

## PASSIFLORA: FERMENTAÇÃO COLÔNICA *IN VITRO* DE COMPOSTOS FENÓLICOS

**Autora: Thais Mie Ando de Mello Araujo**

**Isabella de Araújo Esteves Duarte**

**Eric de Castro Tobaruela**

**Orientadora: Neuza Mariko Aymoto Hassimotto**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

andothais@usp.br

### Objetivos

A *Passiflora tenuifila*, conhecida como maracujá-alho, é uma espécie encontrada no Cerrado e na Mata Atlântica. Dentre os compostos fenólicos presentes, a classe flavan-3-ol é a majoritária, principalmente dímeros de proantocianidinas (Santos et al., 2021). A ingestão de flavan-3-ol é associada a diversos efeitos benéficos à saúde. Contudo, considerando a biodisponibilidade das proantocianidinas, a bioatividade está relacionada principalmente aos catabólitos formados pela microbiota intestinal, e não como sua estrutura originalmente presente na matriz alimentar (Mena et al., 2019; Ruotolo et al., 2020; Mele et al., 2017; Angelino et al., 2019; Rodriguez-Mateos et al., 2018). Considerando que a *Passiflora tenuifila* é rica em compostos fenólicos, principalmente as proantocianidinas e flavonas C-glicosiladas, e sua biodisponibilidade depende principalmente da ação da microbiota intestinal, a hipótese do presente projeto é que os diferentes perfis de microbiota podem interferir no perfil e na quantidade de catabólitos bioativos formados. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a metabolização dos compostos fenólicos da *P. tenuifila* a partir de dois perfis de microbiota

distintos em modelo de fermentação colônica *in vitro*.

### Métodos e Procedimentos

A farinha liofilizada dos frutos do maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip), colhidos no estágio maduro, foi doada pela Dra. Ana Maria Costa, pesquisadora da Embrapa Cerrados. O extrato de compostos fenólicos foi obtido pela extração da farinha de maracujá-alho com metanol 70%, seguida de extração em fase sólida em coluna de poliamida. O resíduo seco foi ressuscitado em água Milli-Q.

O critério de semelhança/discrepância entre os perfis de microbiota foi definido pela razão Firmicutes/Bacteroidetes (F/B), de modo que o perfil de microbiota 1 (n=2 voluntários) tivesse razão F/B inferior ao perfil de microbiota 2 (n=2 voluntários). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCF (CAAE 64071122.0.0000.0067).

A digestão *in vitro* foi realizada segundo método descrito por Gião et al. (2012). As amostras fecais de 4 doadores (n=2, dois perfis de microbiota) foram incubadas a 37 °C, sob agitação (200 rpm) por um período de 24h. Aos frascos foram acrescidos 220 mg de farinha de maracujá, que equivale a 0,4086 mg de proantocianidina, ou 250 uL de extrato fenólico,

equivalente a 1,111 mg de proantocianidinas. A medição dos parâmetros pH e pressão, além da obtenção do meio de fermentação foram realizados nos tempos 0h, 5h, 12h e 24h. Uma “Amostra Branco” contendo apenas o meio de cultura sem a farinha ou extrato fenólico, além de uma “Amostra Controle” contendo o meio de cultura e o inóculo fecal também foram preparados. A fermentação foi realizada em triplicata, ou seja, cada tempo foi composto por três frascos.

A identificação dos compostos fenólicos e seus catabólitos após fermentação foi realizada por LC-qTOF-MS/MS, de acordo com protocolo previamente descrito (Fraga et al., 2021). De forma geral, as amostras foram então analisadas utilizando cromatógrafo líquido (modelo Prominence, Shimadzu, Japan) acoplado ao espectrômetro de massa do tipo qTOF (modelo Compact, Bruker Daltonics, Alemanha). As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Poroshell 120 C18 (100 x 3,0 mm), 2,7µm (Agilent, Palo Alto, CA, USA), com fluxo 0,5 ml/min e temperatura de coluna de 25 °C. A corrida cromatográfica foi realizada com um gradiente de solventes: solvente (A), água/ ácido fórmico (99:1, v/v) e solvente (B), acetonitrila. A corrida foi monitorada a 270 e 370 nm. A identificação e quantificação dos metabólitos foi realizada no software MetaboScape (Bruker). Os padrões internos foram utilizados para a correção do TR em cada amostra, sendo eles a genistina e quercetina 3 4' di-O-glicosídeo.

A análise dos AGCCs foi realizada segundo método descrito por Garcia-Villalba *et al.* (2012). A CG-MS foi realizada em cromatógrafo a gás (Hewlett–Packard 6890-Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA). Foi utilizada a coluna CPWAX 7747 (25 m x 0.32 µm x 0.25 µm i.d.). A temperatura do injetor foi de 250 °C. O programa de temperatura para a corrida cromatográfica foi de 20 °C/min de 50 °C a 180 °C, seguida de uma rampa de 35 °C/min para 200 °C e uma elevação final de 50 °C/min para 250 °C, mantida por 4 min. A temperatura de interface entre o cromatógrafo e o detector de massas foi de 280°C e ionização por impacto de

elétrons (70 eV) com a temperatura da fonte de ion mantida a 230°C. Os softwares GC-MS Translator (Agilent Technologies) e MassHunter foram utilizados para o processamento de dados. Os compostos foram identificados e quantificados pela direta comparação com a solução padrão de uma mistura de AGCC (Sigma-Aldrich, Product ID CRM46975). Cada pico foi integrado e normalizado pelo padrão interno.

## Resultados

A metabolização das proantocianidinas pelas bactérias da microbiota ocorreu ao longo das 24h, sendo que diferenças estatísticas foram observadas entre o Perfil de microbiota 1 e 2, com maior degradação observada para o Perfil 2, para ambos os substratos farinha e extrato fenólico, como mostra a Figura 1:

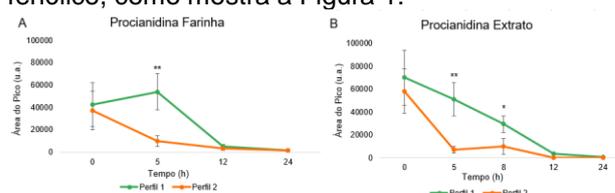


Figura 1: Concentração relativa de proantocianidinas durante a fermentação da farinha liofilizada (A) e do extrato fenólico de *P. tenuifolia* (B), com dois diferentes inóculos fecais.

Dentre os metabólitos encontrados, destaca-se a formação de (epi)catequina ([M-H]- *m/z* 289), 5-(3',4'-dihidroxifenil)-γ-valerolactona ([M-H]- *m/z* 207), ácido 3,4-dihidroxifenil acético ([M-H]- *m/z* 167) e ácido protocatecuico ([M-H]- *m/z* 153). O Perfil 2 apresentou produção superior de (epi)catequina em relação ao perfil 1, como mostra a Figura 2:

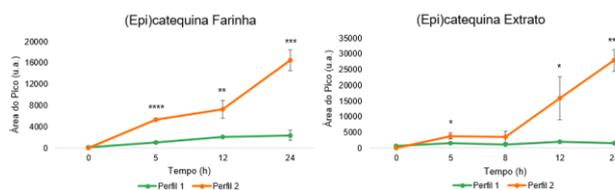


Figura 2: Concentração relativa de (epi)catequina durante a fermentação da farinha liofilizada (A) e do extrato fenólico de *P. tenuifolia* (B), com dois diferentes inóculos fecais.

O Perfil 1 exibiu maior produção de  $\gamma$ -valerolactona na fermentação de ambos os substratos farinha e extrato fenólico, como representado na Figura 3:

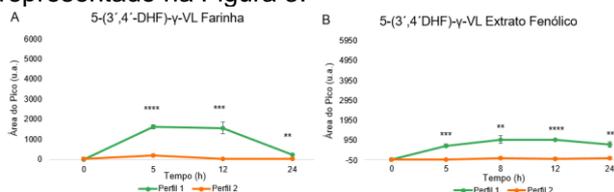


Figura 3: Concentração relativa de 5-(3',4'-dihidroxifenil)- $\gamma$ -valerolactona durante a fermentação da farinha liofilizada (A) e do extrato fenólico de *P. tenuifila* (B), com dois diferentes inóculos fecais.

Tais resultados evidenciam que o Perfil 2, apesar de ser metabolizador mais rápido de procianidinas e maior produtor de (epi)catequina, não é capaz de metabolizar a (epi)catequina nos metabólitos seguintes, levando ao acúmulo deste metabólito.

A produção de ácido 3,4-dihidroxifenil acético e ácido protocatecuico variou de acordo com o tratamento e inóculo fecal. Para o grupo tratado com a farinha liofilizada, o Perfil 1 apresentou-se como maior produtor dos ácidos fenólicos. No entanto, tal comportamento se inverte no grupo tratado com o extrato fenólico, em que o Perfil 2 apresenta-se como maior produtor, como representado na Figura 4 e 5:

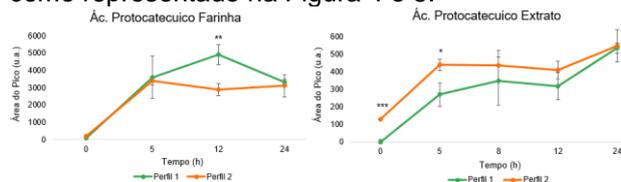


Figura 4: Concentração relativa de ácido protocatecuico durante a fermentação da farinha liofilizada (A) e do extrato fenólico de *P. tenuifila* (B), com dois diferentes inóculos fecais.

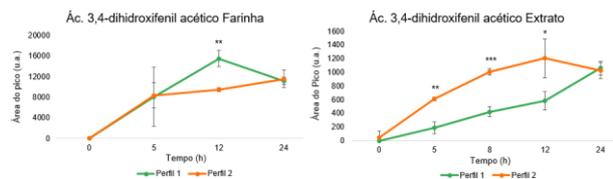


Figura 5: Concentração relativa de ácido 3,4-dihidroxifenil acético durante a fermentação da

farinha liofilizada (A) e do extrato fenólico de *P. tenuifila* (B), com dois diferentes inóculos fecais.

A metabolização das fibras presentes na farinha de passiflora resultou na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). O Perfil 2 apresentou maior produção de AGCC (6,04 mM em 24h), tendo o acetato como produto principal (61%), seguido do butirato e propionato (12% para ambos). O Perfil 1 teve a produção total de 5,85 mM, também em 12h, e o AGCC majoritário foi o acetato (58%), seguido do propionato (22%) e butirato (15%), como representado na Figura 6. O grupo tratado com o extrato fenólico não teve produção significativa de AGCC.

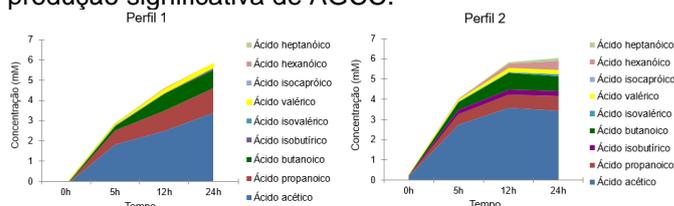


Figura 6: Contribuição individual de AGCCs produzidos durante a fermentação da farinha liofilizada de *P. tenuifila* para dois diferentes inóculos fecais.

## Conclusões

A fermentação colônica da farinha e do extrato fenólico da *P. tenuifila* produz compostos bioativos como os AGCC e catabólitos fenólicos derivados da degradação da proantocianidina, sendo superior para a farinha. O perfil da microbiota influencia a produção destes bioativos, onde o inóculo fecal apresentando maior razão F/B (Perfil 2) é maior produtor de AGCC e baixa produção de 5-(3',4'-dihidroxifenil)- $\gamma$ -valerolactona. A farinha liofilizada de *P. tenuifila* constitui-se como uma matriz mais rica e complexa do que o extrato fenólico concentrado, possuindo compostos como açúcares e fibras que também participam e podem influenciar a fermentação *in vitro*.

## Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, meus colegas e técnicos de laboratório pela valiosa ajuda,



pelos ensinamentos compartilhados e orientação ao longo desse projeto. Agradeço à FAPESP por financiar a bolsa de iniciação científica e a bolsa estágio de pesquisa no exterior (BEPE), que me proporcionou experiências únicas e essenciais para o avanço de meu conhecimento científico.

### Referências

Angelino *et al.*, 2019. doi: 10.3390/nu11112678

Fraga *et al.*, 2021. doi: 10.1039/d1fo02664j

García-Villalba *et al.*, 2012. doi: 10.1002/jssc.201101121

Gião *et al.*, 2012. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.09.030

Mena *et al.*, 2019. doi: 10.1039/c8np00062j

Mele *et al.*, 2017. doi: 10.1002/mnfr.201700074

Rodriguez-Mateos *et al.*, 2018. doi: 10.1093/ajcn/nqy229

Ruotolo *et al.*, 2020. doi: 10.1002/mnfr.201900890

Santos *et al.*, 2021. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110521