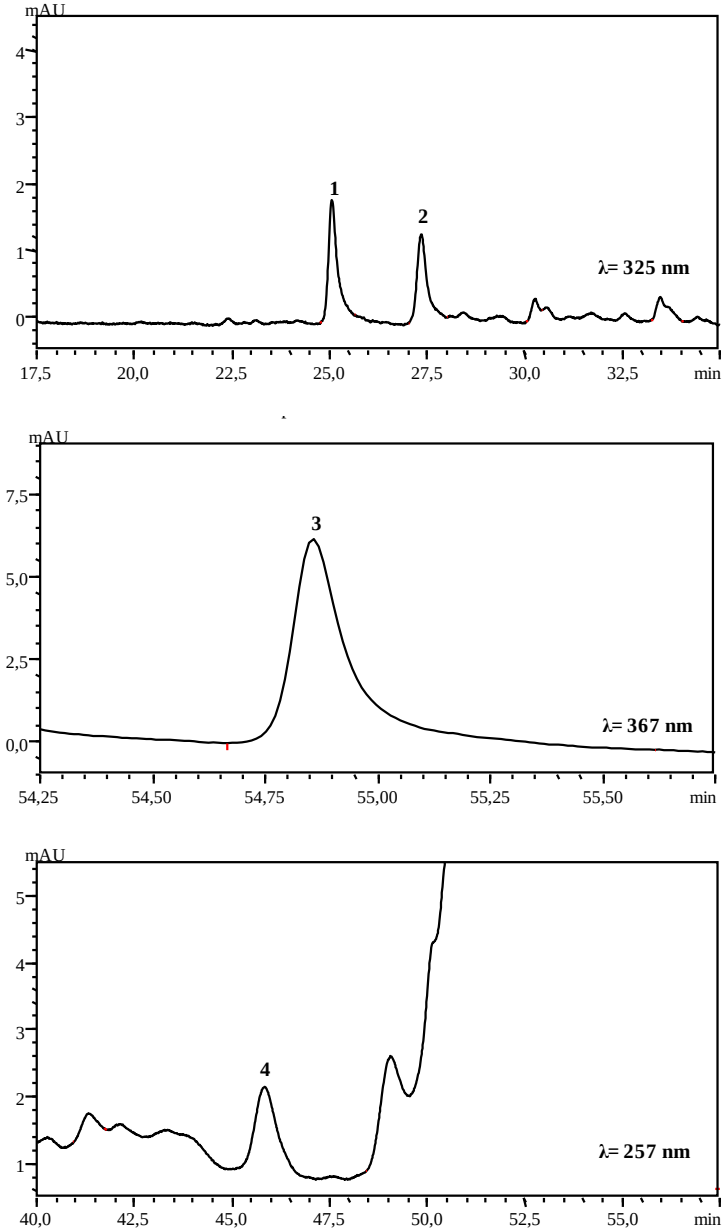
Anexo G – Cromatograma da fase gástrica da digestão *in vitro*

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase oral. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3)** e rutina **(4)**.



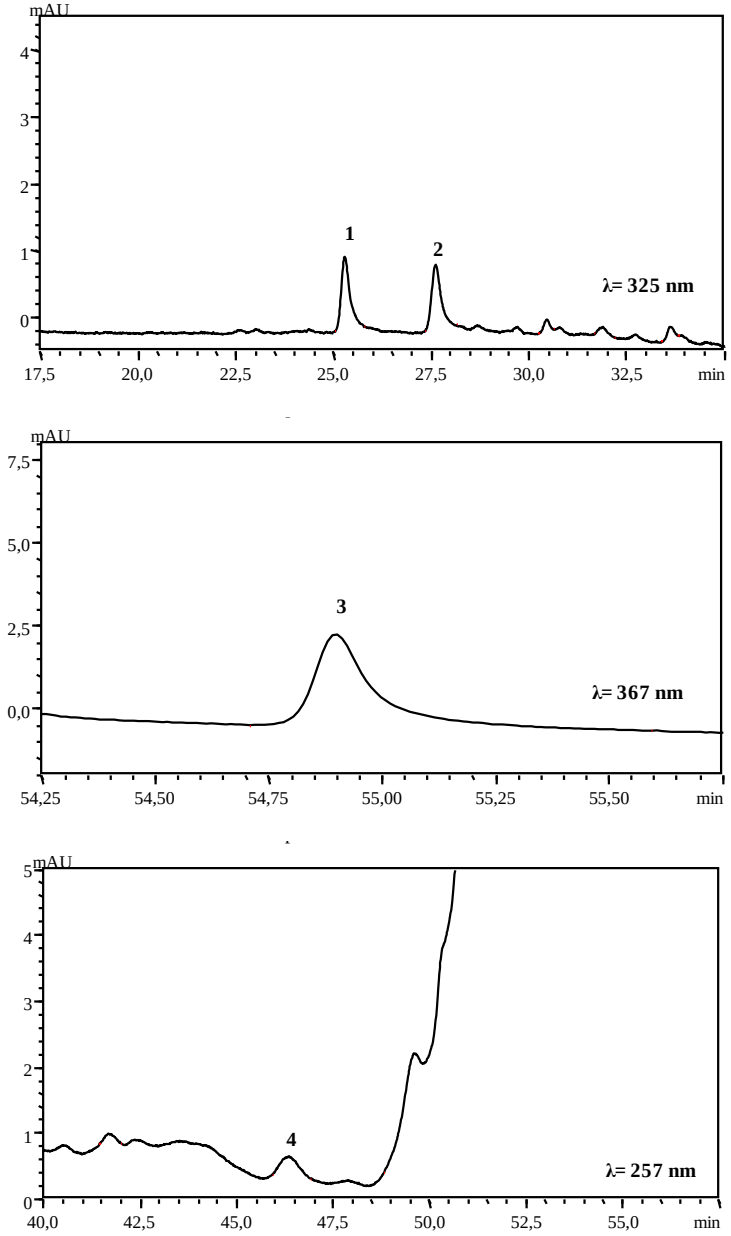
Anexo H – Cromatogramas da fase gástrica da digestão *in vitro*

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3)** e rutina **(4)**.



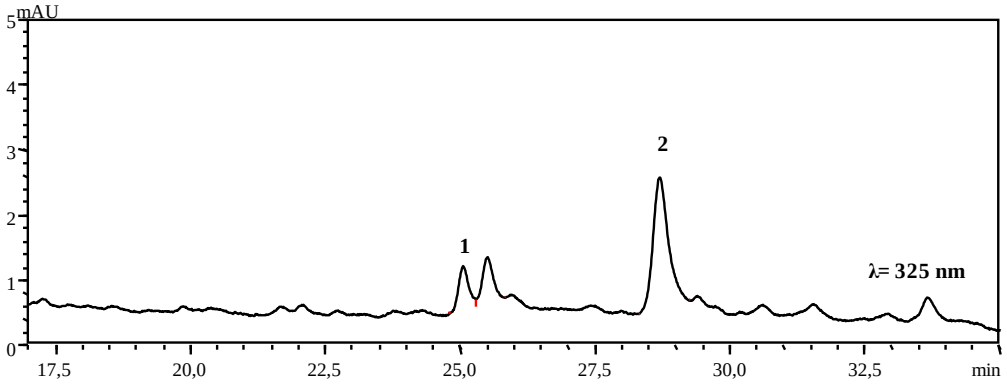
Anexo I – Cromatogramas da fase intestinal da digestão *in vitro*

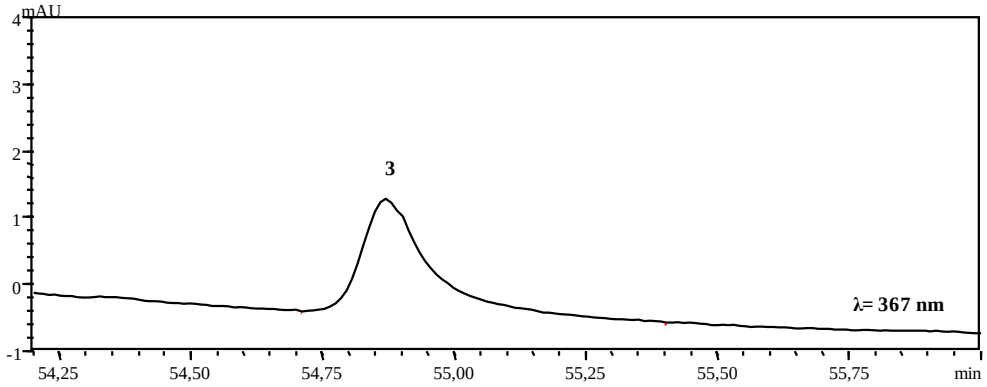
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3)** e rutina **(4)**.



Anexo J – Cromatogramas do tempo 0 da fermentação *ex vivo* do voluntário 1

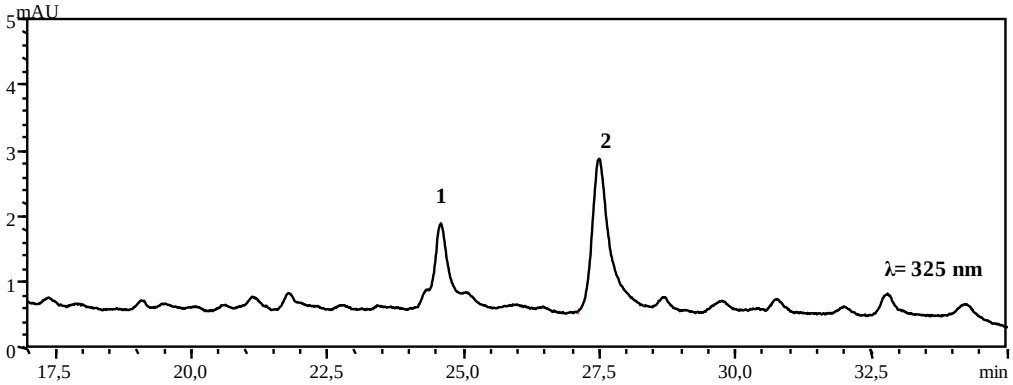
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3).**

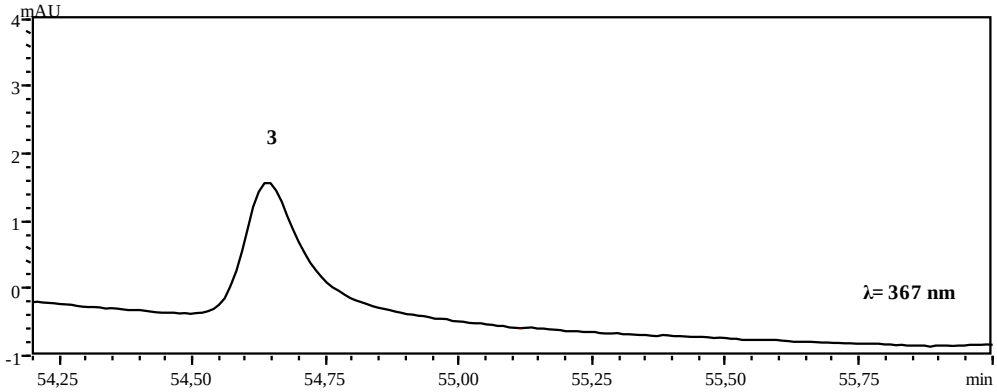




Anexo K – Cromatogramas do tempo 4 horas da fermentação *ex vivo* do voluntário 1

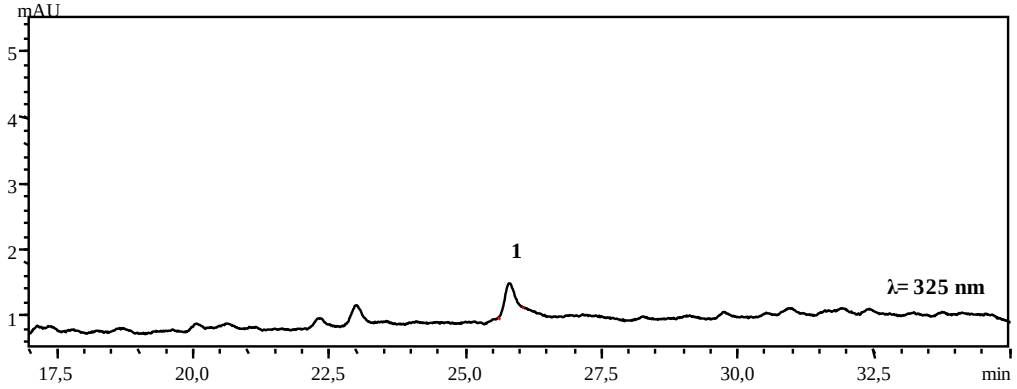
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3).**

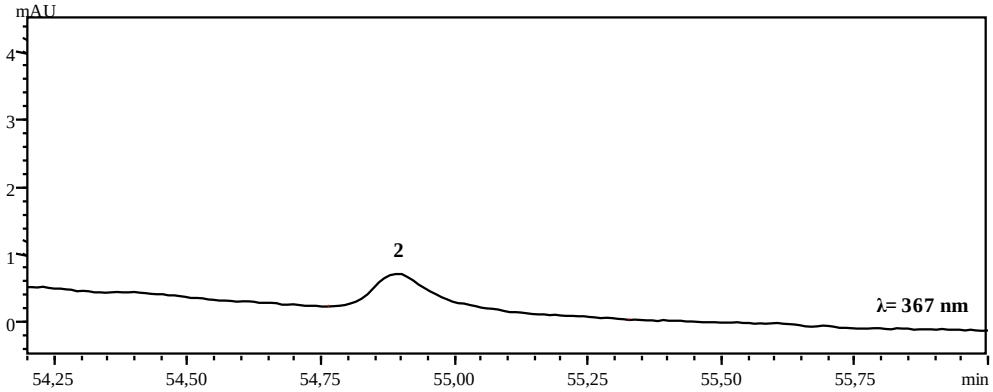




Anexo L – Cromatogramas do tempo de 24 horas da fermentação *ex vivo* do voluntário 1

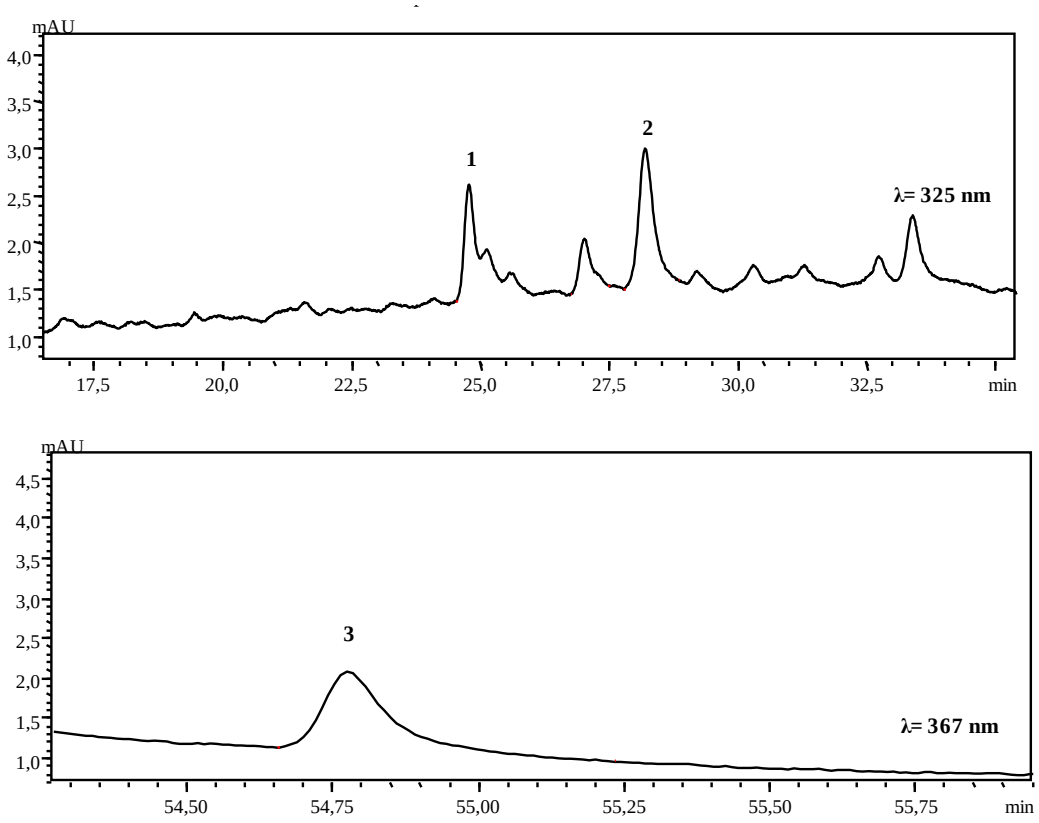
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)** e quercetina **(2).**





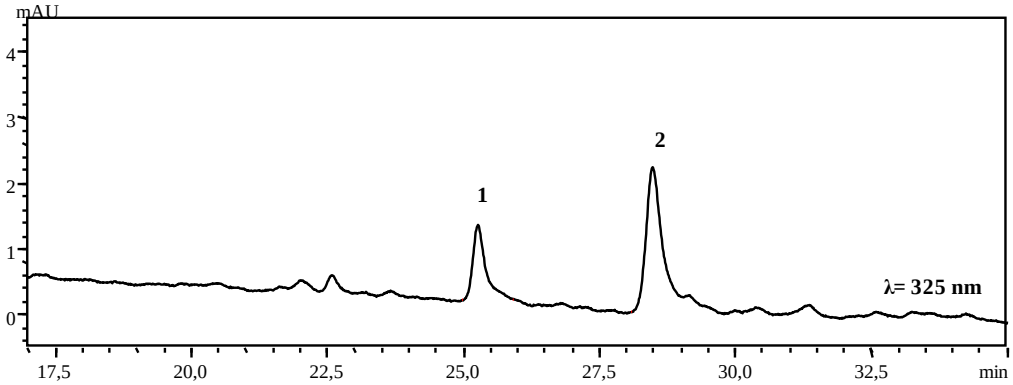
Anexo M – Cromatogramas do tempo 0 da fermentação *ex vivo* com adição da *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 1

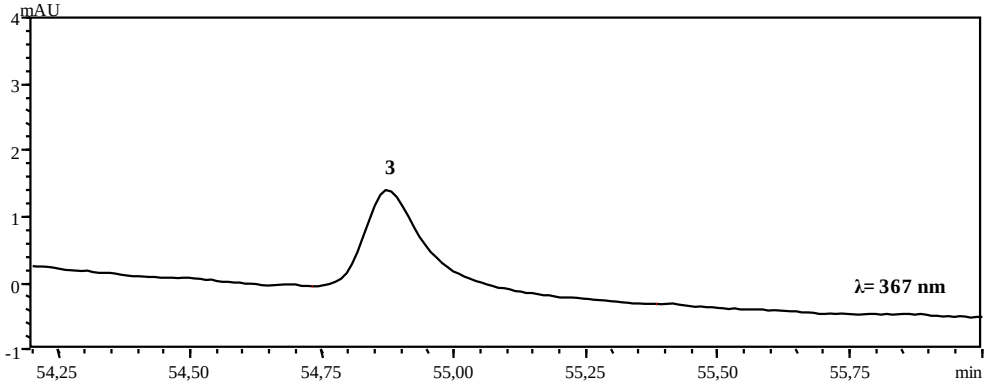
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3).**



Anexo N – Cromatogramas do tempo de 4 horas da fermentação *ex vivo* com adição da *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 1

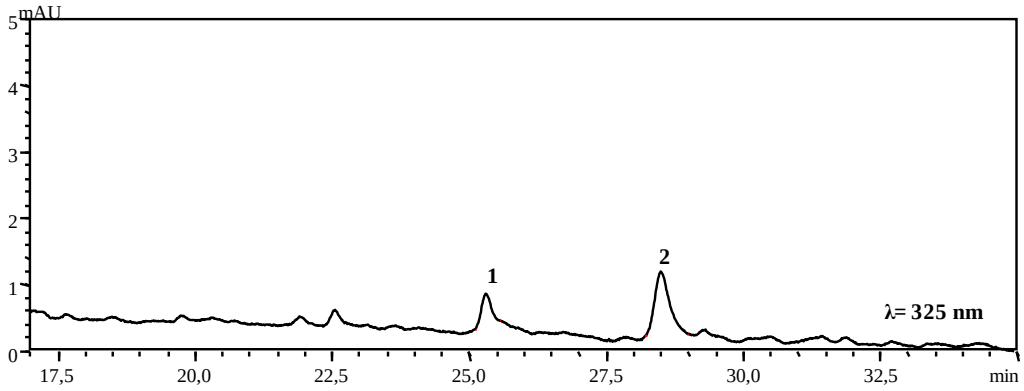
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3).**

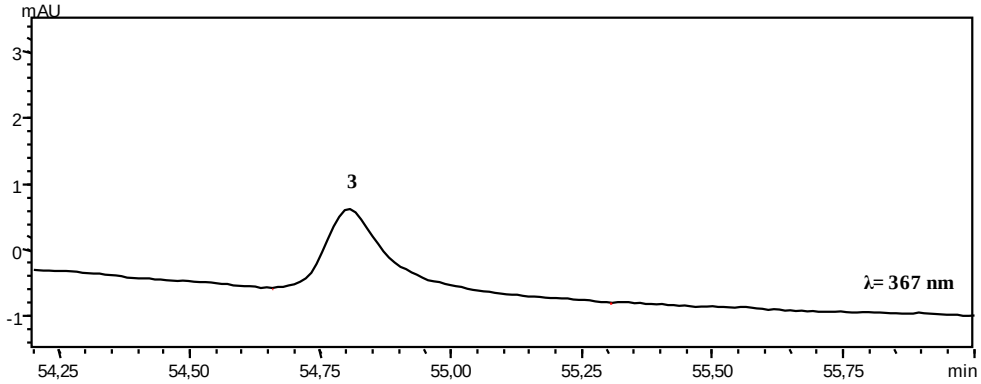




Anexo O – Cromatogramas do tempo de 24 horas da fermentação *ex vivo* com adição da *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 1

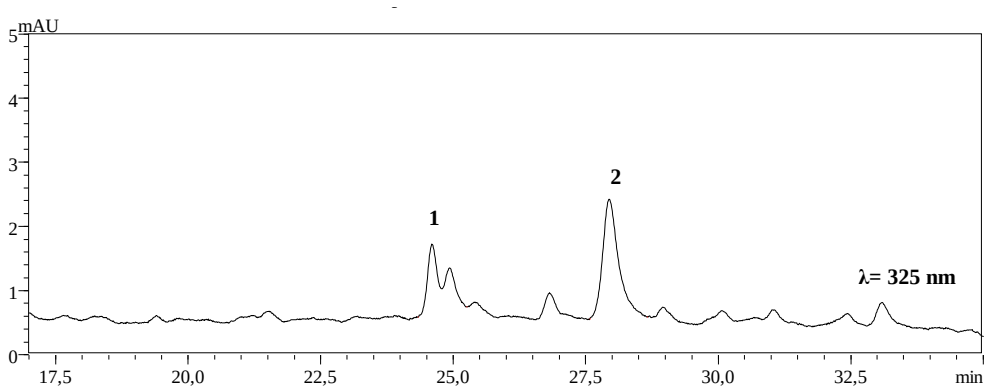
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3).**

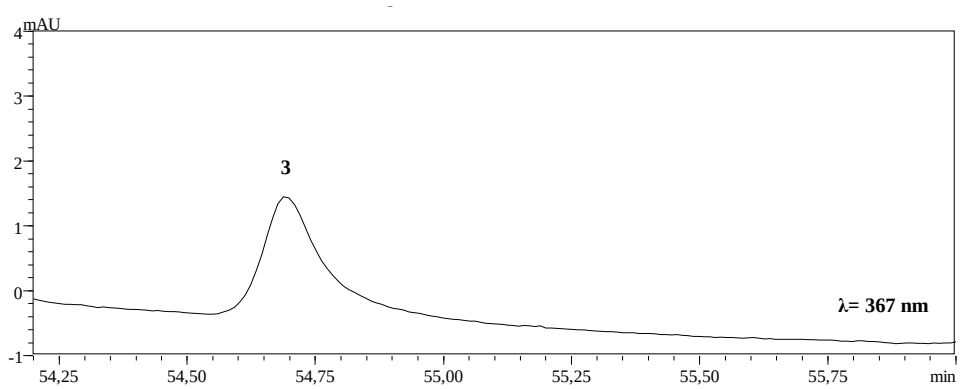




Anexo P – Cromatogramas do tempo 0 da fermentação *ex vivo* do voluntário 2

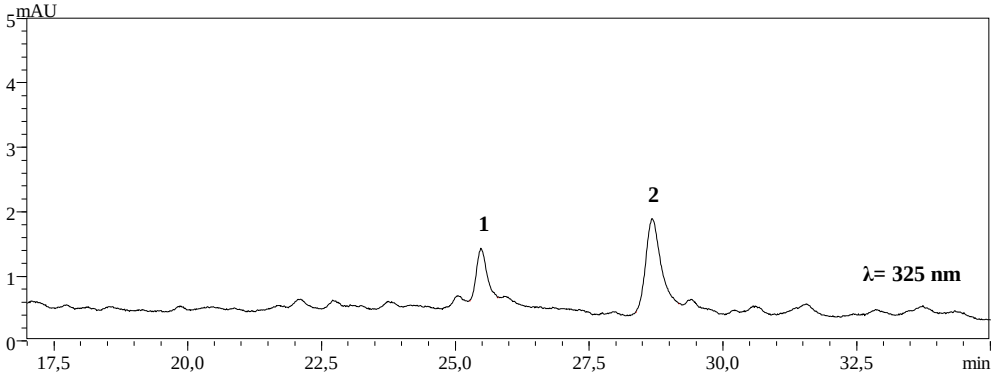
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3).**

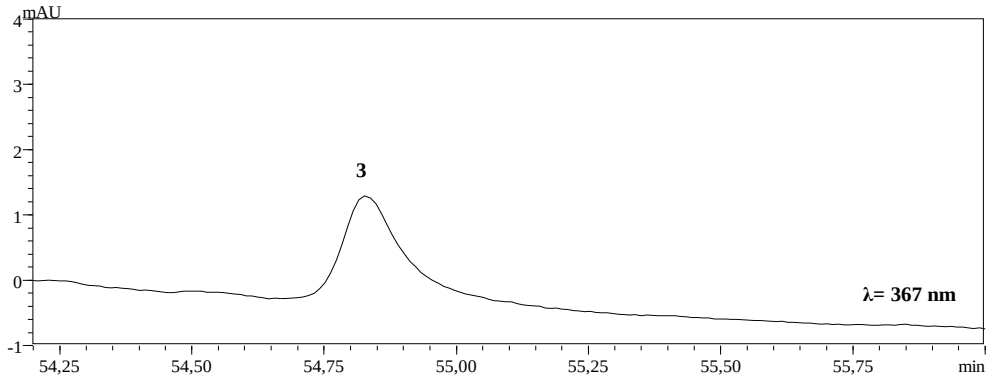




Anexo Q – Cromatogramas do tempo de 4 horas da fermentação *ex vivo* do voluntário 2

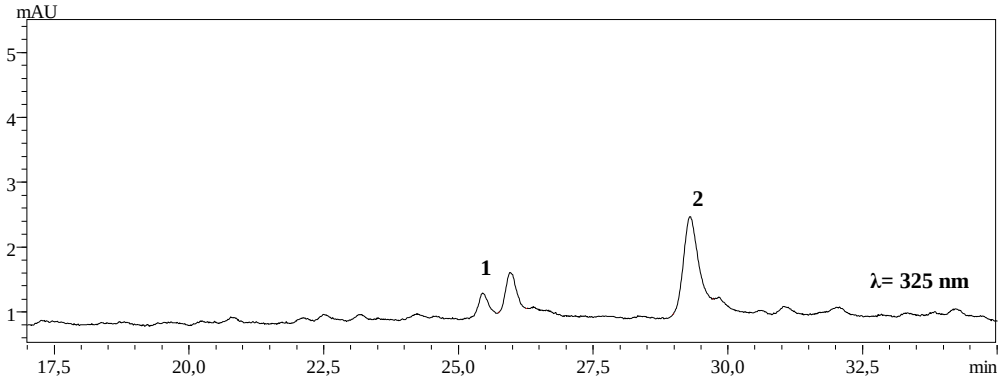
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3).**

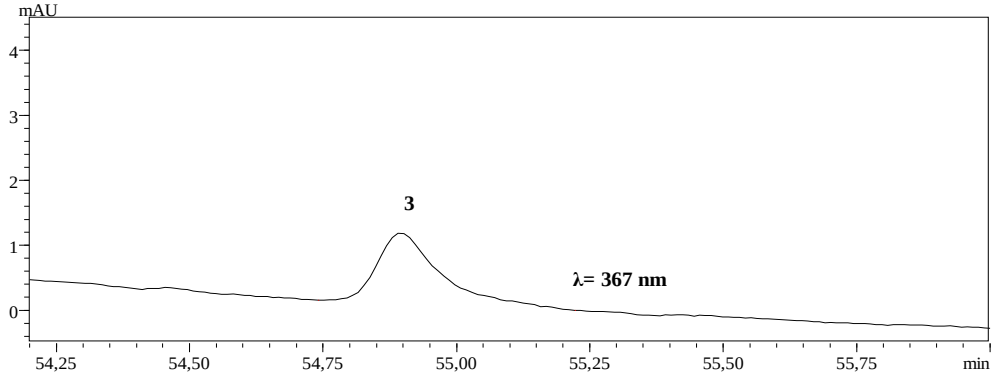




Anexo R – Cromatogramas do tempo de 24 horas da fermentação *ex vivo* do voluntário 2

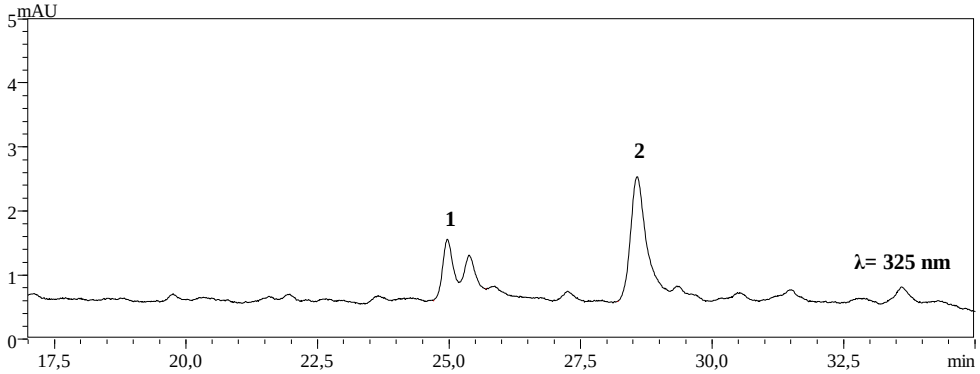
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3).**

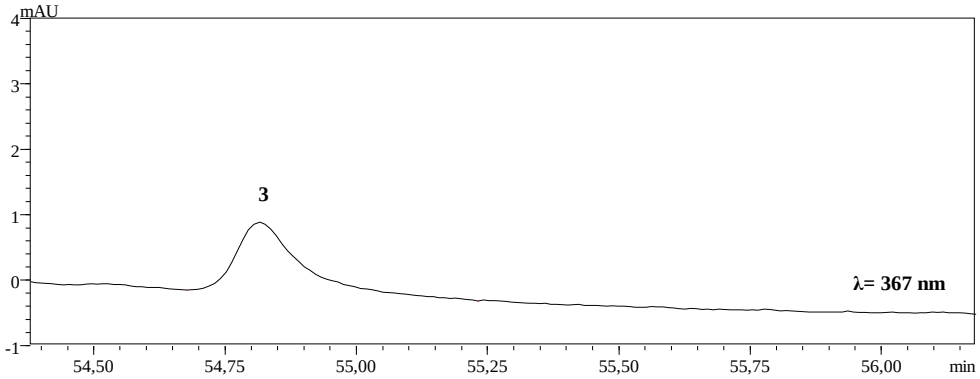




Anexo S – Cromatogramas do tempo 0 da fermentação *ex vivo* com adição da *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 2

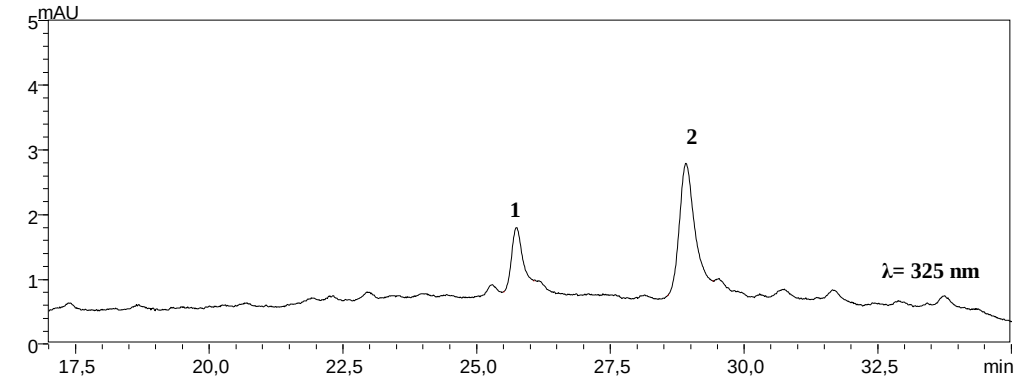
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3).**

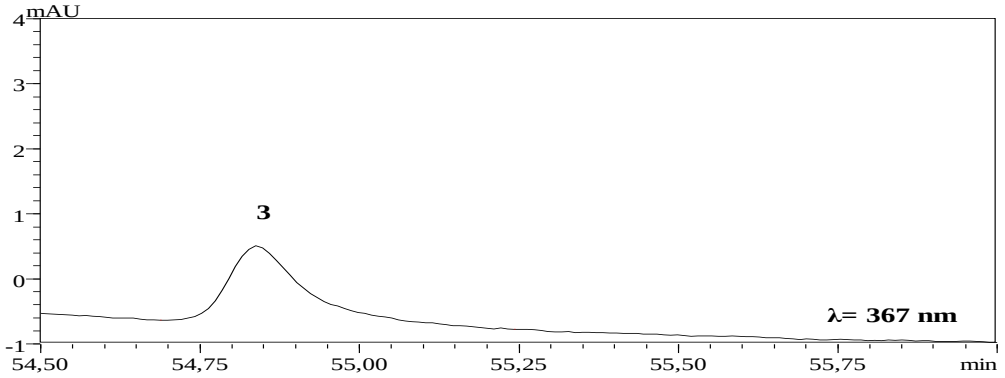




Anexo T – Cromatogramas do tempo de 4 horas da fermentação *ex vivo* com adição da *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 2

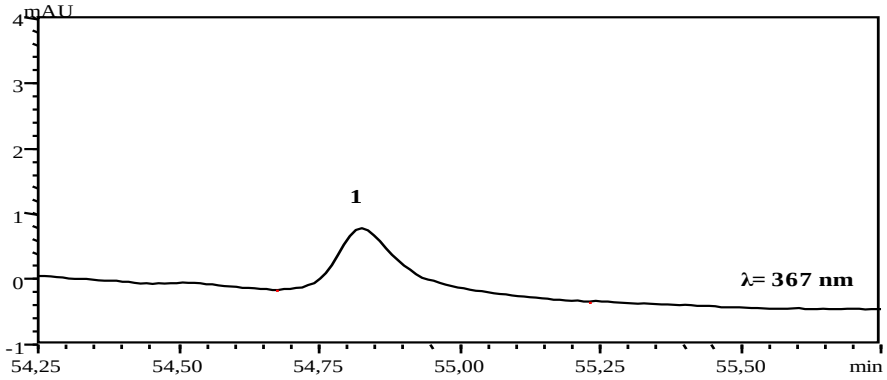
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3).**





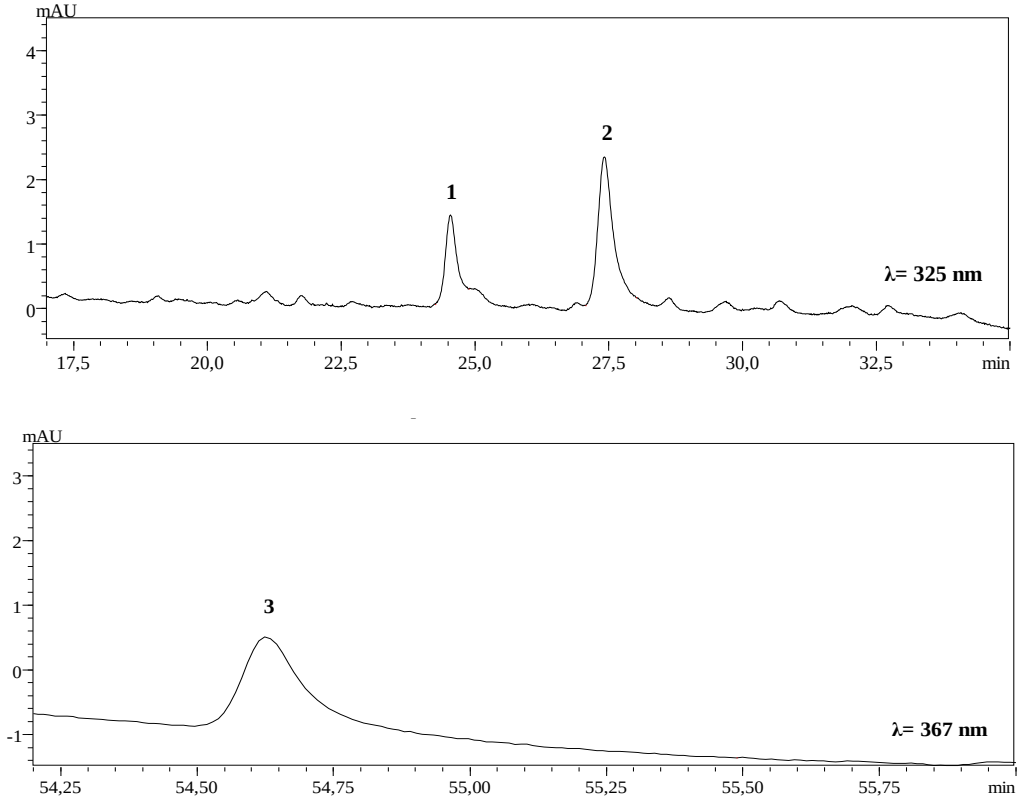
Anexo U – Cromatogramas do tempo de 24 horas da fermentação *ex vivo* com adição da *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 2

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: quercetina **(1).**



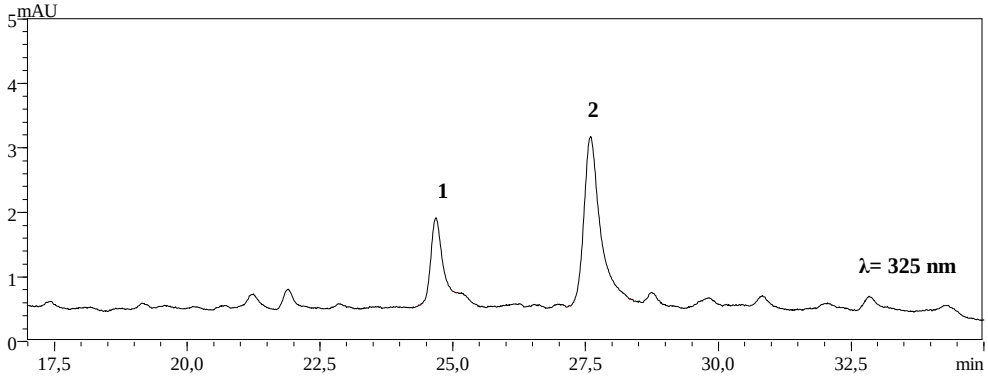
Anexo V - Cromatogramas do tempo 0 da fermentação *ex vivo* do voluntário 3

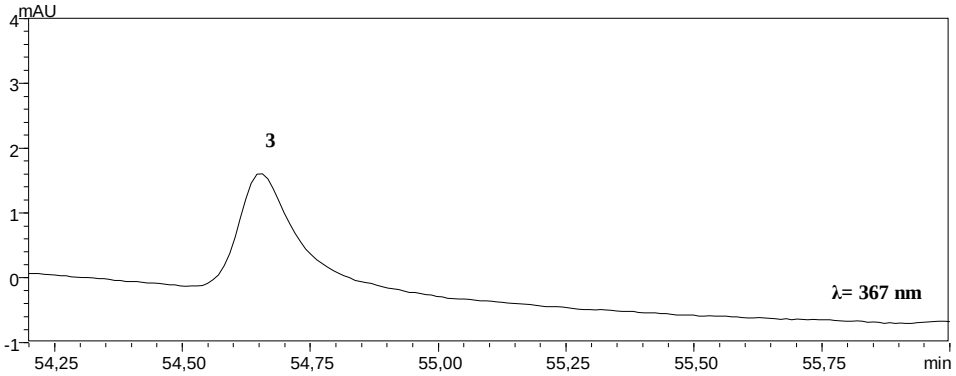
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3).**



Anexo W – Cromatogramas do tempo de 4 horas da fermentação *ex vivo* do voluntário 3

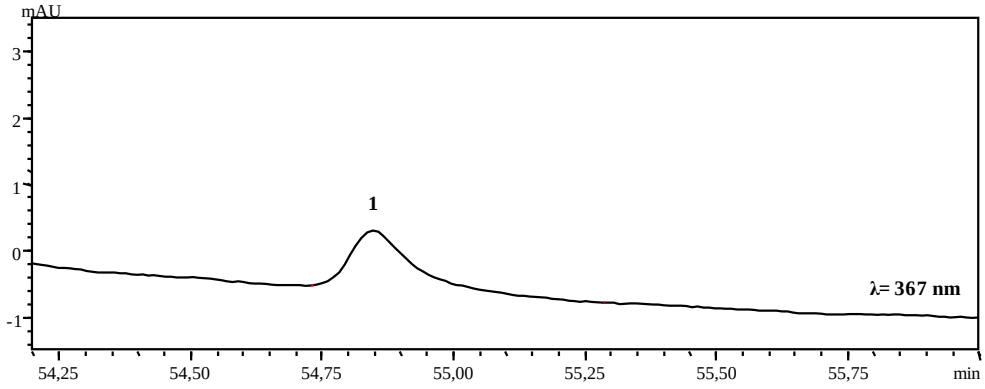
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3).**





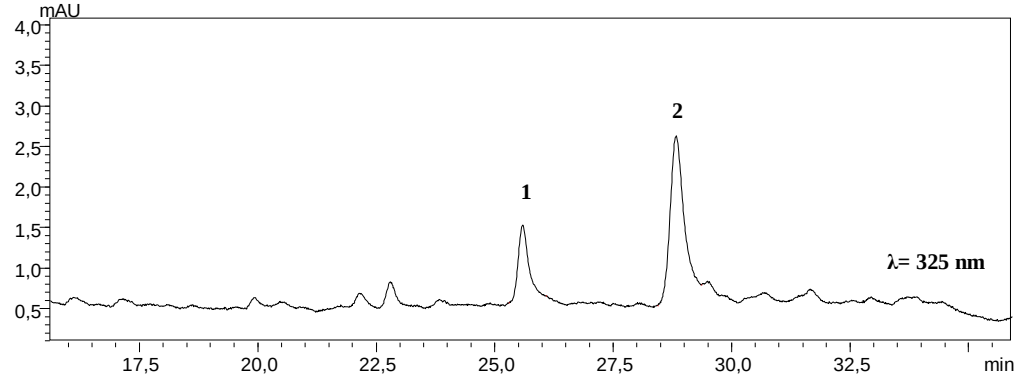
Anexo X – Cromatogramas do tempo de 24 horas da fermentação *ex vivo* do voluntário 3

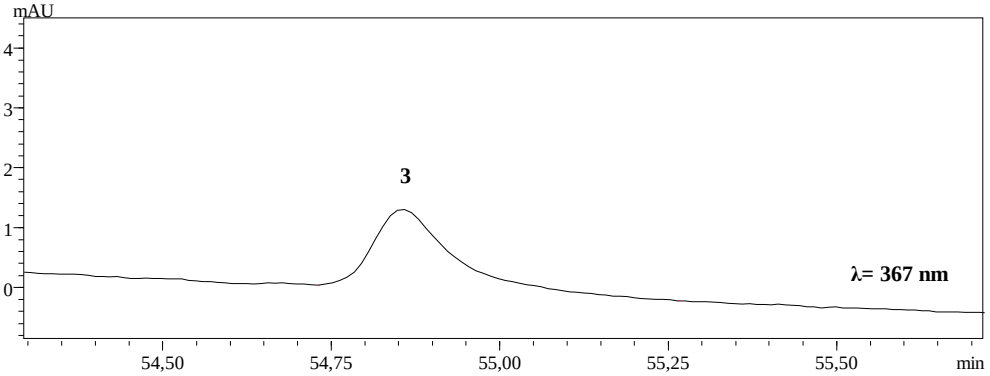
Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: quercetina **(1).**



Anexo Y – Cromatogramas do tempo 0 da fermentação *ex vivo* com adição da *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BB12 do voluntário 3

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fase gástrica. Composto identificado: ácido 3-cafeoilquínico **(1)**, ácido 5-cafeoilquínico **(2)**, quercetina **(3).**





Antioxidant effectiveness of the addition of different honeys on a mixed beverage composed of apple (*Malus domestica* cv. Borkh) and passion fruit (*Passiflora edulis*, cv. Sims).

Authors: Leite, I. B.[1]; Magalhães, C. D. [1]; Fialho, E.[1*]

[1]Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas Filho, 393 RJ 21941-590 Brasil

*Corresponding author: Tel.: +55 (21) 39386679
Fax: +55 (21) 22808343
E-mail: fialho@nutricao.ufrj.br

Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Antioxidant effectiveness of the addition of different honeys on a mixed beverage composed of apple (*Malus domestica* cv. Borkh) and passion fruit (*Passiflora edulis*, cv. Sims).

Research highlights

- The addition of floral honey to the mixed beverage improved the phenolic compounds content
- The addition of floral honey to the mixed beverage improved the antioxidant activity
- Orange blossom, multifloral and “assa-peixe” honeys are good options of sweetener in mixed beverage

Abstract

Different food sources that provide nutrients and bioactive compounds that are associated to maintain healthy, a mixed beverage with natural constituents would be a good option to achieve this purpose. The addition of honey is interesting, as it imparts a sweet flavor to beverages besides being a source of bioactive compounds. In view of this, four types of honey (eucalyptus, multifloral, orange blossom , and “assa-peixe”) were added to a mixed beverage composed of apple and passion fruits, in order to verify their influence on coloration, soluble solids content, phenolic compounds content and antioxidant activities. The beverages added of different honeys conferred color difference, but did not reach enough values detectable by vision. The addition of the honeys resulted in an increase in the soluble solids content, with eucalyptus honey giving the highest increase. In the analyzes of total phenolic compounds and the three antioxidant activities tested, the addition of orange, wild and assa-fish honeys showed an increase in the values compared to the control drink that there was no honey, demonstrating to be better options compared to honey eucalyptus. With the data obtained we conclude that the addition of honey in a mixed beverage composed of apple and passion fruit is beneficial as it enriches nutritionally this product.

Keywords: honey; mixed beverage; phenolic compounds; antioxidant activity.

Introduction

Several epidemiological studies suggest that a balanced diet, including consumption of fruits and vegetables and products derived from these foods, contributes to reducing the risk of developing non-communicable chronic diseases, such as cardiovascular diseases, diabetes and some cancers (Del Rio et al. 2013; Pierson et al. 2012; Turati et al. 2015). These preventive effects are partly due to the high levels of bioactive compounds (BCs) present in these vegetables, which are classified as non-nutrients, present in small quantities in foods, with a capacity to influence physiological or cellular activity and are beneficial to the health (Del Rio et al. 2013). In foods, such compounds are responsible for color, astringency, aroma, and oxidative stability (Naczk and Shahidi 2004). Among the BCs, the class of phenolic compounds is notable for being widely found in a variety of plants, essential for plant growth and reproduction, as well as acting as an antipathogenic agent and contributing to pigmentation (Liu et al. 2004).

The association of different food sources containing nutrients and bioactive compounds is interesting and a mixed beverage with apple, passion fruit and honey serves this purpose. The apple, a fruit widely consumed in Brazil and in the world, is rich in phenolic compounds (Zardo et al. 2013; Alarcon-Flores et al. 2015). The passion fruit is a source of ascorbic acid that helps to prevent the enzymatic browning that usually occurs during the processing of some fruits, among them the apple, besides studies indicate the presence of phenolic compounds in this fruit (Spínola et al. 2015; Macoris et al. 2012). The addition of honey gives the drink a sweet taste and adds nutritional value to the content of vitamins and minerals (Da Silva et al. 2016) and also for its content of bioactive compounds, which is superior to sugar and sweeteners (Korir et al. 2014; Moniruzzaman et al. 2013; Trautvetter et al. 2009). It is possible to find

several types of honey due to the variety of plant species in which the bee can produce its nectar, conferring different compositions and antioxidant activity (Gheldof and Engeseth 2002).

Among the varieties of honey, multifloral honey stands out for its greater availability in the market since it comes from different flowering. The eucalyptus honey also has great commercialization in Brazil due to the great reforestation of this tree allowing its flowers to be source of raw material for the bees. Orange blossom honey for its light color and soft taste is also one of the honeys of great demand by consumers. The “assa-peixe” honey is mainly produced in southeastern of Brazil, has a darker coloration and a characteristic flavor (Komatsu et al. 2002; Ribeiro et al. 2008).

The aim of this study was to verify if the addition of different varieties of floral honey alters the phenolic content and antioxidant activity of a mixed beverage composed of apple and passion fruits. In addition verify which floral honey could give the best results.

Material and methods

Reagents

Folin -Ciocalteu, gallic acid, sodium carbonate anhydrous, 1.1- diphenyl -2- picrylhydrazyl (DPPH), methanol, 2.4.6- tris (2- pyridyl) -s- triazine (TPTZ), ferric chloride ($FeCl_3$), anhydrous sodium acetate, iron sulphate heptahydrate, 6- hydroxy - 2.5.7.8- tetramethylchoman -2- carboxylic acid (Trolox), 2.2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), potassium persulfate and ethanol were from Sigma-Aldrich.

Acquisition of ingredients

Samples of passion fruit (*Passiflora edulis*, cv. Sims.) from the State of Santa Catarina were purchased during the harvest period (March 2016), at the Food Supply Center of the State of Rio de Janeiro CEASA-RJ. The fruits were washed and pulped, packed in a vacuum and stored at -22 ° C until analysis.

Samples of gala apple (*Malus domestica* cv. Borkh) were obtained from commercial establishments in the city of Rio de Janeiro-Brazil, being washed and sanitized in sodium hypochlorite solution at 100 ppm for 15 minutes.

Four types of honey were acquired in order to define which one would be used to compose the mixed juice. The eucalyptus honey (*Eucalyptus grandis*) and multifloral honey were acquired in a commercial establishment in the city of Rio de Janeiro. The orange blossom honey (*Citrus aurantium*) and “assa-peixe” honey (*Vernonia brevifolia*) were purchased in commercial establishments in the city of Rio de Janeiro.

Preparation of the mixed juice sample

Sample was prepared using a dilution of 1: 6.8 (passion fruit pulp: water), corresponding to 25 g of diluted passion fruit pulp, 50 g of apple, 9 g of honey and 140 mL of filtered water (Deliza et al. 2005) The ingredients were beaten in a blender and primed with a sieve. Control mixed beverage had no addition of any kind of honey.

Analysis of Colorimetric Coordinates

A CR-400 (Konica Minolta, Osaka, Japan) colorimeter was used, calibrated based on illuminant D65, observation angle of 2° and with the white ceramic plate supplied by the manufacturer. In a 15 mL aliquot, we obtained the following CIELab*: L* colorimetric parameters, which represents the light reflected by the sample and can range from zero (completely opaque or "black") to 100 (completely transparent or "white"), that is, it represents the scale of gray color; *a**, which represents the spectrum of red (positive values) to green (negative values); And *b**, which represents the spectrum of yellow (positive values) to blue (negative values). The values of the parameters *a** and *b** can vary between 0 and 60 (Konica Minolta, 1998). A comparison was done with control mixed juice to mixed juices with different added honeys through the formula of ΔE*:

$$\Delta E^* = (\Delta L^*2 + \Delta a^*2 + \Delta b^*2\ )^{1/2}$$

Soluble Solids Content

The determination of total soluble solids (TSS) was performed using the Eppendorf refractometer 2763, making readings for three drops from the juice samples. The results will be expressed in ° Brix according to the Adolf Lutz Institute Analytical Standards (IAL 2005).

Determination of Total Phenolic Compounds

The content of total phenolic compounds was determined by the method of Folin Ciocalteau, as described by Singleton et al. (1999). One hundred microliters of the juice were mixed with 700 µL of Milli-Q water, 50 µL of Folin-Ciocalteau reagent and 150 µL of 20% sodium carbonate (Na_2CO_3) solution. After homogenization, the mixture was maintained at 40 ° C for 30 minutes and 300 µL of each test tube was pipetted into a 96-well microplate. The absorbance of the solution was measured at 765 nm and the quantification was performed by the standard curve of gallic acid (GA), with the results expressed in mg of gallic acid equivalents (GAE)/ml. Each extract was analyzed in triplicate.

Antioxidant Actibvity Analysis (AA)

Ferric reduction antioxidant power assay (FRAP)

This assay is based on the methodology described by Benzie and Strain (1996) with minor modifications, in which the iron reduction power in food extract is evaluated. Previously stock solutions were prepared, including: 300 mM sodium acetate buffer pH 3.6, 10mM TPTZ in 40mM HCl and 20mM $FeCl_3$. The test solution (FRAP) was prepared with a mixture of 20 mL of the acetate buffer, 2 mL of the 10mM TPTZ solution and 2 mL of the $FeCl_3$ solution, and then heated to 37 ° C. Juice (20 µL) was added to 180 µL of the FRAP solution for 6 minutes in a dark environment. The reading was performed in a spectrophotometer (Biochrom Anthos zenyth 200st microplate reader) at 593nm. The results were expressed in mmol Fe^{+2}/100 mL and the analysis were performed in triplicate.

Capability of scavenging of DPPH Radical

The AC was performed using the DPPH free radical according to the method described by Duan et al. (2007). The 100 μM DPPH solution was prepared using 80% methanol. The reading of the DPPH solution in the absence of the sample was performed in a spectrophotometer at 517nm in order to verify the absorbance between 0.8 and 1.1. In test tubes were added 0.1 mL of the juice from each sample and 4.9 mL of 100 μM DPPH solution. The tubes were shaken manually kept in the dark for 30 minutes to carry out the readings at 517nm.

To calculate the AC, the percentage of inhibition of the DPPH radical was done according to the formula:

$$CA\ (\%) = (A_0 - A_{30}) * 100 / A_0$$

Where A_0 represents the absorbance of the DPPH solution measured at the initial time, and A_{30} is the absorbance of each sample 30 minutes after the addition of the DPPH solution and the analysis were performed in triplicate.

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

The TEAC test was performed according to the methodology adapted from Re et al. (1999). The preparation of the stock solution of the 2.2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium radical (ABTS) was carried out by the reaction between potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) and ABTS for 12 to 16 h before use. The stock solution of the ABTS radical was diluted (1:50) so that the absorbance reading of the solution at 720 nm was 0.70 ± 0.02. Juice (10 μL) was pipetted into a 96-well plate and 190 μL of the diluted ABTS radical solution added. The absorbance reading was taken at 720 nm and subtracted from the absorbance of the blank. Quantification was performed using a standard Trolox curve. The results were

expressed in μmol de Trolox/ 100mL equivalents and the analysis were performed in triplicate.

Statistical analysis

The results, expressed as mean ± standard error, were evaluated using one-way ANOVA followed by Tukey's test, at a significance level of 5% ($p < 0.05$) for comparison of means. For these analysis were used the software GraphPad Prism® version 6.0. Subsequently, a Pearson correlation was performed between the variables.

Results and discussion

Colorimetric Coordinates Analysis

The colorimetric parameter L * represents the brightness reflected by the sample and can vary between zero (completely opaque or "black") and 100 (completely transparent or "white"), that is, it represents the scale of the gray color; a *, represents the spectrum of red (positive values) to green (negative values); and b * represents the spectrum of yellow (positive values) to blue (negative values). The values of the parameters a * and b * can vary between 0 and 60 (Konica Minolta, 1998).

The values of L * found for mixed beverages were: control (40.10±0.000), with orange blossom honey (38.26±0.007), eucalyptus honey (38.43±0.007), multifloral honey (38.48±0.006) and “assa-peixe” honey (38.37±0.007). All samples differed from each other and when the four samples were compared with the different types of honey, the samples with eucalyptus and wild honeys presented the highest values, although they did not differ statistically from the others, as can be observed in **Figure 1**.

The value of a * found for the mixed beverage control was -0.52 ± 0.007, for the mixed beverage with the orange blossom honey was -0.37 ± 0.006, for the mixed beverage with the eucalyptus honey was -0.49 ± 0 , 01, for the mixed beverage with multifloral honey was -0.56 ± 0.01 and for the mixed drink with the “assa-peixe” honey was -0.34 ± 0.02. The samples that differed from the mixed beverage control were those that possessed the orange blossom and “assa-peixe” honeys. In comparison with the four samples with the different types of honeys, the eucalyptus and multifloral samples had the highest values, although they did not differ statistically as can be observed in **Figure 1**.

The values of b * found for mixed beverages were: control (19.51 ± 0.007), orange blossom honey (18.35 ± 0.007), eucalyptus honey (18.38 ± 0.020), and multifloral honey (18.55 ± 0.009) and with “assa-peixe” honey (18.40 ± 0.012). The samples that differed from the control mixed beverage were the ones that presented orange blossom and assa-peixe” honeys. And in comparison with the four samples with the honeys, the multifloral sample showed the highest value as can be observed in **Figure 1**.

The values of ΔE *, which corresponds to the difference between the control and the mixed beverages with the orange blossom or eucalyptus or multifloral or “assa-peixe” were: 2.18, 2.06, 2.02, 1.88 CIELab units, respectively. Previous studies considered a range of 0.38-0.73 CIELab units as the threshold values and more than 1.75 CIELab units as above the threshold, while the value higher than 5 CIELab units can be considered as visually distinguishable (Melgosa et al. 1997; Obón et al. 2009). Thus, mixed beverages added from different types of honeys conferred color difference, but did not reach sufficient values detectable by vision.

Total Soluble Solids (TSS)

The results of all samples were expressed as ° Brix. The value found for mixed beverage control was 4.33 ± 0.03, for mixed beverage with orange blossom honey was 7.93 ± 0.03, for mixed beverage with eucalyptus honey was 8.20 ± 0.00, for the mixed beverage with multifloral honey was 8.03 ± 0.03 and for the mixed beverage with “assa-peixe” honey was 7.93 ± 0.03. All samples differed from the control beverage and among the four samples with the honeys the eucalyptus sample had the highest value as can be observed in **Figure 2**. This shows that the addition of honey increased the soluble solids content by 1.85 (average 3.7 ° Brix), these solids being mainly sugars

(Chitarra and Chitarra 2005). Honey is a concentrated solution of two sugars (glucose and fructose) which corresponds to approximately 85% of its composition (Silva et al., 2003). The soluble solids content of the control drink, consisting of passion fruit, apple and water, is lower than the contents of mixed passion fruit and apple juices, since the addition of water dilutes soluble solids (Yamamoto et al., 2015).

Determination of Total Phenolic Contents (TPC)

Analyzes were carried out with the control beverage and the beverages with addition of the honeys: orange blossom, eucalyptus, multifloral or “assa-peixe”. The results were expressed in mg GAE/100 mL of mixed beverage, where the mixed beverage control was 127.00±2.30 mg EAG/100 mL, for the mixed drink with orange blossom honey was 193.40±4.63 mg GAE/100 mL, for mixed drink with eucalyptus honey was 167.90±2.04 mg GAE/100 mL, for mixed drink with multifloral honey was 195.10±8.06 mg GAE/100 mL and for the mixed drink with “assa-peixe” honey was 205.60±7.75 mg GAE/100 mL. All samples differed from the control mixed beverage and among the four mixed beverages with the different honeys, which presented the highest values, but without statistical difference were: orange blossom, multifloral and “assa-peixe”, as can be observed in **Figure 3**. We observed that after addition of honey to the mixed drink there was an average increase of 1.55 times its total phenolic compounds content.

Toydemir et al. (2015) evaluated the total polyphenol content of nine types of tea added with flower honey, among them six showed an increase of up to 1.69 times. Celep and Yeşilada (2017) observed that after the addition of floral honey in samples of fresh and soluble coffee, they observed an increase of 1.18 and 1.10 times, respectively. Ozdatlı et al. (2014) evaluated the effect of honey addition on nine different types of tea

and observed an increase of on average 11.2 times the content of phenolic compounds, which can be justified by the interaction between the components of the honey and the components of the teas. Pereira et al. (2015) evaluated the addition of three honey types of different staining to the infusions and observed on average a 1.20 fold increase in the phenolic content, the darker honey being the one that conferred the greatest increase. Thus, the addition of honey was favorable for increasing the phenolic content of these beverages.

Analysis of antioxidant activity (AA) by FRAP, DPPH e TEAC

The quantitative contribution of different antioxidant substances present in several foods determines its antioxidant activity (Zulueta et al 2009). The results obtained by the FRAP method were expressed in mmol Fe^{+2}/100 mL of beverage. The control beverage had a value of 109.70±0.26 mmol Fe^{+2}/100 mL, for the mixed beverage with orange blossom honey was 140.80±1.09 mmol Fe^{+2}/100 mL, for the mixed beverage with eucalyptus honey was 97.91±2.84 mmol Fe^{+2}/100 mL, for mixed beverage with multifloral honey was 149.90±3.52 mmol Fe^{+2}/100 mL and for mixed beverage with “assa-peixe” honey was 139.10 ± 3.15 mmol Fe^{+2}/100 mL.

All samples differed from the control mixed beverage and among the four samples with the different types of honey, the ones that presented the highest values, although not statistically different were: orange blossom, multifloral, and, “assa-peixe” honeys. The mixed beverage with “assa-peixe” had the lowest value, different from all analyzed samples, including mixed beverage control. The results can be seen in **Figure 4**.

The results obtained by the use of DPPH were expressed as % of DPPH radical inhibition. The control beverage presented a value of 5.27 ± 0.34%, for mixed beverage

with orange blossom honey was of 9.41 ± 0.73%, for mixed beverage with eucalyptus honey was of 6.76 ± 0.38% for mixed beverage with multifloral honey was 10.13 ± 1.37% and for the mixed beverage with “assa-peixe” honey was 8.2 ± 0.49%. The beverages containing the eucalyptus and “assa-peixe” honeys did not present significant difference compared to the control mixed beverage and the beverages containing the orange blossom or multifloral honeys presented significant difference of the control beverage, but did not differ among them. After addition of honey, beverage increased by an average of 1.66 times its antioxidant capacity by DPPH.

Toydemir et al. (2015) evaluated the antioxidant activity by the DPPH of nine types of tea added with floral honey, among them four showed an increase of up to 1.45 times. Pereira et al. (2015) also evaluated the effect of honey addition on different combinations of infusions and the results indicated that had a synergistic effect in all combinations, with an increase in average 2.5 times the antioxidant capacity by DPPH and for increased FRAP on average 1.8 times.

The results obtained by the TEAC method were expressed in μM Trolox / 100 mL. The control beverage presented the value of 38.83 ± 0.29 μM Trolox / 100 mL, for mixed beverage with orange blossom honey was 70.36 ± 1.57 μM Trolox / 100 mL, for mixed beverage with eucalyptus honey was 50.43 ± 2.14 μM Trolox / 100 mL, for mixed beverage with multifloral honey was 71.25 ± 1.57 μM Trolox / 100 mL and for mixed drink with “assa-peixe” honey was 74.68 ± 1.33 μM Trolox / 100 mL. All the samples differed from the control mixed beverage and among the four samples with the different types of honey, the samples that presented the highest values, although not giving statistical difference between them were with orange blossom, multifloral and “assa-peixe” honeys.

When correlating the soluble solids content with the different methods for antioxidant activity and total phenolic compounds, a negative correlation was observed, so the soluble solids content is inversely proportional to the content of phenolic compounds and the antioxidant capacity, which may be due to the sugar content of honey that would complex with possible compounds of the beverage (Zhang et al. 2009). The correlation of the phenolic compounds with the different methods of analysis of antioxidant activity was moderate positive for DPPH analysis (R^2= 0.7802, $p< 0.05$) and strong positive for FRAP analysis (R^2 = 0.8859, $p< 0.05$) and TEAC (R^2= 0.9848 $p< 0.05$). The results can be observed in the **Table 1**.

Conclusions

Based on the results obtained, mixed beverages containing the orange blossom, multifloral and "assa-peixe" honeys obtained the highest values for the phenolic compounds content and the three analysis of antioxidant activity. In relation to the soluble solids content, these samples had the lowest values, which showed an inverse correlation with the contents of phenolic compounds and the analysis of antioxidant activity. This suggests that honey with lower amounts of sugars would be favorable to improve the quality of the beverage. And given the analysed data, orange blossom, multifloral and "assa-peixe" honeys would be good options to add nutritional value to a mixed drink based on apple and passion fruits.

References

- Alarcon-Flores MI, Romero-González R, Martínez Vidal JL, Frenich AG (2015) Evaluation of the presence of phenolic compounds in different varieties of apple by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Food Anal. Methods 8:696-709. doi: /10.1007/s12161-014-9931-6.
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem 239:70-76. doi: 10.1006/abio.1996.0292.
- Celep E, Yeşilada E (2017) Influence of honey addition on the bioaccessibility of phenolic contents and antioxidant capacities of different coffee types. Marmara Pharm J 21:906-914. doi: 10.12991/mpj.2017.15.
- Chitarra MIF, Chitarra AB (2005) Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA.
- Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa AC, Fett R (2016) Honey: Chemical composition, stability and authenticity. Food Chem 196:309-323. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.051.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A (2013) Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. Antioxid Redox Signal 18:1818-1892. doi: 10.1089/ars.2012.4581.
- Deliza R, MacFIE H, Hedderley D (2005) The consumer sensory perception of passion-fruit juice using free-choice profiling. J Sens Stud 20:17-27. doi: 10.1111/j.1745-459X.2005.050604.x.

- Duan X, Jiang Y, Su X, Zhang Z, Shi J (2007) Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis Sonn.*) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. Food Chem 101:1365–1371. doi: 10.3390/antiox5020016.
- Gheldof N, Engeseth NJ (2002) Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of *in vitro* lipoprotein oxidation in human serum samples. J. Agric. Food Chem 50:3050-3055. doi: 10.1021/jf0114637.
- IAL - Instituto Adolf Lutz (2005) Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4.ed.,1018.
- Komatsu SS, Marchini LC, Moreti ACCC (2002) Physical-chemical analysis of honeys from wild flowers, eucalyptus flowers and citrus flowers produced by *Apis mellifera* L., 1758 (*Hymenoptera, Apidae*) in the State of São Paulo, Brazil. 2. Sugars and protein contents. Food Sci. Technol 22: 143-146. doi: 10.1590/S0101-20612002000200007.
- Konica Minolt (1998) Comunicação Precisa da Cor: controle de qualidade da percepção à instrumentalização. Konica Minolta Sensing, INC, Osaka, Japão.
- Korir MW, Wachira FN, Wanyoko JK, Ngure RM, Khalid, R (2014) The fortification of tea with sweeteners and milk and its effect on *in vitro* antioxidant potential of tea product and glutathione levels in an animal model, Food Chem 145:145–153. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.016.
- Liu RH (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J Nutr 134:3479S-3485S. doi:134/12/3479S [pii]
- Macoris MS, De Marchi R, Janzantti NS, Monteiro M (2012). The influence of ripening stage and cultivation system on the total antioxidant activity and total

phenolic compounds of yellow passion fruit pulp. J Sci Food Agric 92:1886–1891. doi: 10.1002/jsfa.5556.

- Melgosa M, Hita E, Poza AJ, Alman DH, Berns RS (1997) Suprathreshold color-difference ellipsoids for surface colors. Color Res Appl 22: 148–155. doi: 10.1002/(SICI)1520-6378(199706)22:3<148::AID-COL3>3.0.CO;2-R.
- Moniruzzaman M, Sulaiman SA, Azlan SA, Gan SH (2013) Two-year variations of phenolics, flavonoids and antioxidant contents in acacia honey. Molecules 18:14694-14710. doi: 10.3390/molecules181214694.
- Naczk M, Shahidi F (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. J Chromatogr A 1054:95-111. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.059.
- Obón JM, Castellar MR, Alacid M, Fernández-López JÁ (2009) Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. J Food Engineering 90:4, 471-479. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2008.07.013.
- Ozdatli S, Sipahi H, Charehsaz M, Aydin A, Yesilada E (2014) Effect of honey supplementation on total antioxidant capacity of herbal teas. Marmara Pharm J 18:147–52. doi: 10.12991/mpj.2014187242.
- Pereira C, Barreira JC, Calhelha RC, Lopes M, Queiroz MJ, Vilas-Boas M, Barros L, Ferreira IC (2015) Is honey able to potentiate the antioxidant and cytotoxic properties of medicinal plants consumed as infusions for hepatoprotective effects. Food Funct 6:1435-1442. doi: 10.1039/c4fo01206b.
- Pierson JT, Dietzgen RG, Shaw PN, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR, Gidley MJ (2012). Major Australian tropical fruits biodiversity: bioactive compounds and their bioactivities. Mol Nutrition Food Res 56:357-387. doi: 10.1002/mnfr.201100441.

- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1993) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26:1231–1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- Ribeiro MC, Moreira AFR, De Maria, CAB (2008) Volatile profile of the headspace fraction of "assa-peixe" (*Vernonia sp*.) honeys. Food Sci Technol 28:169-171. doi: 10.1590/S0101-20612008000100024.
- Silva RN, Monteiro VN, Alcanfor JX, Assis EM, Asquieri ER (2003). Comparison methods for the determination of reducers sugars and total in honey. Food Sci. Technol 23:337-341. doi: 10.1590/S0101-20612003000300007.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. Methods Enzymol 299:152–178. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
- Spínola V, Pinto J, Castilho PC (2015) Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI MSn and screening for their antioxidant activity. Food Chem 173:14-30. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.163.
- Toydemir G, Capanoglu E, Kamiloglu S, Firatligil-Durmus E, Sunay AE, Samanci T, Boyacioglu D (2015) Effects of honey addition on antioxidative properties of different herbal teas. Pol J Food Nutr Sci 65:127-135. doi: 10.1515/pjfns-2015-0019.
- Trautvetter S, Koelling-Speer I, Speer K (2008) Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. Apidologie 40:140-150. doi: 10.1051/apido/2008072.

- Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C (2015) Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. Br J Nutr 113:102-110. doi: 10.1017/S0007114515000148.
- Yamamoto LK, de Assis, AM, Roberto, SR, Bovolenta, YR, Nixdorf, SL, García-Romero E, Gómez-Alonso S, Hermosín-Gutiérrez I (2015) Application of abscisic acid (S-ABA) to cv. Isabel grapes (*Vitis vinifera* × *Vitis labrusca*) for color improvement: Effects on color, phenolic composition and antioxidant capacity of their grape juice. Food Res Int 77:572–583. doi: 10.1016/j.foodres.2015.10.019.
- Zardo DM, Silva KM, Guyot S, Nogueira A (2013) Phenolic profile and antioxidant capacity of the principal apples produced in Brazil. Int J Food Sci Nutr 64:611-620. doi: 10.3109/09637486.2013.763909.
- Zhang J, Li L, Sung-Hoon K, Ann H, Junxuan L (2009) Anti-cancer, antidiabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloylglucose. Pharm Res 26:1–27. doi: 10.1007/s11095-009-9932-0.
- Zulueta A, Esteve MJ, Frígola A (2009) ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chem 114:310-316. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.033.

Figure Legends

Figure 1. Colorimetric coordinates (L *, a * and b *) in mixed control beverages (C), plus orange blossom (O), eucalyptus (E), multifloral (M) and "assa-peixe" (A-P) honeys. Different letters indicate that there was a significant difference by the Tukey test at 5% probability.

Figure 2. Soluble solids content in mixed control (C), plus orange blossom (O), eucalyptus (E), multifloral (M) and "assa-peixe" (A-P) honeys beverages. Different letters indicate that there was a significant difference by the Tukey test at 5% probability.

Figure 3. Total phenolic compounds in mixed control (C), plus orange blossom (O), eucalyptus (E), multifloral (M) and "assa-peixe" (A-P) honeys beverages. Values expressed in equivalent milligrams of gallic acid per gram of sample (mg GAE / 100mL). Different letters indicate that there was a significant difference by the Tukey test at 5% probability.

Figure 4. Antioxidant activities from FRAP, DPPH, and TEAC methods in control beverage (C), orange blossom (O), eucalyptus (E), multifloral (M) and "assa-peixe" (A-P) honeys beverages. Different letters indicate that there was a significant difference by the Tukey test at 5% probability.

Table 1. Pearson Correlation between analyzes of total soluble solids, total phenolic compounds, and antioxidant activities (FRAP, DDPH, and TEAC).

	TSS	TPC	FRAP	DPPH	TEAC
TSS	1.00	-0.92	-0.83	-0.74	-0.94
TPC	-0.92	1.00	0.89	0.78	0.98
FRAP	-0,83	0.89	1.00	0.98	0.95
DPPH	-0.74	0.78	0.98	1.00	0.87
TEAC	-0.94	0.98	0.95	0.87	1.00

Leite et al., 2017

Figure

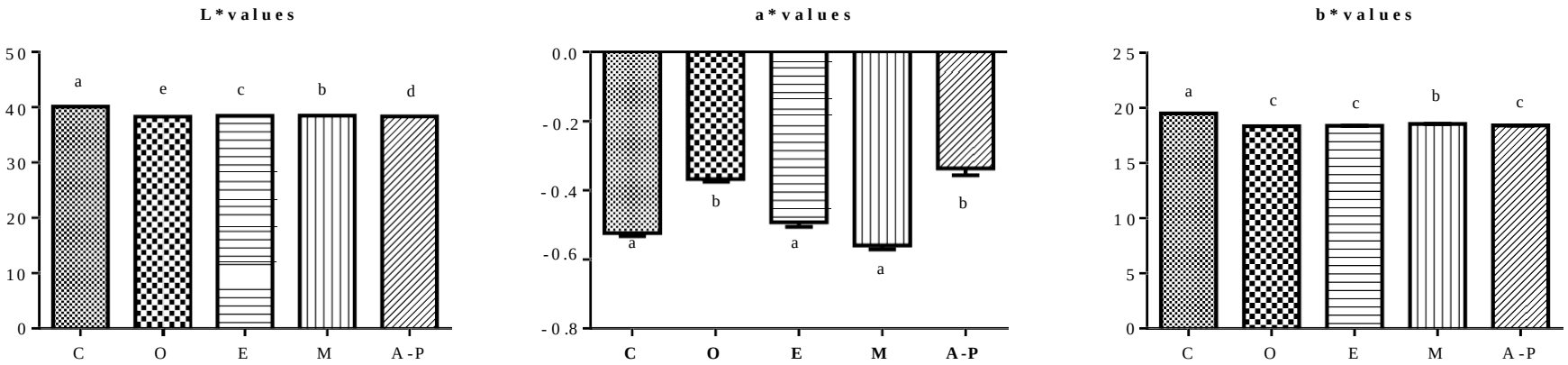


Figure 1

Leite et al., 2017

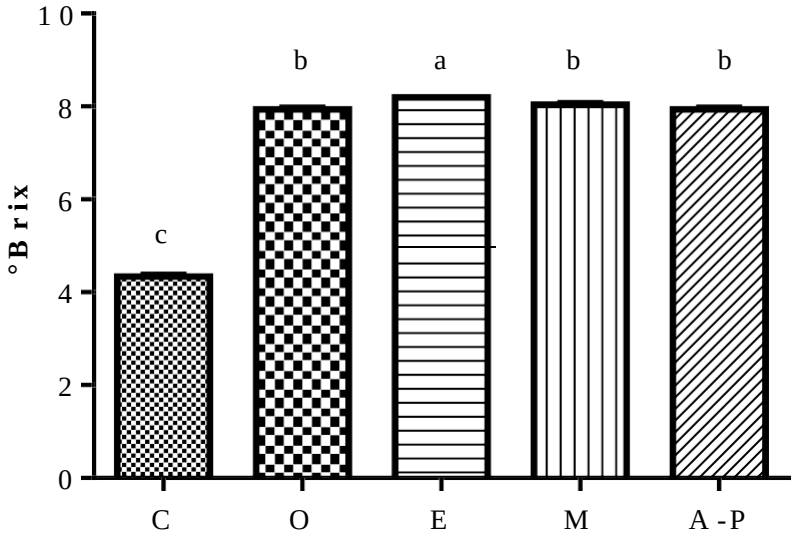


Figure 2

Leite et al., 2017

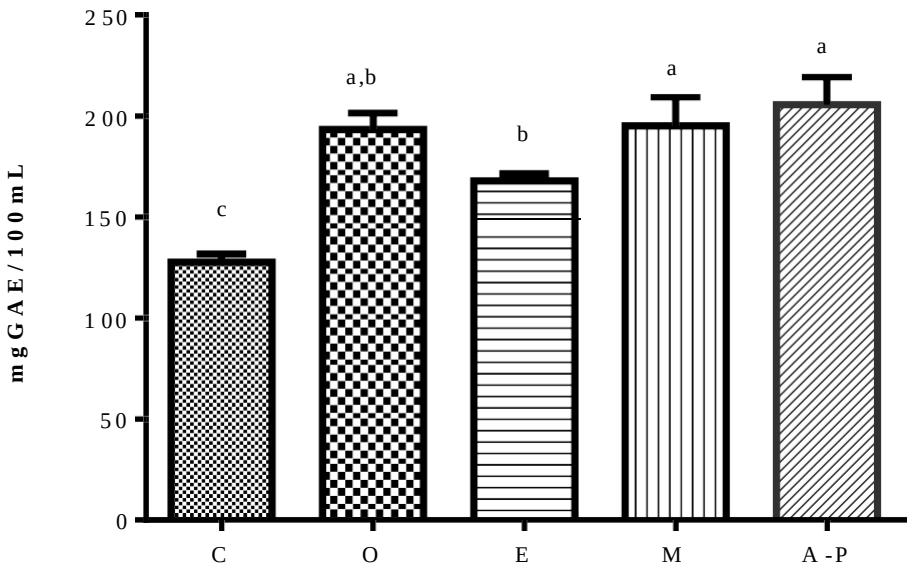


Figure 3

Leite et al., 2017

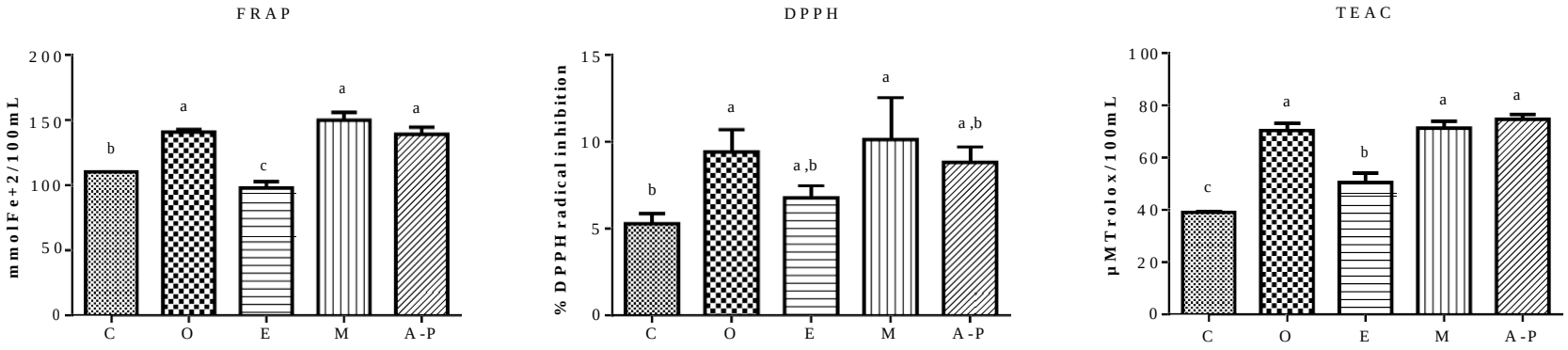


Figure 4

Leite et al., 2017

Journal of Food Science and Technology

Copyright Transfer and Financial Disclosure/Conflict of Interest Statement

The copyright to this article is transferred to the Association of Food Scientists and Technologists of India (AFSTI) (for U.S. government employees: to the extent transferable) effective if and when the article is accepted for publication. The author warrants that his/her contribution is original and that he/she has full power to make this grant. The author signs for and accepts responsibility for releasing this material on behalf of any and all co-authors. The copyright transfer covers the exclusive right to reproduce and distribute the article, including reprints, translations, photographic reproductions, microform, electronic form (offline, online) or any other reproductions of similar nature.

An author may self-archive an author-created version of his/her article on his/her own website and or in his/her institutional repository. He/she may also deposit this version on his/her funder's or funder's designated repository at the funder's request or as a result of a legal obligation, provided it is not made publicly available until 12 months after official publication. He/she may not use the publisher's PDF version, which is posted on www.springerlink.com, for the purpose of self-archiving or deposit. Furthermore, the author may only post his/her version provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The original publication is available at www.springerlink.com".

The author is requested to use the appropriate DOI for the article. Articles disseminated via www.springerlink.com are indexed, abstracted and referenced by many abstracting and information services, bibliographic networks, subscription agencies, library networks, and consortia. After submission of the agreement signed by the corresponding author, changes of authorship or in the order of the authors listed will not be accepted.

I, the undersigned corresponding author, also certify that I/we have no commercial associations (e.g., consultancies, stock ownership, equity interests, patent-licensing arrangements, etc.) that might pose a conflict of interest in connection with the submitted article, except as disclosed on a separate attachment. All funding sources supporting the work and all institutional or corporate affiliations of mine/ours are acknowledged in a footnote. *Please mention if a separate attachment is enclosed.*

Title of the article

Antioxidant effectiveness of the Addition of different honeys on a mixed beverage composed of apple (Malus domestica cv. Borkh) and passion fruit (Passiflora edulis cv. Sims)

Author (s)

Eliane Fialho

Author(s)' signature (s)

Date

11/22/2017

Empowering the Food Professional

Association of Food Scientists and Technologists of India (AFSTI)

Please sign this form, scan and upload to:
https://www.editorialmanager.com/jfst while submitting your manuscript.