

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Estudo comparativo da excreção de flavonoides entre indivíduos eutróficos e obesos, após a ingestão de sucos de laranja, cv. Pera e cv. Moro

Alessandra Harumi Nishioka

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof^a. Dr^a. Neuza Mariko Aymoto
Hassimotto

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Estudo comparativo da excreção de flavonoides entre indivíduos eutróficos e obesos, após a ingestão de sucos de laranja, cv. Pera e cv. Moro

Alessandra Harumi Nishioka

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 6018, de 13/10/2011.
Original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção do Título de Mestre em Ciências dos Alimentos no Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

São Paulo
2019

Alessandra Harumi Nishioka

**Estudo comparativo da excreção de flavonoides entre indivíduos eutróficos e obesos,
após a ingestão de sucos de laranja, cv. Pera e cv. Moro**

Comissão julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

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

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019

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

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

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

N724e	Nishioka, Alessandra Harumi Estudo comparativo da excreção de flavonoides entre indivíduos eutróficos e obesos, após a ingestão de sucos de laranja, cv. Pera e cv. Moro / Alessandra Harumi Nishioka. - São Paulo, 2019. 106 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Hassimotto, Neza Mariko Aymoto 1. Excreção. 2. Flavanonas. 3. Hesperidina. 4. Narirutina. 5. Suco de laranja. I. T. II. Hassimotto, Neza Mariko Aymoto, orientador.
-------	---

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a. Neuza Hassimotto, pela oportunidade, orientação, ensinamentos, dedicação e paciência para a conclusão dessa trajetória.

As agências financiadoras CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FoRC (Food Research Center) e à Universidade de São Paulo por tornar possível esse trabalho.

Aos professores do departamento, pela troca de experiências e conhecimentos. As técnicas do laboratório: Lúcia Justino, Aline de Oliveira, Tânia Shiga e Luciene Lauer pela ajuda com os experimentos. A Miriam Roldán pela ajuda durante as análises de espectrometria de massas.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Aos membros da banca de qualificação: Thomas Ong, Elisa Brasili e William Festuccia, pelas sugestões e críticas que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Aos amigos e colegas que fiz no laboratório: Thiago Santos, Manuela Brito, Elisa Brasili, Mayara Adja, Stephanie Rivera, Lais Moro, Paola Santiago, Victor Castro, Samira Prado e Gabriela Schmitz pelas trocas de experiências, ideias e pela ajuda.

Em especial a Jéssica Ramos, minha primeira amizade no laboratório. Pelas horas de sofrimento, pelas risadas, força e conselhos.

À Aline Alves, Karina Gama, Sara Lima, Jacqueline Valério, Mayra Crystiane e Janayra Teixeira pela ajuda nas minhas análises, pelo encorajamento e pelas conversas mais humoradas.

As voluntárias, que fizeram possível a construção desse trabalho.

As minhas amigas: Erika Soares, Amanda Leite e Paula Vilela, pela amizade.

Aos meus primos, que sempre me escutam e apoiam.

Em especial a minha família, aos meus pais, Maciel e Cecília e a minha irmã, Akemi, por todo apoio e confiança.

A todos, que contribuíram de alguma forma para conclusão desse trabalho.

“A paciência é amarga, mas seu fruto é doce.”

Jean Jacques Rousseau

RESUMO

NISHIOKA, Alessandra Harumi. **Estudo comparativo da excreção de flavonoides entre indivíduos eutróficos e obesos, após ingestão de sucos de laranja, cv. Pera e cv. Moro.** 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

As laranjas e seus derivados, principalmente os sucos, possuem compostos bioativos, tais como os flavonoides, entre eles as flavanonas hesperidina e narirutina, que podem estar relacionados à promoção e benefícios à saúde. A absorção e metabolização de flavonoides podem ser afetadas por diversos fatores como a microbiota e fatores antropométricos, o que pode afetar a sua bioatividade. Assim, o objetivo deste estudo foi comparar o metabolismo e excreção dos flavonoides entre indivíduos eutróficos e obesos após a ingestão de sucos de laranja pasteurizado obtidos das cvs. Pera e Moro. Em um estudo *cross-over* randomizado 20 voluntárias eutróficas e 10 voluntárias obesas, com idade entre 19 e 40 anos, consumiram em dose única 600 mL de cada suco, que contém as flavanonas narirutina e hesperidina, além das antocianinas no suco Moro. Os metabólitos de flavanonas e de antocianinas foram identificados e quantificados em urina coletada em diferentes períodos de tempo durante 24 horas. Não foi observada diferença significativa na permeabilidade intestinal entre os grupos. Foram detectados e identificados 8 metabólitos de fase II da hesperitina e naringenina, principalmente mono e diglicuronidados e sulfatos, além de três ácidos fenólicos catabólitos de flavanonas formados pela microbiota intestinal, entre elas o ácido hipúrico, ácido protocatecuico e ácido 3-(3-hidroxifenil)-3-hidroxiopropiônico. Os ácidos fenólicos foram os metabólitos majoritários recuperados na urina, principalmente o ácido hipúrico. Ainda, os metabólitos de fase II apresentaram maior excreção entre o período de 4-8h e 8-12h (13 a 27% do total de metabólitos excretados). Não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) no total de metabólitos de naringenina e hesperitina excretados na urina durante o período de 24 h entre os dois grupos e para os sucos de laranja, nem para o total de metabólitos, provavelmente devido à grande variabilidade interindividual na excreção. Assim, não foi observada diferença entre a metabolização de flavanonas de laranja entre os eutróficos e obesos e nenhuma correlação com os parâmetros antropométricos avaliados.

Palavras-chaves: Excreção, flavanonas, hesperidina, narirutina, suco de laranja

ABSTRACT

NISHIOKA, Alessandra Harumi. **Comparative study of excretion of flavonoids among eutrophic and obese individuals, after ingestion of orange juice, cv. Pera and cv Moro.** 2019. Dissertation (Master degree) – Faculty of Pharmaceuticals Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Oranges and orange juices contain bioactive compounds, such as flavonoids, mainly the flavanones hesperidin and narirutin, which may be related to the promotion and health benefits. The absorption and metabolism of flavonoids can be affected by several factors such as the gut microbiota and anthropometric parameters, which may affect its bioactivity. Thus, the aim of this study was to compare the metabolism and excretion of flavonoids among eutrophic and obese people after ingestion of two pasteurized orange juice obtained from cvs. Pera and Moro. In a randomized cross-over study 20 eutrophic volunteers and 10 obese volunteers, aged 19-40 years, consumed a single dose of 600 mL of each juice. The metabolites of flavanones and anthocyanins were identified and quantified in urine collected at different time points for 24 hours. No significant difference in intestinal permeability was observed between groups. Eight Phase II metabolites of hesperitin and naringenin, mainly mono and diglycerides and sulfates, and three phenolic catabolites of flavanones formed by the gut microbiota were detected and identified, among them hippuric acid, protocatechuic acid and 3-(3-hydroxyphenyl)-3-hydroxypropionic acid. Phenolic acids were the major metabolites recovered in urine, mainly hippuric acid. Furthermore, phase II metabolites had greater excretion between the period of 4-8h and 8-12h (13-27% of total metabolites excreted). No significant difference ($p < 0.05$) was observed in the total of naringenin and hesperitin metabolites excreted in the urine during the 24 h period between the two groups, probably due to interindividual variability in excretion. Thus, no difference was observed on metabolism of flavanones between the eutrophic and obese and no correlation was observed with the anthropometric parameters evaluated.

Key-words: Excretion, flavanones, hesperidin, narirutin, orange juice

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Laranja cv. Pera e cv. Moro.....	18
Figura 2. Estruturas glicosiladas das flavanonas.....	19
Figura 3. Antocianinas majoritária da laranja Moro.....	19
Figura 4. Metabolismo dos polifenóis.....	21
Figura 5. Fluxograma do estudo.....	30
Figura 6. Capacidade antioxidante dos sucos de laranja das variedades Pera e Moro.....	35
Figura 7. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (λ 280 nm), para o suco de laranja cv. Pera.	36
Figura 8. Íon molecular e padrão de fragmentação para os flavonoides não antociânicos encontrados nos sucos de laranjas cv. Pera e Moro.....	37
Figura 9. Espectro de massas MS2 e MS3 de quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo (m/z 609) e o padrão de fragmentação da quercetina.....	38
Figura 10. Espectro de massas MS2 e MS3 de hesperitina-7- <i>O</i> -rutinosídeo (m/z 609) e padrão de fragmentação da hesperitina.....	39
Figura 11. Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS (λ 525 nm), de suco de laranja cv. Moro em modo positivo.....	40
Figura 12. Espectro de massas MS2 obtido por LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da cianidina-3- <i>O</i> -glucosídeo (m/z 449) e cianidina-3- <i>O</i> -(6"-malonil)-glicosídeo (m/z 535) e o padrão de fragmentação.....	41
Figura 13. Concentração de zonulina plasmática de voluntárias eutróficas e obesas.....	44
Figura 14. Conteúdo de LPS plasmático de voluntárias eutróficas e obesas.....	45
Figura 15. Estrutura de metabólitos de fase II. (A) metabólitos de hesperitina (B) metabólitos de naringenina.....	46
Figura 16. Estrutura de ácidos fenólicos formados pela cisão do anel C das flavanonas por bactérias da microbiota intestinal.....	47
Figura 17. Metabolização da cianidina-3- <i>O</i> -glucosídeo pela microbiota intestinal e degradação térmica.....	48
Figura 18. Metabolização da hesperitina e formação de HPPHA.....	49
Figura 19. Perfil de metabólitos totais de naringenina e hesperitina e porcentagem relativa de metabólitos de fase II em urina de 24h após ingestão de suco de laranja cv. Moro e Pera.....	51
Figura 20. Excreção de metabólitos de flavonoides e porcentagem relativa de metabólitos de fase II e de ácidos fenólicos em urina de 24 h após ingestão de suco de laranja cv. Pera.....	52

Figura 21. Excreção de metabólitos de flavonoides e porcentagem relativa de metabólitos de fase II e de ácidos fenólicos em urina de 24 h após ingestão de suco de laranja cv. Moro.....	53
Figura 22. Excreção de metabólitos de fase 2 e de ácidos fenólicos em urina 24 h de voluntárias obesas e eutróficas após ingestão de suco de laranja Pera.....	55
Figura 23. Excreção de metabólitos de fase 2 e de ácidos fenólicos em urina 24 h de voluntárias obesas e eutróficas após ingestão de suco de laranja Moro.....	56
Figura 24. Curva de excreção tempo dependente, ao longo de 24 h, dos metabólitos de fase II da hesperitina (A) e naringenina (B) e ácidos fenólicos (C) ácido hipúrico e (D) HPHPA, após ingestão de suco de laranja cv. Pera.....	57
Figura 25. Curva de excreção tempo dependente, ao longo de 24 h, dos metabólitos de fase II da hesperitina (A) e naringenina (B) e ácidos fenólicos (C) ácido hipúrico, (D) HPHPA e (E) ácido protocatecúico após ingestão de suco de laranja cv. Moro.....	58
Figura 26. Análise de Componentes Principais (ACP), suco de laranja Pera (A) e moro (B).	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química e de fenólicos totais de sucos de laranja pasteurizados, cv. Pera e Moro.....	34
Tabela 2. Espectro de massas de flavonoides de suco de laranja cv. Pera e Moro, obtido por LC-ESI-MS/MS, modo negativo.....	36
Tabela 3. Espectro de massas de antocianinas detectadas em suco de laranja cv. Moro obtido por LC-ESI-MS/MS.....	40
Tabela 4. Conteúdo de flavonoides no suco de laranjas cv. Pera e cv. Moro.....	42
Tabela 5. Parâmetros antropométricos e perfil bioquímico clínico de voluntárias participantes da pesquisa.....	43
Tabela 6. Espectro de massas de metabólitos de flavonoides encontrados na urina após ingestão de suco de laranja cv. Pera e Moro por LC-MS triplo quadrupolo.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromol
AAPH	2,21-azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloro
AG	Ácido Gálico
APC	Ácido Protocatecuico
AUC	<i>Area Under the Curve</i> (Área sob a curva)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjos de Diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ESI	Ionização por Electrospray
HOMA-IR	Modelo de Avaliação da Homeostase – Resistência à Insulina
HPHPA	Ácido 3-(3-Hidroxifenil)-3-hidroxiopropiônico
IMC	Índice de Massa Corporal
LC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometro de Massa com Ionização por Spray Eletrônico
LPH	Lactase Florizina Hidrolase
LPS	Lipopolissacarídeos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH ₃	Amônia
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
°Bx	Grau Brix
ORAC	Capacidade de Absorção dos Radicais Oxigenados
PCA	Ánalise de Componente Principal
pH	Potencial Hidrogeniônico
PTFE	Politetrafluoretileno

RPM	Rotações por Minuto
SGLT-1	Transportador de Glicose Sódio Dependente
SPE	Separação em Fase Sólida
TNF alfa	Fator de Necrose Tumoral
UDP	Uridina 5'-difosfo
v/v	Volume/volume
λ	Lambda
m/z	Relação Massa-Carga do Íon
cv.	Cultivar
RT	Tempo de Retenção
Mg	Miligramas
Nd	Não detectado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Sucos e Laranjas	18
2.2 Metabolismo de flavonoides.....	19
3. JUSTIFICATIVA.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivo geral	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
5. HIPÓTESE.....	24
6. METODOLOGIA.....	25
6.1 Material.....	25
6.2 Metodologia.....	25
6.2.1 Quantificação de sólidos solúveis - Grau Brix (°Brix)	25
6.2.2 Determinação do pH	25
6.2.3 Açúcares totais	25
6.2.4 Determinação de fenólicos totais	25
6.2.5 Ácidos orgânicos.....	26
6.2.6 Capacidade antioxidante	26
6.2.6.1 Oxygen radical assay capacity (ORAC)	26
6.2.6.2 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	27
6.2.7 Identificação e caracterização de flavonoides.....	27

6.2.7.1 Extração e separação em fase sólida (SPE)	27
6.2.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector diodo array (CLAE-DAD)	28
6.2.8 Estudo comparativo da excreção de flavanonas da laranja em indivíduos obesos e eutróficos	29
6.2.8.1 Comitê de Ética e registro de ensaio clínico	29
6.2.8.2 População de estudo.....	29
6.2.8.3 Desenho do estudo	29
6.2.8.4 Análise da permeabilidade intestinal	30
6.2.8.5 Excreção urinária de lactulose e manitol	31
6.2.8.6 Quantificação dos açúcares (lactulose e manitol) na urina.....	31
6.2.8.7 Dosagem do LPS plasmático	31
6.2.8.8 Dosagem de Zonulina plasmática	31
6.2.8.9 Parâmetros bioquímico	31
6.2.9 Excreção de flavanonas em indivíduos obesos e eutróficos	32
6.2.10 Identificação e quantificação de metabólitos da urina.....	32
6.2.11 Análise estatística	33
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
7.1 Teor de sólidos solúveis totais, pH, açúcares totais, fenólicos totais e ácidos orgânicos...34	
7.2 Capacidade Antioxidante.....	35
7.3 Identificação e caracterização de flavonoides dos sucos de laranja	36
7.4 População do estudo	42
7.5 Análise de permeabilidade intestinal	43
7.5.1 Lactulose e Manitol	43
7.5.2 Zonulina plasmática.....	43
7.5.3 LPS plasmático	44
7.6 Identificação e quantificação de metabólitos excretados na urina após ingestão de sucos de laranja	45
7.6.1 Identificação de metabólitos	45

7.6.2 Perfil de metabólitos	50
7.6.3 Curva de excreção tempo dependente	57
7.7 Análise Multivariada.....	59
8. CONCLUSÃO.....	61
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
10. ANEXOS.....	72

1. INTRODUÇÃO

Os sucos de frutas cítricas, como o suco de laranja, possuem compostos bioativos que podem estar relacionadas a benefícios à saúde devido a sua capacidade antioxidante que derivam tanto da vitamina C como das flavanonas, em especial, as majoritárias narirutina e hesperidina (SANCHEZ-MORENO et al, 2003; MARTÍ et al. 2009). Estes compostos podem atuar como agentes antioxidantes, hipolipidêmicos e anti-inflamatórios (MILENKOVIC et al, 2011; PETERSON et al., 2006).

As principais flavanonas, nos *citrus*, estão conjugados a açúcares através de ligações do tipo β , formando estruturas glicosiladas. Ao serem ingeridas, a molécula de açúcar é hidrolisada por β -glicosidases e α -raminosidases da microbiota intestinal, sendo absorvida posteriormente na forma aglicona (NEMETH et al, 2003; DAY et al, 1998; GEE et al, 2000; BOKKENHEUSER et al, 1987).

Além das flavanonas, há outra subclasse de flavonoides presentes nas laranjas, as antocianinas. Estas, podem ser encontradas nas laranjas sanguíneas, que apresentam pigmentação vermelha na polpa. As antocianinas, em alguns casos, diferente das flavanonas diferem em relação a metabolização, que por vezes podem ser detectadas na forma glicosilada na urina, mas são também metabolizadas pela microbiota intestinal. Mas em geral, ambas as classes se apresentam na forma sulfatada e/ou glucuronidada, além de metilada, no caso das antocianidinas (FELGINES et al. 2002; KAY et al. 2005).

Assim, dependendo da composição da microbiota intestinal de diferentes voluntários, além de outros fatores como a permeabilidade intestinal e dieta, é possível ter diferentes níveis de hipersensibilidade e atividade raminosidases bacterianas, podendo gerar diferenças na metabolização e absorção de flavanonas (Vallejo et al., 2010).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sucos e Laranjas

O suco de laranja está entre os principais sabores de sucos consumidos no mundo. É uma bebida que possui nutrientes, como a vitamina C, e compostos bioativos, tais como os flavonoides, entre eles as flavanonas hesperitina e naringenina (NEVES et al, 2010; KAWAII et al, 1999).

As laranjas podem ser classificadas de acordo com a coloração que apresentam na polpa, sejam amarelas ou sanguíneas. As laranjas com polpas amarelas são as variedades mais comercializadas no mundo, dentre elas está a laranja Pera, já a variedade Moro, tem cor característica devido as antocianinas presentes em sua polpa (**Figura 1**) (MOURA et al., 2010; LIANG et al., 2011).



Figura 1. Laranja cv. Pera e cv. Moro

Os principais derivados glicosilados da naringenina e hesperitina encontrados em frutas cítricas estão apresentados na **Figura 2**. Destes, a hesperidina (hesperitina-7-*O*-rutinosídeo) e a narirutina (naringenina-7-*O*-rutinosídeo) são as principais flavanonas encontradas exclusivamente na laranja. Estes, são caracterizadas por dois anéis benzênicos unidos por uma cadeia de três carbonos cíclico e saturado e um átomo de oxigênio na posição C4, e glicosiladas a um dissacarídeo na posição C7 (D'ARCHIVIO et al, 2007).

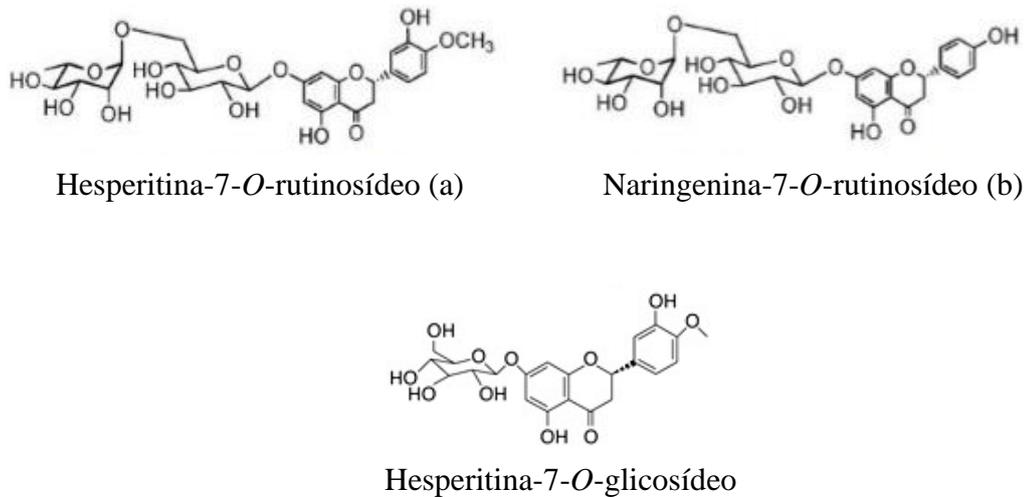


Figura 2. Estruturas glicosiladas das flavanonas. (Fonte: MULLEN et al, 2008)

Na laranja Moro, sua coloração avermelhada a diferencia das laranjas com polpas amarelas, isso devido a presença de antocianinas. As antocianinas majoritárias presentes nessa laranja são a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina 3-(6''-malonil glicosídeo) (DUGO et al. 2003) **Figura 3.**

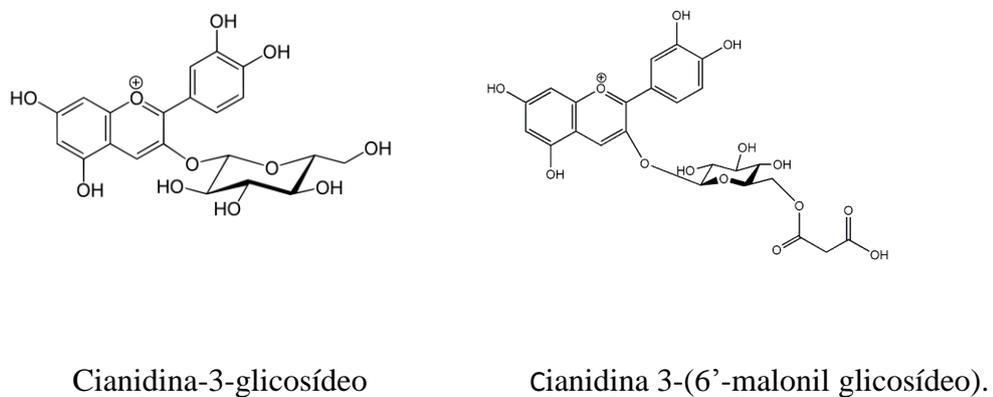


Figura 3. Antocianinas majoritária da laranja Moro

2.2 Metabolismo de flavonoides

O metabolismo, a biodisponibilidade e a atividade biológica dos flavonoides dependem tanto da sua estrutura química como número de grupos hidroxila, configuração e substituição por grupos funcionais quanto da absorção intestinal. Um outro fator que pode influenciar na absorção desses compostos são as diferenças na microbiota intestinal devido a variabilidade intestinal (KUMAR et al., 2013; ERLUND et al, 2000; VALDÉS et al., 2015).

Ao serem ingeridos, os flavonoides são metabolizados por enzimas intestinais e hepáticas e pela microbiota intestinal (KANAZE et al., 2007; SILVEIRA, 2014).

Segundo Dueñas et al. (2015) e Valdés et al. (2015), cerca de 5 a 10% dos polifenóis ingeridos são absorvidos no intestino delgado, enquanto cerca de 90 a 95% chegam ao intestino grosso, onde são degradados pela microbiota intestinal e enfim absorvidos. Os polifenóis nos alimentos, em sua grande maioria estão em sua forma glicosídea, que não são absorvidas pela mucosa intestinal. Para que ocorra a absorção desses compostos, estes precisam ser liberados como aglicona.

A absorção dos glicosídeos no intestino delgado pode ocorrer de duas maneiras. Na primeira, o glicosídeo é hidrolisado pela lactase-florizina hidrolase (LPH), que está presente na borda em escova e concomitantemente, a aglicona pode ser absorvida através do intestino delgado. A segunda forma é o transporte da molécula glicosídica através do transportador de glicose, o SGLT-1 (transportador de glicose sódio dependente) (KUMAR et al., 2013).

Por outro lado, a absorção de rutinosídeos, tais como a hesperidina e narirutina, ocorre no intestino grosso, devido ao intestino delgado não possuir glicosidases capazes de hidrolisar esta ligação, e desta forma são dependentes da microbiota intestinal para sua deglicosilação. Isto explica o pico de concentração plasmática destes dois flavonoides ocorrer por volta de 6 horas (HOLLMAN et al., 1999; HOLLANDS et al., 2008).

As antocianinas podem diferir em relação a metabolização, que por vezes podem ser detectadas intactas na urina. Mas em geral elas podem se apresentar na forma metilada, sulfatada ou glicuronidada (FELGINES et al. 2002; KAY et al., 2005).

No intestino, os polifenóis são transportados dos enterócitos para o fígado através do sistema-portal ligado à albumina ou via linfática (BRAND et al., 2008; SPENCER, et al., 1999; SCALBERT et al., 2000), onde sofrem reações de conjugação como metilação, sulfatação e glicuronidação. Em estudos de biodisponibilidade em humanos, há indicação de que as flavanonas são absorvidas como conjugados glicuronídeo e sulfato.

Após chegar ao fígado os flavonoides então sofrem biotransformação pelas enzimas UDP's glicuronosiltransferases e sulfotransferases (enzimas de conjugação de fase II) ao final, os metabólitos conjugados aos glicuronídeos e sulfoglicuronídeos podem ser excretados pela bile e/ou urina, dependendo do metabólito formado (**Figura 4**) (MATSUMOTO et al., 2004; WILLIAMSON 2002; XIAO et al., 2013; MANACH et al., 2003).

A absorção ocorre tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso. Este fato é reforçado após comparação da excreção na urina de metabólitos de hesperitina, por indivíduos

ileostomizados e saudáveis, na ordem de 3,5% e 11,9 %, respectivamente, do total ingerido de hesperitina-3-*O*-rutinosídeo, o que indica que aproximadamente 70% dos metabólitos de hesperitina são absorvidos no intestino grosso e em menor concentração no intestino delgado (SCALBERT et al. 2000; NIELSEN, et al., 2006; MANACH et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2004; BORGES et al., 2010; BORGES et al., 2013).

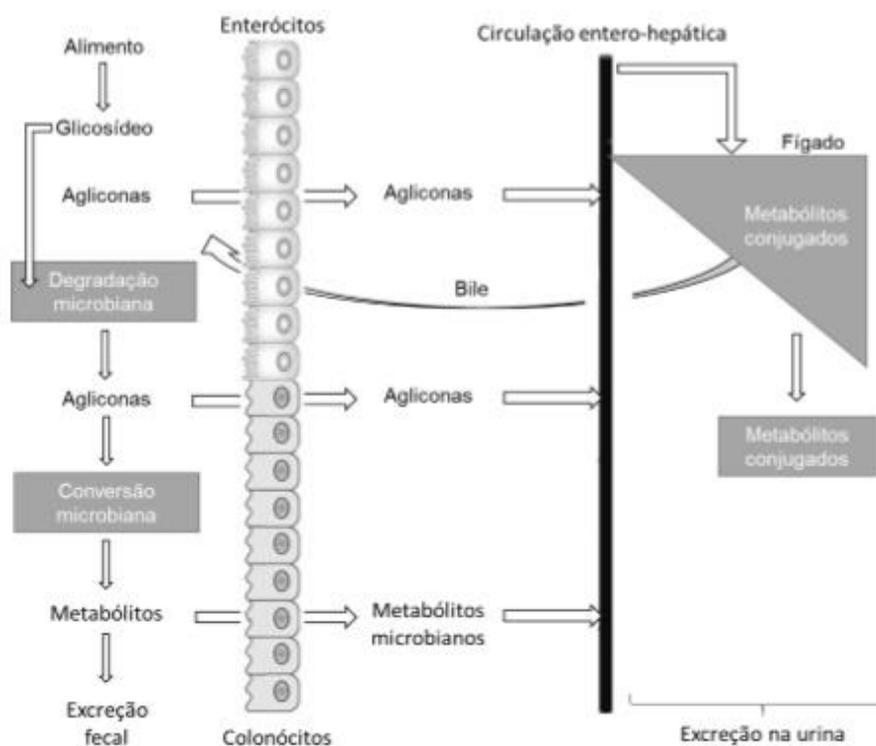


Figura 4. Metabolismo dos polifenóis. (Fonte: Adaptado de Kemperman et al. 2010)

A biodisponibilidade por via oral dos rutinosídeos é baixa, representando aproximadamente 20%. Em estudo realizado por Nielsen et al., (2006), mostrou que a remoção da fração com rutina, após tratamento com a enzima hesperidina, torna a hesperidina mais biodisponível, pois ocorre mudança do sítio de absorção, que antes ocorria no cólon e passa a ser no intestino delgado. Contudo, os resultados podem variar levando em consideração as diferenças genéticas entre os indivíduos (SPENCER et al., 2008).

Griffiths et al., (1972) demonstraram que a microbiota intestinal pode ser importante no processo de hidrólise dos glicosídeos com a liberação de agliconas. Foi observado que a naringenina-7-*O*-neohesperidosídeo e a hesperitina-7-*O*-rutinosídeo quando administradas a ratos *germ-free* se mantinham intactas nas fezes, diferente das baixas concentrações

encontradas em ratos com microbiota normal. As enzimas chave para a hidrólise e absorção de flavanonas são as α -L-ramnosidases, enzimas que são capazes de deglicosilação dos rutinosídeos. Várias estirpes bacterianas presentes no cólon foram apresentadas como produtoras dessas enzimas (BOKKENHEUSER et al., 1987; YADAV et al., 2010). As bactérias do gênero *Bacteroides* JY-6 e *Fusobacterium* K-60 têm demonstrado ser produtoras dessa enzima (JANG et al., 1996; PARK et al., 2005). Assim, uma fonte provável de variação na absorção das flavanonas pode ser a composição da microbiota intestinal, que pode gerar diferentes níveis de alfa-raminosidase e beta-glicosidase, alterando assim o processo de deglicosilação (KANAZE et al., 2007).

Bredsdorff et al. (2010) comparou a biodisponibilidade em humanos de naringina presente na matriz de suco de laranja, e o mesmo suco tratado com α -raminosidase, contendo naringina-7-*O*-glicosídeo, seu produto de hidrólise. Neste caso, a área sob a curva da naringina no plasma do suco tratado com α -raminosidase foi aumentada em 4 vezes e a C_{max} foi 5,4 vezes mais elevada e o T_{max} diminuiu de 311 para 92 min em comparação com o suco sem tratamento, indicando a mudança de local de absorção. Ainda, os metabólitos encontrados na urina aumentaram de 7 para 47% da dose administrada, com o suco tratado. O mesmo aumento na absorção foi observado em uma concentração 3 vezes maior, neste caso só afetou a concentração total, mas não teve qualquer impacto sobre perfil dos conjugados formados após a absorção do cólon.

A maioria das referências sobre as flavanonas identificaram glicuronídeos e sulfatos conjugados circulantes. Em humanos, os locais da *O*-glicuronidação da naringina ocorrem nas posições C7 e C4' e nas posições C7 e C3' na hesperitina (MULLEN et al., 2008; BRETT et al., 2009; BREDSORFF et al., 2010; VALLEJO et al., 2010). Já, a sulfatação da naringina ocorre preferencialmente nas posições C7, C4' e C5 (ZHANG et al., 2004), enquanto que na hesperitina ocorre principalmente na posição C3' (MULLEN et al., 2008; BORGES et al., 2010).

3. JUSTIFICATIVA

A absorção das flavanonas presentes nas laranjas depende inicialmente da ação de enzimas intestinais e da microbiota intestinal, sendo absorvidas nas suas formas livres (KANAZE et al, 2007).

Vallejo et al. (2010) supôs que pode haver diferenças na absorção e excreção de flavonoides devido a fatores como: níveis de hipersensibilidade, atividade de raminosidases bacterianas e em parte a variabilidade interindividual.

Neste caso, uma vez que a absorção dos flavonoides de laranjas depende desses fatores, propõem-se a avaliar a metabolização e excreção de flavonoides na urina de dois grupos distintos, após a ingestão de sucos de laranjas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Comparar o metabolismo e excreção dos flavonoides entre indivíduos eutróficos e obesos após ingestão de sucos de laranjas.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterização dos sucos de laranjas.
- Avaliar a permeabilidade intestinal dos dois grupos de estudo.
- Identificar e quantificar os metabólitos na urina dos voluntários após ingestão dos sucos de laranjas.

5. HIPÓTESE

H0: Não existe diferença significativa entre a metabolismo e a excreção de flavanonas entre indivíduos obesos e eutróficos após ingerir suco de laranja.

H1: Existe diferença significativa entre os objetivos observados.

6. METODOLOGIA

6.1 Material

Suco de laranja, cv. Pera e cv. Moro, pasteurizados foram fornecidos pela FUNDECITRUS, Araraquara-SP, em frascos de 1 litro. Após a pasteurização, os sucos foram congelados em freezer a -20°C.

Os sucos foram centrifugados a 10.000 rpm/15 min/4°C e o sobrenadante utilizado para as análises de caracterização (itens 6.2.1 a 6.2.6).

6.2 Metodologia

6.2.1 Quantificação de sólidos solúveis - Grau Brix (°Brix)

O teor de sólidos solúveis foi avaliado com refratômetro digital portátil (modelo DR 201-95), em triplicata.

6.2.2 Determinação do pH

Foi utilizado pHmetro modelo Metrohm 827 pH Lab Meter Swissmade.

6.2.3 Açúcares totais

Amostras dos sucos foram filtradas em filtros PTFE (Millipore Ltda., Bedford, USA) de 0,45 µm de poro e posteriormente analisados por CLAE acoplado a um detector pulsoamperométrico (Dionex, DX500, Sunnyvale, CA, USA). Foi utilizado uma coluna PA1 (250 x 4 mm, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) e fase móvel constituído de NaOH 18 mM, em modo isocrático, por 25 min. O fluxo através da coluna foi de 1 mL/min. As amostras foram injetadas em duplicata e os açúcares identificados pelo tempo de retenção em comparação a padrões externos Padrões de sacarose, frutose e glicose (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados para a construção de uma curva de calibração com cinco pontos de concentração e aplicados em triplicata (GOMEZ; LAJOLO; CORDENUNSI, 2002). Os resultados foram expressos como g/100 ml de suco.

6.2.4 Determinação de fenólicos totais

Foi utilizado o reagente de Folin-ciocalteau e ácido gálico como padrão (SWAIN, T.; HILLIS, W.E., 1959). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Hewlett Packard, modelo 8453) no comprimento de onda de 765 nm. Os resultados foram expressos como mg AG/100 ml de suco.

6.2.5 Ácidos orgânicos

As amostras foram filtradas em filtros PTFE (Millipore Ltda., Bedford, USA) de 0,45 µm de poro. Em seguida, foram injetadas em sistema cromatográfico equipado com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) (Hewlett-Packard 1100, Agilent), em coluna µBondpack C18 (300mm x 3.6 mm i.d., Waters, Milford, MA), com fase móvel de ácido fosfórico a 0,1%, com fluxo de 0,5 mL/min. O monitoramento foi feito a 210nm. As amostras foram injetadas em triplicatas e os resultados expressos em mg/100 ml de suco. Os ácidos orgânicos foram identificados a partir do tempo de retenção e similaridade do espectro de absorção em comparação aos padrões comerciais. Os padrões dos ácidos málico, succínico, cítrico, ascórbico e tartárico foram utilizados para a construção das curvas de calibração utilizando cinco pontos de concentração e aplicados em triplicata (PASTERNAK, T. et al., 2005).

6.2.6 Capacidade antioxidante

Para a determinação da capacidade antioxidante foi utilizada o método *Oxygen radical assay capacity* (ORAC), segundo Prior et al., 2003, e pelo método do sequestro de radical α,α -difeníl- β -picrilhidrazina (DPPH), proposto por Brand-Williams et al., 1995.

6.2.6.1 Oxygen radical assay capacity (ORAC)

As soluções de fluoresceína 40 nM e 2,2' -azobis 153 mM (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) foram preparados em tampão fosfato 75 mM, pH 7,1. Alíquotas de 25 µL de tampão (branco) ou 25 µL de solução Trolox (curva de calibração) ou 25 µL de amostra, devidamente diluída, foram distribuídas em microplaca de poliestireno de fundo chato com 96 poços seguidas da adição de 150 µL de solução de fluoresceína e incubada a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, a reação foi iniciada pela adição de 25 µL de AAPH. A leitura da intensidade de fluorescência (485 nmex / 525 nmem) foi realizada a cada 1 minuto durante 60 minutos de reação, utilizando-se leitor de microplaca Synergy H1 (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). A capacidade antioxidante foi calculada pela área abaixo da curva de uma amostra subtraindo-se a área correspondente à do branco (solução tampão). Foi utilizando curva de calibração tendo o Trolox como padrão, efetuada a cada ensaio, nas concentrações de 6,25 a 100 µM. Os resultados foram expressos em µmol Trolox equivalente/100 ml de suco.

6.2.6.2 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Para o método DPPH, foi preparada uma solução metanólica de DPPH (0,05 mM) em metanol. A análise foi realizada em microplaca de poliestireno de fundo redondo com 96 poços, no qual cada poço foi preenchido com 200 µL da solução de DPPH, 40 µL de metanol (branco), ou o mesmo volume para a solução de Trolox (curva de calibração), nas concentrações entre 20-70 µM, ou amostras, devidamente diluídos, quando necessário. A leitura de absorbância a 517 nm foi realizada em leitor de microplaca Synergy H1 (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) após 20 minutos de incubação ao abrigo da luz. A capacidade antioxidante foi calculada segundo fórmula abaixo e os resultados foram expressos em µmol Trolox equivalente/ml amostra. Onde, A (Branco) refere-se à absorbância do branco / A (Amostra) refere-se à absorbância da amostra.

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

6.2.7 Identificação e caracterização de flavonoides

6.2.7.1 Extração e separação em fase sólida (SPE)

Amostras dos sucos integral foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi eluído em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology), previamente pré-condicionadas pela passagem de metanol seguido por água deionizada. Após a passagem do extrato, a coluna foi lavada com água deionizada e a eluição dos compostos fenólicos foi realizada com metanol e posteriormente com metanol:NH₃ (99, 5:0,5, v/v). Os eluatos foram completamente secos através de rotaevaporação (Rotavapor, RE 120, Büchi, Flawil, Suíça), sob vácuo, a 40 °C. As amostras de suco de laranja cv. Pera, foram ressuspensos com metanol. Para amostras de suco cv. Moro, as amostras foram ressuspensas com metanol acidificado com ácido acético 5%, a seguir foram filtrados em filtros PTFE (Millipore Ltda., Bedford, USA) de 0,45 µm de poro. Quanto ao precipitado foi adicionado 20 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), sobre agitação, em temperatura ambiente *overnight*. Posteriormente foi filtrado em filtros PTFE (Millipore Ltda., Bedford, USA) de 0,45 µm de poro. A identificação e a quantificação de compostos fenólicos foram realizadas por CLAE-DAD e LC-ESI-MS/MS.

6.2.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector diodo array (CLAE-DAD)

A quantificação de fenólicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em equipamento Agilent 2100 e detector com arranjo de diodo (CLAE/DAD). Para a detecção de flavanonas, foi utilizada a coluna Prodigy 5 μ ODS3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido) com fluxo de 1 mL/min, 25 °C. A eluição foi realizada com gradiente de solventes constituído por A: 0,5% ácido fórmico em água e B: 0,5% ácido fórmico em acetonitrila. O gradiente de concentração dos solventes constituiu em 8% de B no início, 10% em 5 min, 17% em 10 min, 25% em 15 min, 50% em 25 min, de 90% em 30 min, 50% em 32 e 8% em 35 min – o tempo total de corrida foram de 35 minutos. O comprimento de onda para a leitura foi de 280 nm.

Quanto a detecção de antocianinas, foi utilizada a coluna Prodigy 5 μ ODS3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido), com fluxo 0,8 mL/min, 25 °C. A eluição realizada com gradiente de solventes constituídos por A: água/ ácido fórmico/ acetonitrila (96:1:3 v/v/v) e D: água/ ácido fórmico/ acetonitrila (48:1:51 v/v/v). O gradiente de concentração dos solventes constituiu em 10% de D no início, 25% em 10 min, 31% em 15 min, 40% em 20 min, 50% em 30 min, 100% em 40 min, 10% em 45 min e 10% em 50 min – o tempo total de corrida foram de 50 minutos. O comprimento de onda para a leitura foi de 525 nm.

A quantificação foi realizada utilizando curva de calibração com padrões de flavonoides cianidina-3-O-glucosídeo, hesperitina, narirutina e didimina (Extrasynthese, Genay, France) e rutina (Sigma).

LC-ESI-MS/MS

A identificação de compostos fenólicos, foi conduzida em equipamento composto de um espectrômetro de massa tipo *ion trap*, modelo Esquire HCT (Bruker Daltonics, Alemanha), acoplado a um cromatógrafo líquido modelo Prominence (Shimadzu, Japão) e interface de ionização por *electron spray* (ESI). As condições de separação serão foram as mesmas utilizadas para CLAE/DAD. Após a passagem pelo DAD, o fluxo foi alterado para 0,2 mL/min para a passagem no espectrômetro de massa. O ESI foi mantido em modo positivo para antocianinas e modo negativo para os demais flavonoides. O detector de massas foi programado para realizar *full scan* entre m/z 100-1000. A energia de ionização foi de 3000-3500 V. Os compostos foram identificados pela comparação do espectro de massas obtidos e a comparação com o de padrões comerciais e/ou dados de literatura.

6.2.8 Estudo comparativo da excreção de flavanonas da laranja em indivíduos obesos e eutróficos

6.2.8.1 Comitê de Ética e registro de ensaio clínico

A seleção dos voluntários foi realizada por entrevista individual, explicando os objetivos e procedimentos da pesquisa.

A participação do projeto está de acordo com as normas do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de São Paulo, documento – CAAE: 61707116.5.0000.0067 e registrado no sítio de Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) – UTN: U1111-1216-2468.

6.2.8.2 População de estudo

Foram recrutados 20 voluntários com diagnóstico nutricional de eutrofia (IMC= 19,0-24,99 Kg/m²) e 10 com diagnóstico de obesidade (IMC > 30,00), sexo feminino, com idade entre 19 e 40 anos. Para a classificação do percentual de gordura, para os indivíduos eutróficos foi utilizado a porcentagem de gordura corporal entre 9 a 22% e para indivíduos obesos porcentagem de gordura corporal maior ou igual a 32%. As voluntárias não apresentaram nenhum histórico de doença gastrointestinal, hepática ou renal; não eram etilistas, tabagistas, diabéticos ou vegetariano; não apresentaram qualquer tipo de infecção; não estavam fazendo uso de suplementos vitamínicos e minerais, nem de antibióticos, antiácidos ou medicamentos para diarreia ou constipação; não praticavam atividade física intensa; não estavam grávidas ou em período de amamentação ou em terapia hormonal para menopausa.

6.2.8.3 Desenho do estudo

Dentre as 55 voluntárias que responderam ao recrutamento feito na Universidade de São Paulo, somente 30 estavam dentro dos critérios de inclusão. Estas voluntárias foram randomizadas em um estudo clínico *cross-over*, no qual consumiram em dose única 600 mL de cada suco, laranja Pera e laranja Moro (. As voluntárias receberam orientação para que restringissem 3 dias antes de cada suco de laranja, alimentos como maracujá, laranja, tangerina, limão e uva, além de chá e café, e que fosse feito *washout* de uma semana entre as intervenções.

Foi realizado um primeiro encontro para esclarecimento sobre o ensaio clínico, e outro para aferir as medidas antropométricas e para que fosse feita a coleta de sangue e fezes.

Após a ingestão dos sucos, foram coletadas as urinas de 24 horas das voluntárias.

Antes da intervenção com os sucos de laranjas, Pera e Moro, foi realizada a análise de permeabilidade intestinal, onde essas voluntárias ingeriram manitol e lactulose, que foram recuperados na urina depois de 5 horas da ingestão destes açúcares.

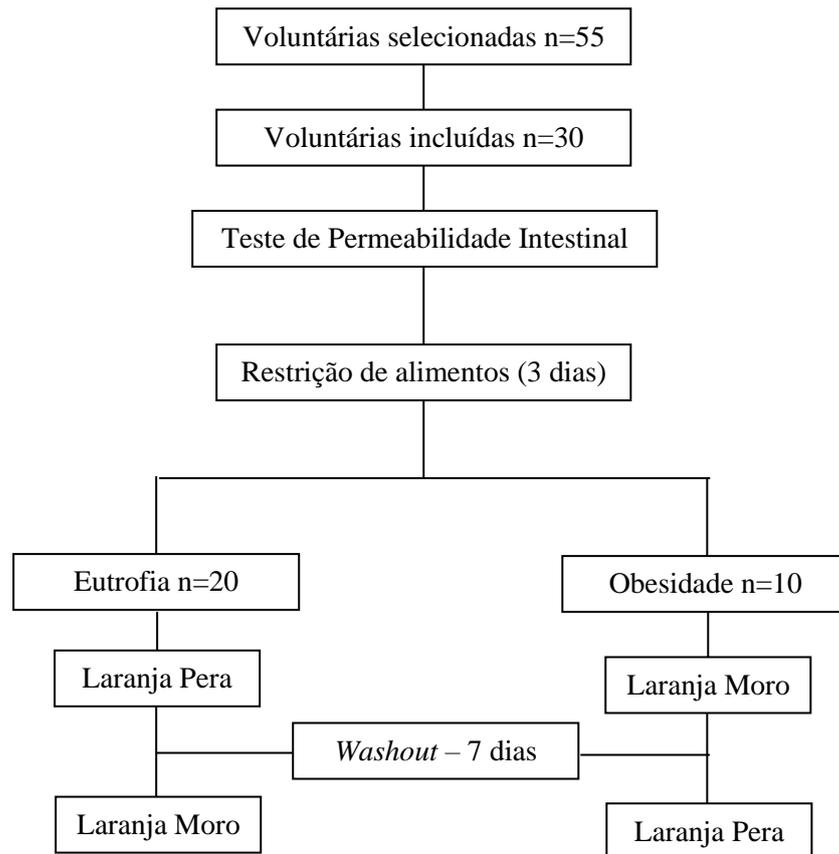


Figura 5. Fluxograma do estudo

6.2.8.4 Análise da permeabilidade intestinal

A análise de permeabilidade permite a avaliação da integridade da mucosa intestinal. Esta foi analisado utilizando três metodologias, excreção urinária de açúcares não metabolizáveis, LPS plasmático e Zonulina plasmática.

6.2.8.5 Excreção urinária de lactulose e manitol

O teste consiste em administrar por via oral de açúcares não metabolizáveis, e posteriormente a coleta de urina-5h, para a mensuração da excreção urinária desses açúcares.

Inicialmente foi solicitada a restrição, três dias antes do ensaio, frutas como maçã, goiaba, pera, uva, ameixa, cereja, damasco, framboesa, amora. No dia do ensaio, as participantes foram avaliadas antropometricamente (peso, altura, circunferência da cintura, % de gordura corporal) e amostras de sangue, urina e fezes foram coletadas para exames bioquímicos. As amostras foram armazenadas em ultra freezer à -80°C até a análise

Foi solicitado às voluntárias eliminarem a urina residual e posteriormente a essa etapa foi feita ingestão de 200 ml de uma solução composta por 3g de manitol e 9,47g de lactulose. Após 1h e 30 min da ingestão da solução, as participantes receberam uma caixinha de água de coco e um pacote unitário de biscoito salgado. Toda urina foi coletada no período de 5h. Ao final, o volume da urina foi mensurado e 80 ml foram armazenados a -20 °C. A fim de impedir o crescimento microbiano 0,015g de Timerosal foi adicionado na amostra.

6.2.8.6 Quantificação dos açúcares (lactulose e manitol) na urina

Foi realizada em CLAE Thermo ICS-5000 + DC, em coluna CarboPac MA1 (4x250 mm) e solvente isocrático de 500 mM de NaOH durante 35 min. A quantificação foi realizada utilizando curva de calibração com os respectivos padrões. Os resultados foram expressos em Razão de lactulose/manitol (L/M).

6.2.8.7 Dosagem do LPS plasmático

Foi utilizado o kit Lonza – Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL – 1000 TM, de acordo com as instruções do fabricante.

6.2.8.8 Dosagem de Zonulina plasmática

Foi utilizado o kit IDK® Zonulin ELISA K 5601, de acordo com as instruções do fabricante.

6.2.8.9 Parâmetros bioquímico

Os exames bioquímicos foram realizados pelo laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário (HU-USP):

- Glicose (Método enzimático - hexoquinase);
- Colesterol total (Método enzimático colorimétrico - colesterol oxidase);
- LDL e VLDL colesterol (obtidas pelo cálculo de Friedewald);
- HDL colesterol (Método enzimático colorimétrico homogêneo sem precipitação);

- Triglicérides (Método enzimático colorimétrico - glicerol fosfato peroxidase segundo Trinder);
- Creatinina (Método colorimétrico – Jaffé);
- Insulina (Eletroquimioluminescência - ECLIA)
- Alanina aminotransferase (ALT ou TGP) (Método enzimático - IFCC sem piridoxal fosfato);
- Aspartato aminotransferase (AST ou TGO) (Método enzimático - IFCC modificado).

6.2.9 Excreção de flavanonas em indivíduos obesos e eutróficos

Os mesmos indivíduos recrutados acima participaram de um segundo encontro, onde três dias antes, foi requisitado que restringissem o consumo de frutas cítricas (laranja, tangerina e limão) e seus derivados (período de *washout*). Após um jejum de 10 horas, as voluntárias ingeriram 600 mL de suco de laranja, em dose única. Foi coletada a urina nos intervalos 0h (anterior à ingestão), e nos intervalos de tempo entre 0-4 h, 4-8 h e 8-12 h e 12-24 h. O volume total de cada período foi mensurado. Durante este período de 24 h foi solicitado à manutenção da restrição de alimentos descritos acima. A urina, no caso do suco de laranja cv. Moro foi acidificada com ácido fórmico a 50%. As urinas foram armazenadas em ultra freezer a -80°C até análise.

6.2.10. Identificação e quantificação de metabólitos da urina

Alíquotas de urina foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 5 minutos à 4°C, filtrados utilizando filtro PVDF 0,22 µm x 13 mm de diâmetro.

A identificação inicial dos metabólitos de fase II e ácidos fenólicos foi realizada em equipamento de CLAE modelo Prominence (Shimadzu, Japão) acoplado ao espectrômetro de massa do tipo *ion trap*, modelo Esquire HCT (Bruker Daltonics, Alemanha), e interface de ionização por *electron spray* (ESI). As condições cromatográficas utilizadas foram coluna Poroshell 120 C18 (100 x 3,0 mm), 2,7µm A(gilent, Palo Alto, CA, USA), com fluxo 0,5 ml/min e temperatura de coluna de 25°C. As fases móveis utilizadas foram A: água/ ácido fórmico (99:1, v/v) e B: acetonitrila. O gradiente de concentração dos solventes para B foram 5% no início, 18% em 7 min, 28% em 17 min, 50% em 17:10 min, 90% em 20 min, 90% em 20:20 min e 5% em 26 min. A corrida foi monitorada a 280 nm e 525 nm. Os metabólitos de fase II foram identificados pela similaridade do espectro de massas comparado a padrão externo dos metabólitos naringenina-7-*O*-glicuronídeo, hesperitina-7-*O*-glicuronídeo e hesperitina-3'-*O*-glicuronídeo, gentilmente doados pelo Dr. Paul Kroon e Paul Needs

(Quadram Institute, UK) e dados de artigos. Os ácidos fenólicos foram também identificados pelo espectro de massas e tempo de retenção de padrões comerciais.

As amostras também foram analisadas por cromatografia líquida acoplado a EVOQ triplo quadrupolo (Bruker Daltonics), para a quantificação de metabólitos. As condições para a identificação dos metabólitos foram *Source Type* HESI, *Spray Voltage* 3500 V, *Cone Temperature* 350°C, *Cone Gas Flow* 20, *Heated Probe Temperature* 350°C, *Probe Gas Flow* 40, *Nebulizer Gas Flow* 50.

Os metabólitos foram identificados pelas seguintes transições: ácido protocatecuico (m/z 153.0) com fragmentação (m/z 108.0); Ácido 3-(3-Hidroxifenil)-3-hidroxiopropiônico (HPPHA) (m/z 181.0) com fragmentação (m/z 119.0); ácido hipúrico (m/z 178.0) com fragmentação (m/z 77.2), hesperitina digluconídeo (m/z 653.0) com fragmentação (m/z 477.0), naringenina diglicuronídeo (m/z 623.0) com fragmentação (m/z 271.0), naringenina sulfoglicuronídeo (m/z 527.0) com fragmentação (m/z 477.0), naringenina-7-glicuronídeo (m/z 446.8) com fragmentação (m/z 112.8) e hesperitina sulfatada (m/z 381.0) com fragmentação (m/z 164.0). A quantificação relativa dos metabólitos foi realizada considerando a área do pico de cada metabólito.

6.2.11 Análises estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, e quando apropriado realizado análise de variância (ANOVA) e teste t. Quando os dados não foram de distribuição normal, foi utilizado o teste de Wilcoxon.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi realizado a caracterização química e perfil de flavonoides dos sucos de laranja pasteurizado, cv. Pera e Moro.

7.1 Teor de sólidos solúveis totais, pH, açúcares totais, fenólicos totais e ácidos orgânicos

O teor de sólidos solúveis totais (TSS), açúcares, fenólicos totais e ácidos orgânicos e pH, foram semelhantes no suco de laranja cv. Pera e cv. Moro (**Tabela 1**).

Tabela 1. Composição química e de fenólicos totais de sucos de laranja pasteurizados, cv. Pera e Moro.

	Laranja Pera	Laranja Moro
TSS (°Brix)	7,2 ± 0,00	6,5 ± 0,00
pH	4,08 ± 0,00	4,14 ± 0,00
Fenólicos Totais*	46,04 ± 0,00	45,75 ± 0,00
Açúcares solúveis**		
Sacarose	2,55 ± 0,03	2,69 ± 0,25
Frutose	1,10 ± 0,02	1,36 ± 0,08
Glicose	0,98 ± 0,02	1,25 ± 0,04
Total	4,63 ± 0,87	5,30 ± 0,80
Ácidos Orgânicos*		
Ácido Cítrico	940,94 ± 0,44	966,24 ± 0,42
Ácido Málico	419,16 ± 0,20	309,71 ± 0,11
Ácido Succínico	102,98 ± 0,00	113,30 ± 0,00
Ácido Tartárico	nd	53,48 ± 0,03
Ácido Ascórbico	28,84 ± 0,01	25,24 ± 0,04

TSS, sólidos solúveis totais; Valores expressos como média ± DP; nd – não detectado; *Concentrações expressas em mg/100 mL; ** concentrações expressas em g/100 mL.

Os sucos de laranjas cv. Pera e cv. Moro avaliados apresentaram TSS de 7,2 e 6,5 °Brix, respectivamente. O conteúdo total de açúcares solúveis foi de 5 e 4,6 % para os cv. Moro e Pera, respectivamente (**Tabela 1**). A sacarose foi o açúcar majoritário, perfazendo aproximadamente 50-55% do total. Os sucos de frutas possuem a mistura de sacarose, glicose e frutose em sua composição que podem variar no conteúdo de glicose e frutose (DEMIATE et al., 2002), como evidenciado para a cultivar Moro (KAFKAS et al., 2009) apresentando conteúdo de sacarose semelhante ao presente estudo, contudo com o dobro de glicose e frutose, podendo assim impactar na doçura do suco.

O principal ácido orgânico encontrado nos cultivares analisados, foi o ácido cítrico, seguido do ácido málico (**Tabela 1**). Os conteúdos encontrados nas duas variedades de suco são semelhantes, exceto pela presença de ácido tartárico no suco de laranja cv. Moro, que pode ser um a característica dessa variedade (RANDHAWA et al., 2014). Os conteúdos de

ácidos orgânicos descritos na literatura nas variedades de laranja são bastante diversos (KAFKAS et al., 2009), mas estão próximos aos encontrados neste trabalho.

A laranja é reconhecida como fonte de ácido ascórbico (SANCHEZ-MORENO et al., 2005), sendo facilmente oxidada. Contudo, não se observou perda significativa durante o processo de pasteurização de suco de laranja, ao contrário, um pequeno aumento na concentração provavelmente devido a maior facilidade de extração (BRASIL et al., 2017). O conteúdo de ácido ascórbico encontrado nesse estudo foi semelhante para os dois cultivares, e também semelhante ao descrito por Silva et al., (2007) para o suco de laranja cv. Pera.

7.2 Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante avaliada pelos métodos ORAC e DPPH estão apresentados na **Figura 6**. Os valores obtidos para o método ORAC e DPPH foram semelhantes nos dois sucos avaliados, sendo superior ao encontrado para os sucos de laranja, cv. Bahia e Cara Cara, analisado anteriormente por nosso grupo (BRASIL et al. 2017).

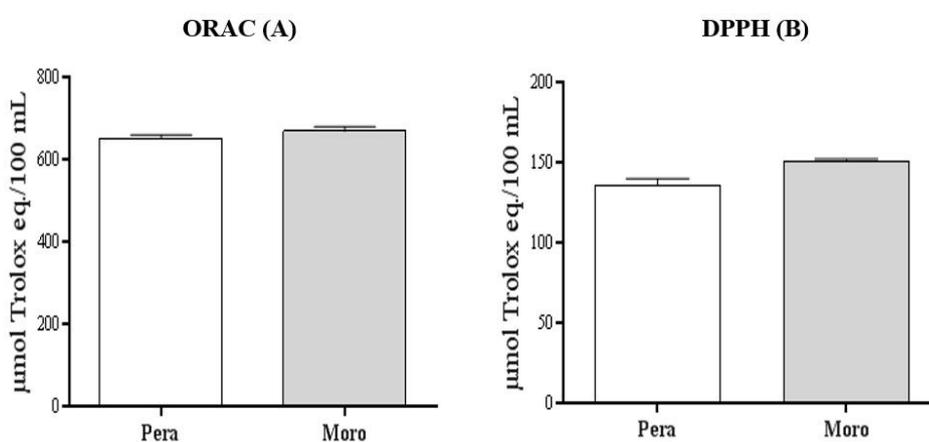


Figura 6. Capacidade antioxidante dos sucos de laranja das variedades Pera e Moro, avaliada pelos métodos ORAC (A) e DPPH (B). Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão.

Os possíveis efeitos benéficos na saúde através do consumo de sucos de frutas cítricas, segundo Pimentel et al. (2005), pode ser atribuído aos compostos capazes de reduzir a reatividade dos radicais livres por sua capacidade redutora. Pode-se destacar, principalmente, o ácido ascórbico e os compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos e flavonoides.

7.3 Identificação e caracterização de flavonoides dos sucos de laranja

Foram identificados seis flavonoides glicosilados não antociânicos comuns às duas variedades (**Tabela 2 e Figura 7**). Ainda, na cv. Moro, foram detectadas 17 antocianinas, responsáveis pela cor vermelha do suco. Os principais flavonoides não antociânicos identificados foram o flavonol quercetina (m/z 301), as flavanonas naringenina (m/z 271), hesperitina (m/z 301) e Isosakuranetina, derivado *O*-metilado da naringenina (m/z 285) e a flavona apigenina *C*-glicosilada (m/z 353) (**Figura 8**). As flavanonas majoritárias identificadas em ambas os cultivares foram a naringenina-7-*O*-rutinosideo (narirutina), pico 3, apresentando íon molecular $[M-H]^-$ a m/z 579 e fragmento MS2 a m/z 271 (**Figura 8**) e a hesperitina-7-*O*-rutinosideo (hesperidina), pico 4, apresentando $[M-H]^-$ a m/z 609 e fragmento MS2 a m/z 301 (**Figura 9**).

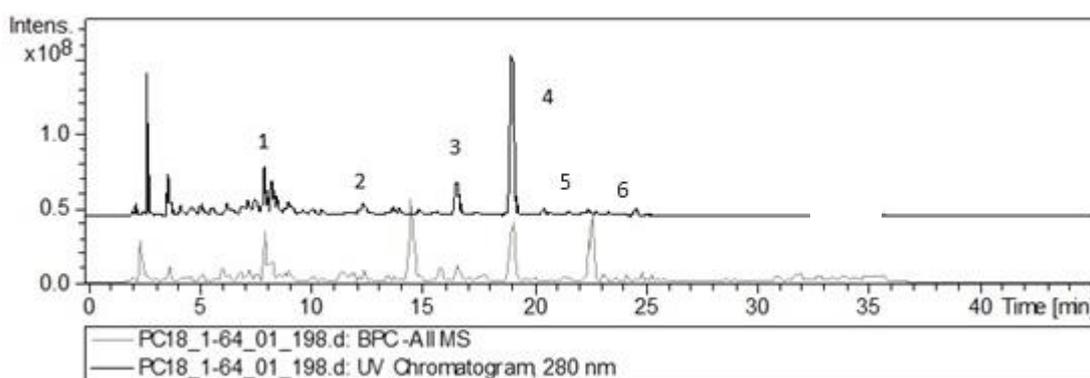


Figura 7. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (λ 280 nm), para o suco de laranja cv. Pera. Identificação dos flavonoides apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Espectro de massas de flavonoides de suco de laranja cv. Pera e Moro, obtido por LC-ESI-MS/MS, modo negativo.

Composto identificado	Pico	TR (min)	$[M - H]^-$ (m/z)	MS/MS (m/z)	Pera	Moro
Apigenina 6,8-di- <i>C</i> -glucosideo (Vicenin-2)*	1	8.1	593	473/353	+	+
Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosideo (Rutina)*	2	12.6	609	563/301	+	+
Naringenina-7- <i>O</i> -rutinosideo (Narirutina)*	3	16.6	579	271	+	+
Hesperitina-7- <i>O</i> -rutinosideo (Hesperidina)*	4	19.0	609	301	+	+
Quercetina-3- <i>O</i> -glucosideo*	5	21.6	463	301	nd	+
Isosakuranetin-7- <i>O</i> -rutinosideo (Didimina)*	6	24.6	593	285	+	+

*Identidade confirmada com padrão externo; TR, tempo de retenção; (+) presente / (nd) não detectada.

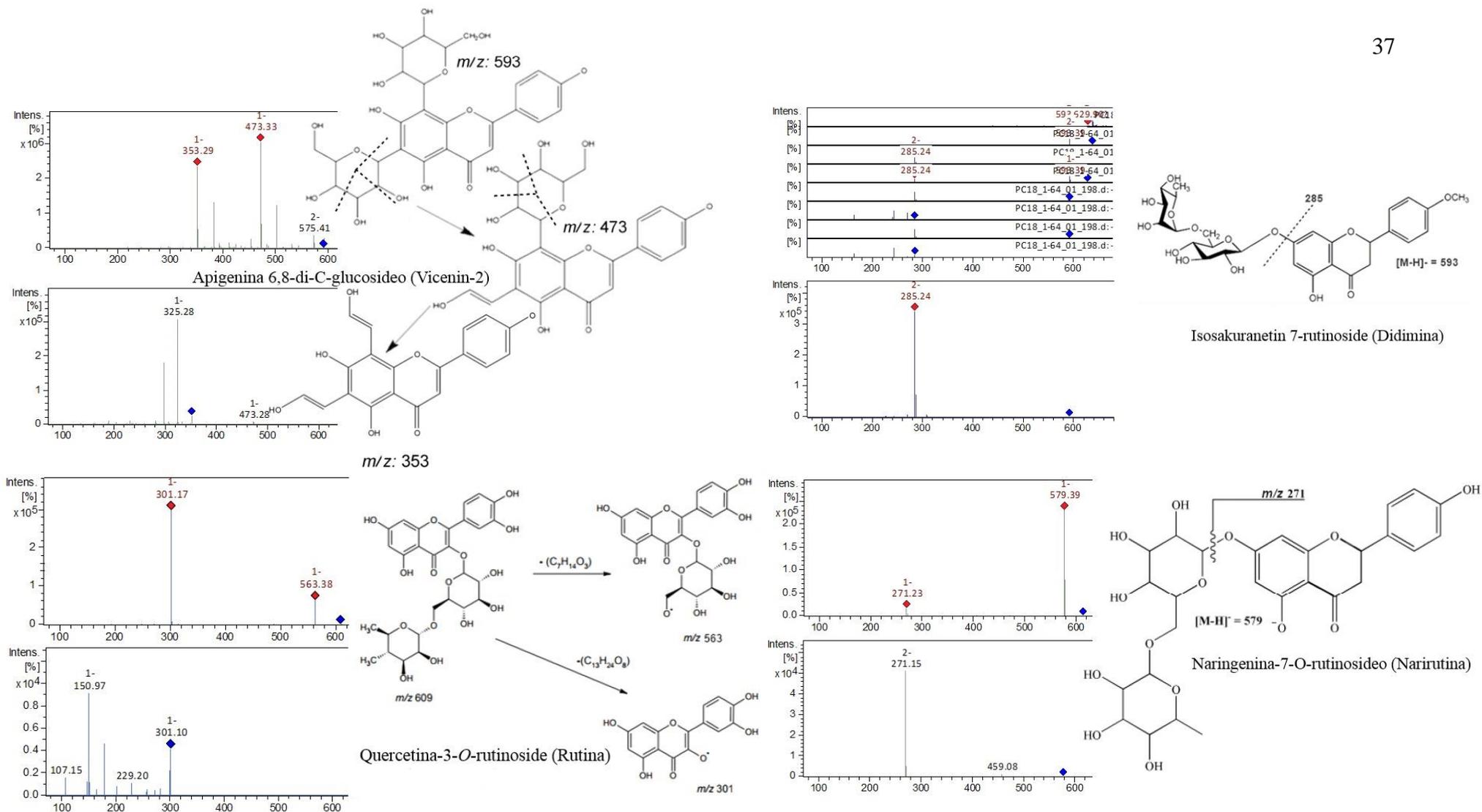


Figura 8. Íon molecular e padrão de fragmentação para os flavonoides não antociânicos encontrados nos sucos de laranjas cv. Pera e Moro.

A hesperitina e a quercetina apresentam o mesmo íon molecular a m/z 301 (**Figura 8 e 9**). Uma forma de diferenciá-los são os fragmentos MS3 os quais são característicos de cada estrutura, além do espectro de absorção. De acordo com Mullen et al., (2003), em modo negativo o fragmento MS2 da quercetina forma fragmentos característicos a m/z 179 e 151 (**Figura 9**). Por outro lado, a hesperitina forma fragmentos característicos a m/z 163 e 136 (**Figura 10**) (MOLINA-CALLE et al., 2015; LÉVÈQUES et al., 2012)

Além destes, também foi identificado a flavona vicenin-2 (pico 1), um C-glicosídeo, apresentando $[M-H]^-$ a m/z 593 e fragmentos MS2 a m/z 473 e a m/z 353 (**Figura 8**).

Todos os flavonoides não antocianicos aqui identificados são característicos de frutas cítricas (NOGOTA et al., 2006; BRASILI et al., 2017).

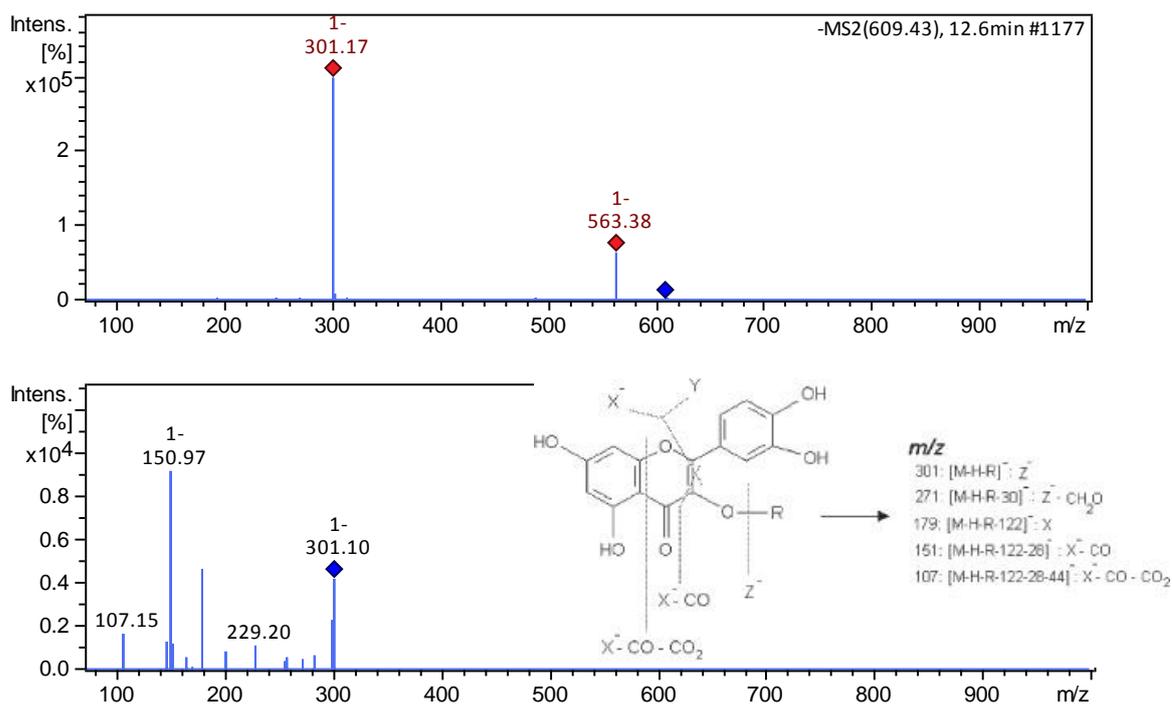


Figura 9. Espectro de massas MS2 e MS3 de quercetina-3-*O*-rutinosídeo (m/z 609) e o padrão de fragmentação da quercetina.

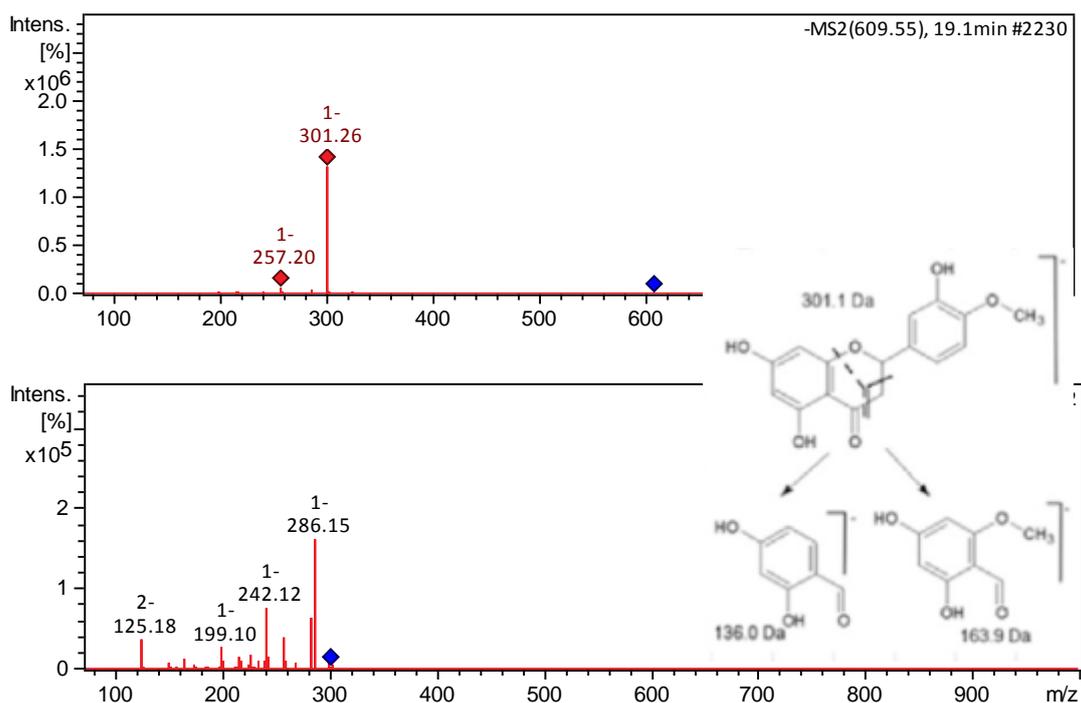


Figura 10. Espectro de massas MS2 e MS3 de hesperitina-7-*O*-rutinosídeo (m/z 609) e padrão de fragmentação da hesperitina.

Além destes flavonoides, o suco da cv Moro apresentou antocianinas em sua composição o que caracteriza a cor vermelha deste fruto. Foram detectadas e tentativamente identificadas 17 antocianinas (**Tabela 3 e Figura 11**), algumas delas aciladas a ácidos fenólicos. Quatro antocianidinas foram identificadas, entre elas a cianidina (m/z 287), delphinidina (m/z 303), petunidina (m/z 317) e a peonidina (m/z 301).

A antocianina majoritária foi identificada como cianidina-3-*O*-glicosídeo (pico 3) apresentando íon molecular $[M]^+$ a m/z 449 e fragmento MS2 a m/z 287, resultante da perda neutra de uma hexose ($[M]^+-162$ u). A segunda antocianina majoritária foi identificada como cianidina-3-*O*-(6"-malonil)-glicosídeo, (pico 6), apresentando $[M]^+$ a m/z 535 e fragmentos MS2 a m/z 449 e m/z 287, resultante da perda de um grupo malonil ($[M]^+-86$ u) e da perda neutra de uma hexose ($[M]^+-162$ u), respectivamente (**Figura 12**). De acordo com Scordino et al., (2015), o perfil das antocianinas são um traço característico das laranjas sanguíneas. Esse perfil pode ser encontrado em um estudo realizado por Maccarone et al., (1998), onde foi relatada a presença do éster malonil da cianidina-3-*O*-glicosídeo ao estudar o suco de laranja Moro. A ocorrência desse éster, raramente é relatada em frutas, mas encontrada em cebolas roxas (FOSSÉN, et al. 1996).

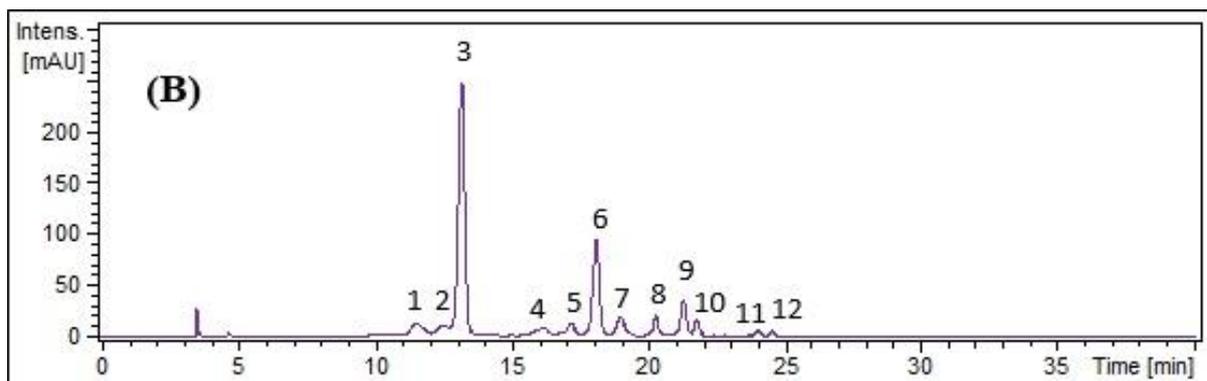


Figura 11. Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS (λ 525 nm), de suco de laranja cv. Moro em modo positivo. Identificação dos flavonoides apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Espectro de massas de antocianinas detectadas em suco de laranja cv. Moro obtido por LC-ESI-MS/MS (modo positivo).

Composto identificado	Pico	TR (min)	λ_{\max} (nm)	$[M]^+$ (m/z)	MS/MS (m/z)
Delfinidina-3-O-glucosídeo*	1	11.6	523	465	303
Cianidina-3-O-galactosídeo	2	12.5		449	287
Cianidina-3-O-glucosídeo*	3	13.3	280/516	449	287
Peonidina-3-O-glucosídeo*	4	15.9		463	301
Petunidina-dihexosídeo-ramnosídeo		16.1		787	641/479/317
Delfinidina-malonyl-glucosídeo		16.2		551	465/303
Cianidina-3-O-(6''-malonyl glucosídeo)		16.2		535	287
Cianidina-3-O-(6''-dioxyalyl) glucosídeo	5	17.3		593	287
Cianidina-3-O-(6''-malonyl glucosídeo)	6	18.1	280/517	535	449/287
Cianidina-3-O-(6''-dioxyalyl glucosídeo)	7	19.1	520	593	287
**nd	8	20.3	520	607	301/287
Cianidina 3-sulfurosídeo		20.4		611	449/303
Derivado de cianidina	9	21.3	520	549	449/287
Derivado de cianidina	10	21.8	520	679	287
Derivado de cianidina				607	287
Derivado de delfinidina	11	24.0		693	465/303
Derivado de cianidina	12	24.6		693	593/287/257

*Identidade confirmada com padrão externo; **nd, não identificado; TR, tempo de retenção

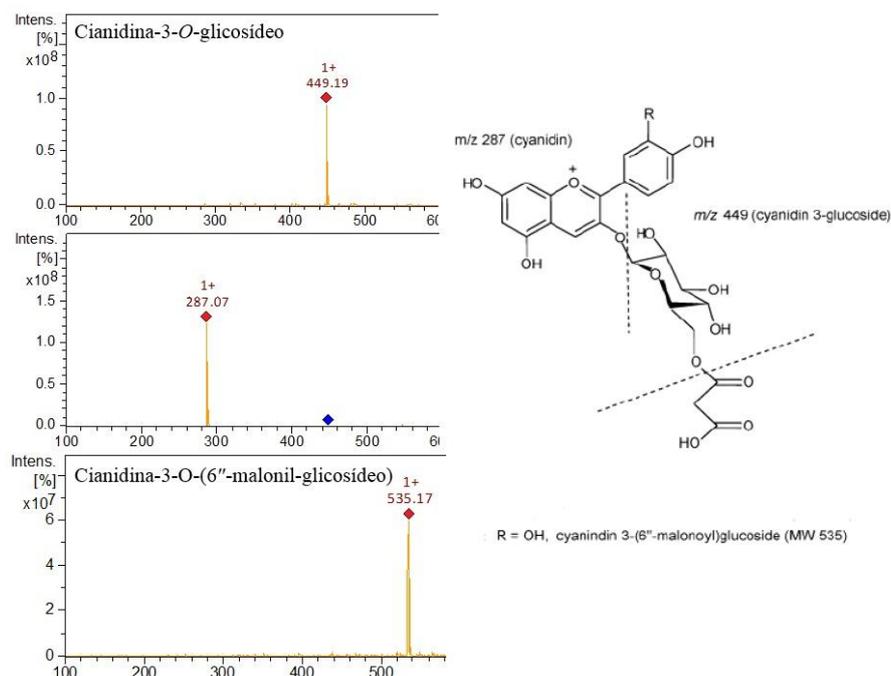


Figura 12. Espectro de massas MS2 obtido por LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da cianidina-3-*O*-glucosídeo (m/z 449) e cianidina-3-*O*-(6''-malonil)-glucosídeo (m/z 535) e o padrão de fragmentação.

O conteúdo total de flavonoides do suco de laranja cv. Pera e Moro foi de 48,49 mg/100 mL e 58,19 mg/100 mL, respectivamente (**Tabela 4**). A hesperidina, flavanona majoritária, contribui com 81% e 62% do total de flavonoides nos cvs. Pera e Moro, respectivamente.

As três flavanonas majoritárias (narirutina, hesperitina e didimina) são encontradas principalmente insolúveis (*pellet*), correspondendo a 84% (40,96 mg/100 mL) e 78% (33,49 mg/100 mL) do total de flavonoides não antocianínicos nos cvs. Pera e Moro, respectivamente. Brasili et al., (2017), encontrou nos sucos de laranja Bahia e Cara Cara, que a narirutina é encontrada majoritariamente na fração solúvel, enquanto que a hesperidina se concentra na fração insolúvel (60-70%). Ainda neste estudo, foi notado que a pasteurização afeta a solubilização das flavanonas, aumentando a insolubilidade da narirutina comparado ao suco não pasteurizado, mas solubilizando a hesperidina. Assim, aparentemente a pasteurização pode influenciar significativamente na biodisponibilidade das flavanonas.

Além das flavanonas, o suco de laranja Moro apresentou antocianinas em sua composição (15,12 mg/100 mL de antocianinas totais), principalmente a cianidina-3-*O*-glucosídeo (80%) e a cianidina-3-*O*-(6''-malonil)-glucosídeo (20%).

Dentre as antocianinas majoritárias, a cianidina-3-*O*-glicosídeo contribui com aproximadamente 21%, enquanto que a cianidina-3-*O*-(6"-malonyl-glicosídeo) com 5%, em relação ao total de flavonoides encontrados no suco de laranja Moro.

Tabela 4. Conteúdo de flavonoides no suco de laranjas cv. Pera e cv. Moro.

Compostos	Pera		Moro	
	Sobrenadante	Pellet	Sobrenadante	Pellet
Narirutina	1,10 ± 0,66	2,79 ± 0,02	2,48 ± 0,28	1,71 ± 0,96
Hesperidina	3,44 ± 2,63	36,09 ± 0,20	5,89 ± 0,62	30,56 ± 13,58
Didimina	0,96 ± 0,42	2,08 ± 0,01	0,68 ± 0,16	1,22 ± 0,69
Naringina	0,43 ± 0,33		0,33 ± 0,01	
Naringenina	0,68 ± 0,20		0,11 ± 0,01	
Hesperitina			0,09 ± 0,02	
Cyn-3- <i>O</i> -glu ^a			12,23 ± 1,76	
Cyn-3- <i>O</i> -(6"-malonyl) glu ^b			2,89 ± 1,14	
Flavanonas totais	6,61	40,96	9,58	33,49
Antocianinas totais				15,12
Flavonoides totais	47,57			58,19

Cyn-3-*O*-glu, cianidina-3-*O*-glucosídeo; Cyn-3-*O*-(6"-malonyl)glu, cianidina-3-*O*-(6"-malonyl)glucosídeo. Valores expressos em mg/100 mL de suco (média ± desvio padrão)

7.4 População do estudo

No total, 55 indivíduos responderam ao recrutamento, contudo somente 30 voluntárias foram incluídas e participaram do estudo, 20 destes apresentaram eutrofia e 10 de obesidade, segundo parâmetros antropométricos (**Tabela 5**). As voluntárias caracterizadas como eutróficas apresentaram perfil bioquímico clínico dentro dos valores de referência, contudo sete voluntárias apresentaram HOMA-IR acima dos valores de referência. Dentre as voluntárias obesas, seis delas apresentaram HOMA-IR acima da referência.

Tabela 5. Parâmetros antropométricos e perfil bioquímico clínico de voluntárias participantes da pesquisa.

Parâmetros	Eutrofia (n=20)	Obesidade (n=10)	Valores de referência
Idade (anos)	27,90 ± 6,76	30,8 ± 9,55	
Peso (kg)	56,80 ± 7,03 ^b	81,82 ± 10,83 ^a	
IMC (kg/m ²)	21,20 ± 1,89 ^b	31,56 ± 2,78 ^a	
% GC	28,00 ± 6,50 ^b	47,00 ± 5,50 ^a	
Creatinina*	0,71 ± 0,10	0,74 ± 0,07	0,50 a 0,90 mg/dL
TGO (U/L)	18,00 ± 13,00	22,00 ± 11,00	Até 32 U/L
TGP (U/L)	19,00 ± 26,00	30,00 ± 36,00	Até 33 U/L
Triglicérides*	92,40 ± 39,80	133,80 ± 53,49	<150 mg/dL
Colesterol total*	176,10 ± 23,21	217,00 ± 56,46	<200 mg/dL
HDL*	68,00 ± 11,00	68,00 ± 31,00	>60 mg/dL
LDL*	90,00 ± 17,00	124,00 ± 54,00	<100 mg/dL
Não HDL*	104,30 ± 30,24	149,50 ± 59,20	<130 mg/dL
Glicose*	86,35 ± 7,51	87,89 ± 6,58	<=99 mg/dL
Insulina (mU/L)	8,00 ± 4,05	12,30 ± 5,49	2 a 23 mU/L
HOMA-IR	1,72 ± 0,94	3,01 ± 1,44	<2,15

IMC: Índice de Massa Corporal; GC: Gordura Corporal; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; HDL: HDL-Colesterol; LDL: LDL-Colesterol; *(mg/dL). Valores expressos em média ± desvio padrão. Teste de Wilcoxon. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

7.5 Análise de permeabilidade intestinal

7.5.1 Lactulose e Manitol

A análise de permeabilidade permite a avaliação da integridade da mucosa intestinal. A razão da excreção lactulose/manitol é considerado um bom marcador de permeabilidade intestinal (FARHADI et al., 2003). A razão lactulose/manitol apresentada pelo grupo de voluntárias eutróficas foi de $0,013 \pm 0,013$, enquanto que para o outro grupo foi de $0,013 \pm 0,02$ ($p=0,678$). Johnston et al. (2000), após realizar o teste com voluntários saudáveis, estabeleceu um limite normal para a razão de excreção de lactulose/manitol de 0,024.

7.5.2 Zonulina plasmática

A zonulina plasmática é considerada um biomarcador de permeabilidade intestinal, e sua função está relacionada à regulação das *tight junctions* dos enterócitos e da permeabilidade intestinal.

Não houve diferença estatística entre as concentrações de zonulina entre os grupos ($p=0,790$). De acordo com Bodil et al. (2017), após análise de amostras de plasma de voluntários saudáveis, foi encontrado a média de 34 ± 14 ng/mL. Os valores obtidos nessa análise foram semelhantes ao encontrado na literatura, e encontram-se em níveis normais.

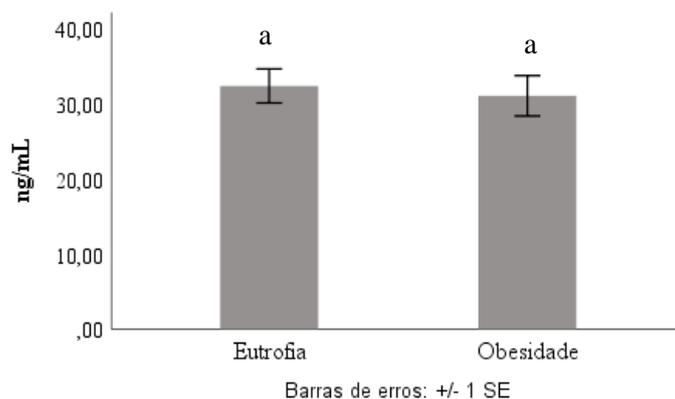


Figura 13. Concentração de zonulina plasmática de voluntárias eutróficas e obesas. Teste de Wilcoxon Letras diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).

7.5.3 LPS plasmático

Os lipopolissacarídeos (LPS) compõe a parede bacteriana de bactérias Gram-negativas e pode estar elevado em indivíduos que consomem dietas hiperlipídicas caracterizando um quadro de endotoxemia (CANI et al., 2007). A dieta hiperlipídica pode afetar a permeabilidade intestinal estimulando a secreção de mediadores inflamatórios, que pode favorecer o deslocamento de LPS para a circulação.

Não se observou diferença significativa ($p=0,221$) no conteúdo de LPS plasmáticos entre os dois grupos (**Figura 14**).

Assim, não se observou diferença significativa na permeabilidade intestinal entre os dois grupos de estudo, considerando os três parâmetros utilizados.

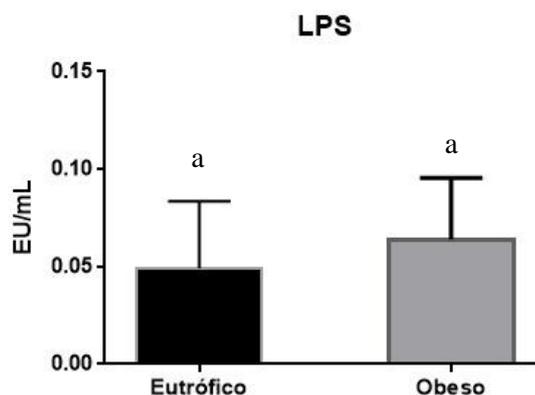


Figura 14. Conteúdo de LPS plasmático de voluntárias eutróficas e obesas. Teste de Wilcoxon. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

7.6 Identificação e quantificação de metabólitos excretados na urina após ingestão de sucos de laranja

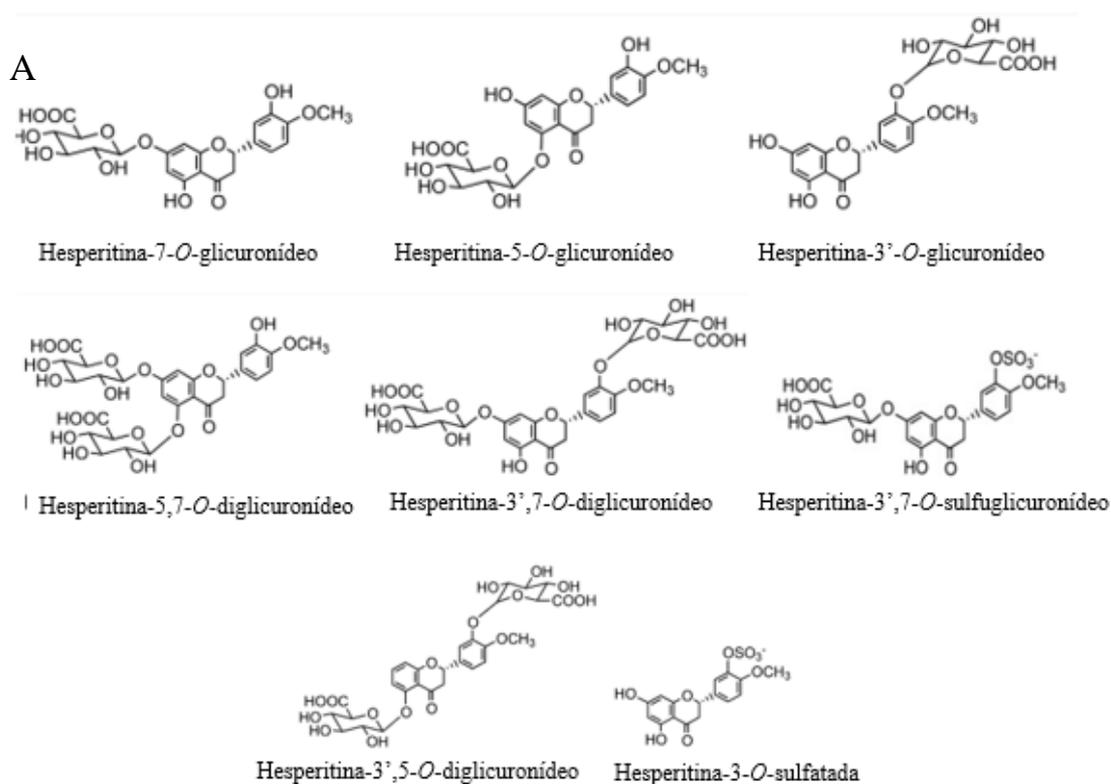
7.6.1 Identificação de metabólitos

Foram identificados 13 metabólitos na urina após a ingestão de 600 mL do suco de laranjas das duas variedades estudadas (**Tabela 6**). Destes, dez são metabólitos de fase 2 da hesperitina (m/z 301) e naringenina (m/z 271) (**Figura 15A e 15B**), entre eles dois isômeros de hesperitina diglicuronídeo (m/z 653), hesperitina sulfuglicuronídeo (m/z 557), hesperitina sulfatada (m/z 381), hesperitina glicuronídeo (m/z 477), dois isômeros de naringenina diglicuronídeo (m/z 623), naringenina sulfuglicuronídeo (m/z 527), naringenina sulfatada (m/z 351) e naringenina-7-glicuronídeo (m/z 446), esta última confirmada com padrão externo. A conjugação da hesperitina e naringenina com o ácido glucurônico e grupamento sulfato podem ocorrer em várias hidroxilas livres do anel A e B das flavanonas (PEREIRA-CARO et al., 2017), formando vários isômeros. Três metabólitos são ácidos fenólicos (**Figura 16**) oriundos da ação da microbiota sobre os flavonoides, entre eles o ácido protocatecuico (m/z 153), ácido 3-(3-hidroxifenil)-3-hidroxipropiônico (HPHPA) (m/z 181) e ácido hipúrico (m/z 178). A forma aglicona da hesperitina e naringenina, bem como os derivados glicosilados da matriz alimentar não foram detectados na urina.

Tabela 6. Espectro de massas de metabólitos de flavonoides encontrados na urina após ingestão de suco de laranja *cv.* Pera e Moro por LC-MS triplo quadrupolo.

Metabólito	Pico	TR (min)	[M] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	Energia Colisão (eV)
Ácido protocatecuico ^b	1	3.93	153.0	108.0	10.0
HPHPA ^{a, b}	2	5.50	181.0	119.0	15.0
Ácido hipúrico ^b	3	6.40	178.0	77.2	10.0
Naringenina diglicuronídeo- Isômero 1	4	6.50	623.0	447/271	15.0
Hesperitina diglicuronídeo- Isômero 1	5	7.96	653.0	477/301	15.0
Naringenina diglicuronídeo-Isômero 2	6	8.50	623.0	447/271	15.0
Naringenina sulfuglicuronídeo	7	8.80	527.0	271.0	15.0
Hesperitina diglicuronídeo-Isômero 2	8	10.41	653.0	477/301	15.0
Hesperitina sulfuglicuronídeo	9	10.60	557.0	301	15.0
Naringenina-7-glicuronídeo ^b	10	13.15	446.8	271	10.0
Naringenina sulfatada	11	14.50	351.0	271	15.0
Hesperitina glicuronídeo	12	14.75	476.9	301/113	15.0
Hesperitina sulfatada	13	16.20	381.0	301/164	15.0

^aÁcido 3-(3-Hidroxifenil)-3-hidroxiopropiônico, ^bidentidade confirmado com padrão externo



B

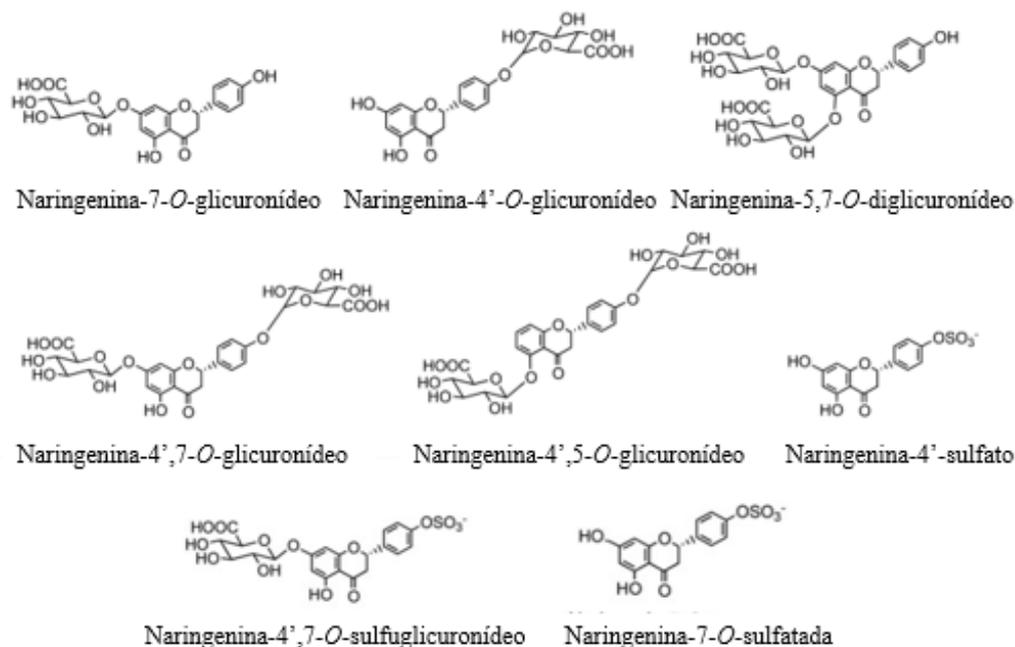


Figura 15. Estrutura de metabólitos de fase II. (A) metabólitos de hesperitina (B) metabólitos de naringenina. Adaptado de Pereira-Caro et al., 2017

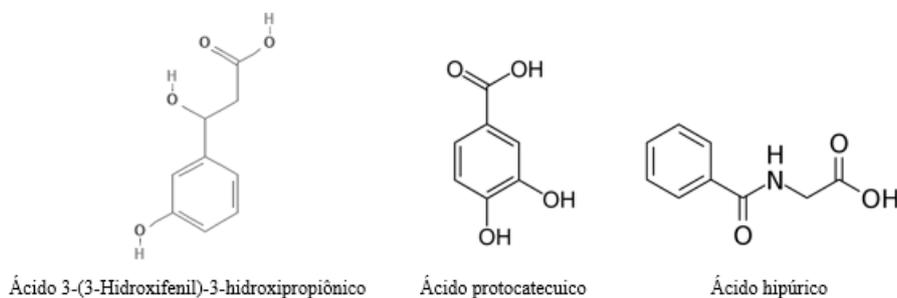


Figura 16. Estrutura de ácidos fenólicos formados pela cisão do anel C das flavanonas por bactérias da microbiota intestinal

Em geral, a absorção de flavonoides glicosídeos, tais como a quercetina-3-*O*-glicosídeo ou hesperidina-7-*O*-glicosídeo, ocorre no intestino delgado, após a hidrólise pela β -glicosidase citosólica ou pela lactase floridzina hidrolase presente na borda em escova do epitélio. Contudo, a absorção dos flavonoides rutinosídeos, tais como a narirutina, hesperidina e quercetina-3-*O*-rutinosídeo, ocorre no intestino grosso uma vez que as β -glicosidases endógenas apresentam especificidade somente para flavonoides glicosídeos mas não flavonoides rutinosídeos (CROZIER et al., 2009). Assim, as

principais flavanonas de citrus, narirutina e hesperidina, alcançam o cólon onde são expostos a α -ramnosidases das bactérias residentes onde são absorvidas na forma aglicona. As cepas identificadas por apresentarem atividade α -ramnosidases e envolvidas na deglicosilação de flavonoides são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* e *Bifidobacterium dentium* (AVILA et al., 2009; BRAUNE e BLAUT, 2016). As flavanonas são então conjugadas ao ácido glicurônico e/ou grupamento sulfato pela ação das enzimas de fase 2, a UDP-glucuronosil transferase e sulfotransferase (C3', C4', C5 ou C7), respectivamente, nos enterócitos e alcançam a circulação pela veia porta e então podem sofrer nova metabolização no fígado (CROZIER, et al., 2009; DEL RIO et al., 2013).

Ainda no cólon, as agliconas resultantes são extensivamente metabolizadas por outras bactérias da microbiota, com a cisão do anel C levando a produção de diversos ácidos hidroxifenilacético, derivados do anel A ou anel B (ESPIN et al., 2007). Em flavanonas, a cisão no anel C ocorre entre o C1 e C2 ou entre C4 e C10, observadas pela bactéria *E. ramulus* e as espécies *Clostridium* (MARIN et al., 2015).

Doze dos metabólitos encontrados, com exceção do ácido protocatecuico (APC), eram esperados para serem encontrados na urina das voluntárias que consumiram o suco de laranja Pera. Contudo, o APC foi detectado na urina de 10 voluntárias que consumiram o suco de laranja Pera antes do ensaio (tempo zero) e durante 24h após ingestão, e pode ser decorrente de um *washout* insuficiente. O APC é ácido fenólico resultante da metabolização da antocianidina cianidina pela microbiota intestinal (**Figura 17**) (CZANK et al, 2013), entretanto pode também ser decorrente da metabolização de outros flavonoides como o flavonol quercetina (MARIN et al., 2015).

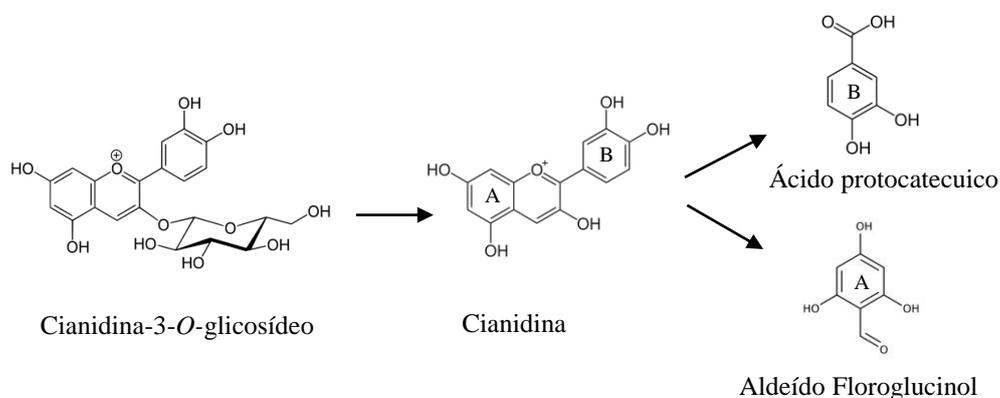


Figura 17. Metabolização da cianidina-3-O-glicosídeo pela microbiota intestinal e degradação térmica.

O ácido 3-(3-Hidroxifenil)-3-hidroxi propiônico (HPHPA), é derivado do metabolismo microbiano da hesperitina (**Figura 18**), podendo ser um biomarcador para consumo de suco de laranja. Por outro lado, o ácido hipúrico pode ser encontrado na urina após acilação do ácido benzoico com a glicina, e sugerido como biomarcador de consumo de frutas e vegetais, entretanto não é específica para flavanonas de *Citrus*, uma vez que podem ser oriundos da metabolização pela microbiota intestinal de diversos flavonoides como a flavanona hesperitina e o flavonol quercetina (RECHNER et al. 2002, PEREIRA-CARO, 2014 e 2015).

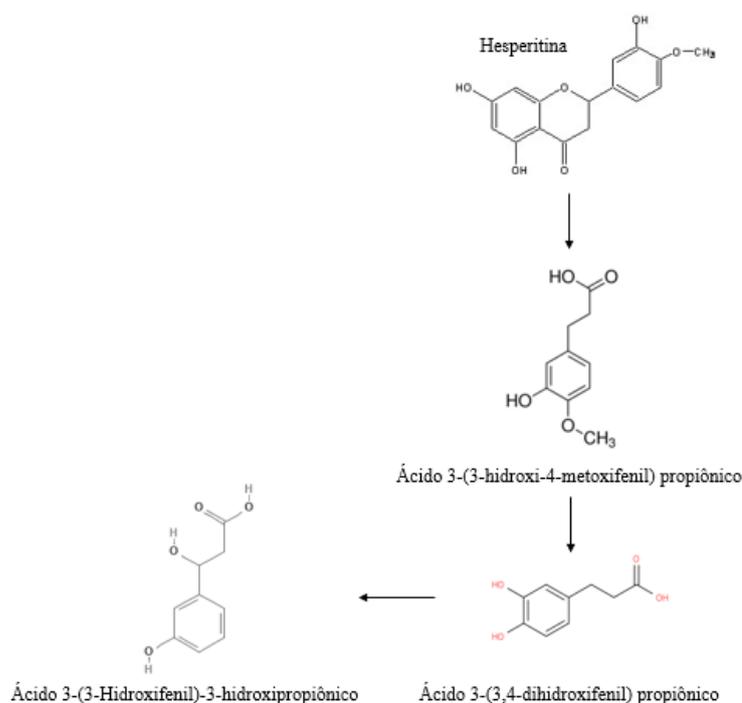


Figura 18. Metabolização da hesperitina e formação de HPHPA. Adaptado de Pereira-Caro et al. 2015.

Os conjugados glicuronidados e sulfatados de flavanonas encontrados neste trabalho também foram encontrados em outros trabalhos após consumo de suco de laranja ou a laranja. Contudo, outros ácidos fenólicos também foram encontrados além dos detectados no presente estudo, entre eles o ácido 3-(3'-hidroxifenil)hidracrilico, ácido 3-(3'-hidroxifenil)propionico, ácido 3-(3'-hidroxifenil)hidracrilico, ácido 3-(3'-metoxi-4'-hidroxifenil)propionico e o ácido 4-hidroxihipurico (ASCHOFF et al, 2016; PEREIRA-CARO et al., 2014).

7.6.2 Perfil de metabólitos

Não foi observado diferença significativa ($p < 0,05$) no total de metabólitos de naringenina e hesperitina excretados na urina durante o período de 24 h entre os dois grupos, obeso e eutróficos, para os dois sucos de laranja (**Figura 19**). Os metabólitos de fase II da hesperitina são majoritários, representando 90 a 95% do total, seguido pelos metabólitos de naringenina, o que é esperado uma vez que a hesperitina é a flavanona majoritária dos sucos.

O perfil de conjugação das duas flavanonas indica uma preferência para a conjugação com grupos sulfatos para a hesperitina, perfazendo 76 a 84% de metabólitos sulfatados, majoritariamente hesperitina sulfoglucuronídeo, enquanto que a naringenina é preferencialmente glucuronidada e quase não sofre sulfatação (**Figura 19**). O metabólito de naringenina majoritária foi a naringenina diglucuronídeo e naringenina glucuronídeo.

Considerando o total de metabólitos, os ácidos fenólicos formados pela ação da microbiota intestinal são majoritários (77 a 98%) quando comparado aos metabólitos de fase II, em ambos os grupos e sucos de laranja, principalmente o ácido hipúrico. A porcentagem relativa de excreção entre os metabólitos difere principalmente entre os períodos entre 4-8h e 8-12h, onde observa-se um aumento de excreção de metabólitos de hesperitina e naringenina (13 a 27%), com menor abundância entre 12-24h (**Figura 20 e 21**).

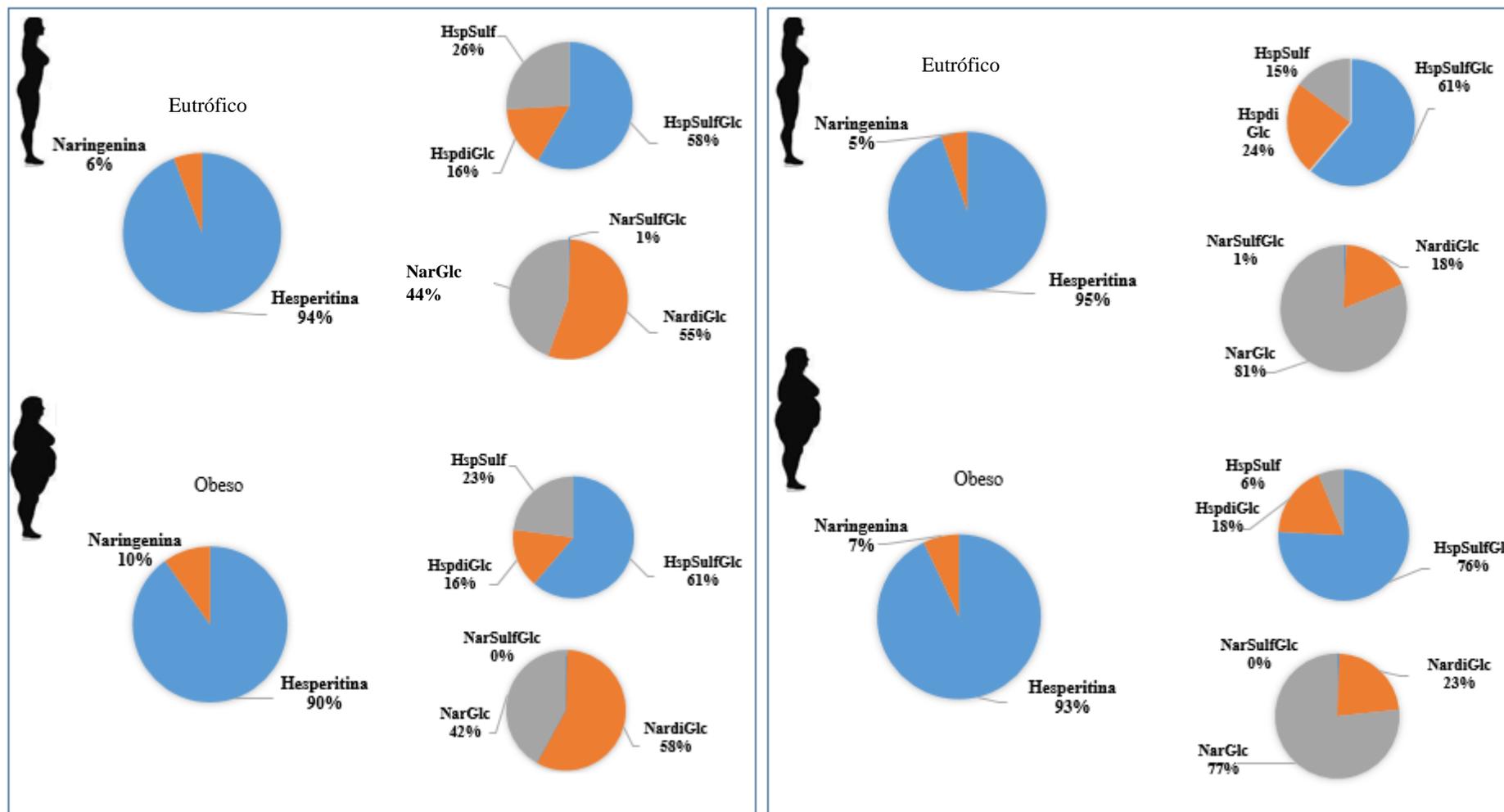


Figura 19. Perfil de metabólitos totais de naringenina e hesperitina e porcentagem relativa de metabólitos de fase II em urina de 24h após ingestão de suco de laranja cv. Pera e Moro. (A) Eutrofico (n=20); (B) Obeso (n=10). Hsp: Hesperitina; Nar: Naringenina; Glc: glicuronídeos; Sulf: Sulfato; SulfGlc: Sulfoglicuronídeo; diGlc: Diglicuronídeo

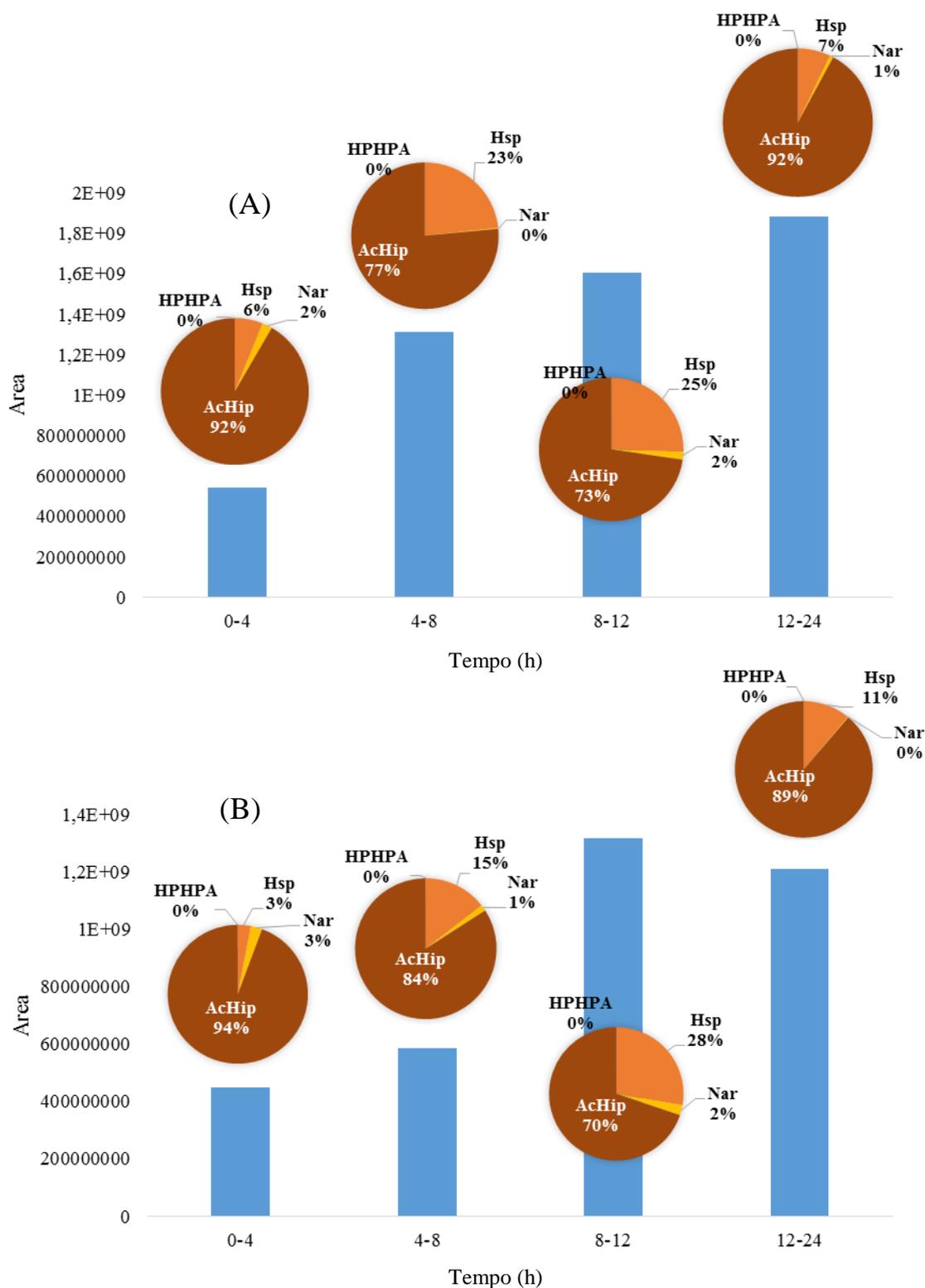


Figura 20. Excreção de metabólitos de flavonoides e porcentagem relativa de metabólitos de fase II e de ácidos fenólicos em urina de 24 h após ingestão de suco de laranja cv. Pera. (A) Eutrófico (n=20); (B) Obeso (n=10)

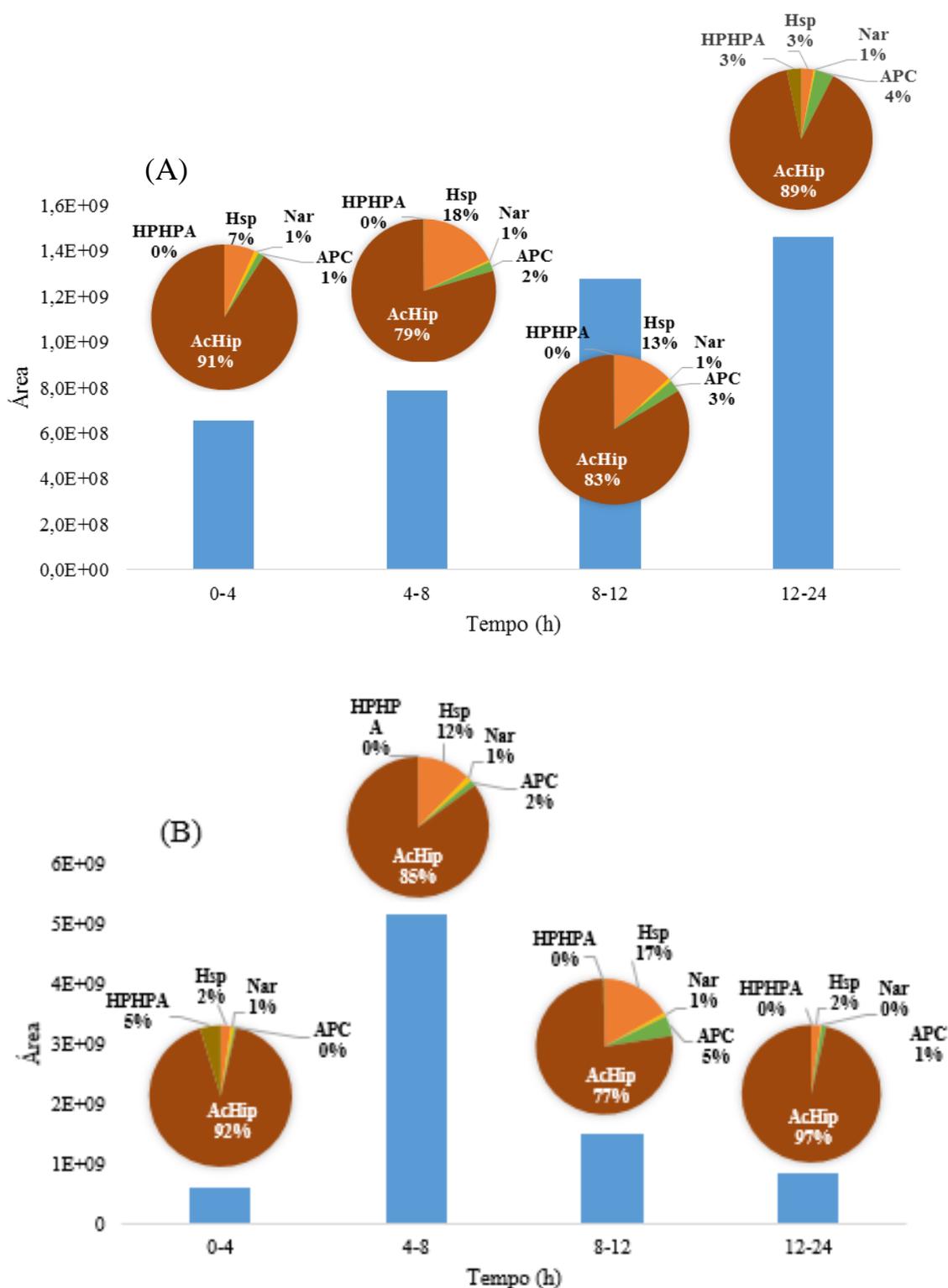


Figura 21. Excreção de metabólitos de flavonoides e porcentagem relativa de metabólitos de fase II e de ácidos fenólicos em urina de 24 h após ingestão de suco de laranja cv. Moro. (A) Eutrófico n=20); (B) Obeso (n)=10.

Observa-se uma grande variabilidade interindividual de excreção dos metabólitos de fase 2 e os ácidos fenólicos mesmo dentro do mesmo grupo de estudo, no período de 24 h após ingestão de ambos os sucos (**Figura 22 e 23**).

Diversos fatores podem contribuir para a grande variabilidade interindividual, entre eles a matriz alimentar, glicosilação, a composição da microbiota intestinal, permeabilidade intestinal, estado metabólico e parâmetros antropométricos.

Voluntários saudáveis foram estratificados em alto, médio e baixo excretadores de metabólitos de flavanonas após a ingestão de suco de laranja. Neste caso, a redução no tamanho de partícula pelo processo de alta pressão parece influenciar positivamente a absorção/excreção destes metabólitos, principalmente nos voluntários com alta excreção, quando comparado aos sucos pasteurizados ou natural (TOMÁS-NAVARRO et al., 2014).

Por outro lado, não foi observado diferença entre a excreção de metabólitos de flavanonas quando administrados na forma de suco de laranja ou fruta. Contudo, a grande variação na excreção foi inversamente relacionada com a idade dos voluntários, mas não relacionados com parâmetros antropométricos como sexo e índice de massa corpórea (BRETT et al, 2009).

A absorção da forma aglicona da hesperitina e naringenina reduz o $T_{máx}$ plasmático para 3,5 a 4h (KANAZE et al, 2007), quando comparado a forma glicuramnosídeo de 6 a 8h (BRETT et al., 2009), uma vez que não necessita da ação da microbiota, ocorrendo na porção do intestino delgado. Neste caso, a naringenina apresentou absorção superior à hesperitina (maior que 2 vezes), provavelmente devido a menor polaridade da naringenina o que facilita o transporte passivo.

Vallejo et al. (2010) supõe que pode haver diferenças na absorção e excreção de flavonoides devido a fatores como: níveis de hipersensibilidade, atividade raminosidases da microbiota e em parte a variabilidade interindividual. Os resultados apresentados neste estudo mostraram que há diferentes níveis de excreção por parte dos voluntários, que podem ser classificados como voluntários que excretam altos níveis de flavanonas e os que secretam baixos níveis. Entretanto, a grande variabilidade na excreção de flavonoides não foi correlacionada com parâmetros antropométricos ou mesmo permeabilidade intestinal.

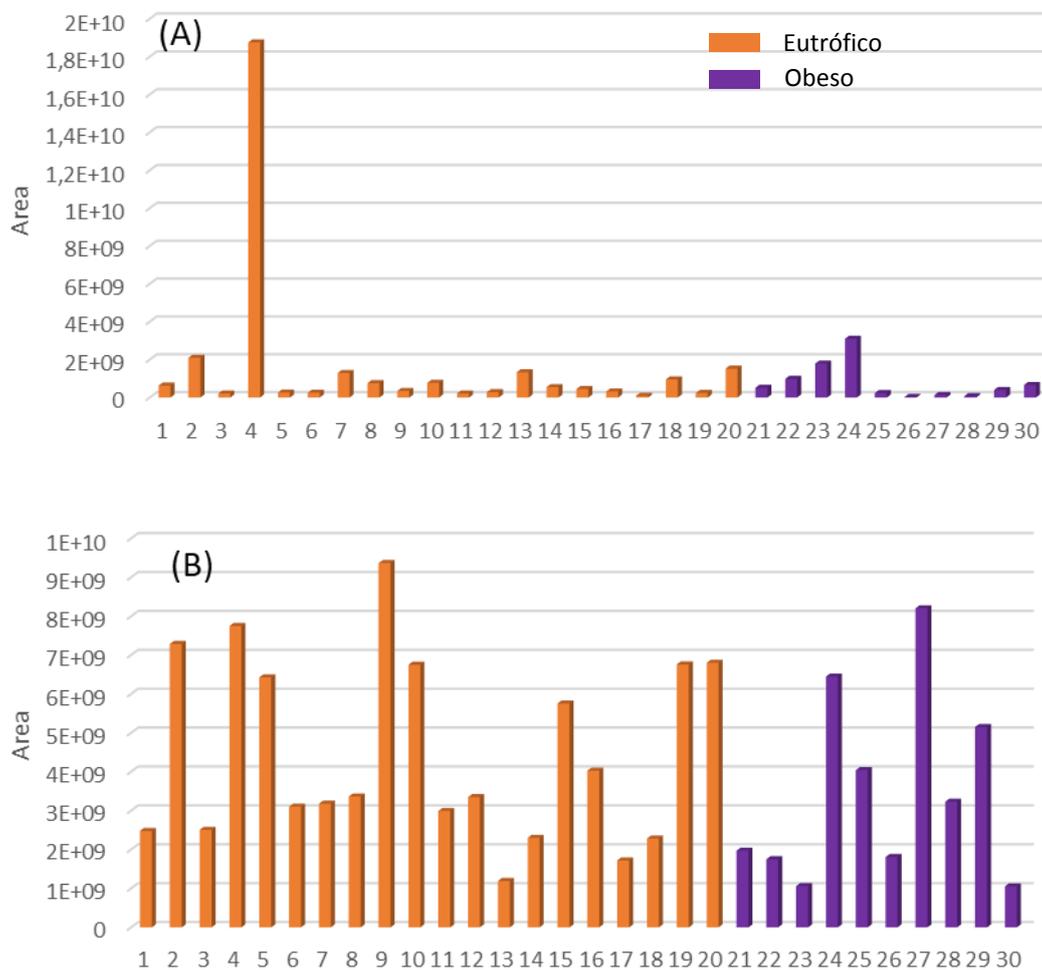


Figura 22. Excreção de metabólitos de fase 2 e de ácidos fenólicos em urina 24 h de voluntárias obesas e eutróficas após ingestão de suco de laranja Pera. Colunas em laranja- eutróficos (n=20) e roxo-obesos (n=10). (A) metabólitos de flavanonas de fase 2; (B) ácidos fenólicos totais.

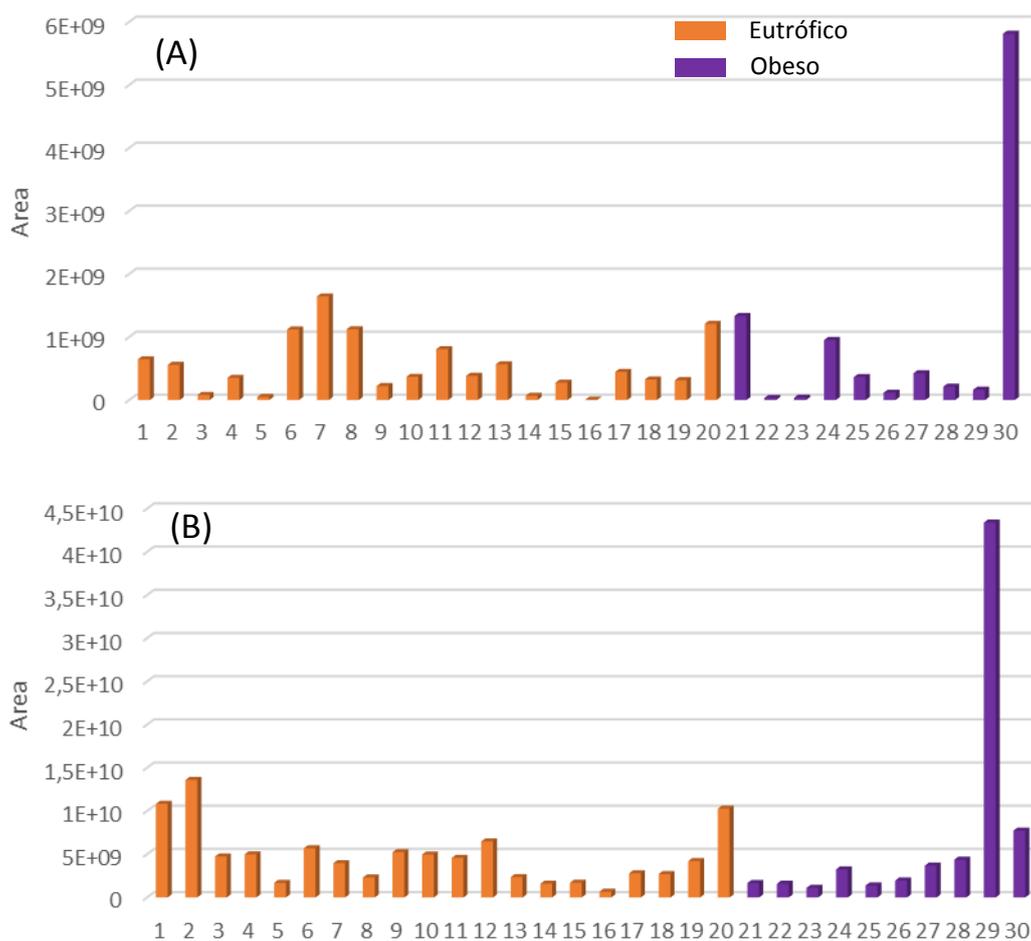


Figura 23. Excreção de metabólitos de fase 2 e de ácidos fenólicos em urina 24 h de voluntárias obesas e eutróficas após ingestão de suco de laranja Moro. Colunas em laranja- eutróficos (n=20) e roxo-obesos (n=10). (A) metabólitos de flavanonas de fase 2; (B) ácidos fenólicos totais.

7.6.3 Curva de excreção tempo dependente

A curva de excreção de metabólitos de flavanonas entre os dois grupos, apesar de apresentarem perfil diferente, não apresentou diferença significativa (**Figura 24 e 25**).

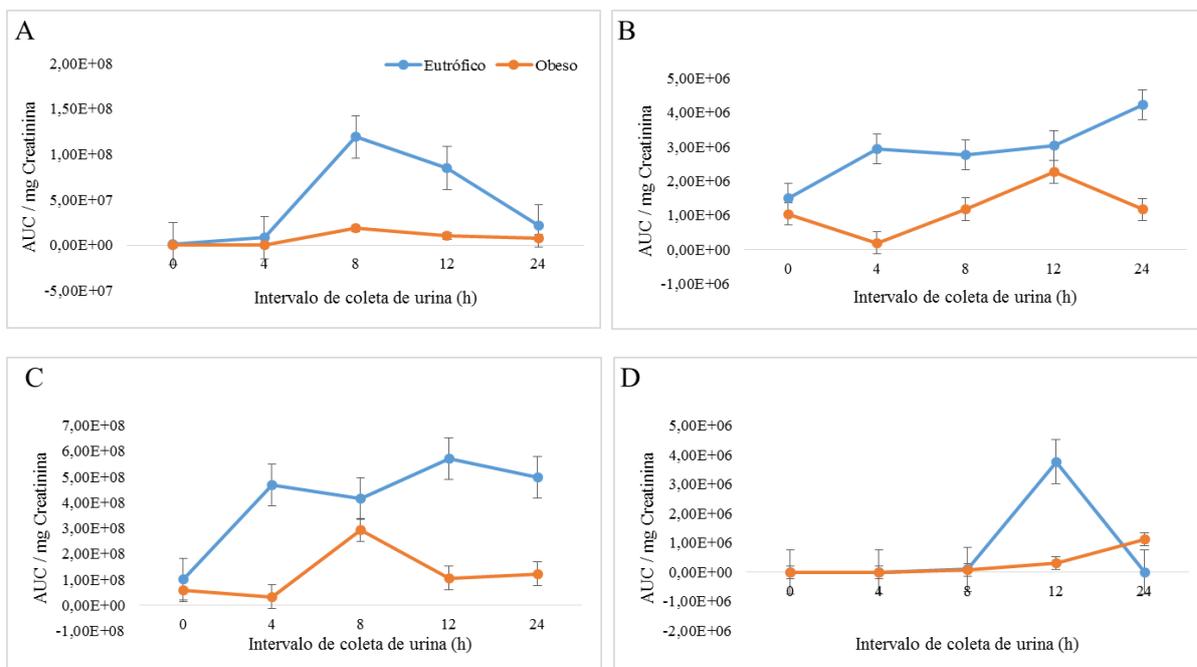


Figura 24. Curva de excreção tempo dependente, ao longo de 24 h, dos metabólitos de fase II da hesperitina (A) e naringenina (B) e ácidos fenólicos (C) ácido hipúrico e (D) HPHPA, após ingestão de suco de laranja cv. Pera. Dados normalizados com creatinina. Média \pm Erro padrão.

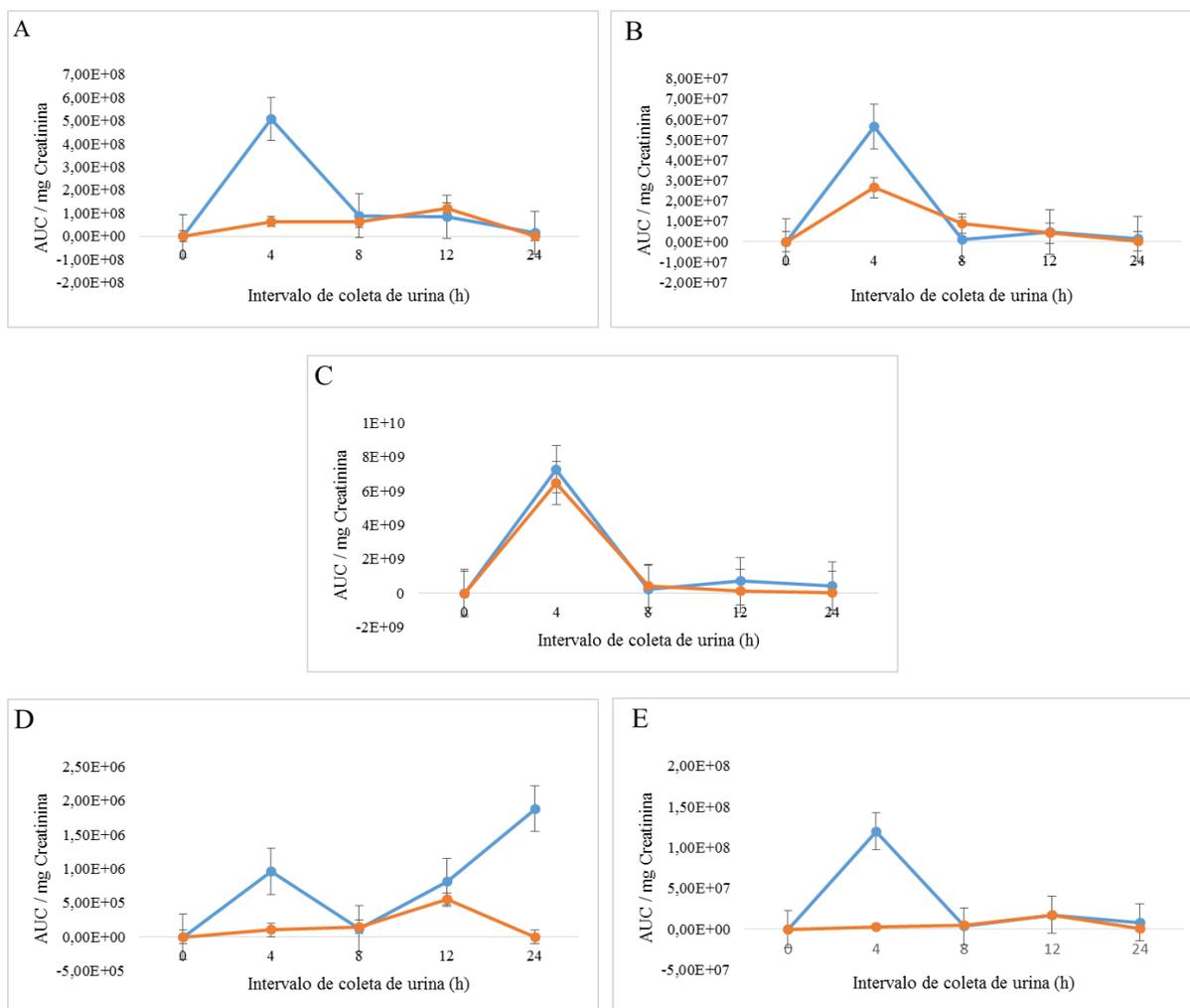


Figura 25. Curva de excreção tempo dependente, ao longo de 24 h, dos metabólitos de fase II da hesperitina (A) e naringenina (B) e ácidos fenólicos (C) ácido hipúrico, (D) HPHPA e (E) ácido protocatecuico após ingestão de suco de laranja cv. Moro. Dados normalizados com creatinina. Média \pm Erro padrão.

Em relação aos metabólitos do suco de laranja Pera, o perfil de excreção dos metabolitos de fase II é diferente entre os grupos, onde a naringenina apresenta uma excreção constante e crescente durante o período de 24 horas, enquanto que a hesperitina apresenta um pico de excreção entre 4 e 12 horas.

Da mesma maneira o ácido hipúrico, apresenta uma excreção constante e crescente durante 24 horas. Entretanto não se observa diferença no perfil de excreção entre obesos e eutróficos, observado pela AUC ($p < 0,05$) (dados não apresentados). Com

exceção para o HPHPA, que apresenta um pico de excreção no grupo eutrófico no período de 8 a 12 horas. Mas ainda não apresenta diferença significativa entre os dois grupos.

O perfil de excreção no suco Moro, apresentou pico de excreção 0 a 4 horas para fase II, diferente do suco de laranja Pera. O mesmo ocorre para os ácidos fenólicos, o maior pico de excreção ocorre durante o intervalo de 0 a 4 horas.

Teixeira et al (2017) encontrou que indivíduos podem ser separados em alto e baixo excretores de metabólitos de elagitaninos, mas não apresentavam diferenças significativas na AUC.

7.7 Análise Multivariada

A análise de componente principal não explica o modelo, onde a PC1 responde somente por 30.3 % e a PC2 com 17,5% para o suco Pera (**Figura 26A**), enquanto que para o suco de laranja Moro a PC1 e PC2 respondem por 50,4% (**Figura 26B**).

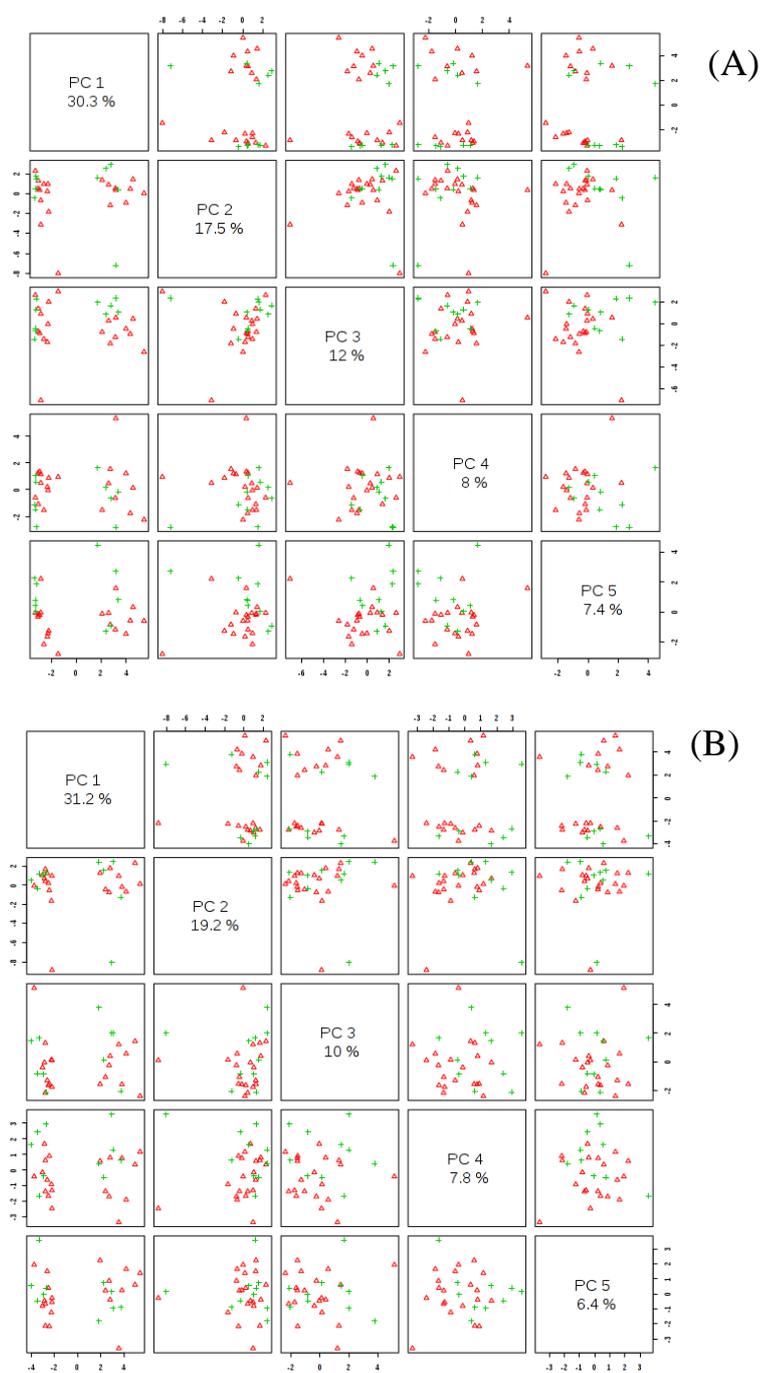


Figura 26. Análise de Componentes Principais (ACP), suco de laranja Pera (A) e moro (B).

8. CONCLUSÃO

Os sucos de laranja, cv. Pera e Moro, apresentam composição de flavonoides semelhante, com exceção das antocianinas característicos do suco de laranja Moro.

Não foi observado diferença na excreção total entre os dois grupos, obesos e eutróficos, e a grande variação na excreção de metabólitos de fase II de flavanonas e catabólitos oriundos da ação da microbiota entre as voluntárias não foi associado aos parâmetros antropométricos ou permeabilidade intestinal.

Assim, outros fatores podem estar influenciando a excreção destes metabólitos, além dos estudados, entre eles a microbiota intestinal. Vale ressaltar que a análise da microbiota está sendo realizada.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASCHOFF, J. K.; RIEDL, K. M.; COOPERSTONE, J. L.; HÖGEL, J.; BOSY-WESTPHAL, A.; SCWATZ, S. J.; SCHWEIGGERT, R. M. Urinary excretion of Citrus flavanones and their major catabolites after consumption of fresh oranges and pasteurized orange juice: a randomized cross-over study. **Molecular Nutrition & Food Research** 60, 2602-2610. 2016.

AVILA, M.; HIDALGO, M.; SANCHEZ-MORENO, C.; PELAEZ, C.; REQUENA, T.; PASCUAL-TERESA, S. Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*. **Food Res. Int.** 42, 1453-1461. 2009.

BOKKENHEUSER, V.D., SHACKLETON, C.H., WINTER, J. Hydrolysis of dietary flavonoids glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. **Biochem J** 248, 953–956. 1987.

BORGES, G., MULLEN, W., MULLAN, A., LEAN, M.E.J., ROBERTS, S.A., CROZIER, A. Bioavailability of multiple components following acute ingestion of a polyphenol-rich drink. **Mol Nutr Food Res** 54: S268–77. 2010.

BORGES, G.; LEAN, M.E.J.; ROBERTS, S.A.; CROZIER, A. Bioavailability of dietary (poly)phenols: A study with ileostomists to discriminate between absorption in small and large intestine. **Food Funct.** 4, 754-762, 2013.

BRAND, W.; VAN DER WEL, P.A.I.; REIN, M.J.; BARRON, D.; WILLIAMSON, G.; VAN BLADEREN, P.J.; RIETJENS, I.M.C.M. Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, p. 1794–1802, 2008.

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

BRASIL, E.; CHAVES, D. F. S.; XAVIER, A. A. O.; MERCADANTE, A. Z.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. N. M. Effect of Pasteurization on Flavonoids

and Carotenoids in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. “Cara Cara” and “Bahia” Juices. **J. Agric. Food Chem.** 65, 1371-1377. 2017.

BRAUNE, A.; BLAUT, M. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. **Gut microbes.** 7 3 (2016): 216-34.

BREDSORFF, L., NIELSON, I.L.F., RASMUSSEN, S.E., CORNETT, C., BARRON, D., BOUISSET, F., OFFORD, E., WILLIAMSON, G. Absorption, conjugation and excretion of the flavanones, naringenin and hesperetin from a-rhamnosidase - treated orange juice in human subjects. **Br J Nutr** 103: 1602–1609, 2010.

BRETT, G.M.; HOLLANDS, W.; NEEDS, P.W.; TEUCHER, B.; DAINY, J.R.; DAVIS, B.D.; BRODBELT, J.S.; KROON, P.A. Absorption, metabolism and excretion of flavanones from single portions of orange fruit and juice and effects of anthropometric variables and contraceptive pill use on flavanone excretion. **British Journal of Nutrition**, v. 101(5), p. 664-75, 2009.

CANI, P.D., AMAR, J., IGLESIAS, M.A., POGGI, M., KNAUF, C., BASTELICA, D., et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes.** 56:1761-72. 2007.

CROZIER A., JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat Prod Rep** 26:965–1096. 2009.

CZANK, C.; CASSIDY, A.; ZHANG, Q.; MORRISON, D. J.; PRESTON, T.; KROON, P. A.; KAY, C. D. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: A ¹³C-tracer study. **American Journal of Clinical Nutrition.** 97(5) 995-1003. 2013.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43(4), p. 348-61, 2007.

DAY, A. J. et al. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.*, 436:71–75. 1998.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants and Redox Signaling**. 18, 1818 – 1892.

DEMIATE et al., Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulométrico. **Publicitário UEPG - Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 8, n.1, p. 65-78, 2002.

DUGO, P.; MONDELLO, L.; MORABITO, D.; DUGO, G., Characterization of the anthocyanin fraction of Sicilian blood orange juice by micro-HPLC-ESI/MS. **J. Agric. Food Chem.**51:1173–1176. 2003.

ERLUND, I.; MERIRINNE, E.; ALFTHAN, G.; ARO, A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. **Journal of Nutrition**, v. 131(2), p. 235-41, 2000.

ESPIN, J.C., GONZALEZ-BARRIO, R., CERDA, B., LOPEZ-BOTE, C., REY, A.I., TOMAS-BARBERAN, F.A. Iberian Pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** 55, 10476–10485. 2007.

FARHADI, A., BANAN, A., FIELDS, J.Z., KESHAVARZIAN, A. Intestinal barrier: na interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18:479-479.

Felgines C, Texier O, Besson C, et al. Blackberry anthocyanins are slightly bioavailable in rats. **J Nutr** 132:1249–1253. 2002.

FOSSEN, T.; ANDERSEN, O. M.; OVSTEDAL, D. O.; PEDERSEN, A. T.; RAKNES, A. Characteristic anthocyanin pattern from onions and other *Allium* spp. **J. Food Sci.** 61, 703-706. 1996.

GEE, J. M.; DUPONT, M. S.; DAY, A. J.; PLUMB, G. W.; WILLIAMSON, G.; JOHNSON, I. T. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. **J. Nutr.**, 130, 2765–2771. 2000.

GRIFFITHS, L.A., BARROW, A. Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. **Biochemical Journal**. 130(4):1161-1162. 1972.

HOLLANDS, W., BRETT, G.M., DAINTY, J.R., TEUCHER, B., KROON, P.A. Urinary excretion of strawberry anthocyanins is dose-dependent for physiological oral doses of fresh fruit. **Molec Nutr Food Res**. 2008.

HOLLMAN, P.C., BIJSMAN, M.N., VAN GAMEREN, Y., CNOSSEN, E.P., DE VRIES, J.H., KATAN, M.B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radic Res.**; 31:569–573. 1999.

JANG, I.S.; KIM, D.H. Purification and characterization of alpha-l-rhamnosidase from *Bacteroides* JY-6, a human intestinal bacterium. **Biol Pharm Bull**; 19:1546–9. 1996.

JOHNSTON, S. D., SMYE, M., PETER WATSON, R. G., MCMILLAN, S. A., TRIMBLE, E. R., & GARY LOVE, A. H. Lactulose-Mannitol Intestinal Permeability Test: A Useful Screening Test for Adult Coeliac Disease. **Annals of Clinical Biochemistry**, 37(4), 512–519. 2000.

KAFKAS, E.; ERCISLI, S.; KEMAL, K. N.; BAYDAR, K.; YILMAZ, H. Chemical composition of blood orange varieties from Turkey: A comparative study. V. 5, n.20, p. 329-335, 2009.

KANAZE, F.I.; BOUNARTZI, M.I.; GEORGARAKIS, M.; NIOPAS, I. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 61(4), p. 472-7. 2007.

KAWAII, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO M. Quantitation of flavonoid constituents in Citrus fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3565-71. 1999.

KAY, C. D., MAZZA, G. J., HOLUB, B. J. Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. **J Nutr** 135: 2582–2588. 2005.

KEMPERMAN, R.A.; BOLCA, S.; ROGER, L.C.; VAUGHAN, E.E. Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: Challenges and opportunities. **Microbiology** 156:3224-3231. 2010.

KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **Scientific World Journal**, 162750, 2013.

LÉVÈQUES, A.; ACTIS-GORETTA, L.; REIN, J.M.; WILLIAMSON, G.; DIONISI, F.; GIUFFRIDA, F. UPLC–MS/MS quantification of total hesperetin and hesperetin enantiomers in biological matrices . **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 57, 1–6 .2012.

LIANG L, SHAO-QIAN C, SI-YI P. Thermal degradation kinetics of three kinds of representative anthocyanins obtained from blood Orange. **Agriculture Sciences in China**, v.10, n.4, p.642-649. 2011.

MACCARONE, E.; RAPISARDA, P.; FANELLA, F.; ARENA, E.; MONDELLO, L. Cyanidin-3-(6''-malonyl)- β -glucoside. One of the major anthocyanins in Blood Orange juice. **Ital. J. Food Sci.** 10, 367-372. 1998.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr** 79, 727–747. 2004.

MANACH, C.; MORAND, C.; GIL-IZQUIERDO, A.; BOUTELOUP-DEMANGE, C.; REMESY, C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 235–42, 2003.

MARCHESI, J.R. Human distal gut microbiome. **Environmental Microbiology**, v.13, n.12, p.3088-3102, 2011.

MARIN, L.; MIGUÉLEZ, E. M.; VILLAR, C. J.; LOMBO, F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolismo: antimicrobial properties. **Biomed Res. Int.** 905215. 2015.

MARTÍ, N.; MENA, P.; CÁNOVAS, J.Á.; MICOL, V.; SAURA, D. Vitamina C and the role of citrus juices as functional food. **Nat Prod Commun.** May, v.4,n.5,p. 677-700, 2009.

MATSUMOTO, H.; IKOMA, Y.; SUGIURA, M.; MASAMICHI Y.; HASEGAXA, Y. Identification and quantification of the conjugated metabolites derived from orally administered hesperidin in rat plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6653-6659, 2004.

MILENKOVIC, D. et al. Hesperidin displays relevant role in the nutrigenomic effect of orange juice on blood leukocytes in human volunteers: a randomized controlled cross-over study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. 1-9; 2011.

MOLINA-CALLE M.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Development and application of a quantitative method for determination of flavonoids in orange peel: Influence of sample pretreatment on composition. **Talanta** 144, 349–355. 2015.

MONTSERRAT, D.; MUÑOZ-GONZÁLEZ, I.; CUEVA, C. et al., A Survey of Modulation of Gut Microbiota by Dietary Polyphenols. **BioMed Research International**, vol. 2015, Article ID 850902, 15 pages, 2015.

MOURA, L. M. Compostos bioativos em frutas cítricas: quantificação, avaliação da atividade antioxidante, parâmetros de cor e efeito da pasteurização. 142f. 2010. **Tese** (Doutorado em Alimentos e Nutrição – Ciências Nutricionais) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara; 2010.

MULLEN, W., YOKOTA, T., LEAN, M.E.J., CROZIER, A., Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MSn. **Phytochemistry** 64, 617–624. 2003.

MULLEN, W.; ARCHEVEQUE, M.A.; EDWARDS, C.A.; MATSUMOTO, H.; CROZIER, A. Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: impact of a full-fat yogurt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 11157-64. 2008.

NEMETH, K. et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell betaglucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. **Eur. J. Nutr.**, 42:29–42. 2003.

NEVES, M. F. et al. O retrato da citricultura brasileira. **Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia** – FEA /USP Ribeirão Preto; 2010.

NIELSEN, I.L.; CHEE, W.S.; POULSEN, L.; OFFORD-CAVIN, E.; RASMUSSEN, S.E.; FREDERIKSEN, H.; ENSLEN, M.; BARRON, D.; HORCAJADA, M.N.; WILLIAMSON, G. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. **Journal of Nutrition**, v. 136(2), p. 404-8, 2006.

NOGATA, Y.; SAGAMOTO, K.; SHIRATSUCHI, H.; ISHII, T.; YANO, M.; OHTA, H. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 2006.

PARK, S.; KIM, J.; KIM, D. Purification and characterization of quercitrinhydrolyzing alpha-l-rhamnosidase from *Fusobacterium* K-60, a human intestinal bacterium. **J Microbiol Biotechnol**; 15:519–24. 2005.

PEREIRA-CARO, G.; BORGES, G.; VAN DER HOOFT, J.; CLIFFORD, M. N.; DEL RIO, D.; LEAN, M. E.; ROBERTS, S. A.; KELLERHALS, M. B.; CROZIER, A. Orange juice (poly)phenols are highly bioavailable in humans. **Am. J. Clin. Nutr.** v.100, p.1378–1384. 2014.

PEREIRA-CARO, G.; MORENO-ROJAS, J. M.; BRINDANI, N.; DEL RIO, D.; LEAN, M. E. J.; HARA, Y.; CROZIER, A. Bioavailability of black tea theaflavins: absorption, metabolism, and colonic catabolism. **J. Agric. Food Chem.** 65, 5365-5374. 2017.

PEREIRA-CARO, G.; OLIVER, C.M.; WEERAKKODY, R.; SINGH, T.; CONLON, M.; BORGES, G.; SANGUANSRI, L.; LOCKETT, T.; ROBERTS, S.A.; CROZIER, A.; AUGUSTIN, M.A. Chronic administration of a microencapsulated probiotic enhances the bioavailability of orange juice flavanones in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 84, p. 206-214, 2015.

PETERSON, J. J.; DWYER, J. T.; BEECHER, G. R.; BHAGWAT, S. A.; GEBHARDT, S. E.; HAYTOWITZ, D. B.; HOLDEN, J. M. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. **J. Food Compos. Anal.**, v.19, p. S66–S73, 2006.

PRIOR, R.L., HOANG, H., GU, L., BACCHIOCCA, M., HOWARD, L., HAMPSCHWOODILL, M., HUANG, D., OU, B., JACOB, R. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Plasma and Other Biological and Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, p.3273-3279, 2003.

RANDHAWA, M.A.; RASHID, A.; SAEED, M.; JAVES, M.S.; KHAN, A.A.; SAJID, M.W. Characterization of organic acids in juices of some pakistan citrus species and their retention during refrigerated storage. **The Journal of Animal & Plant Sciences** 24 (1), 211-215, 2014.

RECHNER, A.R.; KUHNLE, G.; BREMNER, P.; HUBBARD, G.P.; MOORE, K.P.; RICE-EVANS, C.A. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med.* 2002.

SANCHEZ-MORENO, C., PILAR, C. M., DE, A. B., PLAZA, L. et al., Intake of Mediterranean vegetable soup treated by pulsed electric fields affects plasma vitamin C and antioxidant biomarkers in humans. **Int. J. Food Sci. Nutr.** 56, 115– 124. 2005.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; DE ANCOS, B.; CANO, M.P. Vitamin C, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in high-pressurized orange juice during refrigerated storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 647-653, 2003.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v.130, Suppl 8S, p. 2073S-2085S, 2000.

SCORDINO M.; SABATINO L.; LAZZARO F.; BORZÌ M.A.; GARGANO M.; TRAULO P.; GAGLIANO G. Blood orange anthocyanins in fruit beverages: How the commercial shelf life reflects the quality parameter. **Beverages** 1: 82, 2015.

SILVA, P. T. et al. Estabilidades química, físico-química e microbiológica do suco de laranja cv. pera submetido a diferentes condições de estocagem. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.25, p.235-246, 2007.

SILVEIRA, J. Q., CESAR, T. B., MANTHEY, J. A., BALDWIN, E. A., BAI, J., & RAITHORE, S. Pharmacokinetics of flavanone glycosides after ingestion of single doses of fresh-squeezed orange juice versus commercially processed orange juice in healthy humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(52), 12576e12584. 2014.

SPENCER, J. P. E., MOHSEN, M. A. E., MINIHANE, ANN – MARIE., MATHERS, J. C. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. **British Journal of Nutrition**. v. 99. p. 12 - 22. 2008.

SPENCER, J.P.E.; CHOWRIMOOTO, G.; CHOUDHURY, R.; DEBNAM, E.S.; SRAI, S.K.; RICEEVANS, C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. **FEBS Letters**, v. 458, p. 224-230, 1999.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p.63-68, 1959.

TEIXEIRA, L. L.; COSTA, G. R.; DÖRR, F. A.; ONG, T. P.; PINTO, E.; LAJOLO, F. M.; HASSIMOTTO, N. M. A. Potential antiproliferative activity of polyphenol metabolites against human breast cancer cells and their urine excretion pattern in healthy subjects following acute intake of a polyphenol-rich juice of grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lam). **Food & Function**. 2017.

TOMAS-NAVARRO, M., VALLEJO, F., SENTANDREU, E., NAVARRO, J. L. & TOMAS-BARBERAN, F. A. Volunteer stratification is more relevant than technological treatment in orange juice flavanone bioavailability. **J Agric Food Chem**, 62, 24-7. 2014.

VALDES L, CUERVO A, SALAZAR N, RUAS-MADIEDO P, GUEIMONDE M, GONZALEZ S. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. **Food Funct**. 6(8):2424–2439. 2015.

VALLEJO, F.; LARROS, M.; ESCUDERO, E.; ZAFRILLA, M. P.; CERDÉ, B.; BOZA, J.; GARCÍA CONESA, M. T.; ESPÍ, J. C.; TOMÁS-BARBERAN, F. A. Concentration and solubility of flavanones in orange beverages affect their bioavailability in humans. **J Agric Food Chem**;58:6516–24. 2010.

XIAO, J.B., HÖGGER, P. Metabolism of dietary flavonoids in liver microsomes. **Current Drug Metabolism**, v. 14, p. 381–91, 2013

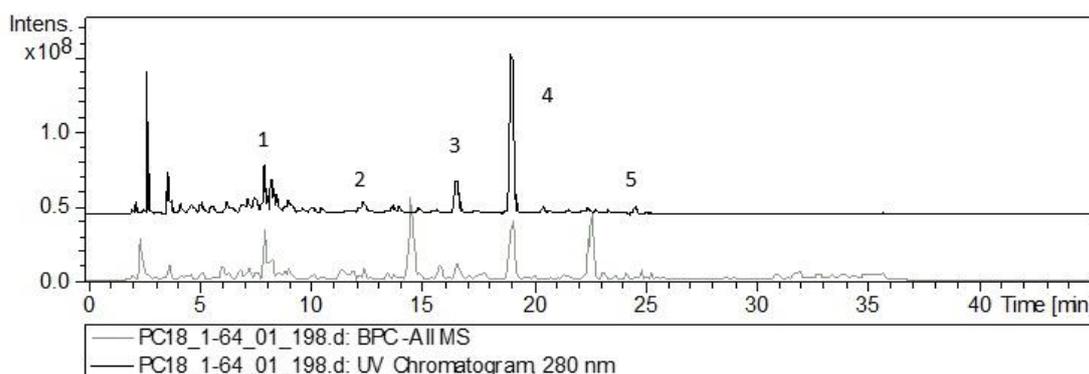
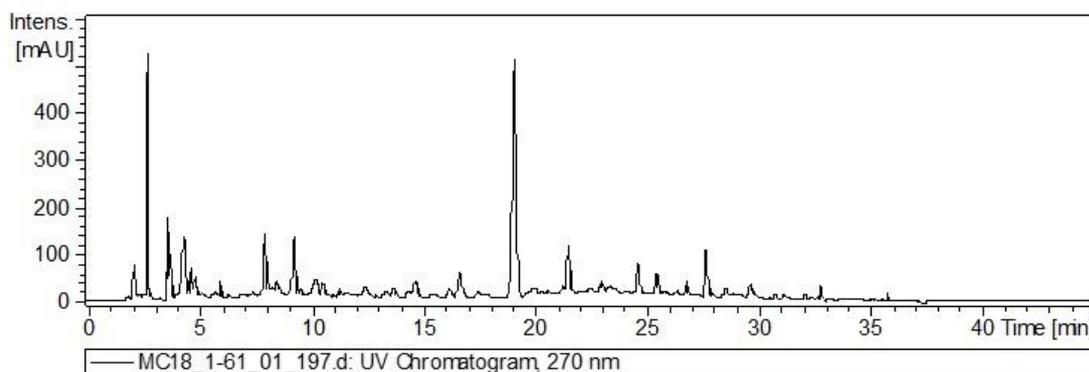
YADAV, V., YADAV, P. K., YADAV, S., YADAV, K. D. S. α -L-Rhamnosidase: a review. **Process Biochem**. 45: 1226–1235. 2010.

ZHANG, J., BRODBELT, J.S. Screening flavonoid metabolites of naringin and narirutin in urine after human consumption of grapefruit juice by LC-MS and LC-MS/MS. **Anly**. 129:1227–33. 2004.

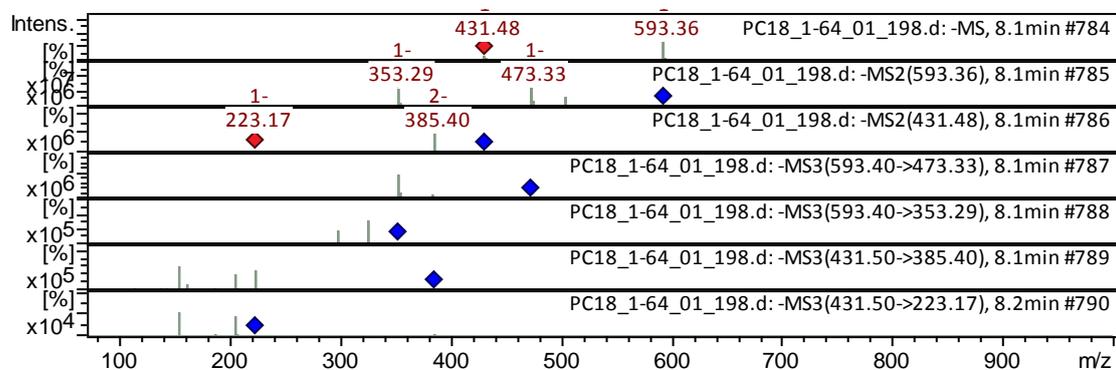
10. ANEXOS

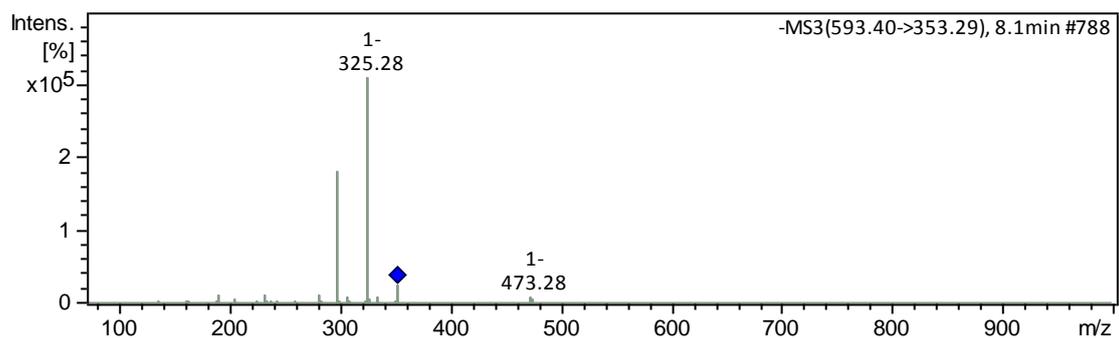
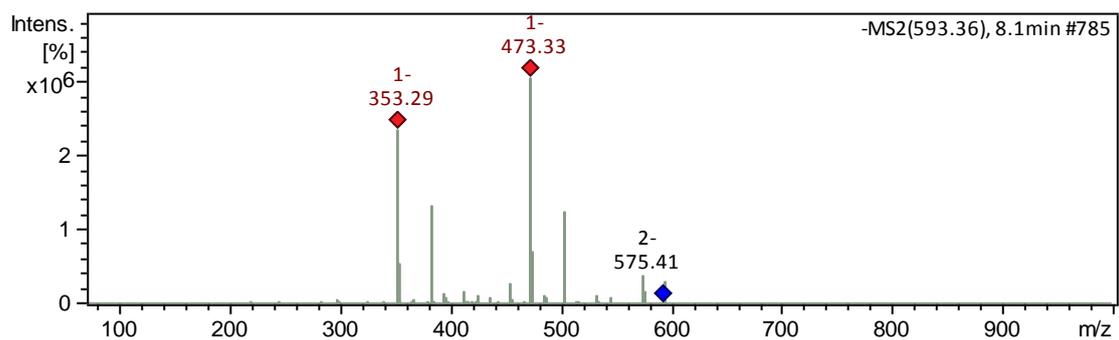
Anexo 1 – Espectro de massas do suco de laranja cv. Pera

Modo Negativo

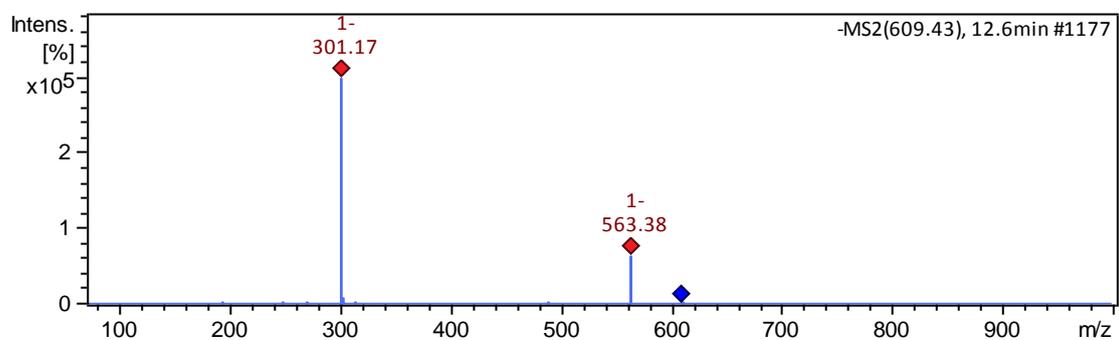
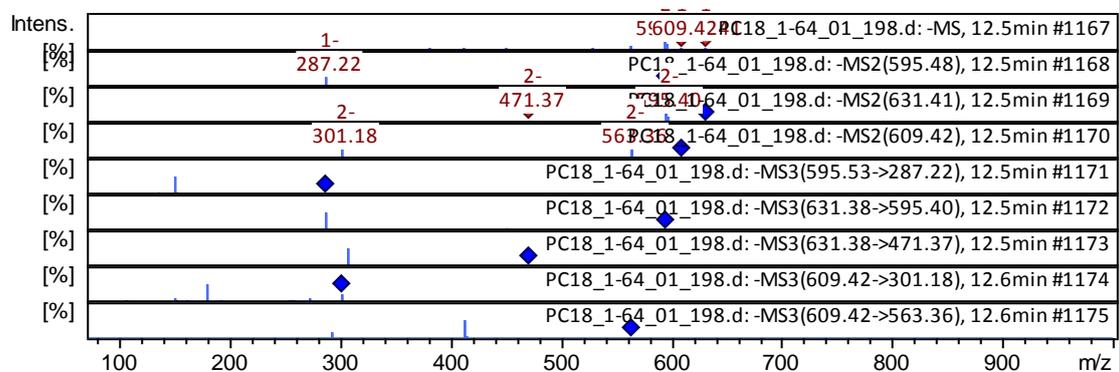


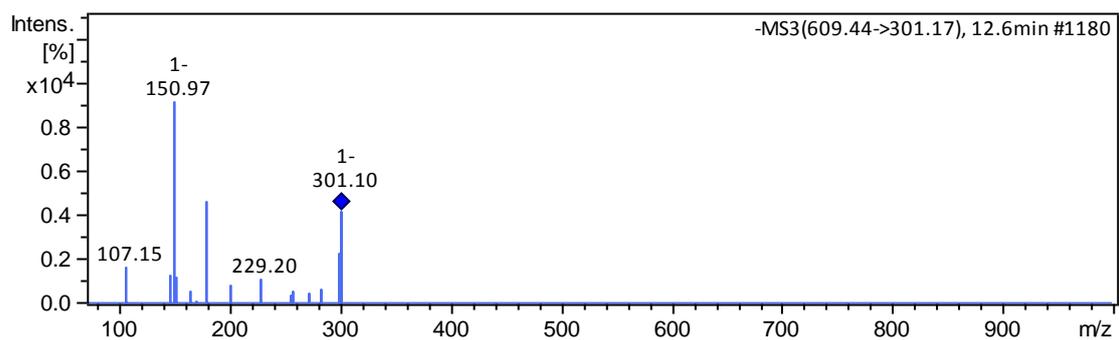
Pico 1 - Apigenina 6,8-di-C-glucosideo (Vicenin-2)



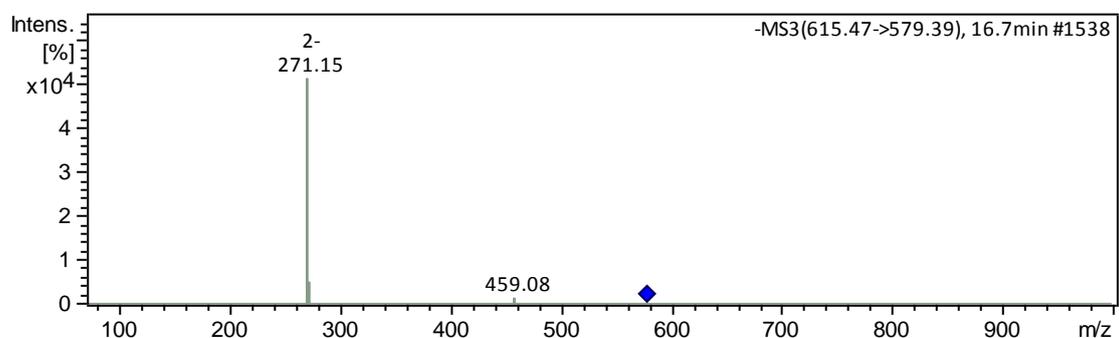
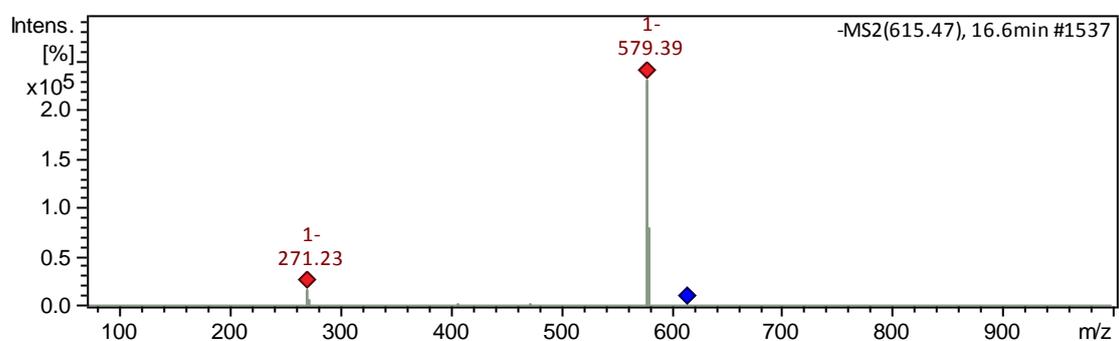
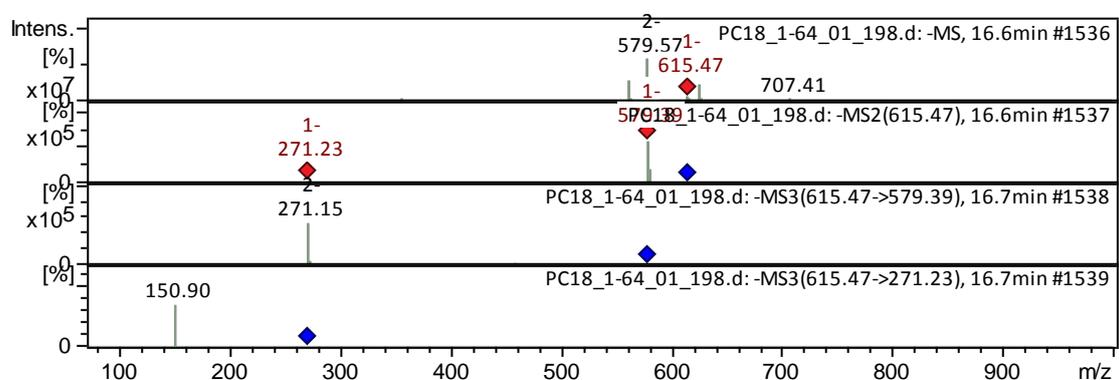


Pico 2 - Quercetina-3-O-rutinoside (rutina)

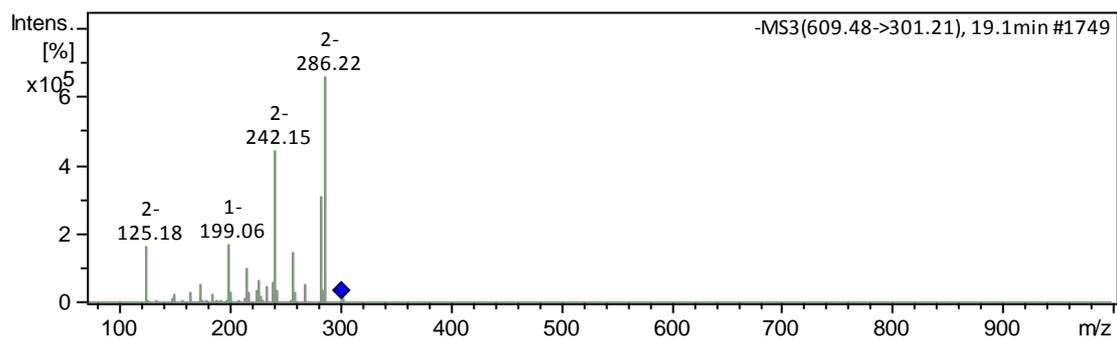
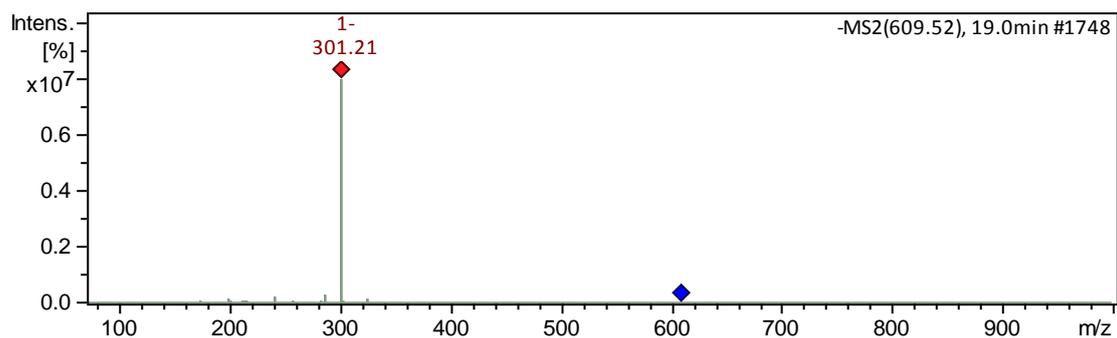
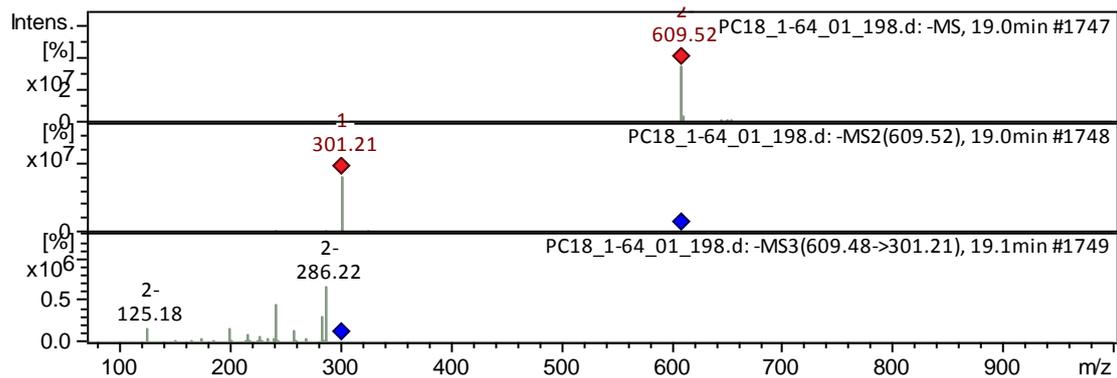




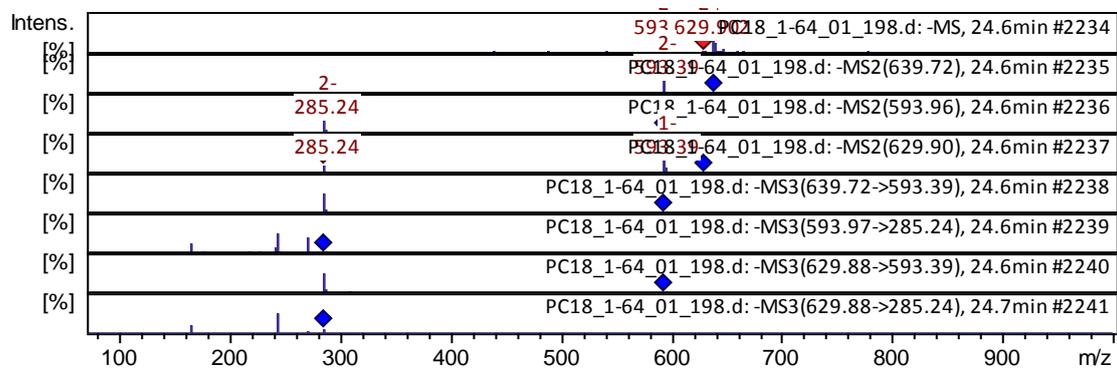
Pico 3 - Naringenina-7-O-rutinosideo (narirutina)

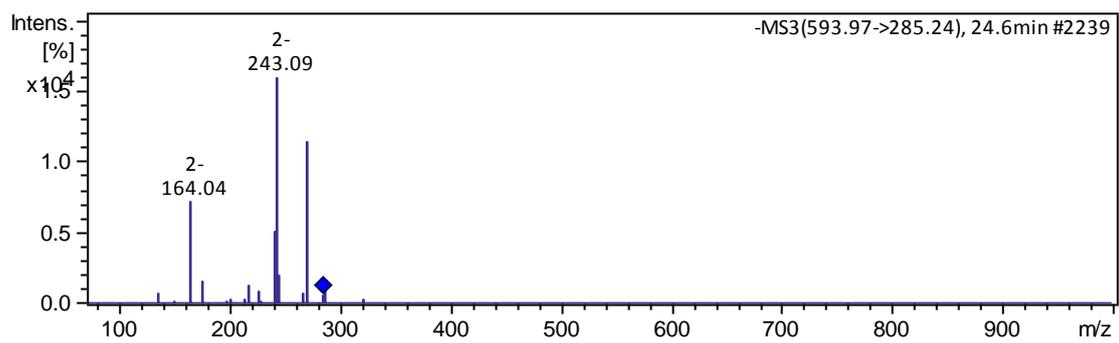
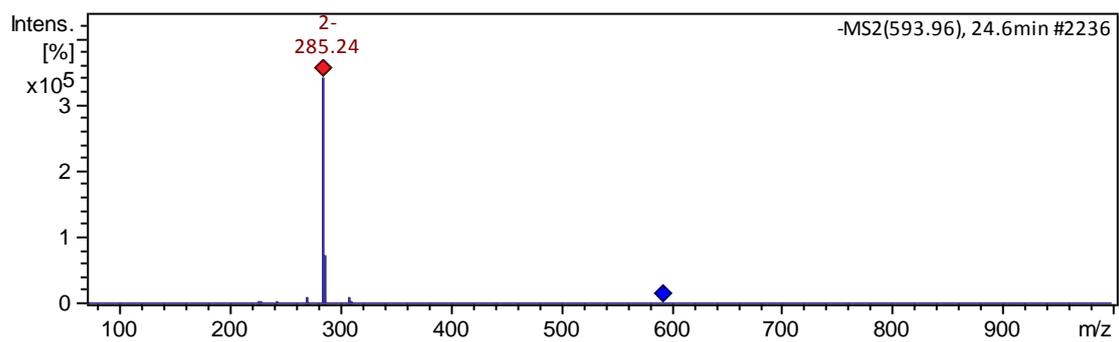


Pico 4 - Hesperitina-7-O-rutinosideo (hesperidina)



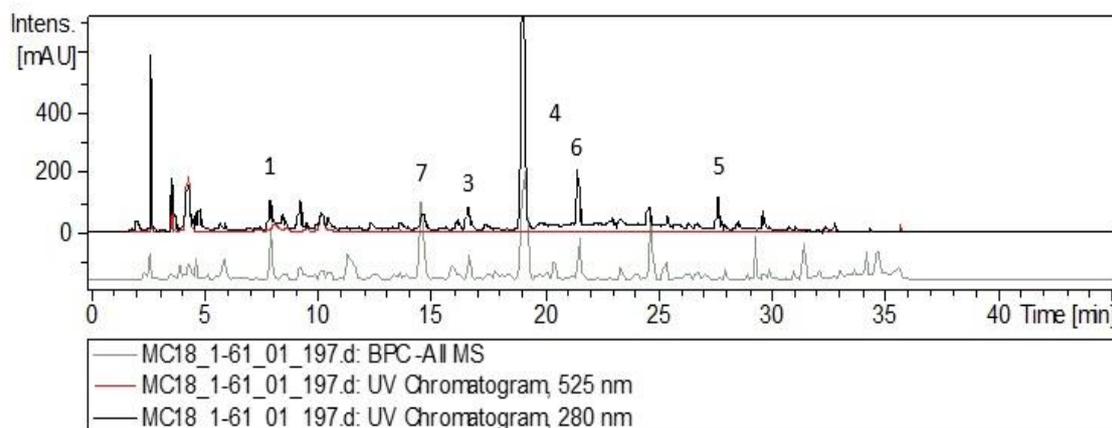
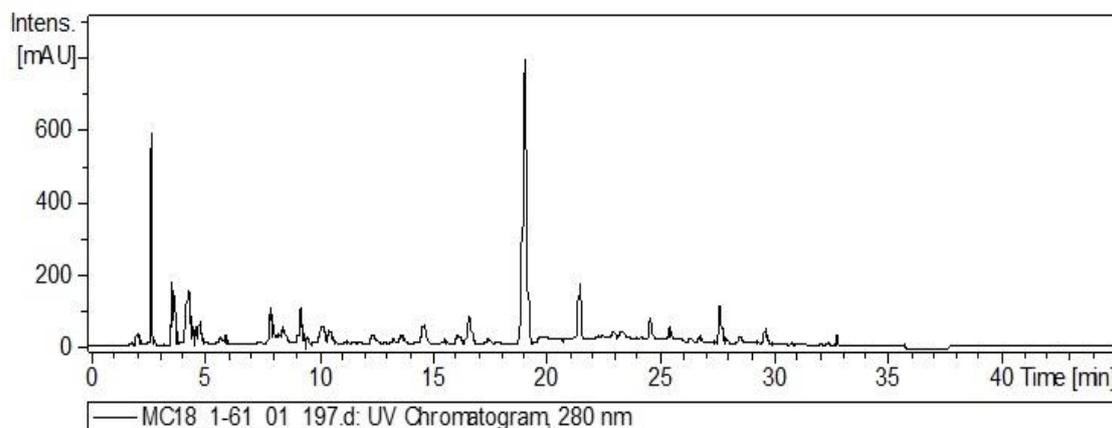
Pico 5 - Isosakuranetin 7-rutinoside (didimina)



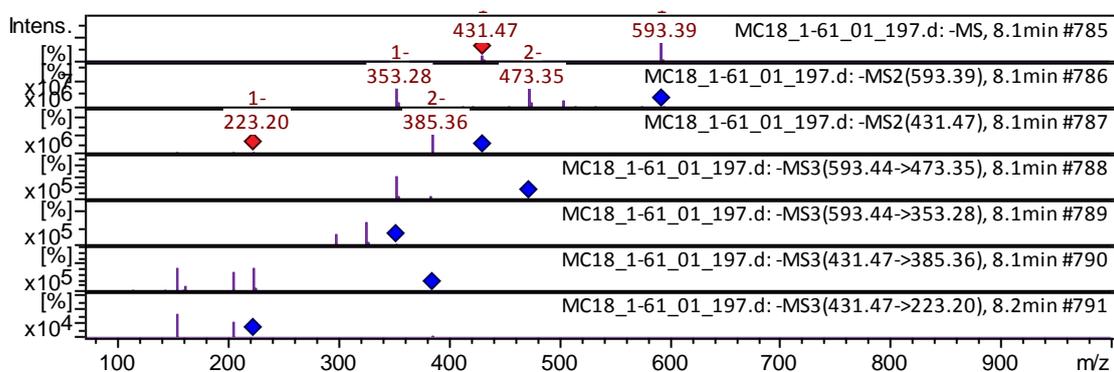


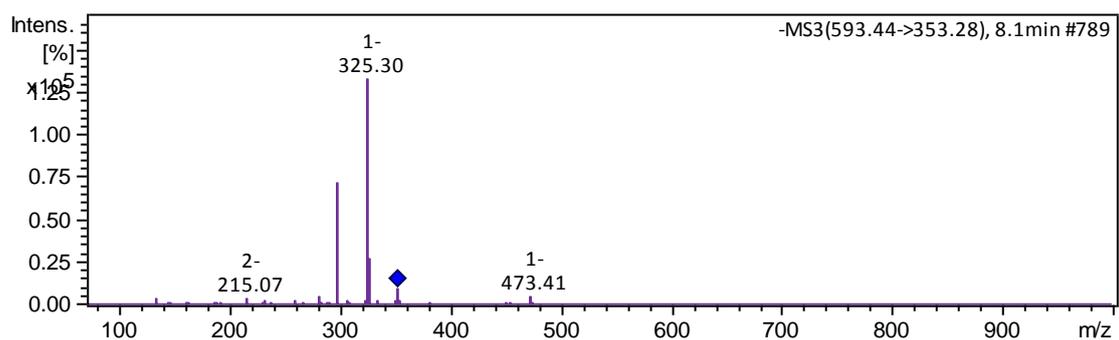
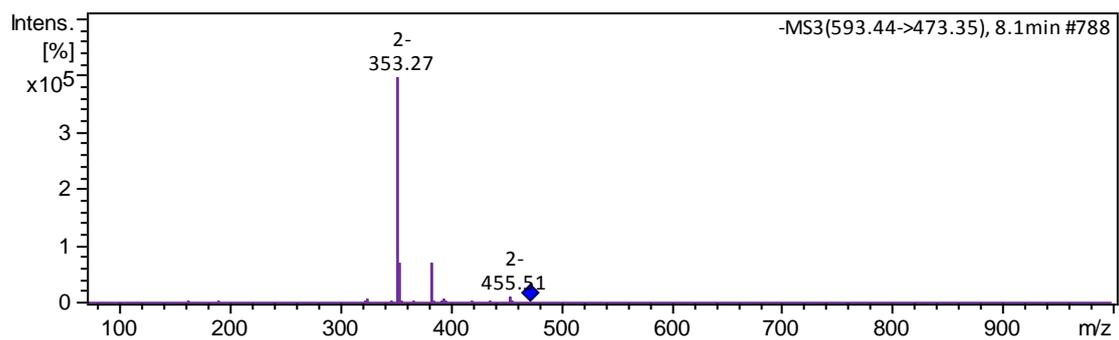
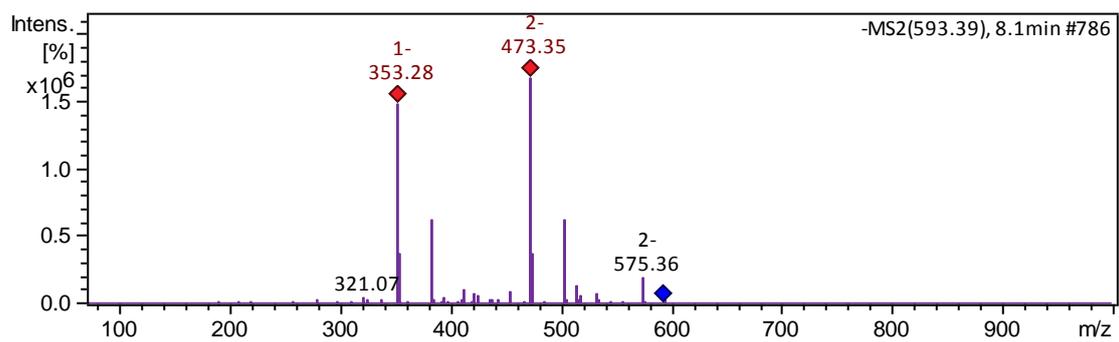
Anexo 2 – Espectro de massas do suco de laranja cv. Moro

Modo Negativo

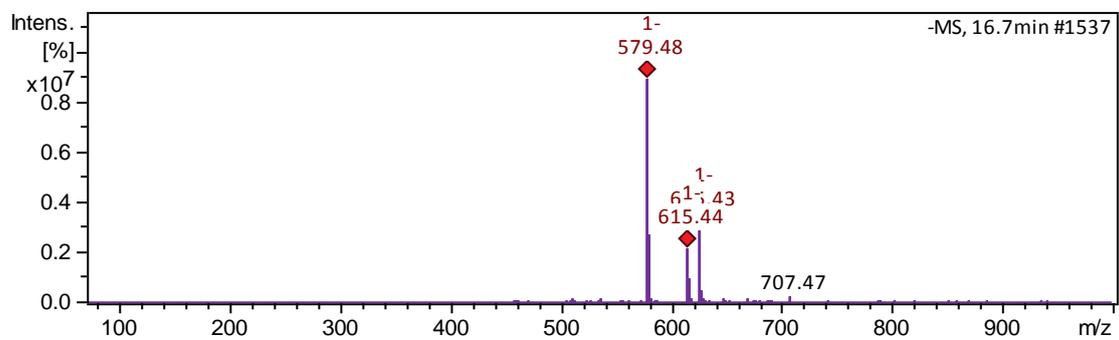


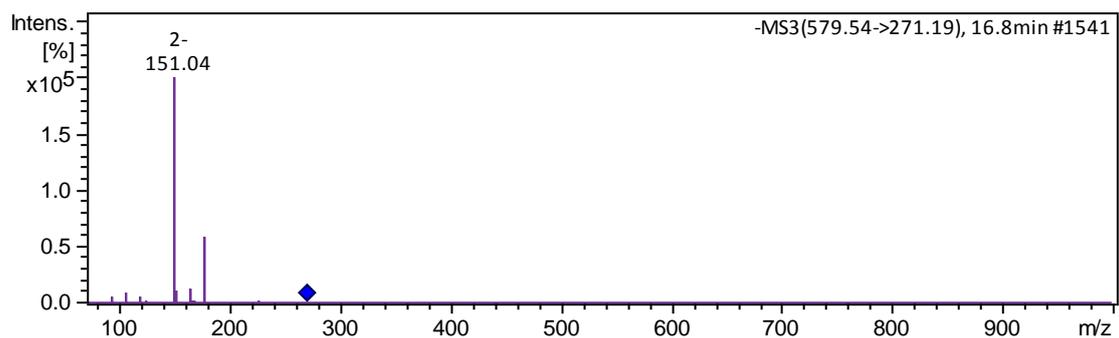
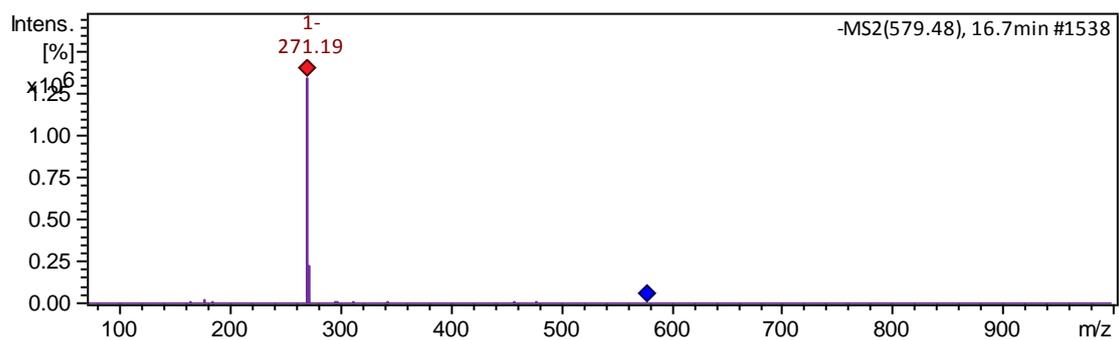
Pico 1 - Apigenina 6,8-di-C-glucosideo (Vicenin-2)



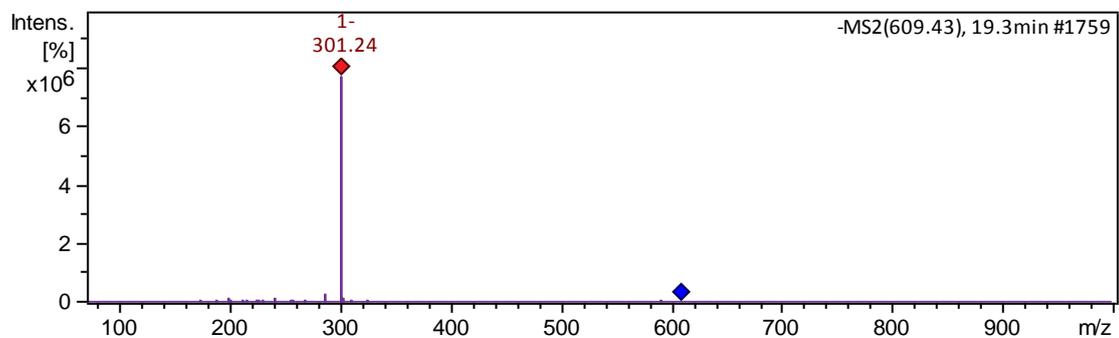
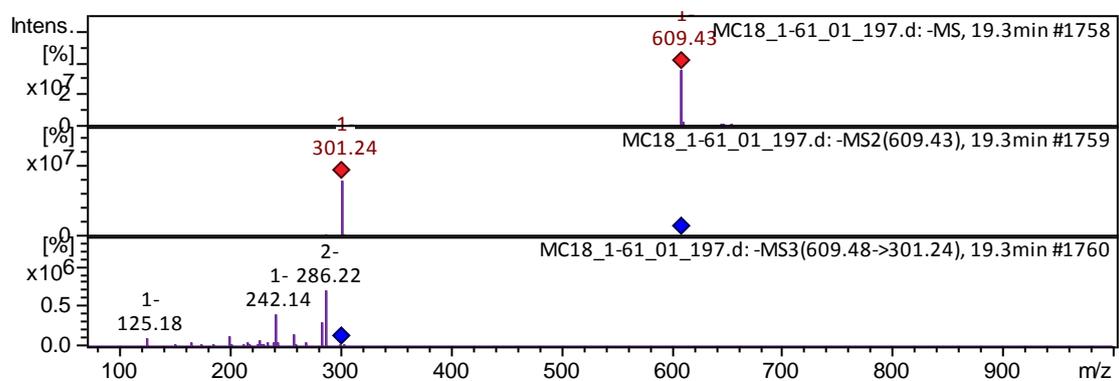


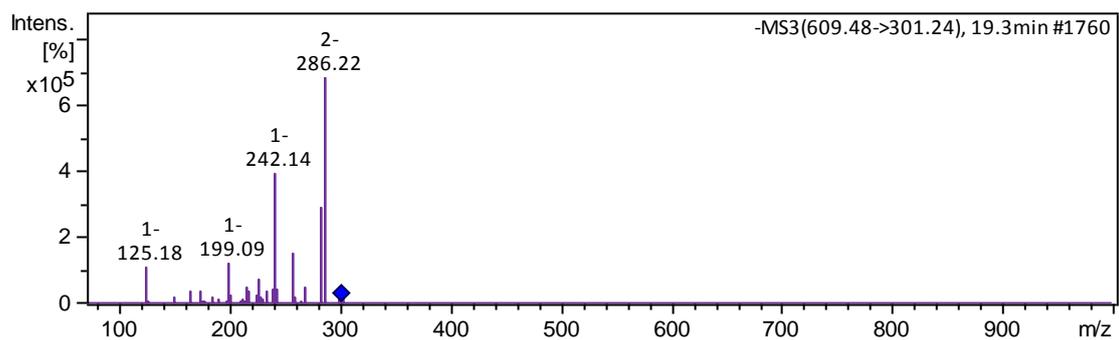
Pico 3 - Naringenina-7-O-rutinosideo (narirutina)



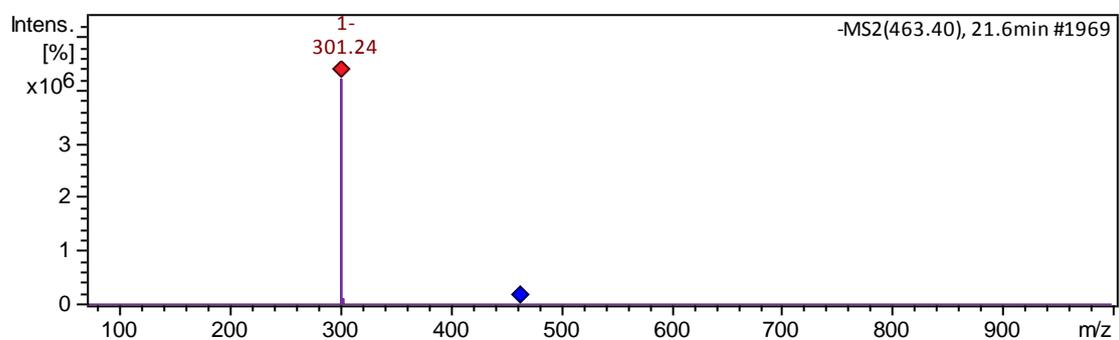
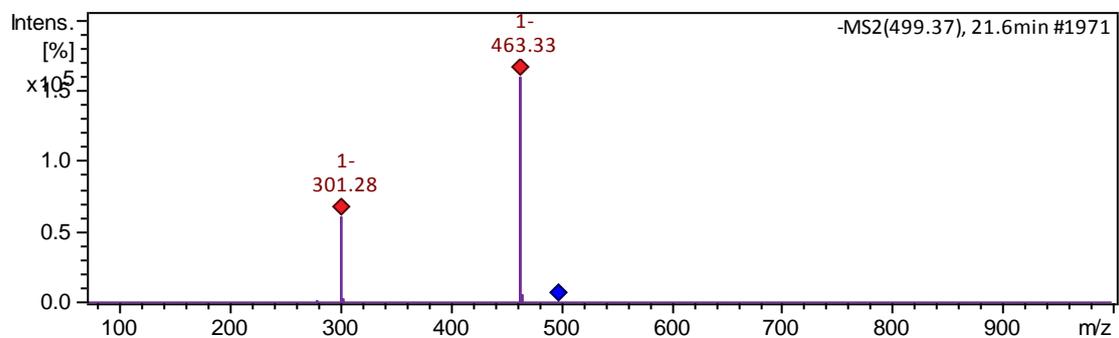
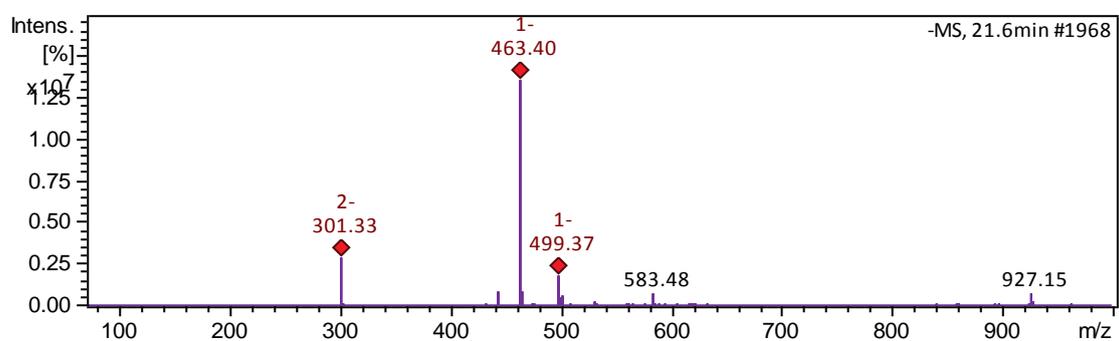


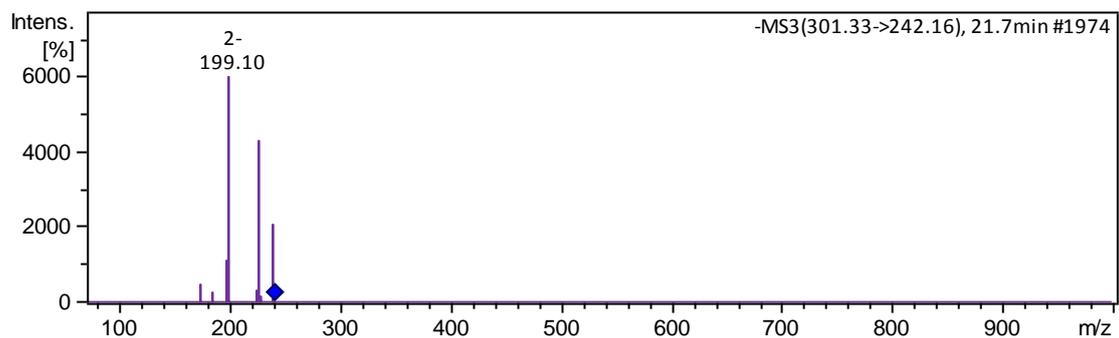
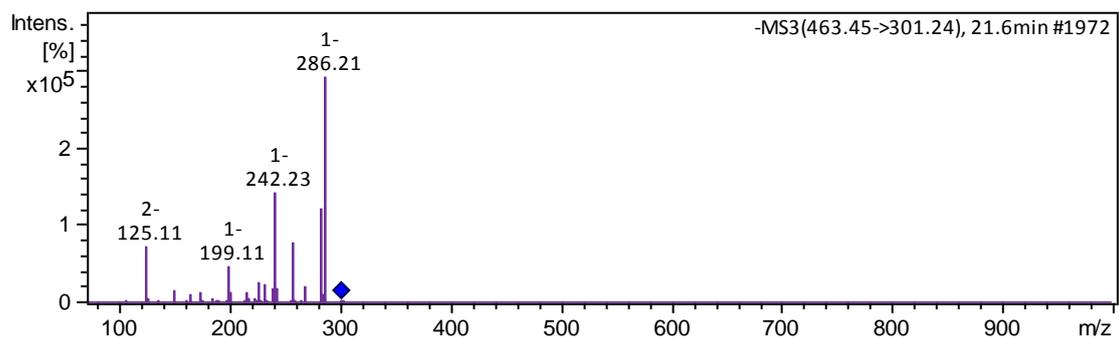
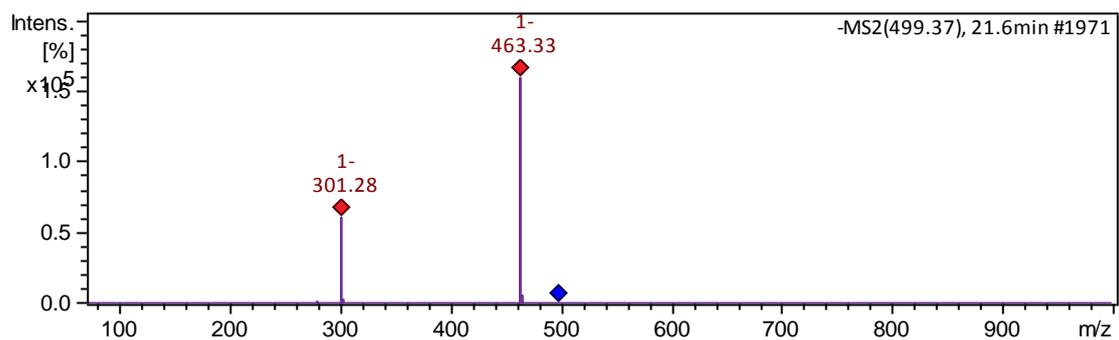
Pico 4 - Hesperitina-7-O-rutinosideo (hesperidina)



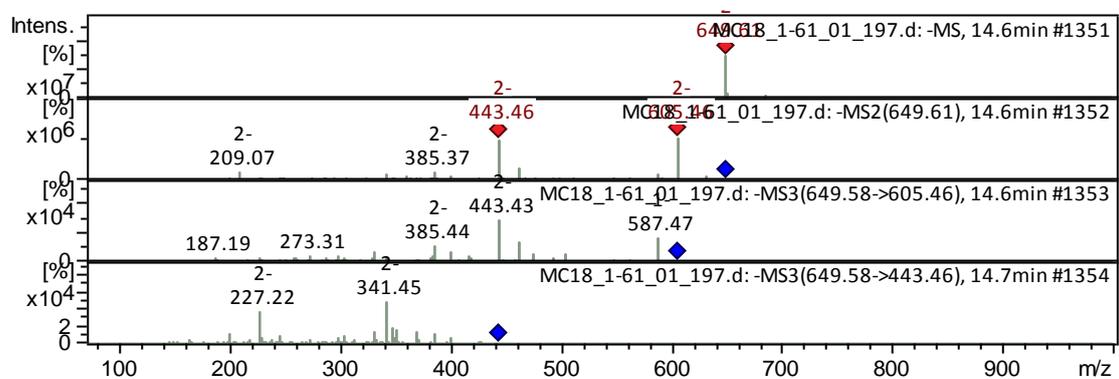


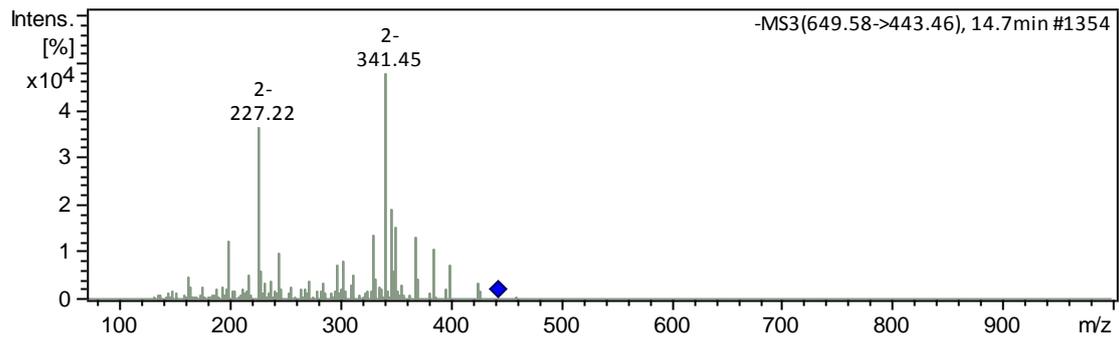
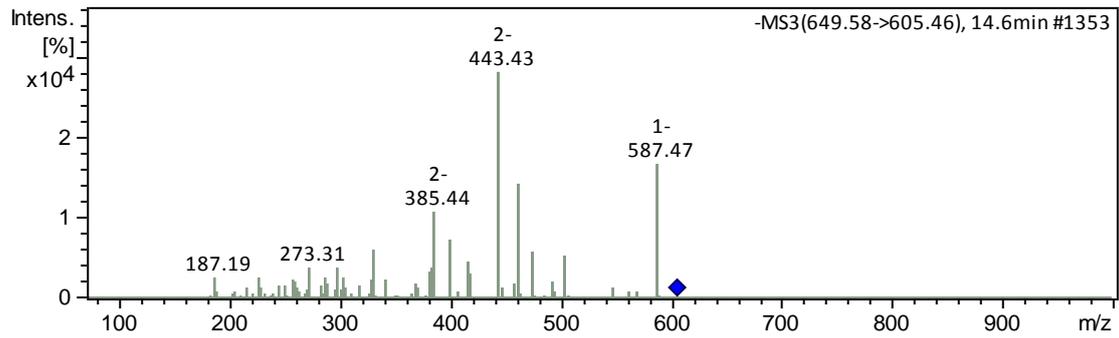
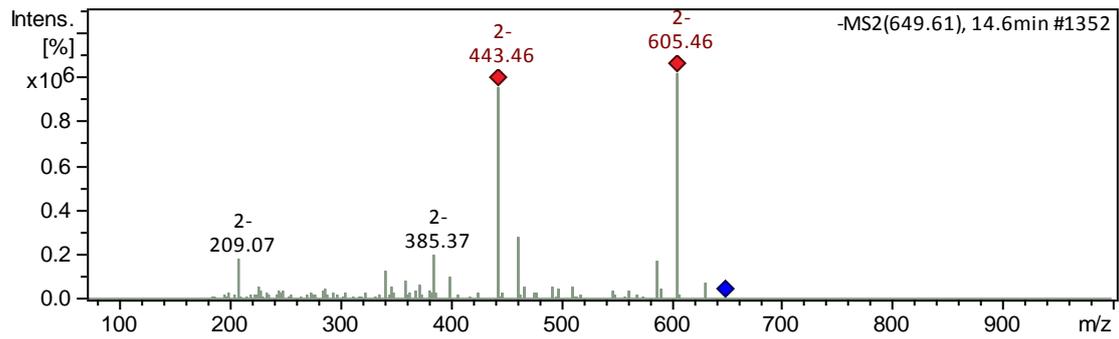
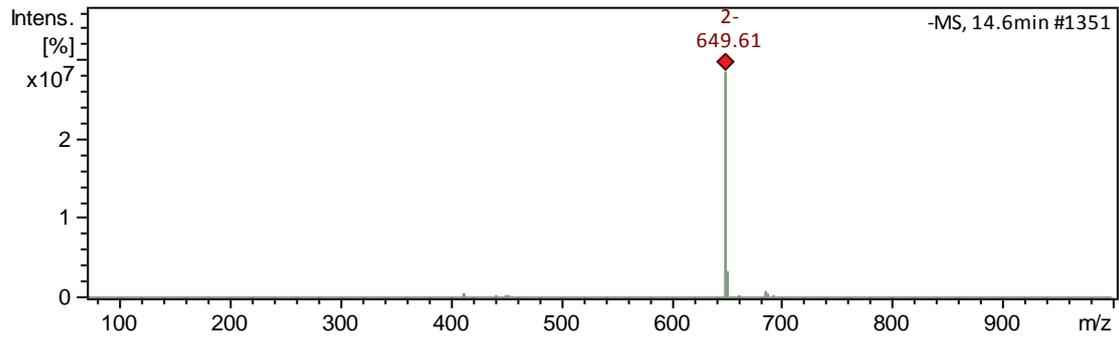
Pico 6 – Não identificado



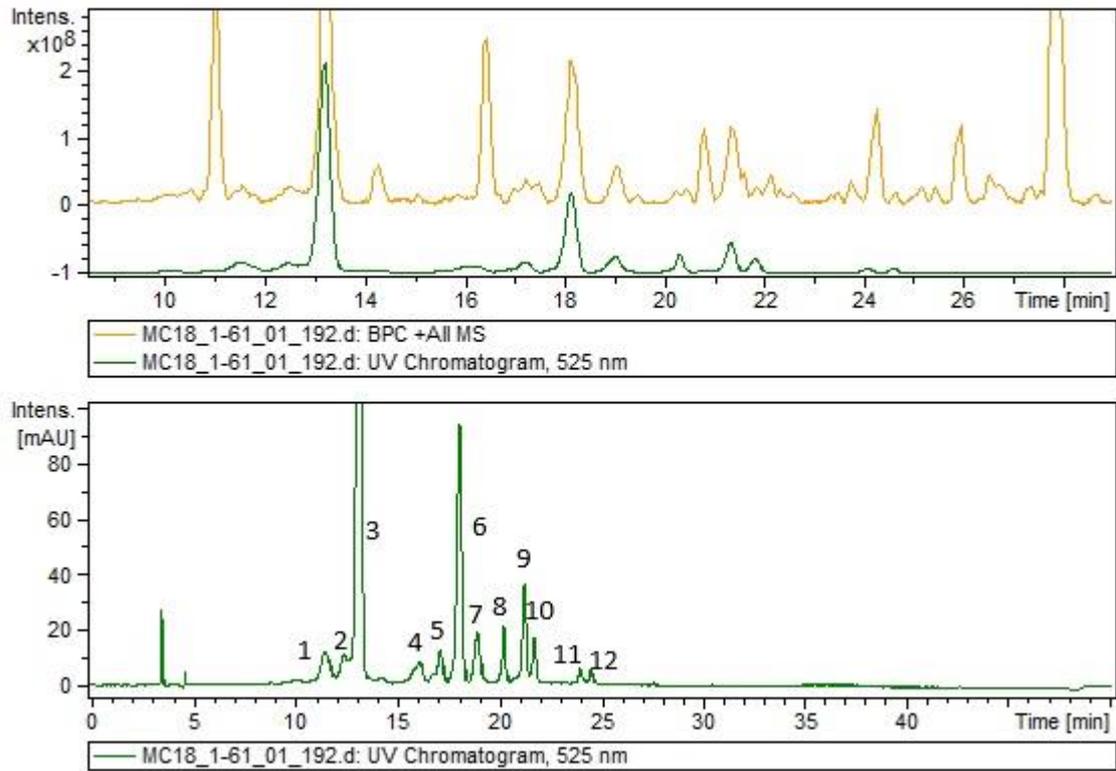


Pico 7 – Não identificado

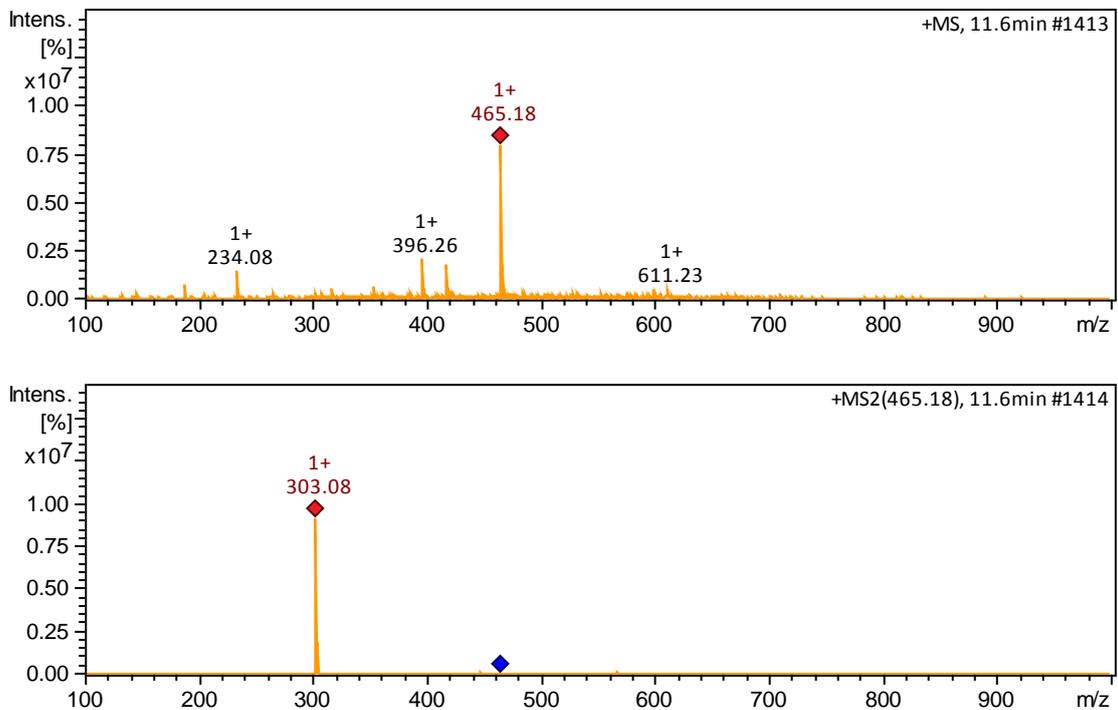


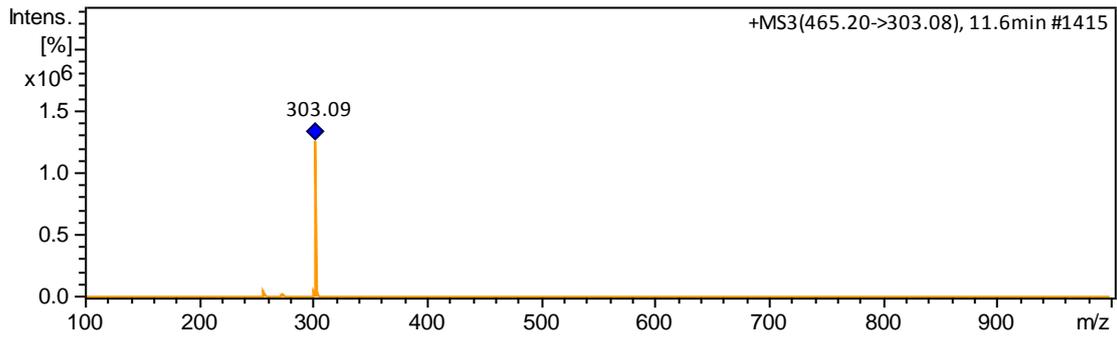


Modo Positivo

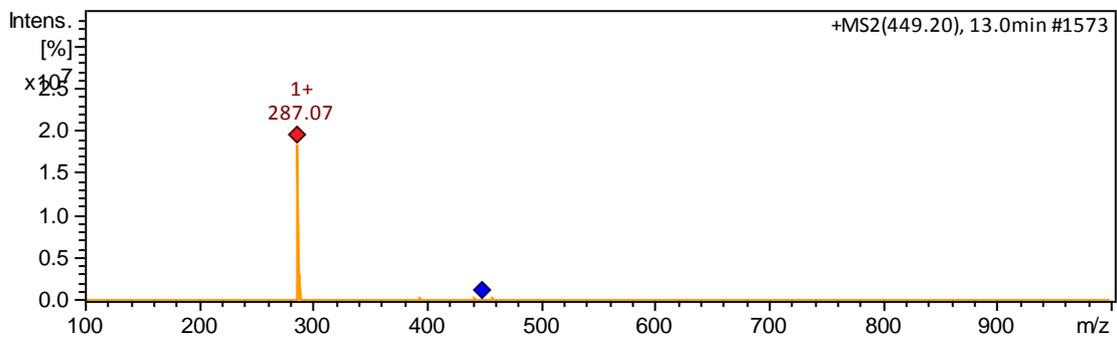
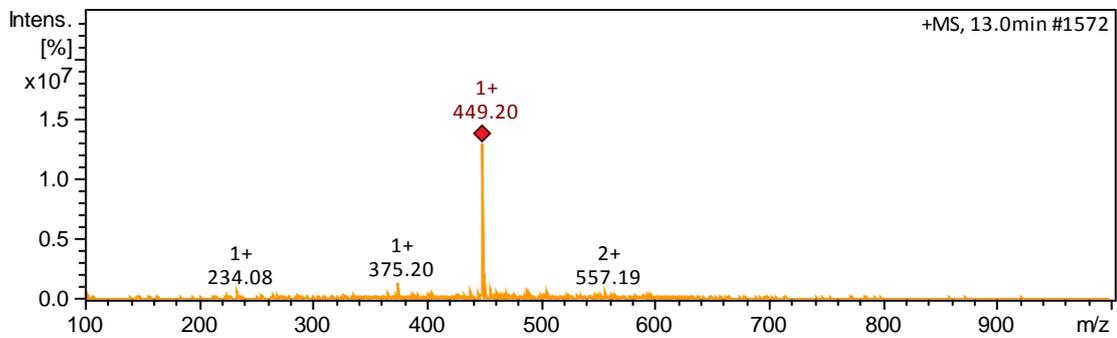
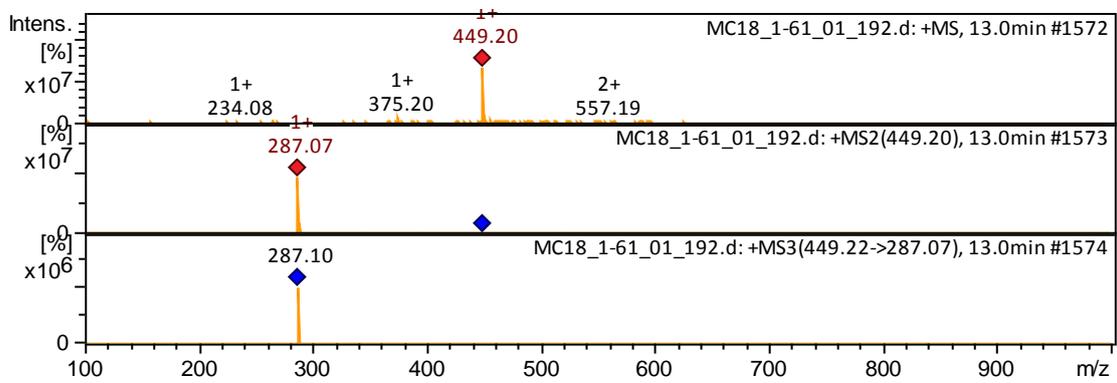


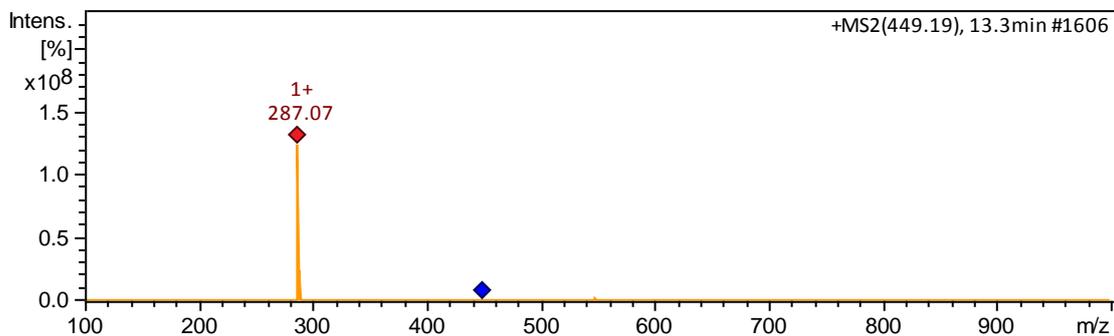
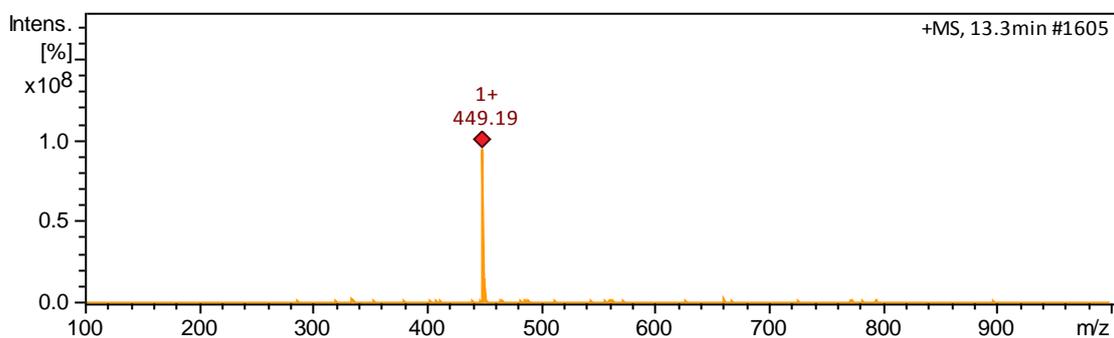
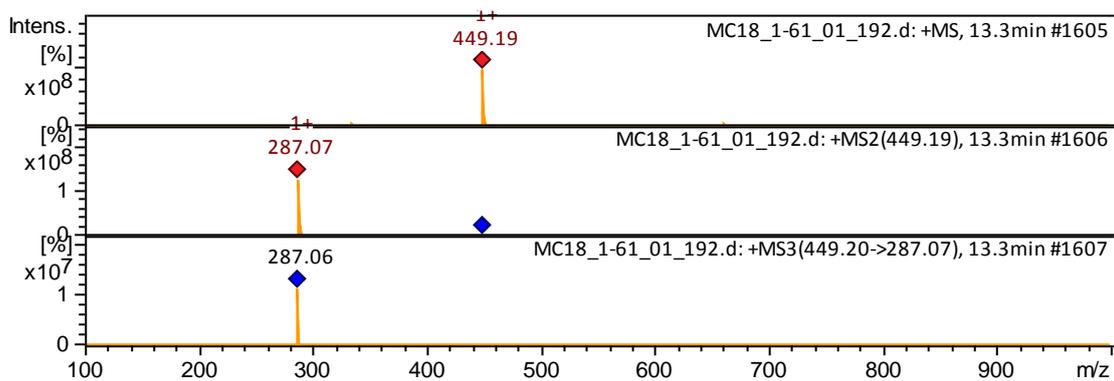
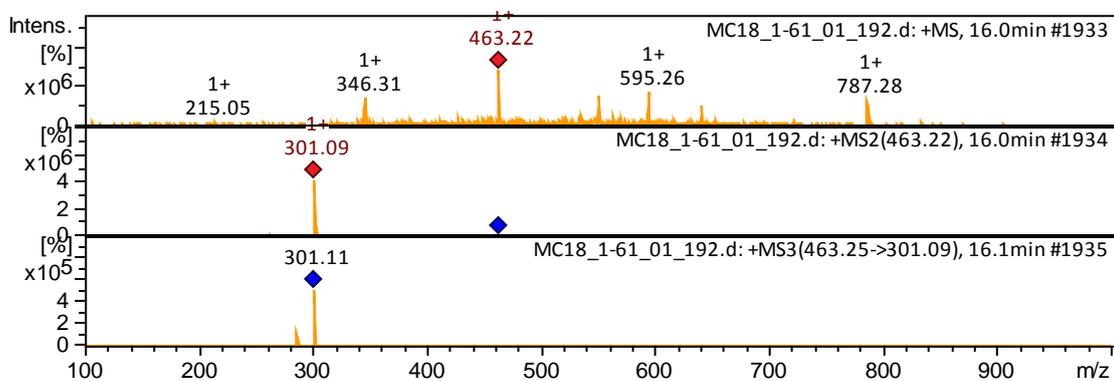
Pico 1 - Delfinidina-3-O-glicosídeo

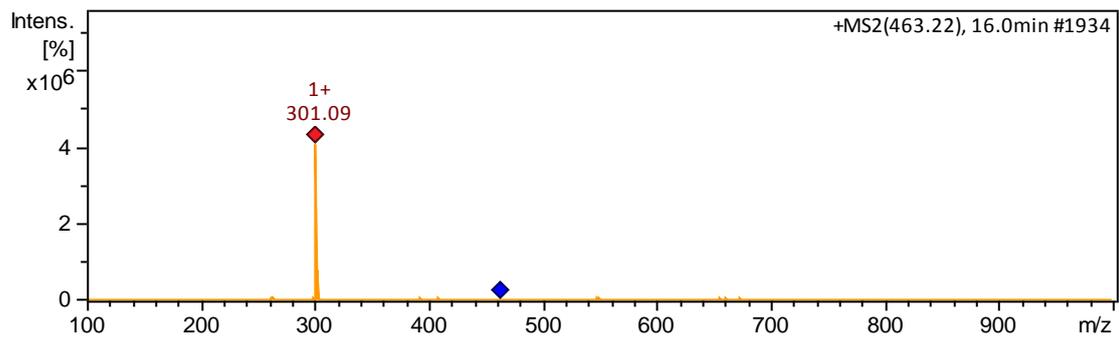
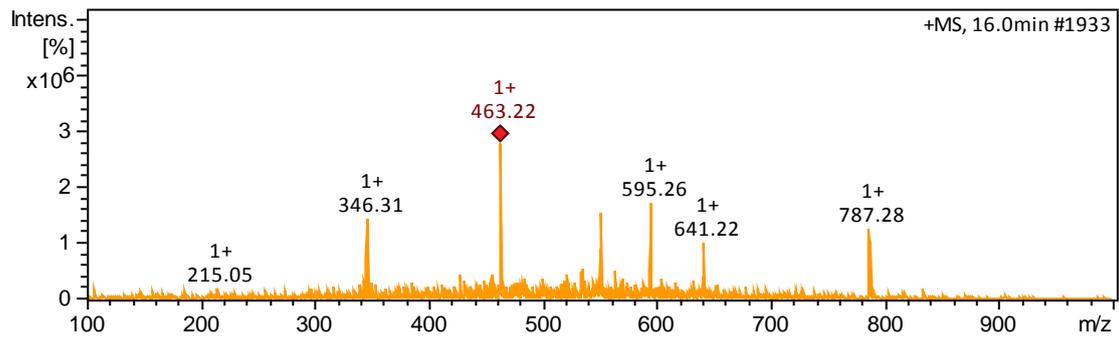




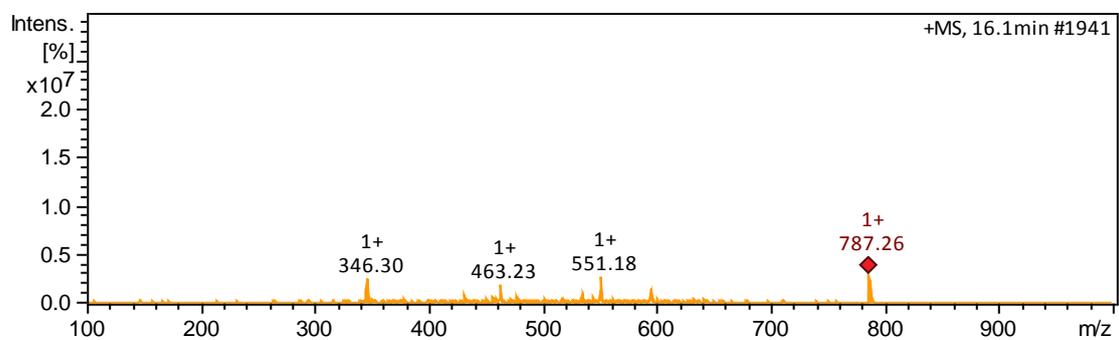
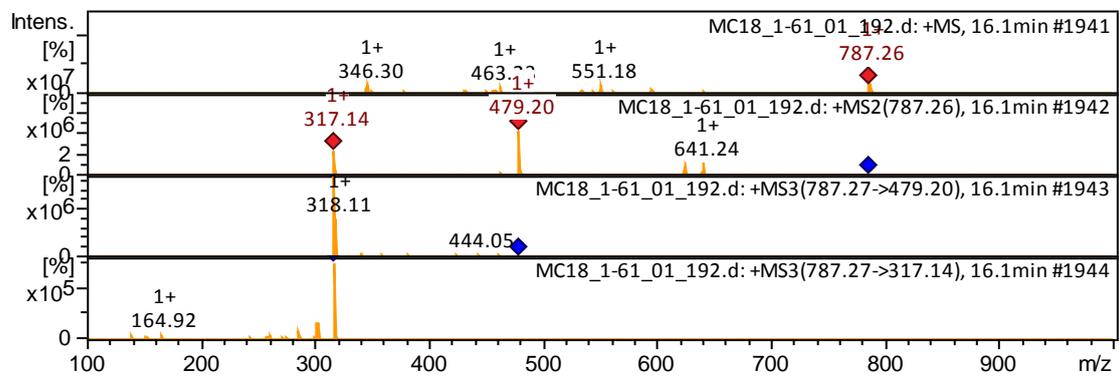
Pico 2 - Cianidina-3-O-galactosídeo

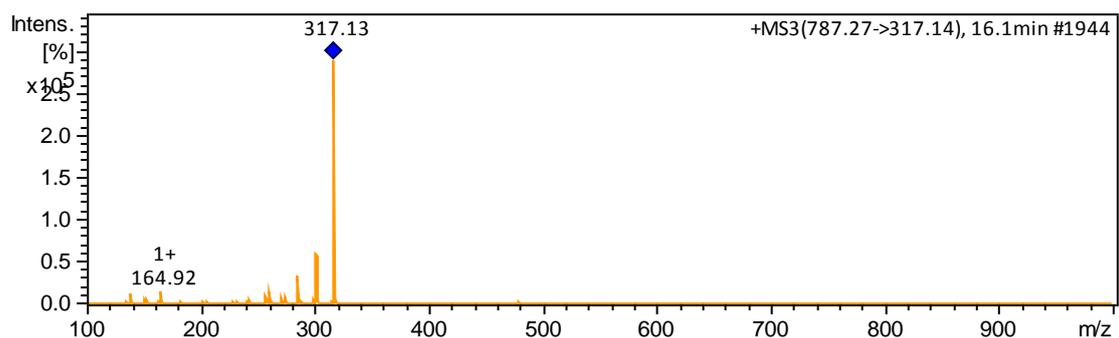
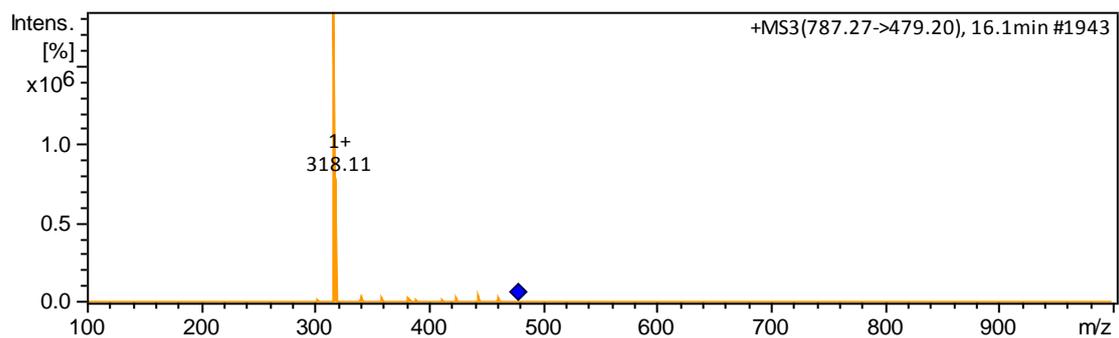
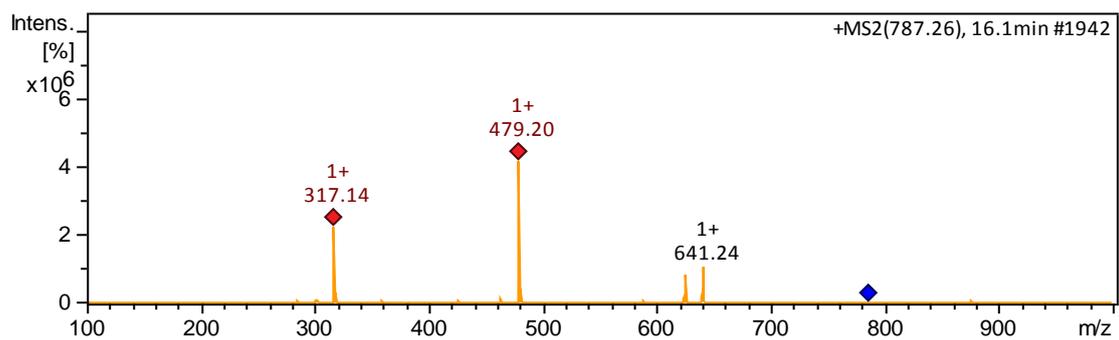


Pico 3 - Cianidina-3-O-glicosídeo**Pico 4a- Peonidina-3-O-glicosídeo**

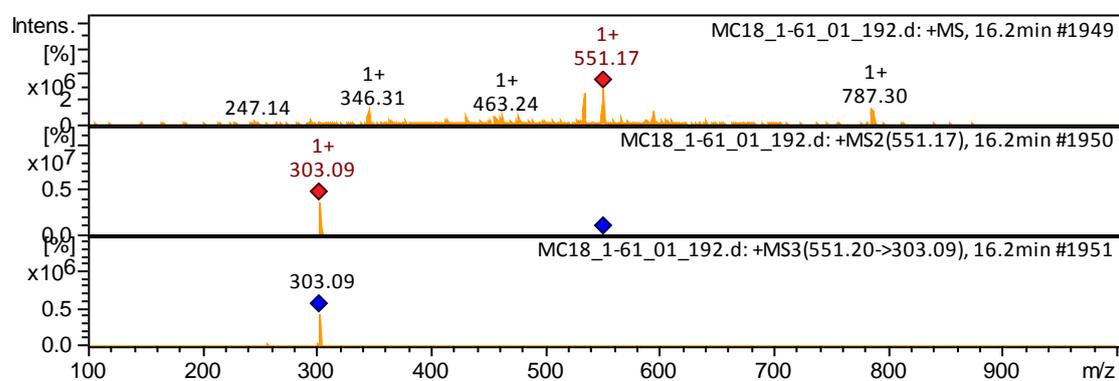


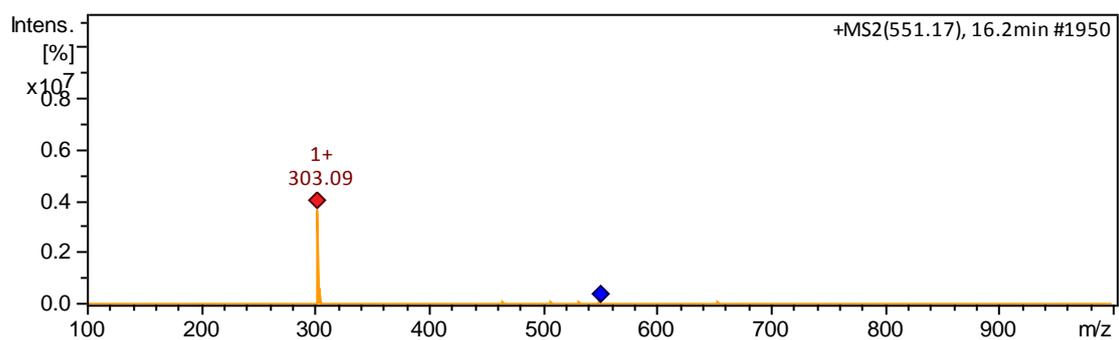
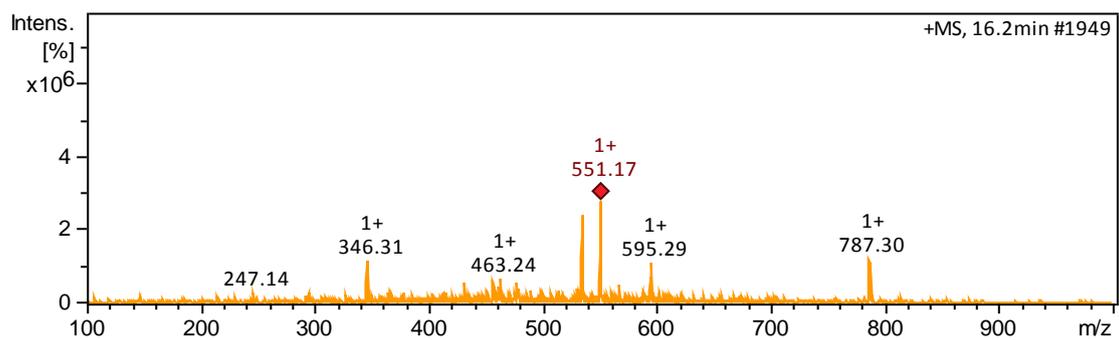
Pico 4b - Petunidina-dihexosideo-ramnosideo



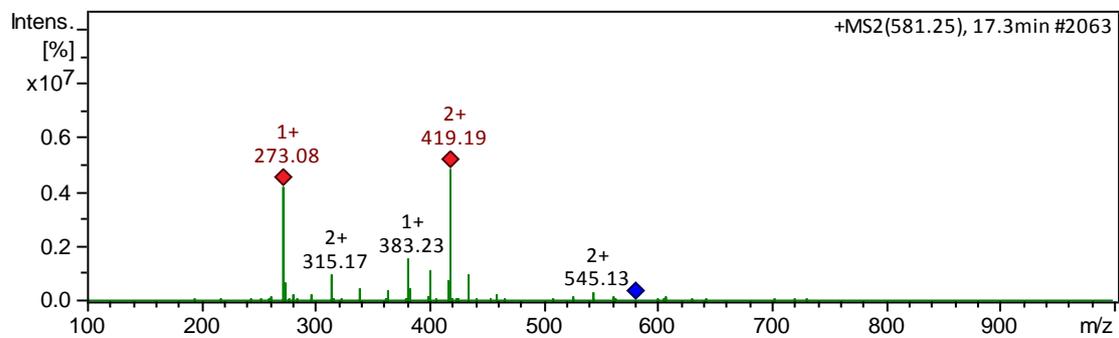
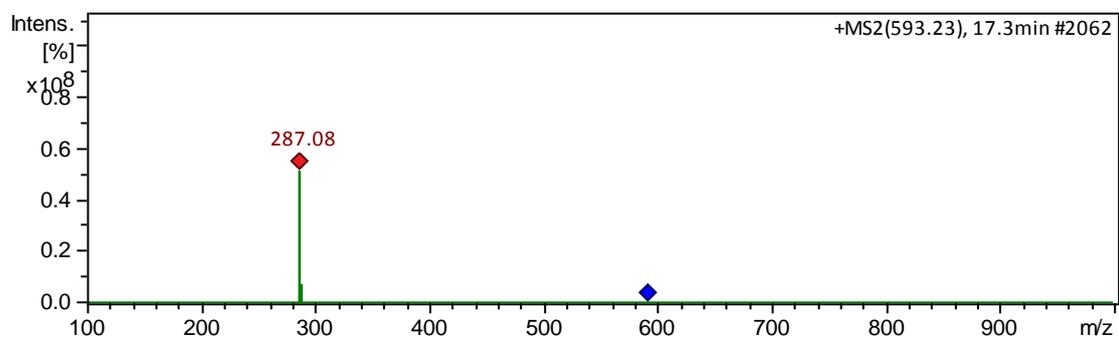


Pico 4c - Delfinidina-malonil-glicosídeo

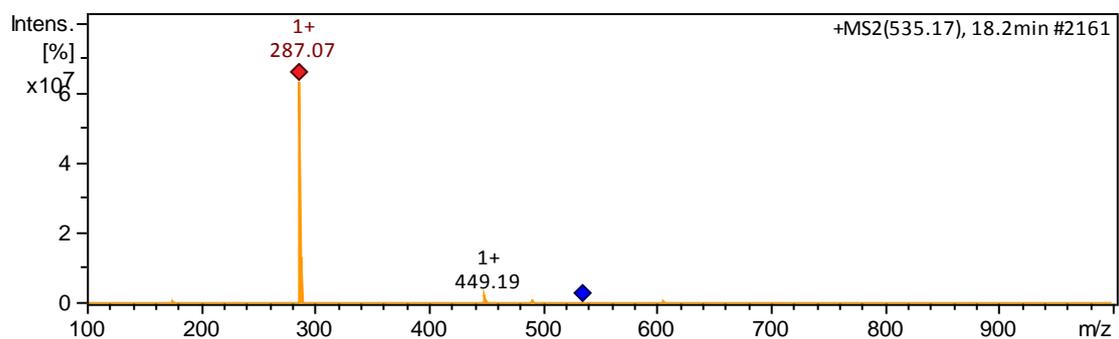
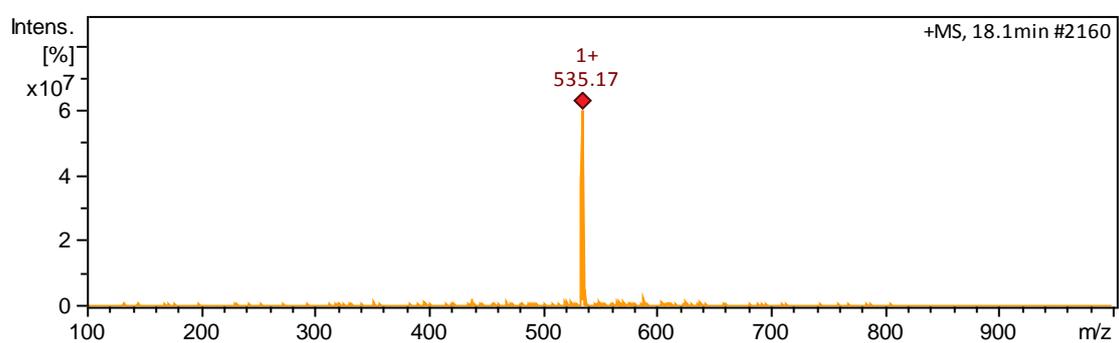
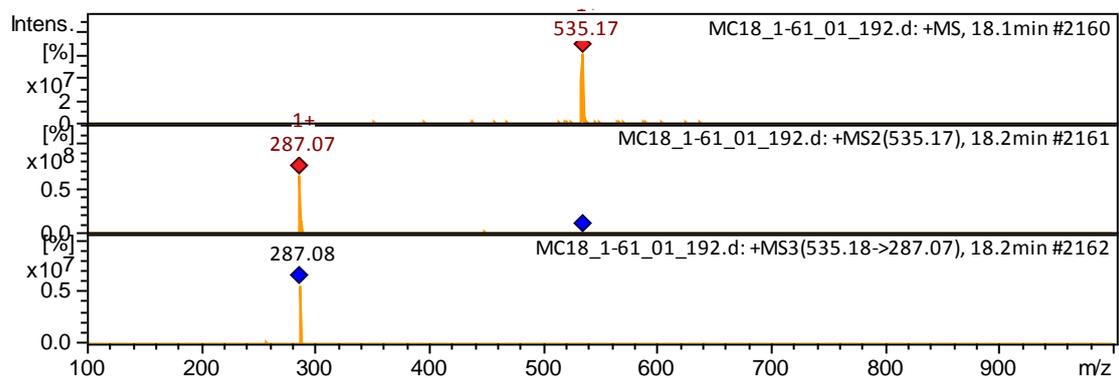




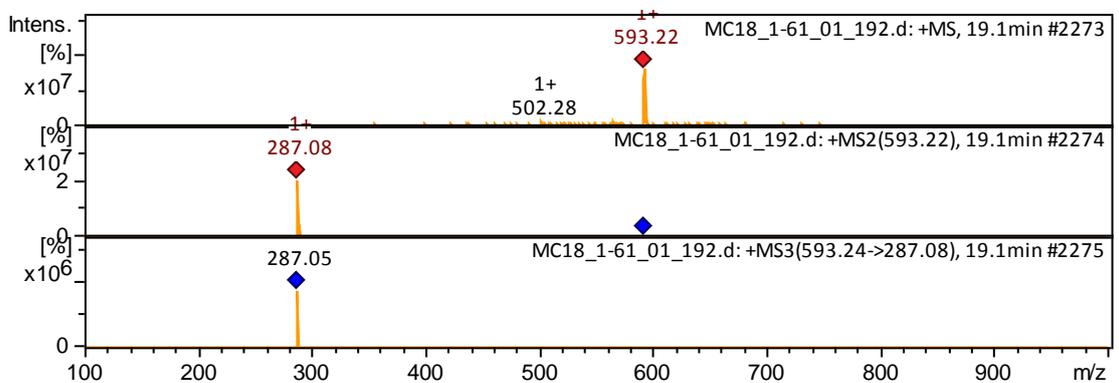
Pico 5 - Cianidina-3-O-(6''-dioxyaly) glicosideo

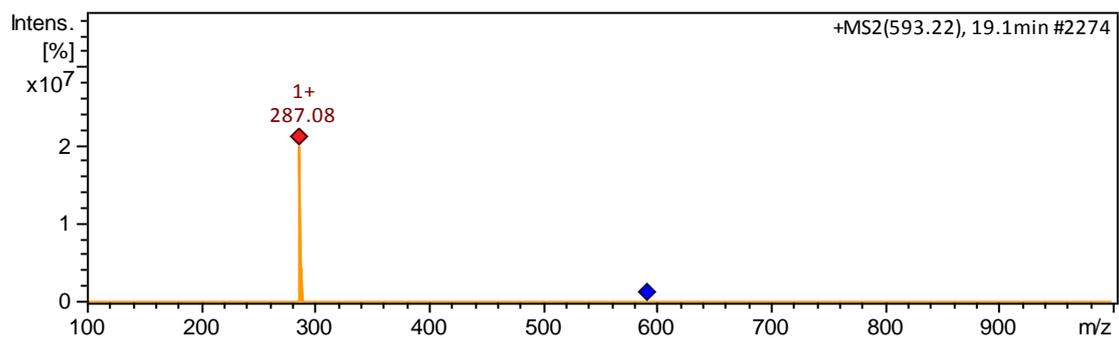
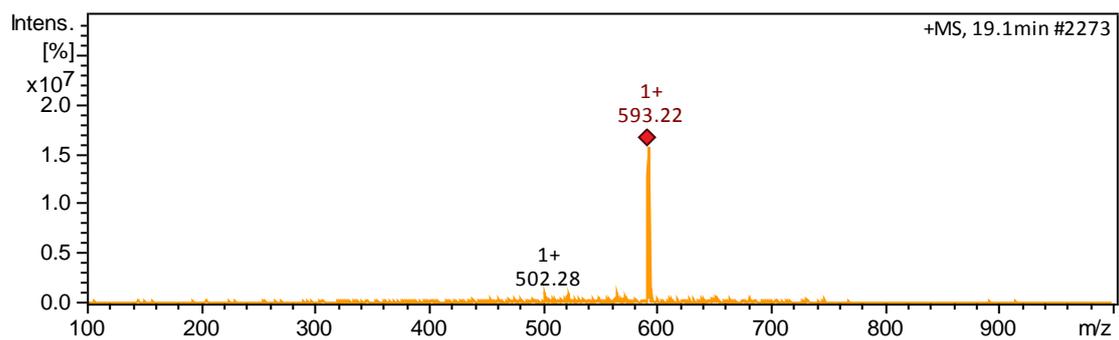


Pico 6 - Cianidina-3-O-(6''-malonil-glicosídeo)

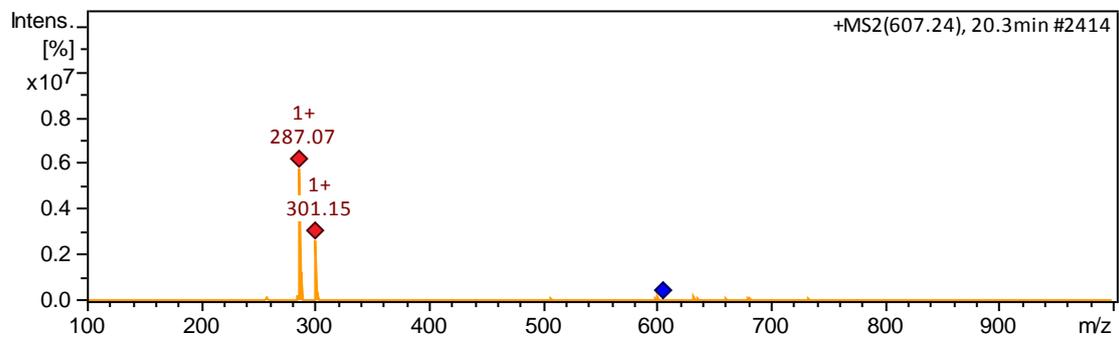
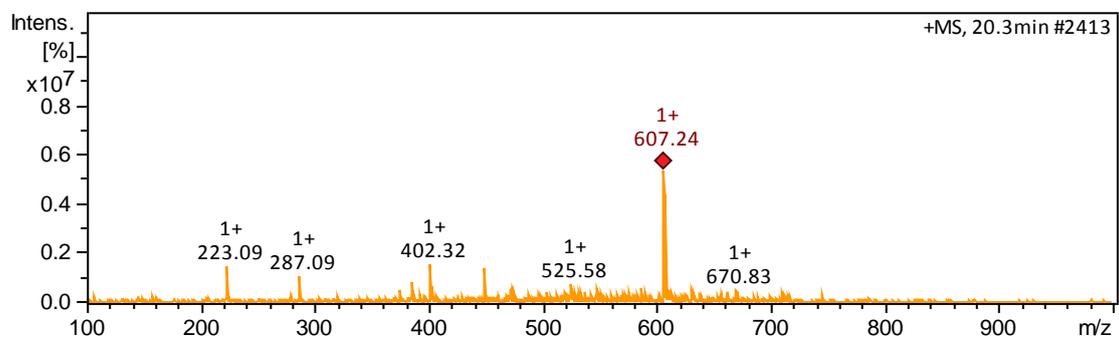


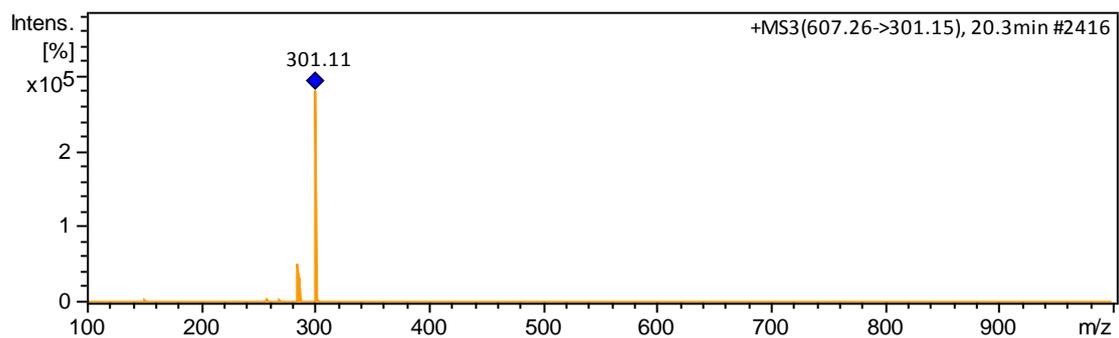
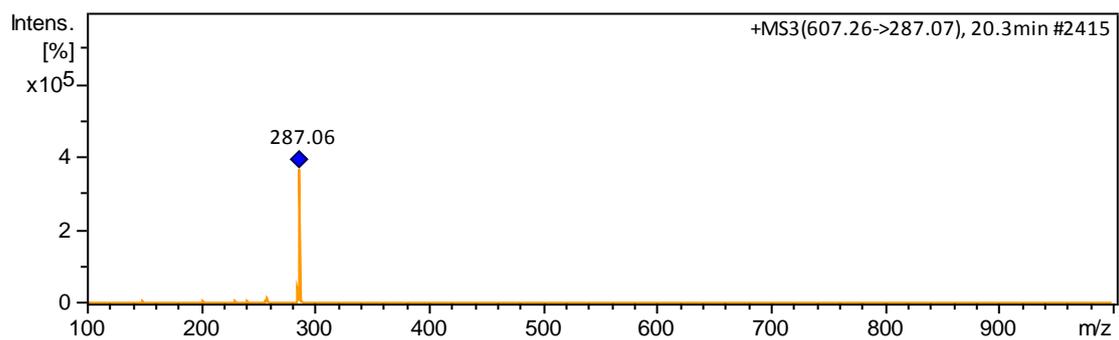
Pico 7 - Cianidina-3-O-(6''-dioxyalyl glicosídeo)



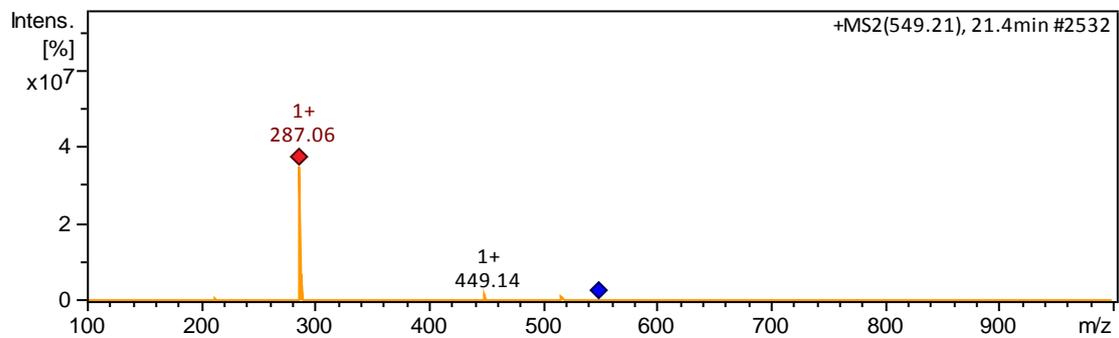
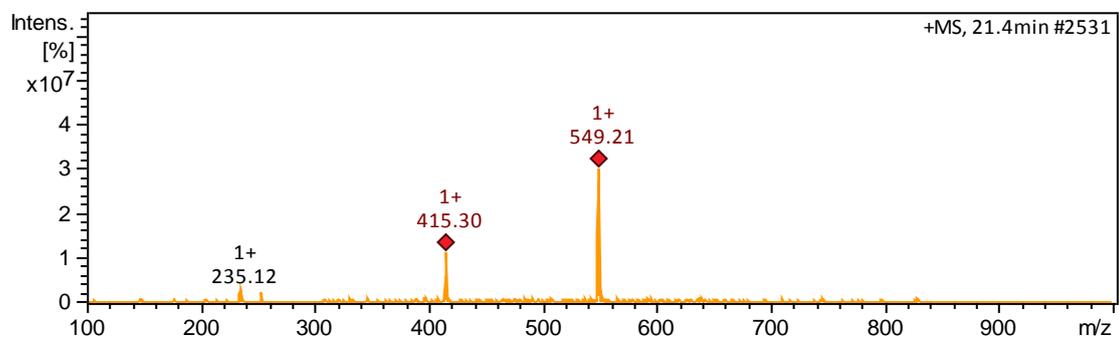


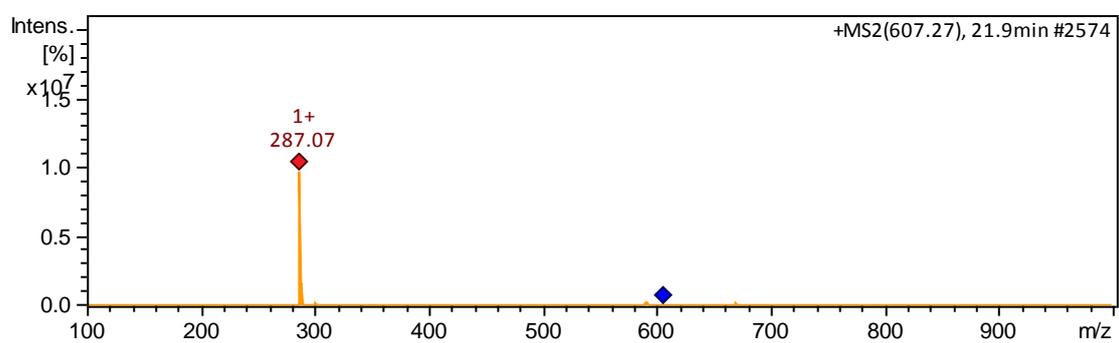
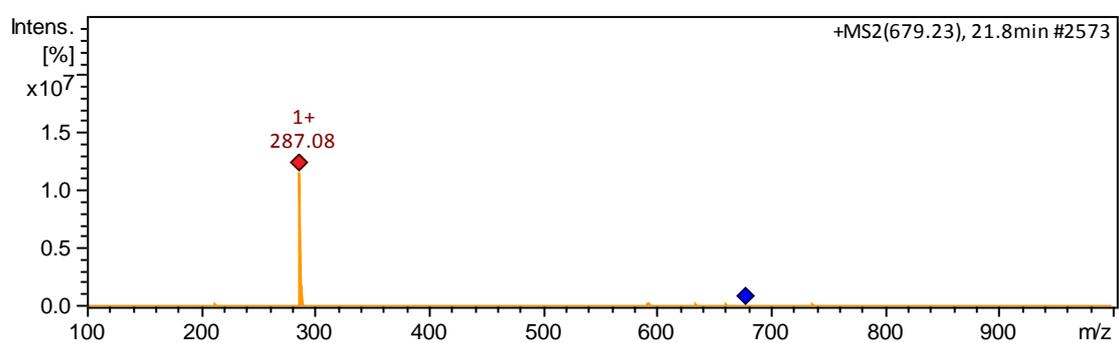
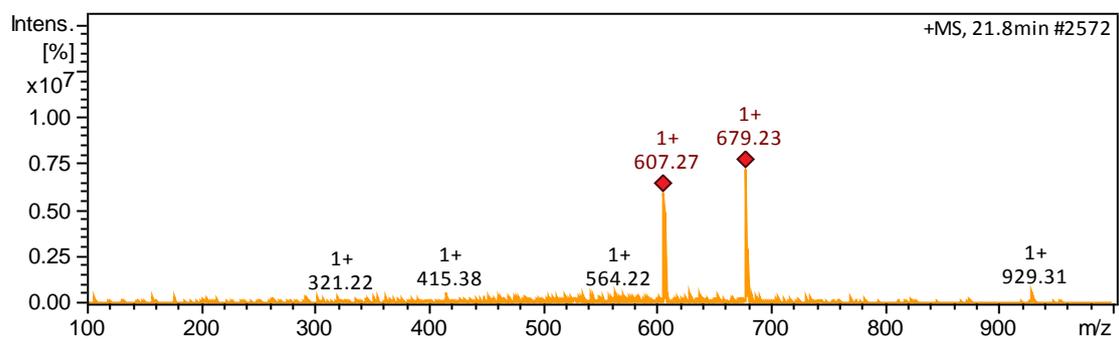
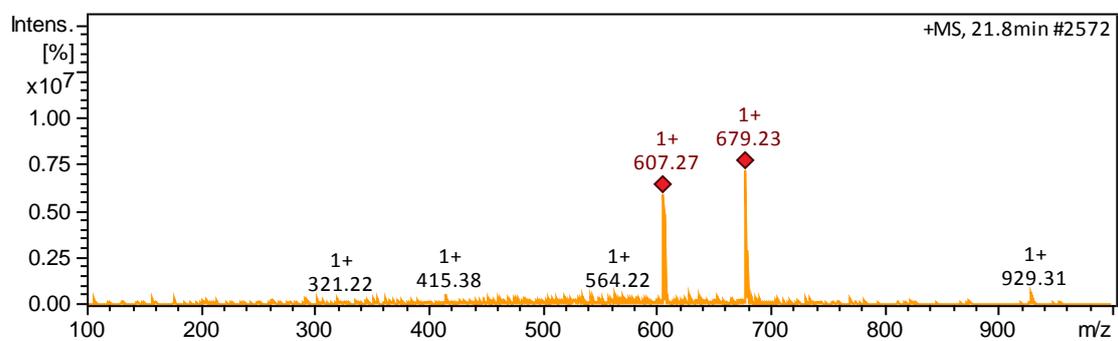
Pico 8 – Não identificado

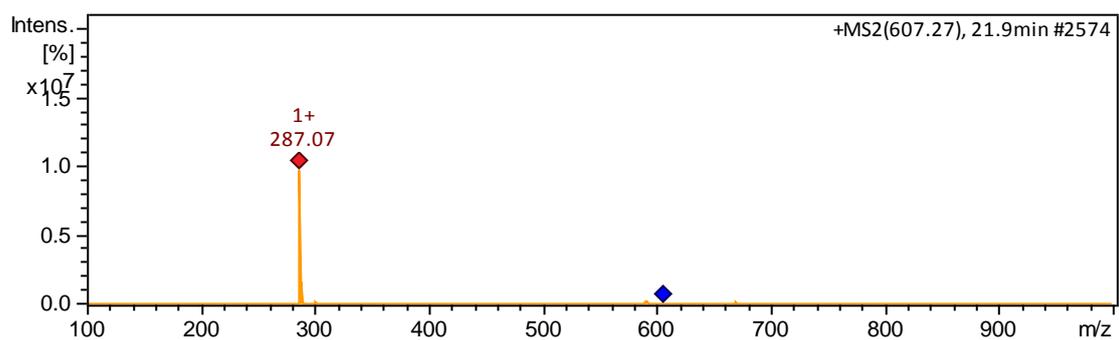
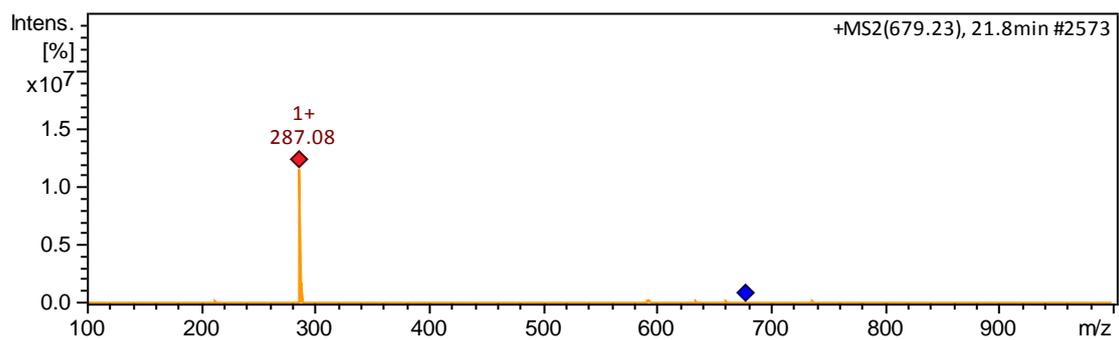




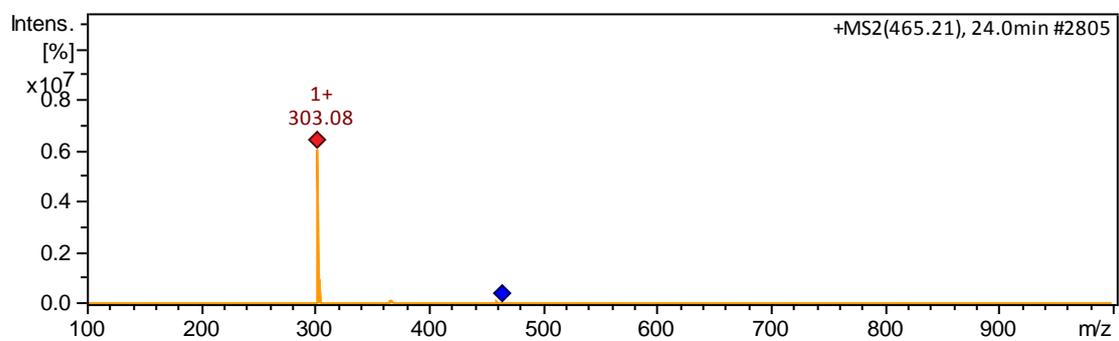
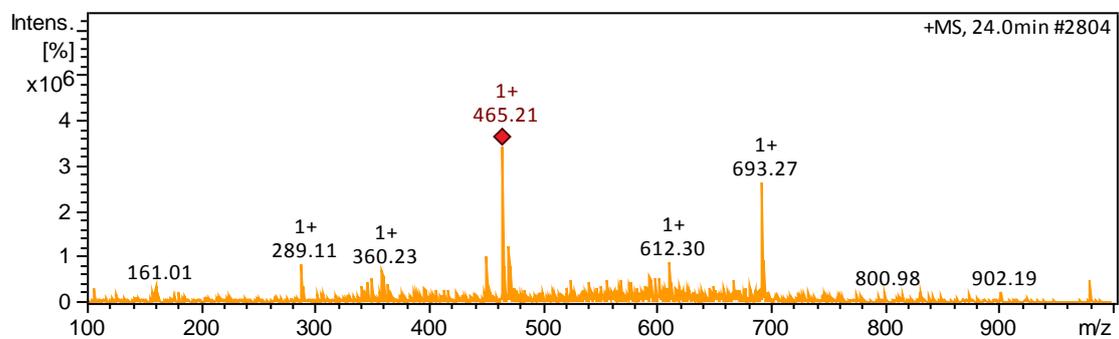
Pico 9 – Derivado de cianidina



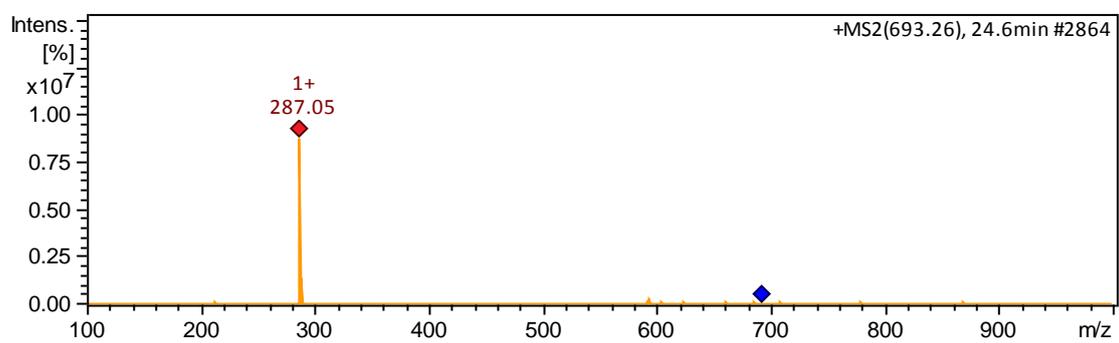
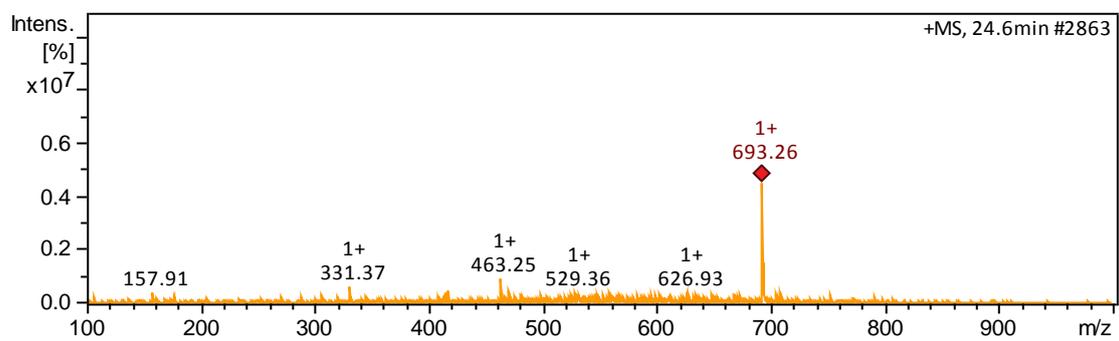
Pico 10 - Derivado de cianidina**Pico 10 b – Derivado de cianidina**



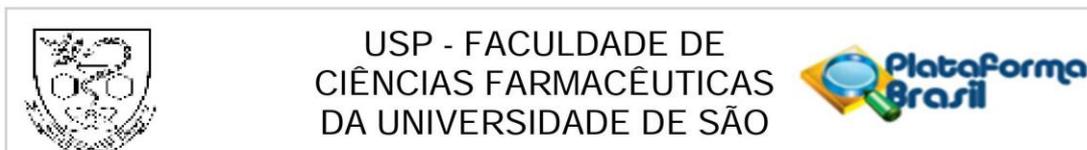
Pico 11 – Derivado de delfinidina



Pico 12 -



Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FCF)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Biodisponibilidade de flavanonas em indivíduos eutróficos e obesos

Pesquisador: Neuza Mariko Aymoto Hassimoto

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 61707116.5.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.043.272

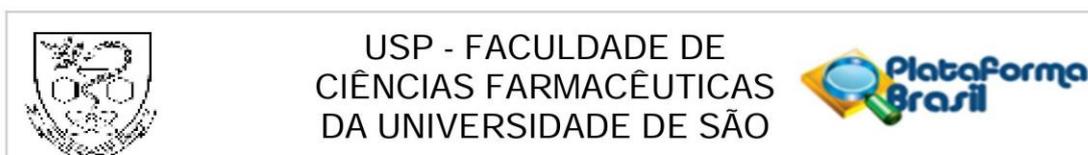
Apresentação do Projeto:

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial que envolve aspectos ambientais e genéticos. Os fatores que podem contribuir para o seu desenvolvimento são o consumo energético excessivo e o sedentarismo. Estudos estão associando a composição da microbiota intestinal à obesidade, onde, sua composição pode ser alterada tanto por fatores genéticos quanto por fatores ambientais como estilo de vida e a dieta. Assim, considerando estes fatores, há indicações em estudos que indivíduos obesos possuem microbiotas intestinais diferentes quando comparados a indivíduos eutróficos, acarretando alteração na aquisição de nutrientes e regulação energética. As flavanonas (hesperidina e narirutina) presentes quase exclusivamente em laranjas são associadas a diversos benefícios à saúde, como ação antioxidante, anti-inflamatória e hipolipidêmica. Contudo, uma vez que a ação biológica depende da biodisponibilidade destes compostos, diferenças na absorção e metabolização poderiam afetar sua ação. Neste contexto, propõe-se estudar a biodisponibilidade de flavanonas em indivíduos obesos e eutróficos.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar a biodisponibilidade dos flavonoides da laranja entre indivíduos obesos e eutróficos e sua relação com a microbiota intestinal.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



Continuação do Parecer: 2.043.272

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores, os riscos são: constrangimento causado pela coleta de sangue, urina e fezes; urinar em excesso; desconforto provocado pela picada da agulha na coleta de sangue e, para pessoas mais sensíveis, diarreia e/ou pequeno hematoma (pele arroxeadada) por até 48 h.

Os benefícios serão o acesso às informações resultantes das avaliações antropométricas, exames laboratoriais, além da contribuição para melhor entendimento sobre a biodisponibilidade dos flavonoides entre os diferentes grupos para auxiliar na compreensão da bioatividade destes compostos na promoção à saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é importante, pois as flavanonas são compostos com propriedades antioxidante, anti-inflamatória e hipolipêmica, tornando essencial o entendimento da biodisponibilidade desses compostos em indivíduos obesos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Neste adendo, a pesquisadora somente solicita a alteração no critério de inclusão dos participantes da pesquisa, dos atuais 19 aos 30 anos para a faixa dos 19 aos 40 anos. De fato, a alteração não produz riscos adicionais aos participantes do estudo, pois continuam sendo indivíduos jovens adultos. Os demais aspectos do projeto não foram alterados.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação da emenda.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_902542_E1.pdf	12/04/2017 17:42:02		Aceito
Brochura Pesquisa	projeto_19_40a.doc	12/04/2017 17:39:57	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	ADENDO.pdf	12/04/2017 17:33:37	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	carta_cep.pdf	18/01/2017 17:02:08	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 2.043.272

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado.pdf	18/01/2017 17:00:45	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	07/11/2016 13:12:59	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	Termo_Outorga_Auxilio.pdf	07/11/2016 11:06:14	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	formulario.pdf	04/11/2016 23:19:27	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	04/11/2016 23:18:26	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_equipe_participacao.pdf	04/11/2016 16:43:58	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	04/11/2016 16:33:59	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	declaracao_anuencia.pdf	04/11/2016 16:24:56	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Outros	Instrucoes_voluntarios.pdf	04/11/2016 11:23:26	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	04/11/2016 10:57:04	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	04/11/2016 10:46:40	Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 03 de Maio de 2017

Assinado por:
Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**1. Informações do Participante da Pesquisa**

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:		Nº.:
Complementos:	Bairro:	
Cidade:		Estado:
CEP:	Telefones:	

2. Título do Projeto de Pesquisa

Biodisponibilidade de flavanonas em indivíduos eutróficos e obesos
--

3. Duração da Pesquisa

2 anos

4. Nome do Pesquisador Responsável

Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto	
Cargo/ Função: Professora	Nº de registro do Conselho Regional:

5. Instituição/Instituições

Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa: Biodisponibilidade de flavanonas em indivíduos eutróficos e obesos, de responsabilidade da professora Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto e colaboração de Alessandra Harumi Nishioka, mestranda do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP.

As frutas cítricas e seus derivados, principalmente os sucos, possuem minerais, vitaminas, carotenoides e flavonoides (compostos naturais encontrados com frequência nos vegetais e frutas), que estão relacionados à promoção da saúde. Os flavonoides são divididos em cinco tipos, e uma delas é a das flavanonas, que são responsáveis pelo amargor dos sucos de laranjas.

Contudo, uma vez que a ação biológica depende da biodisponibilidade (o quanto do alimento ingerido pode ser absorvido e usado pelo corpo) desses compostos, o quanto isso poderia ser afetado se houvesse problema na absorção.

Diante disso, o presente projeto tem como objetivo comparar a absorção de flavonoides do suco de laranja entre eutróficos (peso saudável) e obesos.

O estudo será organizado em uma reunião para esclarecimento, dois encontros e um retorno para entrega de amostra, sendo considerado de risco pequeno. Os riscos que você estará exposto, caso concorde em participar são: constrangimento causado pela coleta de sangue, urina e fezes; urinar em excesso; desconforto provocado pela picada da agulha na coleta de sangue e, para pessoas mais sensíveis, diarreia e/ou pequeno hematoma (pele arroxeadada) por até 48 h.

Para participar você precisa estar em bom estado de saúde e apresentar os seguintes critérios: (a) não apresentar nenhum histórico de doença gastrointestinal (doença de Crohn, síndrome do intestino irritável, doença celíaca, úlceras ou gastrite), hepático ou renal (falha renal, síndrome nefrótica, cirrose, hepatite); (b) não ser alcoólatra; (c) não ser diabético; (d) não ser vegetariano; (e) não apresentar qualquer tipo de infecção; (f) não estar fazendo uso de suplementos vitamínicos e minerais, além de antibióticos, antiácidos ou medicamentos para diarreia ou constipação (intestino preso); (g) não ser fumante; (h) não praticar atividade física intensa; (i) gostar de suco de laranja; (j) as mulheres voluntárias não podem estar em período de gravidez, amamentação ou relatar terapia hormonal para menopausa.

PRIMEIRO ENCONTRO

No primeiro encontro, você terá suas medidas corporais avaliadas (peso, altura, circunferência da cintura, % de gordura corporal e pressão arterial) e será submetido à coleta de sangue, urina e fezes, conforme informado nas instruções que você receberá caso aceite participar do estudo.

Será solicitado que você evite ingerir maçã, goiaba, uva, ameixa e seus derivados durante três dias anteriores ao encontro e também que faça um jejum de 10 h anterior ao primeiro encontro. No dia do primeiro encontro, você irá comparecer ao local de coleta de amostra e esvaziar todo o conteúdo da bexiga. Em seguida será coletado o sangue para realização de exames bioquímicos (Colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, glicemia de jejum e creatinina), LPS plasmático e enzimas hepáticas (ALT, AST). O sangue será coletado em um tubo (4 mL), fluoreto (2 mL) e sem anticoagulante (4 mL), totalizando 10 mL de sangue. Após isso, você irá ingerir 1 copo (120 mL) de uma solução (3g de manitol + 6,25g de lactulose), em dose única e será solicitado que durante o período de 5 horas após a ingestão da solução, toda a urina seja coletada em frasco coletor a ser disponibilizado. Após 2 h da ingestão da solução, poderá ser consumido um lanche. Para a coleta de fezes, você receberá um frasco coletor de boca larga descartável e estéril.

SEGUNDO ENCONTRO

No segundo encontro (estudo da biodisponibilidade de compostos bioativos), serão coletadas amostras de toda a urina de 24 horas, conforme informado nas instruções que você receberá caso aceite participar do estudo.

Coletas de urina/ Tempo	0-4h	4-8h	8-12h	12-24h
-------------------------	------	------	-------	--------

Três dias antes do segundo encontro, você deverá retirar da sua dieta: frutas cítricas (maracujá, laranja, tangerina e limão) e seus derivados, além de chá verde e preto,

uva ou suco de uva e café. No dia anterior ao segundo encontro, terá que ser consumido um jantar padronizado em casa. Será necessário um jejum de 10 h anterior ao segundo encontro. No dia do encontro, você irá ingerir aproximadamente 10 mL/Kg (podendo sofrer uma pequena variação de acordo com a concentração de flavonoides no suco, a ser determinado) de laranja.

As coletas serão realizadas na sala de manipulação de material biológico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, em uma sala isolada, equipada e exclusiva para este fim, podendo garantir um conforto adequado para você e um adequado descarte de material biológico e de coleta. O procedimento durará cerca de 5 horas para o teste do primeiro encontro. A coleta de sangue será realizada por um técnico de enfermagem habilitado contratado para este fim.

Serão coletados 10 mL de sangue (no primeiro encontro). Todo material utilizado será descartável e estéril. Para a coleta, será realizada apenas uma picada. Posteriormente, as análises do material coletado serão realizadas no Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos da FCF/USP por métodos quantitativos apropriados (presença de compostos da laranja na urina, além do perfil de bactérias nas fezes).

É importante ressaltar que você terá livre acesso, em qualquer momento da pesquisa, às informações sobre os procedimentos e riscos relacionados a este estudo; e poderá contar com o pesquisador ou colaboradores para esclarecer eventuais dúvidas. Você tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo. Todos os dados pessoais e materiais coletado serão confidenciais e de uso exclusivo para a pesquisa em questão; somente você, o pesquisador e os colaboradores poderão ter acesso aos resultados encontrados. Não se espera nenhum efeito colateral decorrente da ingestão do suco de laranja, porém, caso surjam problemas, estes deverão ser comunicados imediatamente aos responsáveis pela pesquisa. Eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa, serão devidamente indenizados. Os benefícios serão o acesso às informações resultantes das avaliações antropométricas, exames laboratoriais, além da contribuição para melhor entendimento sobre a biodisponibilidade dos flavonoides entre os diferentes grupos para auxiliar na compreensão da bioatividade destes compostos na promoção à saúde.

A sua participação não será remunerada. Caso você tenha qualquer gasto oriundo da participação na pesquisa este será devidamente ressarcido com verba da reserva técnica.

O fornecimento do suco de laranja cessará definitivamente após a segunda etapa, não havendo obrigação de qualquer natureza da continuidade do fornecimento. Ao término do projeto, as amostras serão descartadas.

Em caso de dúvidas, intercorrências clínicas ou reações adversas, você pode entrar em contato com a pesquisadora responsável: Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto.

Endereço:

Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Av. Prof. Lineu Prestes, 580
Bloco 14, CEP 05508-900 - São Paulo, SP, Brasil
Fone: +55-11-3091-0128 / E-mail: aymoto@usp.br

Ou com a pesquisadora colaboradora: Alessandra Harumi Nishioka

Celular (11) 8462-7819 / E-mail: anishioka@usp.br

Uma via deste termo deverá ser entregue a você e outra via ficará com o pesquisador responsável pelo tempo de 5 (cinco) anos.

Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante da Pesquisa

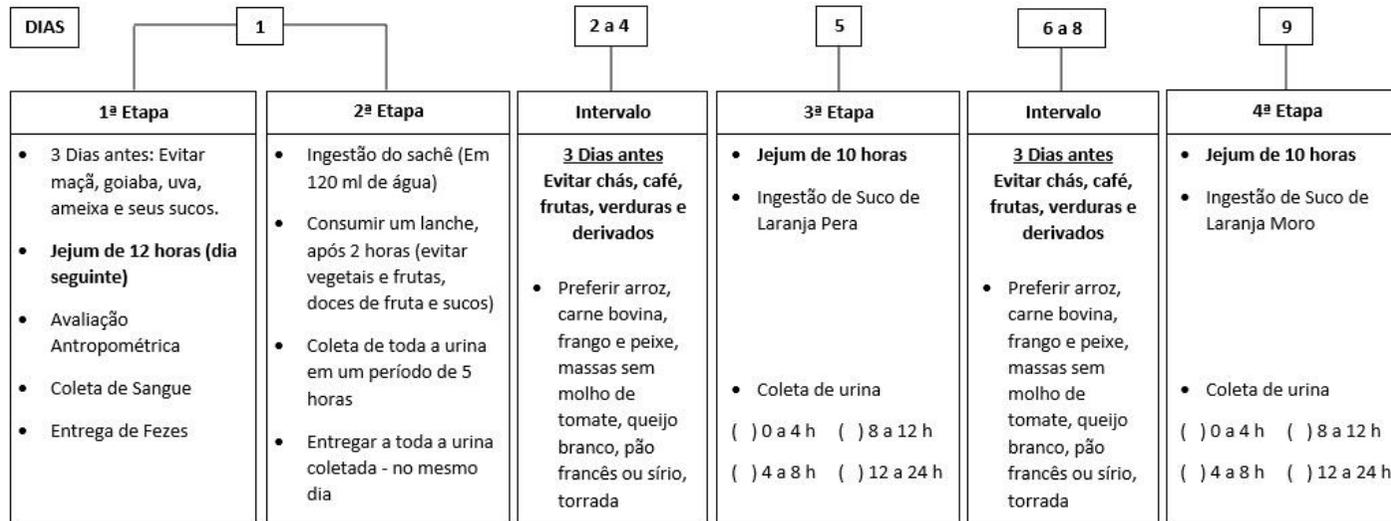


Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** da **Universidade de São Paulo**: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP 05508-000, Telefones 3091-3622 e 3091-3677, e-mail: **cepcf@usp.br**.

Anexo 5 – Instruções sobre o ensaio experimental

INSTRUÇÕES



<p><u>Você receberá:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Frasco Coletor de Urina Frasco Coletor de Urina 24 horas Frasco coletor de Fezes Sachê 	<ul style="list-style-type: none"> Não há necessidade de encher o frasco coletor de fezes. Após a coleta das fezes certificar que o frasco encontra-se bem fechado, em seguida, higienizar as mãos e colocar o frasco dentro de um saco plástico fechando-o. Colocar na geladeira devidamente embalado e protegido evitando contato com os alimentos. Pode-se coletar a qualquer hora do dia, trazendo as fezes ao laboratório em até 12 h após coleta. Os frascos de urina deverão ser armazenados em geladeira. CONTATO: anishioka@usp.br / (11) 9 8462-7819
--	---

Anexo 6 – Formulário para coleta de dados dos voluntários

FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS

DATA: ____/____/____

Nome: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

E-mail: _____

Telefone: _____

Celular: _____

Endereço: _____

1. Você tem ou teve algumas dessas doenças citadas abaixo:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Pressão alta | <input type="checkbox"/> Doença na tireoide Qual? _____ |
| <input type="checkbox"/> Diabetes | <input type="checkbox"/> Câncer Qual? _____ |
| <input type="checkbox"/> Colesterol alto | <input type="checkbox"/> Doenças respiratórias Qual? _____ |
| <input type="checkbox"/> Doenças renais | <input type="checkbox"/> Doenças gastrointestinais Qual? _____ |
| <input type="checkbox"/> Depressão | |

Outras: _____

2. Alguém da sua família (pai, mãe, irmãos, avós) já teve algumas destas doenças abaixo:

- | | |
|--|----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Ataque cardíaco | <input type="checkbox"/> Derrame |
| <input type="checkbox"/> Hipertensão | <input type="checkbox"/> Câncer |
| <input type="checkbox"/> Diabetes | |

Outras: _____

3. É vegetariana?

- Sim
 Não

4. É fumante?

- Sim
 Não

5. Você está atualmente grávida ou amamentando?

- Não
 Sim (grávida)
 Sim (amamentando)

6. Uso de medicações:

- Sim. Quais: _____
 Não

7. Prática atividade física?

- Sim Não

(Se sim) quantos dias da semana você pratica essa atividade

- 1 dia 3 dias
 2 dias Mais que 4 dias Quantos: _____

Qual a duração da atividade física: _____

8. Consome bebidas alcóolicas?

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Bebe 1 a 3 vezes por semana |
| <input type="checkbox"/> Não | <input type="checkbox"/> Bebe 4 a 6 vezes por semana |
| <input type="checkbox"/> Bebe diariamente | <input type="checkbox"/> Bebe raramente |

9. Faz uso de suplementação?

- Sim . Quais: _____
 Não

Preenchimento pela pesquisadora:

Peso: _____

Altura: _____

IMC: _____

Diagnóstico: _____

Dobra Cutânea Tricipital: _____

Dobra Cutânea Bicipital: _____

Circunferência cintura: _____

% Gordura corporal: _____

Diagnóstico: _____

Pressão arterial: _____

Dobra Cutânea Supra-ilíaca: _____

Dobra Cutânea Subescapular: _____

Anexo 7 – Ficha do Aluno

22/01/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 10078736/1 - Alessandra Harumi Nishioka

Email: anishioka@usp.br
Data de Nascimento: 03/11/1992
Cédula de Identidade: RG - 17.239.042 - MG
Local de Nascimento: Estado de Minas Gerais
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharela em Nutrição - Universidade Federal de Alfenas - Minas Gerais - Brasil - 2015

Curso: Mestrado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Bromatologia
Data de Matrícula: 01/08/2016
Início da Contagem de Prazo: 01/08/2016
Data Limite para o Depósito: 01/02/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Neuza Mariko Aymoto Hassimotto - 01/08/2016 até o presente. Email: aymoto@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 01/08/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 27/09/2017
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 01/08/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

Impresso em: 22/01/2019 10:34:50

22/01/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 10078736/1 - Alessandra Harumi Nishioka

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMF5885-1/2	Da Administração ao Sítio de Ação: Princípios de ADME e Farmacocinética (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	29/08/2016	02/10/2016	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBA5754-1/3	Atualização em Ciências Farmacêuticas	26/09/2016	02/10/2016	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5753-1/2	Nutrigenômica e Programação das Doenças Crônicas Não-Transmissíveis	26/09/2016	02/10/2016	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5874-6/2	Química e Análise dos Alimentos Lipídicos	01/11/2016	12/12/2016	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5905-1/1	Planejamento Experimental e Análise Multivariada	13/02/2017	26/02/2017	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBA5899-3/1	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	01/03/2017	11/04/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5788-1/2	Aplicação de Alimentos Probióticos na Modulação de Imunidade de Mucosas	06/03/2017	26/03/2017	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5711-3/1	Redação de Trabalhos Científicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	07/03/2017	10/04/2017	45	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBA5728-4/4	Aprimoramento Pedagógico	30/05/2017	26/06/2017	60	4	87	A	N	Concluída
ICB5711-3/2	Redação de Trabalhos Científicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	01/08/2017	04/09/2017	45	3	100	A	N	Concluída
BMF5885-1/3	Da Administração ao Sítio de Ação: Princípios de ADME e Farmacocinética (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	14/08/2017	17/09/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5896-7/2	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição II	17/11/2017	25/01/2018	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5906-2/1	Análise de Dados de Microbioma	26/02/2018	08/04/2018	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	35
Estágios:			
Total:	0	25	35

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

Impresso em: 22/01/2019 10:34:50

Anexo 8 – Currículo Lattes

22/01/2019

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Alessandra Harumi Nishioka)



Alessandra Harumi Nishioka

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1086813595289029>
Última atualização do currículo em 17/05/2018

Mestranda em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (2016). Graduação em Nutrição pela Universidade Federal de Alfenas (2015). Bolsista de Iniciação Científica pelo PIBICT/FAPEMIG, sob orientação da Professora Dra. Flávia Della Lucia (2014-2015). **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Alessandra Harumi Nishioka
Nome em citações bibliográficas	NISHIOKA, A. H.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Avenida Professor Lineu Prestes Butantã 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30913007 Ramal: 3647
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2016	Mestrado em andamento em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Estudo comparativo da excreção de flavonoides de sucos de laranja, cv. Pera e cv. Moro, entre indivíduos eutróficos e obesos, Orientador: Neuza Mariko Aymoto Hassimoto. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: flavanonas; hesperidina; naringina; absorção; suco de laranja. Grande área: Ciências Agrárias Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos.
2011 - 2015	Graduação em Nutrição. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Brasil. Título: Desenvolvimento de cookie a base de iogurte enriquecido com farinha de resíduos de uva. Orientador: Flávia Della Lucia.

Formação Complementar

2016 - 2016	Bioestatística. (Carga horária: 16h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
--------------------	--

Atuação Profissional

Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Brasil.

Vínculo institucional
2014 - 2015

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluna de Iniciação Científica, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Modalidade de Bolsa: PIBICT/FAPEMIG - Plano de Trabalho: Avaliação sensorial de berinjela minimamente processada com utilização de revestimento comestível e

antioxidante.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2016 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluna de Mestrado, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Modalidade de Bolsa: CNPq - Plano de Trabalho: Estudo comparativo da excreção de flavonoides de sucos de laranja, cv. Pera e cv. Moro, entre indivíduos eutróficos e obesos

Projetos de pesquisa

2014 - 2015

Avaliação sensorial de berinjela minimamente processada com a utilização de revestimento comestível e antioxidante.

Descrição: A berinjela (*Solanum melongena*) é um fruto solanáceo originário da Índia e da China. O processamento mínimo de vegetais é a operação que elimina partes não comestíveis como cascas, talos e sementes. Objetivou-se avaliar a aceitabilidade de berinjelas minimamente processadas frente à utilização de revestimentos comestíveis fécula de mandioca em associação com o ácido cítrico após o preparo em calor seco..

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

2013 - 2014

Desenvolvimento de cookie à base de iogurte enriquecido com farinha de resíduos de uva
 Descrição: O consumo de iogurte natural está diretamente ligado aos benefícios que este derivado lácteo traz ao organismo, tais como: aumenta a disponibilidade de vitaminas no intestino; facilita a ação das proteínas e enzimas digestivas; facilita a absorção de cálcio, fósforo e ferro; é fonte de galactose; importante na síntese de tecidos nervosos. A Farinha de Uva (FU) possui um alto teor de fibras assim como alta quantidade de flavonóides, e é também um dos melhores antioxidantes, favorecendo o combate aos radicais livres e reduzindo risco de doenças degenerativas. Foram desenvolvidas formulações de biscoito tipo cookie realizando-se substituições de 2, 4, 6, 8 e 10% da quantidade de farinha de trigo da formulação base pela FU. Em relação ao perfil nutricional dos biscoitos tipo cookie, os cálculos mostraram que, conforme se aumentou a quantidade de FU, houve decréscimo calórico e aumento no teor de fibras. Conclui-se que a adição da FU na formulação de biscoitos tipo cookies à base de iogurte representa incremento significativo no teor de fibras, recomendando-se formulações em até 6% de FU, visto que esta apresenta resultados satisfatórios em sua aceitabilidade..

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Áreas de atuação

1.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição.

Produções

Produção bibliográfica

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. I International Symposium on Citrus Bioactive Compounds and Health Benefits. 2018. (Simpósio).
2. 2nd FoRC International Symposium Advances in Food Science and Nutrition. 2017. (Simpósio).
3. Cromatografia: Aspectos práticos de seleção de colunas de HPLC, GC e preparo de amostra. 2017. (Seminário).
4. XVI Evento da Série de Workshops Internacionais sobre Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde - Alimentos Funcionais e Compostos Bioativos: Avanços Científicos, Perspectivas e Desafios?. 2017. (Outra).
5. 51ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. Simpósio de Alimento, Nutrição e Doenças Crônicas. 2016. (Simpósio).
6. Compostos Bioativos dos Alimentos. 2016. (Seminário).
7. II Metabolic Programming Workshop. 2016. (Outra).
8. ILSI Brasil - 15º Workshop "Microbioma, Probióticos e Saúde". 2016. (Congresso).
9. 5ª Conferência Municipal de Saúde de Carmo do Rio Claro/MG. Saúde Pública de qualidade para cuidar bem das pessoas: direito do povo brasileiro. 2015. (Outra).
- 10.

- Seminário de Iniciação Científica - SIC/2014.AVALIAÇÃO DA QUALIDADE NO PREPARO DE BERINJELA MINIMAMENTE PROCESSADA COM UTILIZAÇÃO DE REVESTIMENTO COMESTÍVEL E ANTIOXIDANTE. 2014. (Seminário).
- 11.** Seminário de Iniciação Científica - SIC/2014.DESENVOLVIMENTO DE COOKIE À BASE DE IOGURTE ENRIQUECIDO COM FARINHA DE RESÍDUOS DE UVA. 2014. (Seminário).
- 12.** VIII Semana da Nutrição: "Nutricionista o que te motiva a ser nutricionista".VIII Semana da Nutrição: "Nutricionista o que te motiva a ser nutricionista". 2011. (Outra).