



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

**JORDANA NUNES DE OLIVEIRA**

**POTENCIAL PREBIÓTICO DA FARINHA DO SUBPRODUTO  
DO UMBU-CAJÁ (*Spondias* spp.) NA MICROBIOTA  
COLÔNICA HUMANA**

São Cristóvão/SE

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

**JORDANA NUNES DE OLIVEIRA**

**POTENCIAL PREBIÓTICO DA FARINHA DO SUBPRODUTO  
DO UMBU-CAJÁ (*Spondias spp.*) NA MICROBIOTA  
COLÔNICA HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Nutrição  
como requisito para obtenção do título de  
Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Jane de Jesus da  
Silveira Moreira.

Coorientadora: Profa. Dra. Elma Regina  
Silva De Andrade Wartha.

São Cristóvão/SE

2023

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA  
CENTRAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

O48p      Oliveira, Jordana Nunes de  
Potencial prebiótico da farinha do subproduto de umbu-cajá  
(Spondias spp.) na microbiota colônica humana / Jordana Nunes de  
Oliveira ; orientadora Jane de Jesus Silveira Moreira ; coorientadora Elma  
Regina Silva de Andrade Wartha. – São Cristóvão, SE, 2023.  
116 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Nutrição) – Universidade  
Federal de Sergipe, 2023.

1. Nutrição. 2. Umbu-cajá. 3. Prebióticos. 4. Microbioma  
gastrointestinal. 5. Probióticos. 6. Fermentação. 7. Metabólitos. I.  
Moreira, Jane de Jesus da Silveira, orient. II. Wartha, Elma Regina  
Silva de Andrade, coorient. II. Título.

CDU 613.2:634.442

**JORDANA NUNES DE OLIVEIRA**

**POTENCIAL PREBIÓTICO DA FARINHA DO SUBPRODUTO DO  
UMBU-CAJÁ (*Spondias spp.*) NA MICROBIOTA COLÔNICA HUMANA**

Dissertação de mestrado aprovada pelo  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Nutrição 16 de outubro de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
 **JANE DE JESUS DA SILVEIRA MOREIRA**  
Data: 16/12/2023 21:43:24-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Jane de Jesus da Silveira Moreira  
Orientadora/PPGCNUT/UFS  
Presidente da banca examinadora

Documento assinado digitalmente  
 **THATYANE MARIANO RODRIGUES DE ALBUQUE**  
Data: 20/12/2023 17:54:10-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Thatyane Mariano Rodrigues De Albuquerque  
Examinadora externa/DN/CCS/UFPB

Documento assinado digitalmente  
 **JAILANE DE SOUZA AQUINO**  
Data: 20/12/2023 20:42:02-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino  
Examinadora externa/DN/CCS/UFPB

São Cristóvão/ SE  
2023

## **AGRADECIMENTOS**

Sou grata primeiramente à Deus que esteve presente em todos os momentos, me dando saúde, força e coragem para enfrentar essa jornada sem hesitar.

Aos meus pais, Joselito Nunes e Maria José pelo amor incondicional, apoio e presença em todas as etapas da minha vida, e nunca mediram esforços para realização dos meus sonhos.

Ao meu marido, João Jacó, por sua compreensão, paciência, companheirismo e encorajamento nessa caminhada.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Jane de Jesus pelos conhecimentos transmitidos, orientação e por todo apoio prestado durante essa trajetória. A minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Elma Andrade por sua contribuição na orientação.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal de Sergipe por toda assistência prestada, e a todos os Professores que contribuíram de algum modo com o meu conhecimento acadêmico.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal da Paraíba pelo auxílio para execução da pesquisa, aos Prof. Evandro Leite de Souza pela parceria e comprometimento, e a Prof<sup>a</sup>. Thatyane Albuquerque pelo acolhimento, incentivo e ensinamentos da microbiologia de alimentos.

A FAPITEC/SE pelo apoio financeiro e suporte oferecido para a realização dessa pesquisa, permitindo minha dedicação integral.

Obrigada aos membros da banca pela disponibilidade e interesse.

Obrigada a todos que contribuíram de algum modo para que eu pudesse celebrar esse momento único em minha vida!

OLIVEIRA, J. N. Potencial prebiótico da farinha do subproduto do umbu-cajá (*Spondias* spp.) na microbiota colônica humana. [Dissertação]. São Cristóvão: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição. Universidade Federal de Sergipe; 2023.

## RESUMO

O umbu-cajá (*Spondias* spp.) é um fruto tropical típico do Nordeste brasileiro, considerado um híbrido natural entre o umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) e a cajazeira (*Spondias lutea*). O subproduto proveniente do processamento industrial do umbu-cajá possui elevado valor nutricional, devido a quantidade de fibras alimentares e compostos bioativos, que juntos podem apresentar potencial prebiótico. Além disso, a utilização do subproduto de umbu-cajá pode, prolongar a utilização dos seus frutos em períodos fora das safras, contribuindo para a sustentabilidade do sistema alimentar. Neste contexto, o estudo teve como objetivo desenvolver uma farinha a partir do subproduto do processamento agroindustrial de umbu-cajá (FUC) e avaliar o potencial efeito prebiótico durante a fermentação colônica *in vitro*. A farinha foi elaborada a partir do subproduto do umbu-cajá, seguida da caracterização físico-química. Posteriormente, a farinha foi submetida à digestão gastrointestinal *in vitro*, visando avaliar a abundância relativa de grupos bacterianos presentes na microbiota colônica humana, usando a técnica de fluorescência de hibridização *in situ* acoplada com citometria de fluxo multiparamétrica durante 48 h de fermentação *in vitro*, determinando os índices prebióticos. A atividade metabólica microbiana foi avaliada pela determinação do pH, quantificação de açúcares, dos ácidos orgânicos, pela identificação do perfil metabolômico e atividade antioxidante, avaliados nos tempos 0, 24 e 48 h de fermentação colônica. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão estimado e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey; e teste *t* de Student não pareado. Os valores de  $p < 0,5$  foram considerados significativos (nível de significância de 5%). A farinha de umbu-cajá apresentou baixo teor de umidade, alto teor de fibra insolúvel ( $57.46 \pm 0.28$  mg/100 g) e flavonóis Quercetina 3-Glucosídeo e procianidina B2 ( $36.96 \pm 0.31$  e  $9.81 \pm 0.02$  mg/100 g, respectivamente). A FUC digerida apresentou índice prebiótico positivo ( $5.37 \pm 1.16$  to  $11.86 \pm 1.47$ ) e intensa atividade metabólica microbiana durante a fermentação colônica, a partir do consumo de açúcares (glicose e frutose), produção de ácidos graxos de cadeia curta (acético, láctico, butírico e propiônico) comprovado a partir do perfil metabólico global, concomitante à diminuição dos valores de pH e aumento da atividade antioxidante. Esses achados mostram que a FUC apresenta-se como produto potencialmente prebiótico, devido a sua capacidade de modular positivamente a microbiota intestinal. Estes resultados podem encorajar o setor agroindustrial a avaliar os subprodutos do processamento de frutas como produtos com valor agregado.

**Palavras-chaves:** Fermentação; Microbiota; Probióticos; Metabólitos.

OLIVEIRA, J. N. Prebiotic potential of umbu-cajá (*Spondias* spp.) by-product flour on human colonic microbiota. [Dissertation defense]. São Cristóvão: Graduate Program in nutrition sciences, Federal University of Sergipe; 2023.

## ABSTRACT

Umbu-cajá (*Spondias* spp.) is a tropical fruit typical of Northeastern Brazil, considered a natural hybrid between the umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) and the cajazeira (*Spondias lutea*). The by-product from the industrial processing of umbu-cajá has high nutritional value, due to the amount of dietary fiber and bioactive compounds, which together may have prebiotic potential. Furthermore, the use of the umbu-cajá by-product can prolong the use of its fruits in periods outside the harvest, contributing to the sustainability of the food system. In this context, the study aimed to develop a flour from the by-product of agro-industrial processing of umbu-cajá (FUC) and evaluate the potential prebiotic effect during *in vitro* colonic fermentation. The flour was made from the by-product of umbu-cajá, followed by physical-chemical characterization. Subsequently, the flour was subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion, and the relative abundance of bacterial groups present in the human colonic microbiota was evaluated using the *in situ* hybridization fluorescence technique coupled with multiparametric flow cytometry during 48 h of *in vitro* fermentation, determining prebiotic indices. Microbial metabolic activity was evaluated by determining pH, quantifying sugars, organic acids, identifying the metabolic profile and antioxidant activity, evaluated at times 0, 24 and 48 h of colonic fermentation. The results were expressed as the mean  $\pm$  estimated standard deviation and subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test; and unpaired Student's *t* test. P values  $<0.5$  were considered significant (5% significance level). Umbu-cajá flour had low moisture content, high insoluble fiber content ( $57.46 \pm 0.28$  mg/100 g) and flavonols Quercetin 3-Glucoside and procyanidin B2 ( $36.96 \pm 0.31$  and  $9.81 \pm 0.02$  mg/100 g, respectively). Digested FUC showed a positive prebiotic index ( $5.37 \pm 1.16$  to  $11.86 \pm 1.47$ ) and intense microbial metabolic activity during colonic fermentation, from the consumption of sugars (glucose and fructose), production of short-chain fatty acids (acetic, lactic, butyric and propionic) proven from the global metabolic profile, concomitant with a decrease in pH values and an increase in antioxidant activity. These findings show that FUC is a potentially prebiotic product, due to its ability to positively modulate the intestinal microbiota. These results may encourage the agro-industrial sector to evaluate fruit processing by-products as value-added products.

**Keywords:** Fermentation; Microbiota; Probiotics; Metabolites.

## LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1-</b> Umbu-cajá. ....                                                                                                                         | 18 |
| <b>Figura 2</b> - Subproduto do umbu-cajá coletado na indústria processadora POMAR/SE. ....                                                              | 27 |
| <b>Figura 3</b> - Desenho do estudo do potencial prebiótico do subproduto do processamento de umbu-cajá em sistema de fermentação <i>in vitro</i> . .... | 28 |
| <b>Figura 4</b> - Farinha de umbu-cajá ( <i>Spondias</i> spp.).....                                                                                      | 29 |
| <b>Figura 5</b> - Tubo de diálise de celulose com o subproduto de umbu-cajá liofilizado pré-digerido. ....                                               | 39 |

### LISTA DE FIGURAS DOS ARTIGOS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 1</b> - Process for obtaining flour from the by-product of umbu-cajá ( <i>Spondias</i> spp.)....                                                                                                                                                                     | 72  |
| <b>Figure 2</b> - Representative <sup>1</sup> H NMR spectra of media with UCF and FOS, at time 0 and 48h of <i>in vitro</i> colonic fermentation. ....                                                                                                                         | 102 |
| <b>Figure 3</b> - Principal component analysis (PCA) variables with relative abundance of hybridized bacterial groups, short-chain fatty acids, and sugars analyzed during <i>in vitro</i> colonic fermentation in UCF, FOS and NC treatments at times zero, 24 and 48 h. .... | 103 |



## LISTA DE QUADROS E TABELAS

### LISTA DE QUADROS DA DISSERTAÇÃO

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1</b> - Resultados encontrados sobre os produtos elaborados com subprodutos agroindustriais do gênero <i>Spondias</i> . .... | 21 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### LISTA DE TABELAS DA DISSERTAÇÃO

|                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Sondas de oligonucleotídeos de rRNA 16S e condições de hibridização utilizadas nas análises com hibridização <i>in situ</i> fluorescente acoplada a citometria de fluxo multiparamétrica. .... | 42 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Table - 1</b> - Characterization of the by-product and flour from the by-product of umbu-cajá ( <i>Spondias</i> spp.), (mean $\pm$ estimated standard deviation).....                                                                                                                                                                                             | 70  |
| <b>Table - 2</b> - Microbiological Analysis of umbu-cajá flour ( <i>Spondias</i> spp.).....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 71  |
| <b>Table - 3</b> - Physicochemical parameters of umbu-cajá flour (UCF; average $\pm$ estimated standard deviation; n = 3) used in assays to evaluate prebiotic properties. ....                                                                                                                                                                                      | 96  |
| <b>Table - 4</b> - Relative abundance (% average $\pm$ estimated standard deviation; n = 3) and prebiotic index of different bacterial groups in medium with digested umbu-cajá flour (UCF), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC; without fermentable substrate) at 0, 24 and 48 h of colonic fermentation. ....                                  | 98  |
| <b>Table - 5</b> - Prebiotic index (mean $\pm$ estimated standard deviation; n = 3) calculated for medium with digested umbu-cajá flour (UCF), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC; without fermentable substrate) at 24 and 48 h of colonic fermentation.....                                                                                    | 99  |
| <b>Table - 6</b> - pH values and contents of sugars, lactic acid and short chain fatty acid (SCFA; g L <sup>-1</sup> ; average $\pm$ estimated standard deviation; n = 3) in medium with digested umbu-cajá flour (UCF), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC; without fermentable substrate) at time 0, 24 and 48 h of colonic fermentation. .... | 100 |
| <b>Table - 7</b> - Antioxidant activity of UCF at times 0, 24 and 48 of colonic fermentation. ....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 101 |

## LISTA DE EQUAÇÕES

### LISTA DE EQUAÇÕES DA DISSERTAÇÃO

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Equação 1</b> - Determinação da umidade.....                                  | 30 |
| <b>Equação 2</b> - Determinação de acidez .....                                  | 31 |
| <b>Equação 3</b> - Determinação de cinzas .....                                  | 31 |
| <b>Equação 4</b> - Determinação de proteínas.....                                | 31 |
| <b>Equação 5</b> - Determinação de lipídeos.....                                 | 32 |
| <b>Equação 6</b> - Correção do branco.....                                       | 33 |
| <b>Equação 7</b> - Cálculo de fibra insolúvel .....                              | 33 |
| <b>Equação 8</b> - Correção do branco.....                                       | 34 |
| <b>Equação 9</b> - Cálculo de fibra solúvel .....                                | 34 |
| <b>Equação 10</b> - Fibra alimentar total.....                                   | 34 |
| <b>Equação 11</b> - Cálculo de atividade antioxidante – ABTS <sup>•+</sup> ..... | 37 |
| <b>Equação 12</b> - Cálculo de atividade antioxidante – DPPH <sup>•</sup> .....  | 37 |
| <b>Equação 13</b> - Cálculo de índice prebiótico.....                            | 44 |

### LISTA DE EQUAÇÕES DO ARTIGO

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Eq. 1</b> - % activity: $\{[(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100\}$ .....               | 76 |
| <b>Eq. 2</b> - % activity $\{[(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100\}$ .....                | 77 |
| <b>Eq. 3</b> - Prebiotic index: $(\% \text{ Lab}) + (\% \text{ Bif}) + (\% \text{ Rfla}) - (\% \text{ Bac}) - (\% \text{ Chis}) - (\% \text{ Erec})$ ..... | 81 |

## LISTA DE SIGLAS

|        |                                                           |
|--------|-----------------------------------------------------------|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                  |
| AOAC   | Association of Official Analytical Chemists               |
| BAL    | Bactéria ácido láctica                                    |
| CLAE   | Cromatografia líquida de alta eficiência                  |
| CFM    | Flow cytometry                                            |
| DM2    | Diabetes mellitus tipo 2                                  |
| DNA    | Ácido desoxirribonucleico                                 |
| FISH   | Fluorescence <i>in situ</i> hybridization                 |
| FOS    | Fruto-oligossacarídeos                                    |
| GOS    | Galacto-oligossacarídeo                                   |
| IAL    | Instituto Adolfo Lutz                                     |
| ITPS   | Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe |
| MAPA   | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento       |
| MDR    | Ministério do Desenvolvimento Regional                    |
| ODS    | Objetivos do desenvolvimento sustentável                  |
| ONU    | Organização das Nações Unidas                             |
| PIQ    | Padrões para identificação e qualidade                    |
| RMN    | Ressonância magnética nuclear                             |
| TGI    | Trato gastrointestinal                                    |
| UCF    | Farinha de umbu-cajá                                      |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                                  |                                |
|----------------------------------|--------------------------------|
| $\mu\text{HG}$                   | Micrômetro de mercúrio         |
| $\mu\text{l}$                    | Microlitro                     |
| $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$   | Etanol (álcool etílico)        |
| $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$   | Acetona                        |
| $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ | Acetato de Etila               |
| $\text{CaCl}_2$                  | Cloreto de Cálcio              |
| $\text{CH}_3\text{OH}$           | Metanol (álcool metílico)      |
| $\text{CHCl}_3$                  | Clororfórmio                   |
| $\text{Cy}_3$                    | Cianina 3                      |
| $\text{D}_2\text{O}$             | Água deuterada                 |
| $\text{FeSO}_4$                  | Sulfato ferroso                |
| $\text{H}_2\text{SO}_4$          | Ácido sulfúrico                |
| $\text{HCl}$                     | Ácido Clorídrico               |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$         | Fosfato de potássio dibásico   |
| $\text{KCl}$                     | Cloreto de potássio            |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$         | Fosfato de potássio monobásico |
| $\text{mol L}^{-1}$              | Mol por litro                  |
| $\text{MgSO}_4$                  | Sulfato de Magnésio            |
| $\text{MHz}$                     | Megahertz                      |
| $\text{NaCl}$                    | Cloreto de Sódio               |
| $\text{NaHCO}_3$                 | Bicarbonato de sódio           |
| $\text{NaOH}$                    | Hidróxido de sódio             |
| ppm                              | Partes por milhão              |
| rpm                              | Rotações por minuto            |

## SUMÁRIO

|                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                              | <b>15</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                                                    | <b>17</b> |
| 2.1 GÊNERO <i>SPONDIAS</i> : UMBU-CAJÁ.....                                                            | 17        |
| 2.1.1 <i>Composição nutricional e compostos bioativos presentes no umbu-cajá e seu subproduto.....</i> | <i>19</i> |
| 2.2 SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS DO PROCESSAMENTO DE FRUTAS .....                                       | 20        |
| 2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E COMPONENTES PREBIÓTICOS .....                                              | 22        |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>                                                                               | <b>26</b> |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....                                                                               | 26        |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                        | 26        |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                                      | <b>27</b> |
| 4.1 OBTENÇÃO DO SUBPRODUTO .....                                                                       | 27        |
| 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....                                                                    | 27        |
| 4.3 ELABORAÇÃO DA FARINHA DE UMBU-CAJÁ .....                                                           | 29        |
| 4.4 DETERMINAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA FARINHA DE UMBU-CAJÁ.....                                           | 29        |
| 4.4.1 <i>Determinação de umidade.....</i>                                                              | <i>30</i> |
| 4.4.2 <i>Determinação de pH.....</i>                                                                   | <i>30</i> |
| 4.4.3 <i>Determinação de acidez titulável.....</i>                                                     | <i>30</i> |
| 4.4.4 <i>Determinação de cinzas.....</i>                                                               | <i>31</i> |
| 4.4.5 <i>Determinação de proteínas pelo Método de Kjeldahl.....</i>                                    | <i>31</i> |
| 4.4.6 <i>Determinação de lipídeos.....</i>                                                             | <i>32</i> |
| 4.4.7 <i>Determinação de fibras alimentares .....</i>                                                  | <i>32</i> |
| 4.4.8 <i>Determinação de carboidratos totais.....</i>                                                  | <i>35</i> |
| 4.4.9 <i>Determinação do teor de açúcares e ácidos orgânicos .....</i>                                 | <i>35</i> |
| 4.4.10 <i>Determinação do teor de compostos fenólicos .....</i>                                        | <i>35</i> |
| 4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....                                                       | 36        |

|       |                                                                                                                                                                                 |     |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.5.1 | <i>Análise da capacidade antioxidante pelo método ABTS<sup>•+</sup> - captura do radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2' - azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))</i> ..... | 36  |
| 4.5.2 | <i>Análise da capacidade antioxidante pelo método DPPH<sup>•</sup> (Captura do radical livre - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil)</i> .....                                          | 37  |
| 4.5.3 | <i>Análise da capacidade antioxidante pelo método FRAP- poder redutor do Ferro (FRAP)</i> .....                                                                                 | 37  |
| 4.6   | ENSAIO GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE PREBIÓTICA.....                                                                                             | 38  |
| 4.7   | ENSAIO DE ATIVIDADE PREBIÓTICA UTILIZANDO INÓCULO FECAL .....                                                                                                                   | 39  |
| 4.7.1 | <i>Procedimentos éticos e legais</i> .....                                                                                                                                      | 39  |
| 4.7.2 | <i>Coleta de amostras fecais</i> .....                                                                                                                                          | 39  |
| 4.7.3 | <i>Preparação de amostras fecais</i> .....                                                                                                                                      | 40  |
| 4.7.4 | <i>Preparação do meio de fermentação colônica</i> .....                                                                                                                         | 40  |
| 4.7.5 | <i>Enumeração e identificação de populações bacterianas por fluorescência de hibridização com citometria de fluxo multiparamétrica</i> .....                                    | 41  |
| 4.7.6 | <i>Determinação de índices prebióticos</i> .....                                                                                                                                | 44  |
| 4.8   | MONITORAMENTO DE INDICADORES DE ATIVIDADE METABÓLICA .....                                                                                                                      | 45  |
| 4.9   | ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....                                                                                                                                                     | 45  |
| 4.10  | ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....                                                                                                                                                      | 45  |
| 5     | <b>RESULTADOS</b> .....                                                                                                                                                         | 47  |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                                                                                                                                        | 48  |
|       | <b>APÊNDICES</b> .....                                                                                                                                                          | 58  |
|       | APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....                                                                                                                   | 59  |
|       | APÊNDICE B – ARTIGO I .....                                                                                                                                                     | 62  |
|       | APÊNDICE C – ARTIGO II.....                                                                                                                                                     | 73  |
|       | <b>ANEXOS</b> .....                                                                                                                                                             | 106 |
|       | ANEXO A- COMPROVANTE DE CADASTRO NO SISGEN.....                                                                                                                                 | 107 |
|       | ANEXO B - CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....                                                                                                                         | 108 |

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a quinta posição como um dos países com maior extensão territorial do planeta, aproximadamente 8.510.417 km<sup>2</sup> (IBGE, 2023). Com toda essa área e apresentando grandes biomas, o país possui uma grande variedade de frutas nativas e exóticas subexploradas, que apresentam características sensoriais e composição nutricional diferenciadas (SVIECH; UBBINK; PRATA, 2022). Dentre essas frutas, encontra-se o gênero *Spondias* o qual apresenta importante potencial socioeconômico para a região Nordeste do Brasil, uma vez que a região possui características geográficas e climáticas favoráveis à produção do fruto (SOUZA, PORTO FILHO & MENDES, 2020).

Neste gênero, destaca-se o umbu-cajá (*Spondias* spp.), fruto endêmico da região semiárida do Nordeste do Brasil (Alagoas, Bahia, Pernambuco e Sergipe) que apresenta coloração amarela, forte aroma e sabor doce acidulado (SILVA-LUZ *et al.*, 2023). Embora o umbu-cajá seja atualmente explorado de forma extrativista, apresenta grande potencial agroindustrial devido às excelentes propriedades sensoriais do fruto. Assim, além do consumo in natura, ele é amplamente utilizado na indústria processadora de frutas, para produção de polpas, doces, geleias, sucos, picolés, néctares, sorvetes, dentre outros (FONSECA *et al.*, 2010).

O processamento de frutas apresenta-se como uma alternativa viável de conservação, pois contorna problemas de sazonalidade e perecibilidade, e possibilita o consumo por maiores períodos do ano (ALVES *et al.*, 2020). Porém, o processamento de frutas resulta em grande quantidade de subprodutos agroindustriais, dos quais cerca de 20 a 70 % são descartados (AKTER, RABETA, 2021; BANERJEE *et al.*, 2017). Esses subprodutos descartados são compostos de sementes trituradas, cascas e polpa amassada, que podem ser considerados como fontes de carboidratos fermentáveis e compostos bioativos (CANGUSSU *et al.*, 2021). Portanto, com tecnologias adequadas, podem ser utilizados para elaboração de farinhas, tornando-se potencialmente prebióticos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021a; ANDRADE *et al.*, 2020; SAYAGO-AYERDI *et al.*, 2019;).

Os prebióticos são definidos como “substrato não digerível pelo ser humano, que impulsionam o crescimento e/ou atividade de microrganismos benéficos presentes na microbiota intestinal, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro” (GIBSON *et al.*, 2017; KHANGWAL; PATYOOSH, 2019). Estudo recente têm demonstrado potencial nutricional da farinha do subproduto do gênero *Spondias*, a partir do alto teor de fibra alimentar, compostos fenólicos e atividade antioxidante. Esses compostos estão atrelados à efeitos benéficos à saúde.

Além disso, a farinha do subproduto do gênero *Spondias* apresenta potencial para

utilização em produtos de panificação (SILVA *et al.*, 2018; ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). Esses estudos indicam uma perspectiva promissora para utilização da farinha do subproduto do umbu-cajá, seja por sua qualidade nutricional ou tecnológica (SANTOS *et al.*, 2023). Efeito modulador na microbiota colônica a partir do consumo de farinha de subprodutos de frutas como acerola, goiaba, e caju. (BATISTA *et al.*, 2023).

Dessa forma, considerando a composição nutricional dos frutos de umbu-cajá e o caráter sazonal da sua frutificação que pode restringir a utilização dos frutos, é importante encontrar formas de aproveitamento de subprodutos para desenvolver novas fontes alimentares potencialmente prebióticas. Além disso, a utilização do subproduto de umbu-cajá torna-se uma estratégia interessante para minimizar o impacto ambiental associado ao descarte desses subprodutos, contribuindo para o cumprimento da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU), em especial aos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável, que visam a erradicação da pobreza (ODS1) e da fome (ODS2), e produção e consumo sustentável (ODS12). Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial prebiótico da farinha do subproduto do umbu-cajá (*Spondias* spp.) utilizando sistema de fermentação *in vitro*.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 GÊNERO *SPONDIAS*: UMBU-CAJÁ

O gênero *Spondias* apresentou uma das primeiras espécies da família Anacardiaceae relatada por Linnaeus em 1753, denominada de cajazeira ou taperebazeiro (*Spondias mombin* L.). Além da *Spondias mombin* L., também estão agrupadas as espécies *Spondias purpurea* L. (serigueleira), *Spondias dulcis* Parkinson ou *Spondias cythera* Parkinson (cajaraneira ou cajá-manga), *Spondias tuberosa* Arruda (umbuzeiro) e *Spondias* spp. (umbu-cajazeira) (Figura 1) (ARAÚJO *et al.*, 2018).

Até o momento não existe consenso acerca da classificação botânica do umbu-cajazeira, uma vez que a hibridização genômica não está completamente definida. Portanto, alguns estudos podem trazer a nomenclatura *Spondias* spp. proveniente do híbrido natural entre o umbuzeiro (*S. tuberosa*) e a cajazeira (*S. mombin* L.), assim como *Spondias bahiensis* resultado do cruzamento entre o umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) e a cajaraneira (*Spondias dulcis*) (SOUZA; PORTO FILHO & MENDES, 2020).

A umbu-cajazeira é uma árvore xerófita nativa do Nordeste brasileiro, que pode atingir mais de 6,0 metros de altura. Seus frutos, classificados como drupa, apresentam cor amarela, formas piriformes a obovoides, e mesocarpo (polpa) carnoso e fibroso. O rendimento da polpa do umbu-cajá pode variar entre 46 à 68 %. Essas variações são decorrentes dos efeitos da variabilidade genética dos genótipos, condições edafoclimáticas dos ambientes de cultivo e da interação entre os genótipos e os ambientes de cultivo (SOUZA, PORTO FILHO & MENDES, 2020). A produção de frutos da umbu-cajazeira tem início no quarto ano após o plantio (ROMANO *et al.*, 2011). A árvore produz uma grande quantidade de frutos em cada safra, e pode ser considerada uma das culturas com grande potencial socioeconômico a ser desenvolvido no semiárido (ARAÚJO *et al.*, 2018; MACHADO *et al.*, 2021).

A fim de incentivar a cultura do umbu-cajá no país, o Ministério do Desenvolvimento Regional, por meio do programa Rotas da Fruticultura Alagoana, lançou um projeto conhecido como “Um milhão de árvores de umbu-cajá e demais *Spondias* 2021/2022”, que tem como objetivo cadastrar produtores rurais, e divulgar tecnologias e práticas agrícolas sustentáveis para aumentar a produtividade e a qualidade dos frutos da umbu-cajazeira e demais *Spondias*. As projeções estimam uma produção de 10 milhões de caixas de umbu-cajá por ano, com rendimento de R\$ 80 milhões (BRASIL, 2023; BRASIL, 2019). Programas de incentivo à fruticultura mostram-se eficazes, uma vez que ampliam a produção de frutas nativas no Brasil,

incentivam os agricultores rurais e apoiam a produção orgânica de frutas, dentre outros (BRASIL, 2022).

**Figura 1-** Umbu-cajá.



Fonte: Souza, Porto Filho, & Mendes (2020).

Embora o agronegócio da umbu-cajazeira venha ganhando espaço, a cadeia produtiva precisa adotar técnicas e métodos apropriados de produção (ARAÚJO *et al.*, 2018). As condições climáticas mudam de um ano para o outro, podendo afetar negativamente o ciclo reprodutivo do umbu-cajá. Logo, precipitações anuais bem distribuídas e acima de 600 mm são condições ideais para seu desenvolvimento. O período de florescimento e frutificação do umbu-cajá ocorrem entre os meses de novembro à junho, época em que no semiárido coincide com o período chuvoso. Nesse contexto, em condições adequadas de solo e irrigação, sua produtividade pode variar entre 270 kg à 1.894 kg do fruto por safra. Na Fazenda Santa Maria, localizada em Tabuleiro Grande - RN, entre os anos de 2010 e 2014, a colheita de umbu-cajá passou de 1.063,8 kg por safra sob condições de sequeiro (528,5 mm) para 1.894,3 kg por safra (750 mm) após irrigação programada (SOUZA, PORTO FILHO, & MENDES, 2020).

Além das condições climáticas interferirem na produtividade do umbu-cajá, a falta de telas de sombreamento utilizadas para amortecer a queda dos frutos, a coleta dos frutos maduros e em temperaturas inadequadas de armazenamento, associado à sua alta perecibilidade são outros fatores que aceleram a deterioração e provocam perdas (ALEGBELEYE *et al.*, 2022). Logo, é preciso a adoção de medidas preventivas para minimizar as perdas e prolongar a vida útil dos frutos (EMBRAPA, 2022; SOUZA, PORTO FILHO, & MENDES, 2020).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) ainda não definiu padrões de identidade e qualidade (PIQ) de polpas e sucos do umbu-cajá, assim, ele é utilizado na composição de misturas (*blends*) de polpas, sucos, sorvetes do cajá, que também é da espécie

*Spondias* (FONSECA *et al.*, 2017). Essa mistura regional dos nomes comuns das *Spondias* gera confusão e disseminação de informação erradas, trazendo como consequência produtos nomeados, rotulados e comercializados com nomes de outras *Spondias*. Nesse contexto, os dados atuais podem ser aquém da realidade e esconder os reais dados de produção do umbu-cajá (SOUZA, PORTO FILHO, & MENDES, 2020).

### **2.1.1 Composição nutricional e compostos bioativos presentes no umbu-cajá e seu subproduto**

Estudos recentes têm destacado o potencial do umbu-cajá para a indústria farmacêutica e alimentícia, devido a sua atividade antioxidante, anti-hipertensiva e antidiabética (SANTOS *et al.*, 2023; DUTRA *et al.*, 2017; MACEDO *et al.*, 2023; BARROS *et al.*, 2020). O umbu-cajá apresenta alto teor de fibras dietéticas e compostos bioativos como a vitamina C, um importante antioxidante (SANTOS *et al.*, 2023). O carboidrato apresenta-se como principal macronutriente, com menores concentrações para proteínas e lipídios (SIQUEIRA *et al.*, 2018).

O fruto é rico em vitaminas do complexo B (riboflavina, nicotinamina, ácido pantotênico, e biotina), minerais (principalmente fósforo), carotenoides e compostos fenólicos (ASSIS *et al.*, 2020a; ASSIS *et al.*, 2022b). Pesquisa com o fruto da umbu-cajazeira identificou um total de dezesseis compostos fenólicos diferentes, sendo o ácido protocatecuico o composto majoritário, seguido pelos ácidos 4-hidroxibenzoico e salicílico, que estão associados a efeitos benéficos à saúde humana (YANG *et al.*, 2023; VIZZARI *et al.*, 2019). Convém ressaltar que o local de cultivo, época de colheita, estágio de maturação, tratos culturais e estação do ano, podem interferir na composição nutricional de frutos da mesma espécie (MANZLOOR *et al.*, 2023).

Recentemente foi comprovado que extratos aquosos do subproduto do umbu-cajá contêm altas concentrações de compostos fenólicos, entre os quais se destacam a rutina e p-coumárico (BARROS *et al.*, 2020; DUTRA *et al.*, 2017). A presença desses compostos está associada à capacidade de prevenir doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e oncológicas (BARRECA, ALESSANDRO & CORRADO, 2023). Os compostos fenólicos constituem um grande grupo de fitoquímicos encontrado como metabólitos secundários nas plantas. Na alimentação humana, a maior parte pertence aos ácidos fenólicos, flavonóides e taninos (LIN *et al.*, 2016). A presença de taninos também foi identificada em extratos de umbu-cajá (BARROS *et al.*, 2020).

Quando avaliada a capacidade dos extratos aquosos do subproduto de umbu-cajá em resistir aos processos de digestão e fermentação, estes mantiveram-se estáveis, demonstrando alta

bioacessibilidade (BARROS *et al.*, 2020). A bioacessibilidade refere-se a fração de compostos liberados no trato gastrointestinal a partir de uma matriz alimentar, que está disponível para absorção intestinal e pode contribuir para a atividade biológica (HU *et al.*, 2023). Sabe-se que o TGI não é capaz de absorver toda a quantidade de fitoquímicos bioativos, assim, é importante avaliar a bioacessibilidade dos compostos bioativos nos alimentos para determinar o seu verdadeiro potencial (RODRÍGUEZ-ROQUE *et al.*, 2013).

Para determinar a eficácia de um composto é necessário primeiramente avaliar sua estabilidade durante a digestão no trato digestivo, pois qualquer composto só pode ser considerado potencialmente eficaz para a saúde humana se permanecer bioacessível após todas as etapas da digestão gastrointestinal (PELLEGRINI *et al.*, 2018). Dutra *et al.*, (2017) também avaliaram a bioacessibilidade de compostos fenólicos de umbu-cajá após simulação gastrointestinal *in vitro*, e observaram alta bioacessibilidade de flavonóides, sendo a catequina o flavonóide que apresentou maior bioacessibilidade (69,94%).

## 2.2 SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS DO PROCESSAMENTO DE FRUTAS

A fruticultura é um dos setores agroindustriais que tem apresentado resultados positivos nos últimos anos no Nordeste do Brasil, e as estimativas apontam crescimento no setor (EMBRAPA, 2018). Em 2021, o país produziu 41 milhões de toneladas de frutas em uma área de 2,4 milhões de hectares, tornando-se o terceiro maior produtor mundial de frutas, depois da China e da Índia (ANUÁRIO, 2021). Do total de frutas produzidas, aproximadamente 53 % são voltada para o consumo *in natura*, enquanto 47 % é processada no setor agroindustrial (BORNAL *et al.*, 2021).

O processamento industrial de frutas é responsável por gerar uma grande quantidade de subprodutos, que são descartados ou subutilizados na maioria das fábricas. O termo “subproduto” designa a parte da matéria-prima, constituída por cascas, sementes, bagaços e caroços, que é transformada e aproveitada para elaboração de produtos alimentícios, como bolos, muffins, biscoitos, iogurtes, queijos, hambúrgueres, dentre outros (JEDDOU *et al.*, 2017; RUPASINGHE *et al.*, 2008; THEAGARAJAN *et al.*, 2019; CHOUCOULI *et al.*, 2013; LUCERA *et al.*, 2018; ERGEZER *et al.*, 2018). Enquanto o termo “resíduo” refere-se ao material que não é aproveitado ou utilizado para o mesmo fim (PHILIPPINI *et al.*, 2020).

Nesse sentido, estudos vêm sendo realizados com objetivo de demonstrar o potencial de utilização do subproduto agroindustrial para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios (Tabela 1). A obtenção da farinha por meio da desidratação é uma das tecnologias comumente

utilizadas (FONTES *et al.*, 2018; BRASIL, 2005). Trata-se de processo relativamente simples, que não exige maiores custos de produção, além de concentrar o conteúdo de nutrientes e compostos bioativos no produto (LEÃO *et al.*, 2017). A elaboração de farinhas surge como uma alternativa de aproveitamento de subprodutos de frutas, possibilitando sua incorporação em diversos produtos de panificação, produtos cárneos, produtos lácteos, entre outros, melhorando o perfil nutricional desses alimentos (LIMA *et al.*, 2023; SKWARKER & KARWOWSKA, 2023; ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2012).

**Quadro 1** - Resultados encontrados sobre os produtos elaborados com subprodutos agroindustriais do gênero *Spondias*.

| Gênero                                                      | Espécie          | Produto gerado                                                                            | Referência                       |
|-------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Spondias</i> spp.                                        | Umbu-cajá        | Formulação de <i>cupcake</i> adicionado de 20% de farinha da casca de umbu cajá           | Silva <i>et al.</i> , 2018       |
| <i>Spondias tuberosa</i> Arruda Cam.                        | Umbu             | Farinha a partir da casca do umbu                                                         | Alves <i>et al.</i> , 2021       |
| <i>Spondias tuberosa</i> Arruda Cam.                        | Umbu             | Farinha da casca e semente de umbu                                                        | Xavier <i>et al.</i> , 2022      |
| <i>Spondias tuberosa</i> Arruda Cam.                        | Umbu             | Óleo da semente do umbu                                                                   | Dias <i>et al.</i> , 2019        |
| <i>Spondias tuberosa</i> Arruda Cam. e <i>Spondias</i> spp. | Umbu e Umbu-cajá | Elaboração de Hambúrguer de tilápia adicionado de farinha da casca do umbu e do umbu-cajá | Silva <i>et al.</i> , 2014       |
| <i>Spondias cythera</i> Parkinson                           | Cajá-manga       | Formulação de pão utilizando 10 % da farinha da casca do cajá-manga                       | Perin <i>et al.</i> , 2021       |
| <i>Spondias purpurea</i> L.                                 | Seriguela        | Formulação de farinha a partir do caroço de seriguela                                     | Nascimento <i>et al.</i> , 2020  |
| <i>Spondias purpurea</i> L.                                 | Seriguela        | Formulação de biscoito utilizando 10% da farinha da casca da seriguela                    | Albuquerque <i>et al.</i> , 2016 |

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

A utilização integral do fruto reduz o desperdício e coopera para o cumprimento da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas, em especial aos Objetivos do

Desenvolvimento Sustentável (ODS1, ODS2 e ODS12, respectivamente), que tratam da erradicação da pobreza e da fome, e do consumo e produção responsáveis (BRASIL, 2017). A adoção de medidas que agreguem valor nas cadeias produtivas de frutas nativas, contribuem para ampliação e preservação da biodiversidade, e diminuição do impacto ambiental negativo atrelado ao descarte irregular.

Por isso, torna-se cada vez mais importante estudos que busquem formas de aproveitamento desses subprodutos, seja como ingrediente em produtos alimentícios ou como fonte de extração de compostos de interesse para a indústria alimentícia (RIFNA *et al.*, 2023).

## 2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E COMPONENTES PREBIÓTICOS

A microbiota humana reúne cerca de 100 trilhões de microrganismos em um ecossistema microbiano complexo e diversificado, composto por bactérias, arqueias, fungos, protozoários e vírus, metabolicamente ativos e em relação mutualística (SENDER, FUCHS & MILO, 2016). Esse grupo microbiano atua em uma relação simbiótica com o hospedeiro. Desse modo, enquanto o hospedeiro fornece substratos alimentares para os microrganismos, a microbiota intestinal contribui em diversos processos fisiológicos com o hospedeiro (PICKARD *et al.*, 2017), atuando no metabolismo de nutrientes, no metabolismo de xenobióticos e de medicamentos, na manutenção da integridade estrutural da barreira da mucosa intestinal, na imunomodulação e na defesa contra patógenos (JANDHYALA *et al.*, 2015).

Em relação à taxonomia, a microbiota intestinal de adultos saudáveis é composta por 6 filos microbianos, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Firmicutes e Bacteroidetes. Desses, Firmicutes e Bacteroidetes são dominantes, representando aproximadamente 90% da composição intestinal (RINNINELLA *et al.*, 2019). O funcionamento adequado da microbiota intestinal depende de uma composição equilibrada desses grupos bacterianos. No entanto, na disbiose, o aumento do número de organismos patogênicos pode levar a uma resposta inflamatória resultando em doenças inflamatórias intestinais, como a colite ulcerativa e doença de Crohn (TALAPKO *et al.*, 2022; VENEGAS *et al.*, 2019).

Diversos fatores contribuem para alterações na diversidade da microbiota intestinal, incluindo dieta, idade, inatividade física, uso de medicamentos (antibióticos), hábitos alimentares e a genética (HASAN & YANG, 2019). A dieta é um dos principais fatores ambientais que influenciam a composição e funcionalidade da microbiota intestinal,

representando cerca de 20% da variabilidade do perfil de populações microbianas presentes no cólon (LEEMING *et al.*, 2019). A dieta fornece uma fonte consistente de substratos alimentares para a microbiota e cria um ambiente que molda a ecologia microbiana (ZHANG, 2022). Nesse sentido, a administração de prebióticos representa uma estratégia promissora para manutenção e/ou restauração do equilíbrio da microbiota quando a homeostase é interrompida (ONISZCZUK *et al.*, 2021).

Os subprodutos, constituídos por cascas, sementes, bagaços e caroços, podem conter alto teor de vitaminas, minerais, compostos fenólicos e fibras dietéticas do que partes convencionalmente consumidas da fruta, e podem ser considerados como potenciais prebióticos (PEREIRA *et al.*, 2022; DUTRA *et al.*, 2017; SANTOS, SILVA & PINTADO *et al.*, 2022). Essas moléculas bioativas são de interesse para a indústria de alimentos por atuarem como promotores da saúde (TAVARES *et al.*, 2022).

O subproduto resultante do processamento de frutas consiste em um material lignocelulósico, composto por celulose, hemicelulose e lignina, conhecida como fibras insolúveis; e pectinas,  $\beta$ -glucanos, gomas, inulina, mucilagem, fruto-oligossacarídeos, psyllium e algumas hemiceluloses, denominadas fibras solúveis (RUSSO *et al.*, 2021; POPOOLA-AKINOLA *et al.*, 2022). Os benefícios à saúde mais comuns atribuídos ao consumo de fibras alimentares incluem a melhora da resistência à insulina, redução do risco de desenvolver diabetes mellitus tipo 2, redução do peso corporal e adiposidade abdominal e redução do risco de doenças coronárias (BARBER *et al.*, 2020).

Essas biomoléculas indigeríveis resistem à digestão enzimática e atuam facilitando o transporte dos alimentos no trato digestivo. Ao chegarem no cólon, bactérias intestinais fermentam essas substâncias dietéticas não digeríveis, e obtêm sua energia de sobrevivência (DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019). Essa fermentação resulta em múltiplos grupos de metabólitos, dos quais os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (principalmente, acetato, lactato, butirato e propionato) são os grupos mais abundantes (FUSCO *et al.*, 2023). Esses compostos estão associados a diversos efeitos benéficos à microbiota intestinal humana (PORTINCASA *et al.*, 2022).

Os prebióticos são substratos utilizados seletivamente por microrganismos, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (GIBSON *et al.*, 2017). O consumo de ingredientes prebióticos está associado à redução do risco de doenças cardiovasculares e obesidade, aumento da absorção de minerais como o cálcio, redução do risco para o câncer de cólon, redução de sintomas associados à doença inflamatória intestinal, dentre outros (DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019).

Para ser classificado como prebiótico, o composto deve resistir à acidez gástrica, hidrólise enzimática e absorção gastrointestinal, demonstrar capacidade de fermentação pela microbiota intestinal, e estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade metabólica de microrganismos associados à saúde, como *Bifidobacterium* e/ou *Lactobacillus* (GIBSON *et al.*, 2017; DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019). Atualmente, várias substâncias são relatadas como prebióticos, incluindo inulina, fruto-oligossacarídeo (FOS), pectina, oligossacarídeos do leite humano (HMO), galacto-oligossacarídeos (GOS), xilooligossacarídeos (XOS), oligossacarídeos derivados da glicose (polidextrose), lactulose, lactossacarose e arabinoxilanos, entre outros (GIBSON *et al.*, 2017).

Os microrganismos presentes na microbiota intestinal promovem a biotransformação desses componentes alimentares para obtenção de energia, gerando metabólitos ao final desse processo (ROWLAND *et al.*, 2018). Os principais metabólitos finais da fermentação bacteriana de prebióticos são os AGCC, como acetato, butirato e propionato relacionados a diversos benefícios à saúde humana. Normalmente esses compostos estão presentes na proporção de 3:1:1 (NOGAL, VALDES & MENNI, 2021).

O acetato é metabolizado em diversos tecidos, especialmente no tecido muscular e cerebral. Na microbiota intestinal apresenta efeito anti-inflamatório. Em condições excepcionais, o acetato pode ser utilizado na alimentação cruzada para produção de butirato (SILVA, BERNARDI & FROZZA, 2021). O butirato é fonte de energia preferida para as células epiteliais do cólon, onde é metabolizado. Ele atua estimulando a proliferação de células normais do cólon, induzindo apoptose de células cancerígenas, reduzindo o estresse oxidativo no cólon, e assim como o acetato, apresenta efeito anti-inflamatório (SALVI & COWLES, 2021). O propionato, embora seja uma fonte de energia menor para as células epiteliais do cólon, previne a proliferação e induz a apoptose de células cancerosas colorretais. Além disso, promove saciedade, redução dos níveis de colesterol no sangue e melhora a sensibilidade à insulina (WEITKUNAT *et al.*, 2016). Juntos, esses ácidos atuam reduzindo o pH colônico, diminuindo a solubilidade dos sais biliares e absorção de amônia, aumentando a absorção de minerais, e inibindo o crescimento de patógenos (RIVIÈRE *et al.*, 2016).

Recentemente foi demonstrado que extratos da polpa de umbu-cajá fermentada foi capaz de modular benéficamente a microbiota bacteriana intestinal, com o aumento da abundância de *Lactobacillus* spp./ *Enterococcus* spp e *Bifidobacterium* spp e diminuição da abundância de *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp, *C. histolyticum* e *E. rectale*/*C. coccoides*. Esses resultados estão relacionados com possível efeito prebiótico do umbu-cajá (MACEDO *et al.*, 2023).



Dessa forma, considerando a crescente demanda por produtos naturais e alimentos funcionais, o aumento da conscientização do consumidor sobre os benefícios à saúde (BAKER *et al.*, 2022), a demanda do setor agroindustrial de frutas para valorização dos excedentes de produção (RODRIGUES *et al.*, 2022), a busca por novos ingredientes prebióticos a partir de subprodutos de frutas tem sido uma alternativa promissora para a área de alimentos funcionais ou suplementos dietéticos (VALLADARES-DIESTRA *et al.*, 2023).

Neste contexto, farinhas produzidas a partir de subprodutos de frutas têm despertado interesse devido a sua capacidade de contribuir com diversos efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Esses efeitos são atrelados a capacidade da farinha em estimular o crescimento de cepas probióticas, e produzir metabólitos. A farinha composta de subprodutos de frutas, como laranja selecta (*Citrus sinensis*), maracujá (*Passiflora edulis*) e melancia (*Citrullus lanatus*), apresentou crescimento de *Lactobacillus* e produção de AGCC como butirato, após 48 horas de fermentação (ANDRADE *et al.*, 2020). A farinha de caule de abacaxi promoveu o crescimento *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. e produção de AGCC (ácidos acético, propiônico e butírico) (CAMPOS *et al.*, 2020).

A farinha da semente de jaca apresentou importantes compostos bioativos como fibras alimentares e polifenóis, além de atividade antioxidantes, resultando no aumento de populações de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (RODRÍGUEZ *et al.*, 2021). A farinha obtida da casca e sementes de melão (*Cucumis melo* L.) promoveu crescimento de bactérias lácticas, principalmente bifidobactérias após 8 horas de fermentação (ROLIN *et al.*, 2018). Esses resultados confirmam o potencial de utilização de farinhas de subprodutos de frutas para o desenvolvimento de ingredientes com potencial prebiótico.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial prebiótico da farinha do subproduto de umbu-cajá (*Spondias* spp.) utilizando sistema de fermentação *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir a farinha a partir do subproduto de umbu-cajá;
- Determinar a composição nutricional e parâmetros físico-químico da farinha de umbu-cajá;
- Expor a farinha a condições que mimetizem o trato gastrointestinal humano;
- Quantificar a abundância relativa de populações bacterianas presentes na microbiota intestinal humana durante fermentação colônica;
- Determinar o índice prebiótico da farinha de umbu-cajá durante fermentação colônica;
- Avaliar atividade metabólica microbiana (pH, açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e perfil metabólico) e atividade antioxidante durante fermentação colônica *in vitro*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO SUBPRODUTO

O subproduto do umbu-cajá (aproximadamente 21 Kg) foi coletado na indústria processadora de polpa de frutas POMAR Polpa de Frutas LTDA, localizada na cidade de Aracaju – SE. Posteriormente, foi armazenado em embalagens de polietileno, acondicionado em caixas isotérmicas e transportado até o Laboratório de Bromatologia de Alimentos pertencente ao Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Sergipe, onde foram acondicionados em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$ . A Figura 2 mostra o subproduto do processamento do umbu-cajá.

**Figura 2** - Subproduto do umbu-cajá coletado na indústria processadora POMAR/SE.



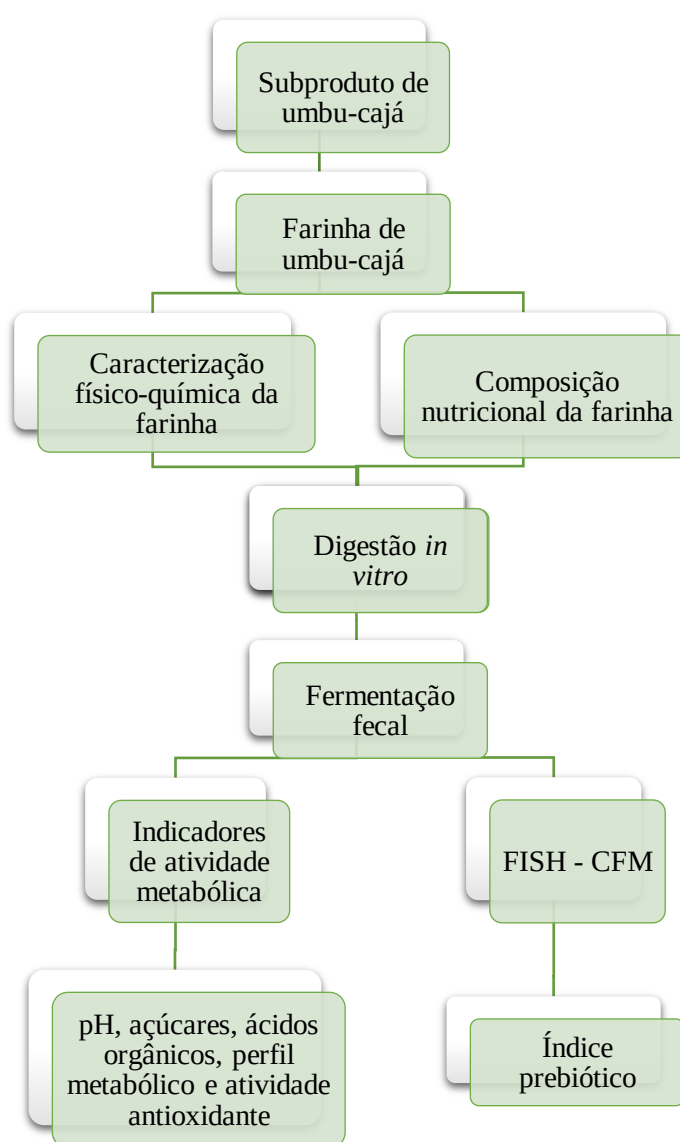
Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Nas dependências dos Laboratórios de Bromatologia de Alimentos, de Química e de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe o subproduto do umbu-cajá foi submetido ao processo de secagem, trituração e tamisação até obtenção de um pó. A partir de elaborada a farinha foi realizada a composição nutricional e determinação dos parâmetros físico-químicos, seguido das etapas que mimetizam a digestão gastrointestinal humana. A farinha foi testada em ensaio de fermentação com inóculo fecal humano, e enumeração de grupos bacterianos utilizando a técnica de fluorescência de hibridização *in situ* (FISH), seguida da citometria de fluxo multiparamétrica (CFM). Ambas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos, Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba (UFPB) - Campus I, João Pessoa – PB. Índices prebióticos foram determinados nos

diferentes meios de fermentação (Farinha de umbu-cajá (FUC); Fructooligossacarídeos (FOS); e Controle Negativo (CN)). O monitoramento de indicadores de atividade metabólica (pH, açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e perfil metabólico global) e atividade antioxidante presentes no meio fermentado foi realizado ao longo do tempo (0, 24 e 48 h). O desenho do estudo é apresentado na Figura 3.

**Figura 3** - Desenho do estudo do potencial prebiótico do subproduto do processamento de umbu-cajá em sistema de fermentação *in vitro*.



Fonte: Própria, 2023. Legenda: CFM: Citometria de Fluxo Multiparamétrica; FISH: Hibridização por fluorescência *in situ*;

#### 4.3 ELABORAÇÃO DA FARINHA DE UMBU-CAJÁ

O subproduto de umbu-cajá foi descongelado, pesado e distribuído em bandejas de aço inoxidável. A farinha foi elaborada por meio de secagem em estufa com circulação de ar forçada (Marconi – MA 035) à  $60 \pm 2$  °C por aproximadamente 7h30min, a fim de alcançar um teor de umidade <15%. Após a secagem, o material foi triturado em processador doméstico (baixa velocidade, 10 minutos; Processador Nutri Ninja - Auto-IQ), peneirado com peneiras de 0,25 mm (60 mesh) para obtenção de um pó (ALVES *et al.*, 2021; XAVIER *et al.*, 2022). Em seguida, a farinha foi embalada em sacos estéreis de polipropileno, selada à vácuo, e mantida sob temperatura ambiente e proteção da luz em local seco por até 6 meses. O balanço de massa para a farinha foi calculado dividindo-se a massa final do produto pela matéria-prima inicial e expresso como % p p<sup>-1</sup>. A figura 4 apresenta a farinha elaborada (Figura 4A) e embalada à vácuo (Figura 4B).

**Figura 4** - Farinha de umbu-cajá (*Spondias* spp.).

Fonte: Elaborada pelo autor (2023)



#### 4.4 DETERMINAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA FARINHA DE UMBU-CAJÁ

A farinha produzida foi submetida às análises físico-químicas quanto ao teor de umidade, pH, acidez, cinzas, proteínas, lipídios, carboidratos totais e fibras alimentares. Todas as análises foram realizadas em triplicata, seguindo segundo os protocolos Físico-Químicos para Análise de Alimentos (IAL, 2008; AOAC, 2016).

As análises químicas foram determinadas para farinha de umbu-cajá quanto ao teor de açúcares e ácidos orgânicos (COELHO *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2019), compostos fenólicos (PADILHA *et al.*, 2017; MORO *et al.*, 2018) e atividade antioxidante (RE *et al.*, 1999; BRAND-WILLIAMS, CUVELIER & BERSET, 1995; OYAIZU, 1986).

#### **4.4.1 Determinação de umidade**

A farinha produzida foi submetida às análises físico-químicas quanto ao teor de umidade por secagem direta em estufa estabilizada a 105 °C até obtenção de peso constante (IAL, 2008). O cálculo para determinação do teor de umidade está descrito na Equação 1.

**Equação 1-** Determinação da umidade

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade ou substâncias voláteis à } 105^{\circ}\text{C por cento (m/m)}$$

Sendo:

N = n.º de gramas de umidade (perda de massa em g);

P = n.º de gramas da amostra

#### **4.4.2 Determinação de pH**

O pH foi determinado por leitura em medidor de pH potenciométrico (Kasvi - K39-0014PA). A medida foi realizada empregando 10 g da amostra diluída em 100 mL de água destilada. Após a leitura constante foi obtido o valor de pH da amostra do subproduto e da farinha de umbu-cajá. A determinação foi realizada em triplicata (IAL, 2008).

#### **4.4.3 Determinação de acidez titulável**

Para determinação de acidez foi pesado cerca de 5 g de cada amostra (subproduto e farinha), transferindo para um béquer de 200 mL com o auxílio de 100 mL de água destilada e adicionando de 2 a 4 gotas da solução fenolftaleína para titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>. O béquer com a solução foi levado para o agitador magnético onde foi colocado o eletrodo e compensador de temperatura, determinando o ponto de equivalência pela medida do pH da solução. A titulação com hidróxido de sódio foi realizada até que a solução apresentasse uma faixa de pH entre 8,2 e 8,4. (IAL, 2008). A análise foi realizada em triplicata, e o cálculo para determinação do seu valor está descrito na equação a seguir na equação 2.

#### **Equação 2 - Determinação de acidez**

$$\frac{V \times f \times 100}{P \times c} = \text{acidez em solução molar por cento (v/m)}$$

Onde:

V= Volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação (0,1 M)

f= fator de correção da solução de hidróxido de sódio (0,1M)

P= n.º de gramas da amostra usado na titulação

c=correção para solução NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>

#### **4.4.4 Determinação de cinzas**

O teor de cinzas foi determinado por carbonização seguida de incineração em forno mufla estabilizado a 550 °C, tanto para o subproduto quanto para a farinha (IAL, 2008). O cálculo para determinar o teor de cinzas está descrito na Equação 3.

#### **Equação 3 - Determinação de cinzas**

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{cinzas por cento (m/m)}$$

Sendo:

N = n.º de gramas de cinzas

P = n.º de gramas da amostra

#### **4.4.5 Determinação de proteínas pelo Método de Kjeldahl**

Para determinação de proteínas, a amostra foi encaminhada para o Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe (ITPS), que adota os protocolos dos Métodos físico-químicos para análise de alimentos, edição IV, 1ª Edição Digital, do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). O cálculo para determinação de proteínas está descrito na equação 4.

#### **Equação 4 - Determinação de proteínas**

$$\frac{V * 0,14 * f}{P} = \text{protídeos por cento m/m}$$

Sendo:

V = diferença entre o nº de mL de ácido sulfúrico 0,05 M e o nº de mL de hidróxido de sódio 0,1 M gastos na titulação

f = fator de conversão (6,25)

P = nº de g da amostra

#### 4.4.6 Determinação de lipídeos

A determinação de gordura foi realizada pela extração de lipídeos ligados às proteínas e carboidratos através da utilização de solventes polares. O teor de lipídeos foi realizado no ITPS de acordo com os protocolos dos Métodos físico-químicos para análise de alimentos (IAL, 2008). O cálculo para determinar o teor de lipídios está descrito na Equação 5.

#### Equação 5 - Determinação de lipídeos

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{lipídios ou extrato etéreo por cento m/m}$$

Onde:

N= nº de gramas de lipídios

P= nº de gramas da amostra

#### 4.4.7 Determinação de fibras alimentares

O procedimento para determinar o conteúdo de fibra alimentar (solúvel e insolúvel) foi determinado utilizando um kit de ensaio enzimático-gravimétrico (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e um kit de ensaio enzimático-colorimétrico (Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Irlanda), de acordo com método (991.43) (AOAC 2016). Segundo este método, duplicados de cada amostra seca e moída (com um teor de gordura <10 %) são submetidos à digestão enzimática, com o objetivo de promover a hidrólise do amido e das proteínas presentes na amostra. Inicialmente procedeu-se à hidrólise do amido através da  $\alpha$ -amilase, na etapa seguinte à hidrólise da proteína pela ação da protease e, por último à hidrólise da amilase por adição da amiloglicosidase. A fibra solúvel é precipitada com etanol 95%. O resíduo total é filtrado e sucessivamente lavado com etanol 78%, etanol 95% e acetona. Após secagem o resíduo é



pesado. Um dos duplicados é usado para a determinação da proteína e o outro para a determinação da cinza. O cálculo para determinação dos valores de fibra insolúvel, solúvel e total está descrito nas Equações 7, 9 e 10, respectivamente. Os dados foram aplicados em cálculos para a correção do branco de acordo com as equações 6 e 8.

A correção do branco é expressa em gramas e o resultado das fibras insolúveis e solúveis é expressa por 100 g de amostra.

#### **4.4.7.1 Fibras Insolúveis**

**Equação 6** - Correção do branco

$$(P2bi - P1bi) - PTNbi - Czbi$$

**Equação 7** - Cálculo de fibra insolúvel

$$FAI = \frac{(P2i - P1i) - PTNi - CZi - CBi}{PAi} * 100$$

Sendo,

P2bi= Número de gramas do cadinho de resíduo de branco;

P1bi=Número de gramas cadinho branco tarado;

PTNbi= Proteína calculado para o branco;

CZbi=Cinzas obtidas do branco;

P2i=Número de gramas do cadinho de resíduo da amostra;

P1i=Número de gramas do cadinho da amostra tarado;

PTNi=Proteína calculado para a amostra;

CZi=Cinzas obtidas da amostra;

CBi=Correção do branco; e

PAi=Peso (média) da amostra em gramas.

#### **4.4.7.2 Fibras Solúvel**

#### **Equação 8 - Correção do branco**

$$= (P2bs - P1bs) - PTNbs - Czbs$$

#### **Equação 9 - Cálculo de fibra solúvel**

$$FAS = \frac{(P2s - P1s) - PTNs - CZs - CBs}{PA_s} * 100$$

Sendo,

P2bs= Número de gramas do cadinho de resíduo de branco;

P1bs=Número de gramas cadinho branco tarado;

PTNbs= Proteína calculado para o branco;

CZbs=Cinzas obtidas do branco;

P2s=Número de gramas do cadinho de resíduo da amostra;

P1s=Número de gramas do cadinho da amostra tarado;

PTNs=Proteína calculado para a amostra;

CZs=Cinzas obtidas da amostra;

CBs=Correção do branco; e

PA<sub>s</sub>=Peso (média) da amostra em gramas.

#### **4.4.7.3 Fibra Total**

#### **Equação 10 - Fibra alimentar total**

$$FAT = FAI + FAS$$

Sendo,

FAI= Resultado de fibras insolúvel

FAS= Resultado de fibras solúvel

O teor de fibra alimentar total foi realizado por meio da somatória dos teores de fibra insolúvel e fibra solúvel, sendo o resultado expresso em g 100 g<sup>-1</sup> de amostra.

#### 4.4.8 Determinação de carboidratos totais

O teor de carboidratos totais foi calculado pela diferença entre o total da amostra (100 %) e a soma dos teores de proteínas, lipídios, umidade e cinzas obtidos conforme descritos anteriormente (AOAC, 2005).

#### 4.4.9 Determinação do teor de açúcares e ácidos orgânicos

Para determinação do conteúdo de açúcares (glicose, frutose e maltose) e ácidos orgânicos da farinha (ácido acético, láctico, butírico e propiônico), foram realizados extratos aquosos da farinha. Inicialmente, 2 g do UCF foi homogeneizada com 10 mL de água ultrapurificada (Milli-Q® Sistema de Purificação Integral de Água, EMD Millipore Corporation, Billerica, EUA) por 10 minutos usando a Incubadora refrigerada com Agitação (TE 424, Tecnal, São Paulo, Brasil). A mistura foi centrifugada (4000 x g, 15 minutos, 4 °C) e o sobrenadante foi filtrado com um filtro de 0,45 µm (Whatman®, GE Healthcare, Chicago, IL, EUA) (COELHO *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2019).

Na sequência as amostras foram cromatografadas, utilizando um cromatógrafo Agilent (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, St. Clara, EUA) equipado com bomba de solvente quaternário (modelo G1311C), desgaseificador, compartimento da coluna termostática (modelo G1316A) e amostrador automático (modelo G1329B), acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) (modelo G1315D), detector de Índice de Refração (RID) (modelo G1362A), coluna Hydro-RP C18 (150 x 4.6 mm, 4 micrômetros); fase móvel solução aquosa H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 milimol L<sup>-1</sup> em água ultrapura e taxa de fluxo 0,7 mL min<sup>-1</sup>. Os dados foram processados usando o software *OpenLAB CDS ChemStation Edition™* (Agilent Technologies, St. Clara, EUA). Os picos da amostra observados na CLAE foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com os respectivos padrões (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para açúcares e ácidos orgânicos.

#### 4.4.10 Determinação do teor de compostos fenólicos

Extrato metanólico da farinha foi preparado para determinação dos compostos fenólicos (ácido fenólico: ácido gálico, ácido caftarico, ácido clorogênico, ácido p-cumárico; Flavanonas: hesperidina, naringenina; Flavanóis: catequina, epigallocatequina galato, epicatequina, procianidina A2, procianidina B1, procianidina B2, miricetina, quercetina 3-glicosídeo, kaempferol 3-glicosídeo, isoramnetina; e Estilbenos: trans-resveratrol). Para isso, 2 g da farinha foi acidificado com 0,1 mM HCl (Neon, São Paulo, Brazil) para atingir o pH 2. Posteriormente o conteúdo foi misturado à 10 mL de metanol:água (70:30 v/v) (25 °C/ 60 min) utilizando a

Incubadora refrigerada com Agitação (Tecnal, São Paulo, Brasil). A mistura foi centrifugada ( $4000 \times g$ , 15 min, 24 °C) e o sobrenadante foi filtrado (membrana de celulose regenerada, 0,45  $\mu m$ ) (PADILHA *et al.*, 2017; MORO *et al.*, 2018).

A determinação dos compostos fenólicos presentes na farinha seguiram a metodologia descrita na seção 4.4.9, cujo os cumprimentos de onda monitorados foram (DAD1 A, 280,4 nm (ácido gálico, hesperidina e naringenina); DAD1 B, Sinal =220,4 nm (catequina, epigallocatequina galato, epicatequina, procianidina A2, procianidina B1, procianidina B2); DAD1 C, 320,4 nm (ácido caftarico, ácido clorogênico, ácido p-cumárico e trans-resveratrol) e DAD1 D, 360,4 nm (miricetina, quercetina 3-glicosídeo, kaempferol 3-glicosídeo, isoramnetina). A identificação dos dos picos cromatográficos referentes aos compostos fenólicos da amostra, parados por CLAE, foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com os respectivos padrões (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante da farinha de umbu-cajá foi avaliada pelos ensaios ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> e FRAP. A obtenção do extrato foi realizada conforme a metodologia descrita na seção 4.4.10.

##### 4.5.1 Análise da capacidade antioxidante pelo método ABTS<sup>•+</sup> - captura do radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2' - azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))

Na determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS<sup>•+</sup>, foi adotada metodologia proposta por (RE *et al.* 1999), com algumas adaptações. O ABTS<sup>•+</sup> foi preparado 16 horas antes das análises adicionando-se persulfato de potássio e solução estoque de ABTS<sup>•+</sup>. No dia da análise o radical estabilizado, foi avaliado a 720nm em espectrofotometria de absorção molecular, e diluído em etanol. Em ambiente escuro foi transferida uma alíquota de 30  $\mu L$  de cada concentração do extrato em microplaca, adicionando em seguida 300  $\mu L$  do radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)). Após 6 minutos realizou-se leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 734nm. Os resultados foram expressos em percentual de atividade redutora a partir da equação 11:

#### **Equação 11** - Cálculo de atividade antioxidante – ABTS<sup>•+</sup>

$$\% \text{ de atividade} = (\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle} \times 100$$

Onde: “Abs amostra” e “Abs controle” são, respectivamente, a absorbância observada na amostra e no sistema (sem antioxidante).

#### **4.5.2 Análise da capacidade antioxidante pelo método DPPH<sup>•</sup> (Captura do radical livre - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil)**

Adotou-se a metodologia utilizada anteriormente (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995) com algumas modificações para microplaca na determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH<sup>•</sup>. Para tanto, foi preparado 50 µL e diluído em 150 µL de solução de DPPH<sup>•</sup> 400 milimol L<sup>-1</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) diluído em metanol. Após 30 minutos de repouso, a redução do radical foi verificada a 515 nm em espectrofotômetro. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle (sem antioxidante). O decréscimo dos valores de densidade ótica das amostras foi correlacionado com o do controle e estabelecido o percentual de atividade redutora, expressa pela equação 12:

#### **Equação 12** - Cálculo de atividade antioxidante – DPPH<sup>•</sup>

$$\% \text{ de atividade} = (\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle} \times 100$$

Onde: “Abs amostra” e “Abs controle” são, respectivamente, a absorbância observada na amostra e no sistema (sem antioxidante).

#### **4.5.3 Análise da capacidade antioxidante pelo método FRAP- poder redutor do Ferro (FRAP)**

Foi utilizado o método empregado por (OYAIZU, 1986) com algumas modificações para microplaca. Em ambiente escuro foram retiradas alíquotas de 9 µL do extrato, acrescentaram-se 27 µL de água destilada e 270 µL do reagente FRAP (Solução de tampão acetato 0,3 M, TPTZ e cloreto férrico). A microplaca foi mantida em estufa (37°C durante 30 minutos). E seguida, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Todas as leituras foram feitas em triplicata e os resultados, expressos em micromol equivalentes de Trolox, utilizando-se a curva padrão ( $y = 0,0009x + 0,1422$ ;  $R^2=0,993$ ).

#### 4.6 ENSAIO GASTROINTESTINAL *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE PREBIÓTICA

FUC foi submetida à digestão gastrointestinal *in vitro*, mimetizando condições gastrointestinais fisiológicas em três fases sequenciais (oral, gástrica e intestinal, incluindo diálise), com ajuste de pH, tempo, temperatura, rotação e enzimas específicas em cada etapa, a fim de ser transformada em material com características similares às aquelas que alcançam o cólon humano (WOJTUNIK-KULESZA *et al.*, 2020).

Para isso, 10 g da farinha foram misturados com 50 mL de água destilada estéril em um frasco de vidro com tampa e homogeneizado manualmente por 5 min. Uma mistura de  $\alpha$ -amilase (3,33 mg) e  $\text{CaCl}_2$  1 milimol (1,04 mL, pH 7) foi adicionada a solução das farinhas e mantidas a 37 °C por 30 min sob agitação de 130 rpm. Posteriormente, o pH da mistura foi ajustado para 2 – 2,5 de solução 0,001 mol L<sup>-1</sup> de HCl, adicionado de pepsina (0,45 g em 4,16 mL de solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>,) e mantida à 37 °C por 2 horas sob agitação de 130 rpm. Bile (0,58 g) e pancreatina (0,93 g) misturados com 20,8 mL de  $\text{NaHCO}_3$  0,5 mol L<sup>-1</sup> foram incorporados a mistura. O pH foi ajustado para 6,5 – 7 usando  $\text{NaHCO}_3$  1 mol L<sup>-1</sup> e mantidos à 37 °C por 2 horas sob agitação de 45 rpm. As enzimas e reagentes utilizados para realização da digestão gastrointestinal *in vitro* foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Ao final do processo digestivo, o material resultante foi submetido a barreira intestinal simulada, utilizando membrana de celulose regenerada de 1 kDa de peso molecular (Spectra/Por® 6, Spectrum Europe BV, Breda, Holanda) (Figura 5), previamente hidratada por 30 minutos em água destilada aquecida (60 ± 2 °C). Essas membranas contendo o material foram imersas em NaCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> e incubadas a 5 ± 0,5 °C, para remover produtos da digestão de baixo peso molecular. Após 18 horas, os fluidos de diálise foram trocados e a diálise continuou por um período adicional de 2 horas. As amostras dializadas foram congeladas a - 80 °C por 24 horas, em seguida foram liofilizadas (temperatura - 53 ± 2 °C, pressão do vácuo < 138 µHg, velocidade 1 mmh<sup>-1</sup>) por 20 h utilizando liofilizador de bancada (modelo L-101, LIOTOP, São Carlos, SP, Brasil) e depois armazenadas à vácuo em sacos de polipropileno sob proteção da luz em local seco por até 4 semanas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021).

**Figura 5** - Tubo de diálise de celulose com o subproduto de umbu-cajá liofilizado pré-digerido.



Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

#### 4.7 ENSAIO DE ATIVIDADE PREBIÓTICA UTILIZANDO INÓCULO FECAL

##### 4.7.1 Procedimentos éticos e legais

Por se tratar de uma pesquisa envolvendo seres humanos, o estudo levou em consideração a garantia dos princípios éticos e legais que regem a pesquisa em seres humanos, preconizados na Resolução N° 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) do Ministério da Saúde. Visando assegurar direitos e deveres no que diz respeito à comunidade científica, aos sujeitos do estudo e ao Estado, este estudo foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe – CEP/ UFS. O protocolo experimental foi aprovado sob o número 6.419.531, de acordo com o parecer consubstanciado (ANEXO A). Ao concordarem com os objetivos do estudo, os participantes foram orientados a ler e convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (APÊNDICE A), garantido aos participantes do estudo a confidencialidade e sigilo das informações.

##### 4.7.2 Coleta de amostras fecais

Amostras fecais frescas foram coletadas de seis voluntários adultos (três homens e três mulheres), com idade entre 22 e 28 anos. Como critérios de inclusão, os participantes seguiam uma dieta onívora, sem antecedentes de transtornos metabólicos e/ou gastrointestinais e sem uso

de alimentos probióticos ou prebióticos concentrados, antibióticos ou qualquer outro medicamento de uso controlado por, pelo menos, seis meses antes da coleta. Foi disponibilizado para cada doador um kit de coleta, contendo frascos coletores esterilizados, luvas, máscaras, prato e espátula descartável, além de álcool 70%, sendo instruídos quanto ao manuseio asséptico das amostras (GUERGOLETTTO *et al.*, 2016).

Após a coleta das amostras, elas foram colocadas em uma jarra anaeróbica (Anaerojar™ 2.5L, Oxoid Ltd) junto com um kit gerador de gás (AnaeroGen™, Oxoid), a fim de reproduzir as condições anaeróbicas, por no máximo 1 h, e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021b).

#### **4.7.3 Preparação de amostras fecais**

As amostras fecais frescas coletadas de cada doador foram misturadas em igual quantidade (1:1:1:1:1), diluídas ( $1:10 \text{ p v}^{-1}$ ) em solução de sal fisiológico reduzido constituído de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de cisteína e  $8,5 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl e, posteriormente, homogeneizadas por cerca de um minuto sob agitação manual. Após a diluição e homogeneização, o inóculo fecal foi filtrado com o uso de camada tripla de gazes esterilizadas para remoção de partículas grandes. Posterior a filtração, o inóculo fecal fresco foi utilizado (ANDRADE *et al.*, 2020; MENEZES *et al.*, 2020). Os ingredientes usados para preparar a solução de sal fisiológico foram obtidos da Sigma-Aldrich.

#### **4.7.4 Preparação do meio de fermentação colônica**

Foi utilizado para o processo de fermentação 1 L de meio de crescimento esterilizado em autoclave ( $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm, 15 min), com a seguinte composição: 4,5 g de NaCl, 4,5 g de KCl, 1,5 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,69 g de  $\text{MgSO}_4$ , 0,8 g de L-cisteína HCl, 0,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,4 g de sal biliar, 0,08 g  $\text{CaCl}_2$ , 0,005 g de  $\text{FeSO}_4$  e 1 mL de Tween 80. Como um indicador anaeróbio,  $4 \text{ mL L}^{-1}$  de solução de resazurina (0,025%,  $\text{v v}^{-1}$ ) foi adicionado ao meio, e água destilada foi utilizada para diluir todos os componentes. O meio de crescimento foi adicionado em frasco de vidro estéril e o pH do meio foi ajustado para 6,8 com HCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . A farinha de FUC digerida foi submetida à fermentação com o inóculo fecal humano (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021b; MENEZES *et al.*, 2021).

A fermentação colônica foi formulada com 40% do meio de crescimento ( $\text{v v}^{-1}$ ), 40% do inóculo fecal e 20% de farinha de UCF digerida ( $\text{p v}^{-1}$ ), em um volume final de 40 mL. Após o preparo, as culturas foram incubadas anaerobicamente à  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Um meio de fermentação contendo FOS ( $20\% \text{ p v}^{-1}$ ) e um meio sem substrato foram utilizados como



controle positivo e negativo, respectivamente, sendo submetidos aos mesmos procedimentos citados acima. Os reagentes usados para preparar o meio de fermentação foram obtidos da Sigma Aldrich.

#### **4.7.5 Enumeração e identificação de populações bacterianas por fluorescência de hibridização com citometria de fluxo multiparamétrica**

Para avaliar a capacidade da farinha UCF, após a digestão, em modular a microbiota intestinal humana durante fermentação colônica *in vitro*, foi utilizada a técnica de fluorescência de hibridização *in situ* (FISH), usando sondas oligonucleotídicas selecionadas e programadas para atingir regiões alvo específicas do gene 16S rRNA de distintos grupos bacterianos, em combinação com citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021b; CONTERNO *et al.*, 2019; MENEZES *et al.*, 2021).

De acordo com Botari *et al.* (2006), a FISH-MFC inclui quatro procedimentos básicos: fixação e permeabilização da amostra, hibridização, lavagem para remoção das sondas em excesso e detecção pela citometria de fluxo. Antes da hibridização, as amostras contendo os microrganismos são fixadas para proteger o RNA da degradação de RNAses endógenas e permeabilizadas para permitir que as sondas penetrem na célula.

##### **4.7.5.1 Sondas de DNA**

Foram utilizadas um total de seis sondas, sintetizadas comercialmente e marcadas com o fluoróforo de cianina Cy3, (Lab 158 específica para *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp., Bif 164 específica para *Bifidobacterium*, Rfla 729 *Ruminococcus albus*/R. *Flavefaciens*, Bac 303 específica para Bacteroides - *Prevotella*, Chis 150 específica *Clostridium histolyticum* e Erec 482 específica para *Eubacterium rectale*/*Clostridium coccoides*) (Sigma-Aldrich) (Tabela 2). Para enumerar a população total de bactérias por meio da marcação da fita dupla de DNA, foi utilizado o marcador SYBR Green (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (CONTERNO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2023).

**Tabela 1** - Sondas de oligonucleotídeos de rRNA 16S e condições de hibridização utilizadas nas análises com hibridização *in situ* fluorescente acoplada a citometria de fluxo multiparamétrica.

| Sonda    | Grupo bacteriano<br>alvo                                   | Sequência (5' – 3')     | Temperatura | Lavagem para<br>hibridização |
|----------|------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------|------------------------------|
| Lab 158  | <i>Lactobacillus</i> spp.-<br><i>Enterococcus</i> spp.     | GGTATTAGCAYCTGTTTCCA    | 50 °C       | 50 °C                        |
| Bif 164  | <i>Bifidobacterium</i> spp.                                | CATCCGGCATTACCACCC      | 50 °C       | 50 °C                        |
| Rfla 729 | <i>Ruminococcus albus</i> /R.<br><i>flavefaciens</i>       | AAAGCCCAGTAAGCCGCC      | 50 °C       | 50 °C                        |
| Bac 303  | <i>Bacteroides</i> spp.-<br><i>Prevotella</i> spp.         | CCAATGTGGGGGACCTT       | 45 °C       | 45 °C                        |
| Chis 150 | <i>Clostridium histolyticum</i>                            | TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT | 50 °C       | 50 °C                        |
| Erec 482 | <i>Clostridium coccoides</i><br><i>Eubacterium rectale</i> | GCTTCTTAAGTCARGTACCG    | 50 °C       | 50 °C                        |

Fonte: Adaptado de Silva *et al.*, 2023.

#### 4.7.5.2 Fixação e permeabilização

Visando estabilizar a estrutura celular, no tempo zero (logo após a homogeneização dos componentes do meio de fermentação) e após 24 e 48 h de fermentação, alíquotas de 375 µl das culturas foram fixadas overnight a 4 °C em 1,125 µl de paraformaldeído filtrado à 4% (p v<sup>-1</sup>). Em seguida, as alíquotas foram centrifugadas (10600 × g, 5 minutos, 4 °C), lavadas duas vezes (10600 × g, 5 minutos, 4 °C) com 1 mL de PBS estéril (0,1 milimol, descartado o sobrenadante, ressuspensas em 300 µL de PBS:etanol 99% (1:1 v v<sup>-1</sup>), filtradas com filtro de membrana 0,45 µm (Whatman®) e armazenadas à - 20 °C até ser usado para hibridização.

#### 4.7.5.3 Hibridização e lavagem

Para a realização da hibridização *in situ*, 10 µL da suspensão contendo as células fixadas foram ressuspensas em 190 µL de PBS 1X (Gibco®, Gaithersburg, EUA; pH 7.2), centrifugadas (4000 × g, 15 minutos, 4 °C), descartado o sobrenadante, ressuspensas em 200 µL de tampão Tris-EDTA (01, mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl e 0,05, mol L<sup>-1</sup> EDTA – diluídos em água Milli-Q; pH 8) e centrifugadas (2146 × g, 15 minutos, 4 °C). As amostras foram tratadas com 200 µL de Tris-EDTA contendo lisozima (1 mg mL<sup>-1</sup>) e incubadas por 10 minutos no escuro a temperatura

ambiente ( $25 \pm 0,5$  °C) para permeabilizar as células que receberam as sondas Lab 158 e Bif 164, seguindo por centrifugação ( $2146 \times g$ , 15 minutos, 4 °C). As amostras foram ressuspensas em 45 µL de tampão de hibridização [(0,9 milimol NaCl, 20 mM Tris-HCl - diluídos em água Milli-Q (pH 7,5), 0,1% (p v-1) de dodecil sulfato de sódio (DSS)] e com 5 µL de sonda oligonucleotídica fluorescente ( $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) e mantidas sob temperatura de hibridização apropriada para cada sonda (45 ou 50 °C) no escuro por 4 horas. As sondas oligonucleotídicas fluorescentes foram preparadas imediatamente antes dos ensaios.

Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas ( $2146 \times g$ , 15 minutos, 25 °C), descartado o sobrenadante, ressuspensas em 200 µL de tampão de lavagem (0,9 milimol NaCl, 20 milimol Tris-HCl - diluídos em água Milli-Q (pH 7,5) sem DSS e mantidas sob temperatura de lavagem apropriada para cada sonda (45 ou 50 °C) no escuro por 30 minutos para retirar sondas não ligadas. As amostras foram centrifugadas ( $2146 \times g$ , 15 minutos, 25 °C), ressuspensas em 200 µL de PBS 1X e 20 µL de SYBR Green (1:1000 solução estoque diluída em dimetil sulfoxido  $\geq 99.9\%$ , Sigma-Aldrich), incubadas por 10 minutos no escuro sob temperatura ambiente ( $25 \pm 0,5$  °C), centrifugadas ( $2146 \times g$ , 15 minutos, 25 °C) e ressuspensas com 200 µL de PBS 1X.

Uma amostra em branco (sem a sonda oligonucleotídica e sem SYBR Green), e uma amostra marcada somente com SYBR Green, foram preparadas para todas as amostras (0, 24 e 48h), seguindo os mesmos passos das amostras hibridizadas, como um controle para definir o limiar das comportas do citômetro de fluxo (BD Accuri C6, New Jersey, EUA), o que permite revelar a potencial autofluorescência das amostras, excluindo os falsos positivos.

#### **4.7.5.4 Detecção por citometria de fluxo multiparamétrica**

Na análise de CFM, os sinais fluorescentes das células individuais passam através de uma zona de laser, sendo coletados como sinais logaritmos. Esses sinais são convertidos em sinais eletrônicos e são analisados por um computador e registrados com um *software* (MCKINNON, 2018).

Os sinais fluorescentes (mensuramento da área de pulso) foram coletados pelos canais FL1 (SYBR Green) e FL2 (Lab 158, Bif 164, Rfla 729, Bac 303, Chis 150, Erec 482). A aquisição das amostras foi configurada para passar em um baixo fluxo, com nível limite para dispersão direta (FSC) ajustado para 30.000 e com total de 10.000 eventos coletados para cada amostra. Os citogramas de emissão de fluorescência foram registrados com o *software* BD Accuri C6 (Becton Dickinson and Company). Os resultados foram expressos como abundância (porcentagem relativa) de células hibridizadas com cada sonda Cy3 específica de grupo

bacteriano (registrados como eventos fluorescentes) em relação ao total de bactérias enumeradas com coloração SYBR Green (CONTERNO et al., 2019).

#### 4.7.6 Determinação de índices prebióticos

Visando quantificar uma medida comparativa geral do equilíbrio entre as diferentes populações bacterianas na amostra de fermentação colônica, assim como comparar a influência do FUC na modulação microbiana seletiva durante a fermentação colônica, um índice prebiótico foi calculado com dados obtidos na análise de FISH-CFM. O índice prebiótico foi determinado após o cálculo da abundância relativa (%) de cada grupo bacteriano medido com base nos resultados de FISH-CFM (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021b; SILVA *et al.*, 2023), usando a equação 13:

#### Equação 13 - Cálculo de índice prebiótico

$$\text{Índice prebiótico} = \% \text{Lab} + \% \text{Bif} + \% \text{Rfla} - \% \text{Bac} - \% \text{Chis} - \% \text{Erec}$$

Onde: %Lab = (abundância encontrada para Lab após 24 ou 48 horas) – (abundância encontrada para Lab no tempo zero);

%Bif = (abundância encontrada para Bif após 24 ou 48 horas) – (abundância encontrada para Bif no tempo zero);

%Rfla (abundância encontrada para Lab após 24 ou 48 horas) – (abundância encontrada para Rfla no tempo zero);

%Bac = (abundância encontrada para Bac após 24 ou 48 horas) – (abundância encontrada para Bac no tempo zero);

%Chis = (abundância encontrada para Chis após 24 ou 48 horas) – (abundância encontrada para Chis no tempo zero); e

%Erec = (abundância encontrada para Erec após 24 ou 48 horas) – (abundância encontrada para Erec no tempo zero).

Quando a equação expressa um aumento na população de *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp. (hibridizado pela sonda Lab 158) e/ou *Bifidobacterium* spp. (hibridizado pela sonda Bif 164) e/ou *Ruminococcus albus*/*R. flavefaciens* (hibridizados pela sonda Rfla 729), representa um efeito positivo, enquanto um aumento na população de *Bacteroides* spp. - *Prevotella* spp. (hibridizado pela sonda Bac 303), *C. histolyticum* (hibridizado pela sonda Chis 150) e *E. rectale* - *C. coccoides* (hibridizado pela sonda Erec 482) representa um efeito negativo (ALBUQUERQUE et al., 2021b).

#### 4.8 MONITORAMENTO DE INDICADORES DE ATIVIDADE METABÓLICA

Indicadores de atividade metabólica (pH, açúcares, ácidos orgânicos, perfil metabólico global) foram avaliados em diferentes meios de fermentação colônica (umbu-cajá (FUC), frutooligossacarídeos (FOS) e Controle Negativo (CN), e em diferentes tempos (0, 24 e 48 horas). Para isso, foram retiradas alíquotas (3 mL) ao longo da fermentação.

A análise de pH, realizada nos diferentes meios, durante 0, 24 e 48 horas foi realizada utilizando medidor de pH potenciométrico (Q400AS, Quimis, São Paulo, Brasil) até leitura constante. As análises de açúcares e ácidos orgânicos nos diferentes meios, durante 0, 24 e 48 horas foram realizadas conforme metodologia descrita nas seções 4.4.9.

O perfil metabólico global foi avaliado em meios com UCF e FOS nos tempos 0 e 48 horas, a partir da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$ ). Essa análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise da UFPB. A quantificação e identificação dos metabólitos foram realizados por método espectroscópico de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . As análises foram realizadas utilizando um equipamento da marca Bruker, modelo *Avance Neo*, operando à 500 MHz para  $^1\text{H}$ -NMR e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$  (Bruker, Billerica, MA, EUA). Para se obter a sequência do espectro foram utilizados os seguintes parâmetros: Ic1pngpf2; temperatura 26 °C; número de varreduras: 64; varredura dumer: 16; ganho do receptor: 32; tempo de aquisição: 3,27 segundos.

Para realização desta análise, 2 mL de cada amostra foi diluída (1:1) em solução com metanol grau HPLC ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) e água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) (9:1, vv<sup>-1</sup>), centrifugadas (MPW®, 4000 RPM, 10 minutos, 4° C) e filtradas com filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore®). A análise de dados das amostras consistiu em picos que variam de acordo com a intensidade de sinais nas diferentes regiões avaliadas. O processamento dos espectros foi realizado utilizando o *software* MestReNova® (MNova) versão 5.2.3.

#### 4.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi avaliada em meio com FUC durante 48 h de fermentação colônica, e foi realizada conforme metodologia descrita na seção 4.5.

#### 4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios foram conduzidos em triplicata e expressos em média  $\pm$  desvio padrão estimado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey; e teste  $t$  de Student não pareado. Os valores de  $p < 0,5$  foram considerados significativos (nível de significância de 5%). A Análise de Componentes Principais (ACP) foi executada com uma matriz de 9 linhas (3 linhas para UCF, FOS e sem fonte, e em três momentos distintos), e 13 colunas, (6 colunas para abundância dos grupos bacterianos avaliados, 1 para o Índice prebiótico, 2 para açúcares e 4 para AGCC). Os dados coletados foram tabulados no Software Microsoft Excel e a análise foi avaliada no Software R (Versão 4.3.1 Ross Ihaka & Robert Gentleman, University of Auckland, Auckland, New Zealand).

## 5 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados no artigo intitulado “Umbu-cajá flour and prebiotic potential on colonic microbiota *in vitro*” (Apêndice B).

Diante da composição da farinha de umbu-cajá, os resultados demonstraram índices prebióticos positivos durante às 24 e 48 h de fermentação colônica, demonstrado através do aumento da abundância relativa das populações de *Lactobacillus-Enterococcus*, *Bifidobacterium*, diminuição de *E. rectale/C. coccoides* e intensa atividade metabólica ao longo da fermentação colônica. Esses resultados foram evidenciados a partir do consumo de açúcares (frutose e glicose), produção de AGCC (acetato, lactato, butirato e propionato), diminuição do pH ao longo das 48 horas de fermentação colônica. Esses resultados sugerem que a farinha de umbu-cajá é um potencial produto prebiótico devido a sua capacidade de regular positivamente a microbiota intestinal. Estes resultados podem incentivar o setor agroindustrial a avaliar os subprodutos do processamento do umbu-cajá para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais e sustentáveis a partir de recursos atualmente subutilizados.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, J. G. D. *et al.* Aproveitamento integral da seriguela (*spondias purpurea*) na produção de biscoito doce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 3, 2016.
- ALBUQUERQUE, M. A. C. *et al.* Bioactive compounds of fruit by-products as potential prebiotics. Valorization of Agri-food waste and by-products. Recent Trends, Innovations and Sustainability Challenges, Cambridge: **Academic Press**, p. 47-59, 2021a.
- ALBUQUERQUE, T. M. R. *et al.* Effects of digested flours from four different sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) root varieties on the composition and metabolic activity of human colonic microbiota in vitro. *Journal of Food Science*, 86, p. 3707–3719, 2021b.
- ALEGBELEYE *et al.* Microbial spoilage of vegetables, fruits and cereals. **Applied Food Research**, v. 2, n. 1, p. 100122, 2022.
- ALVES, I. A. *et al.* Nutritional and functional potential of umbu bark flour (*Spondias tuberosa* Arruda Cam.). **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 11, n. 2, p. 964-974, 2021.
- ALVES, T. P., *et al.* Qualidade pós-colheita de frutos do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) armazenados sob atmosfera modificada. **Diversitas Journal**, v. 5, n.3, p. 1523–1535, 2020.
- ANDRADE, R. M. S. *et al.* Potential prebiotic effect of fruit and vegetable byproducts flour using in vitro gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 137, 2020.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI 2021 – **Editora Gazeta**. Disponível em: <<https://www.editoragazeta.com.br/produto/anuario-brasileiro-de-horti-fruti-2021/>>. Acesso em: 20 dez. 2022.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**, 18th Edition. Gaithersburg, USA, 2005.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 20th Edition, Washington, DC – USA, 2016.
- ARAÚJO, R. R. *et al.* *Spondias bahiensis*: Umbu-cajá. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste. Brasília: **Ministério do Meio Ambiente**, p. 279-286, 2018.
- ASSIS, R.C. *et al.* Determination of water-soluble vitamins and carotenoids in Brazilian tropical fruits by High Performance Liquid Chromatography. **Heliyon**, v. 6, n.10, p. e05307 2020a.
- ASSIS, R. C. *et al.* Characterization of Mineral Content in Fruits of Northeast Agrobiodiversity of Brazil. **Agriculture, Agribusiness and Biotechnology**, v. 65, p. e22200759, 2022b.
- AKTER, B., RABETA, M. S. Synbiotic and antioxidant activity of fruit by-products and their effect on human health. **Food Research**, v. 5, n. 1, p. 24 – 35, 2021.



BANERJEE, J., *et al.* Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. **Food chemistry**, n. 225, p. 10–22, 2017.

BARBER, T. M., *et al.* The Health Benefits of Dietary Fibre. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 3209, 2020.

BARRECA, M. M.; ALESSANDRO, R.; CORRADO, C. Effects of Flavonoids on Cancer, Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases: Role of NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9236, 2023.

BARROS, R. G. C. *et al.* *In vitro* gastrointestinal digestion and probiotics fermentation impact on bioaccessibility of phenolics compounds and antioxidant capacity of some native and exotic fruit residues with potential antidiabetic effects. **Food Research International**, v.136, p. 109614–109614, 2020.

BATISTA, K. S. *et al.* Effects of supplementation of tropical fruit processing by-products on lipid profile, retinol levels and intestinal function in Wistar rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 95, n. 2, 2023.

BAKER, M. T. *et al.* Consumer Acceptance toward Functional Foods: A Scoping Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 3, p. 1217, 2022.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Dispõe sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 jun. 2013. Disponível em: <Disponível em: <http://bit.ly/1mTMIS3> > Acesso em: 25 de janeiro de 2022.

BRASIL. Rota de fruticultura Alagoana. Ministério da Integração e do Desenvolvimento Regional, 2023. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2023. Disponível em: < <https://www.gov.br/mdr/pt-br/noticias/mdr-apoia-acao-da-rota-da-fruticultura-alagoana-que-visa-expandir-producao-de-umbu-caja> > Acesso em 21 mar. 2023.

BRASIL. Relatório Nacional Voluntário sobre os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável: Brasil 2017/ Secretaria de Governo da Presidência da República, Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p.76, 2017.

BRASIL. Decreto Nº 9.810, DE 30 DE MAIO DE 2019 - Institui a Política Nacional de Desenvolvimento Regional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2019. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2019-2022/2019/decreto/D9810.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/decreto/D9810.htm). Acesso em: 21 mar. 2023.

BRASIL. LEI N.º 2.453/2022. **Institui o Programa Municipal de Incentivo a Fruticultura no âmbito do Município de Rebouças** – PR. Secretaria Municipal de Agricultura,

Desenvolvimento, Meio Ambiente e Serviços Rurais. Disponível em: <http://pr.portaldatransparencia.com.br/prefeitura/reboucas/iframe.cfm?pagina=abreDocumento&arquivo=3FEC015E8B49>. Acesso em: 20 mar. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Aprova regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos**. Resolução - RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0263\\_22\\_09\\_2005.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0263_22_09_2005.html). Acesso em: 18 abr. 2023.

BORNAL, D. R. *et al.* Brazilian position in the international fresh fruit trade network. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 43, n. 5, 2021.

BOTARI, B.; ERCOLINI, D.; GATTI, M.; NEVIANI, E. Application of FISH technology for microbiological. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.73, p.485-494, 2006.

CAMPOS, D. A. *et al.* Impact of functional flours from pineapple by-products on human intestinal microbiota. **Journal of Functional Foods**, v. 67, p. 103830, 2020.

CANGUSSU, L. B., *et al.* Profile of bioactive compounds in pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) peel flours. **Food chemistry**, v. 15, n. 350, p. 129221, 2021.

CHOUCHOULI, V. *et al.* Fortification of Yoghurts with Grape (*Vitis Vinifera*) Seed Extracts. **Food Science and Technology**. v.53, p.522–529, 2013.

COELHO, E. M. *et al.* Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160–167, 2018.

CONTERNO, L. *et al.* Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects. **European Journal of Nutrition**, v. 58, p. 63–81, 2019.

DAVANI-DAVARI, D. *et al.* Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 92, 2019.

DIAS J. L. *et al.* Extraction of umbu (*Spondias tuberosa*) seed oil using CO<sub>2</sub>, ultrasound and conventional methods: Evaluations of composition profiles and antioxidant activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, p. 10-18, 2019.

DUTRA, R. L. T. *et al.* Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food research international**, vol. 100, p. 650-657, 2017.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira** – Brasília, DF, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/10180/9543845/Vis%C3%A3o+2030+-+o+futuro+da+agricultura+brasileira/2a9a0f27-0ead-991a-8cbf-af8e89d62829?version=1.1>. Acesso em 12 de mai. 2022.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Cultivares de umbu-cajazeira BRS Tropicália, BRS Topázio do Sertão, BRS Luz do Sertão, BRS Dama do Campo e BRS Campesina** – Brasília, DF, 2022. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1150350/1/Folder-Umbu-Cajazeira-CristinaNelson-2022-AINFO.pdf>. Acesso em 28 de jun. 2022.

ERGEZER, H.; SERDAROĞLU, M. Antioxidant Potential of Artichoke (*Cynara scolymus L.*) Byproducts Extracts in Raw Beef Patties during Refrigerated Storage. **J. Food Meas. Charact.**, v.12, p.982–991, 2018.

ESPÍRITO-SANTO A.P., PEREGO P., CONVERTI A., OLIVEIRA M.N. Influence of milk type and addition of passion fruit peel powder on fermentation kinetics, texture profile and bacterial viability in probiotic yoghurts. **LWT**, v. 47, p. 393–399, 2012.

FONSECA, N. *et al.* *Spondias* spp. Umbu, cajá e espécies afins. **Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)**, 2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/183626/1/Umbu.pdf>. Acesso em 16 mar. 2022.

FONSECA, M. D. *et al.* Avaliação sensorial de geleia convencional e dietética de umbu-cajá (*Spondias* spp.). **Jornada Científica – Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 2010. Disponível em <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/26534/1/039-Mercia-Eliseth-ok.pdf>.

FONTES, A. S. *et al.* Aroma retention during drying of caja-umbu fruit pulp. **21ST International Drying Symposium**, p. 11-14, 2018.

FUSCO, W. *et al.* Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. **Nutrients**, v. 15, n.9, p. 2211, 2023.

GIBSON, R. G. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, p. 491–502, 2017.

GONZÁLEZ, C. *et al.*, Simulation of Human Small Intestinal Digestion of Starch Using an In Vitro System Based on a Dialysis Membrane Process. **Foods**, v.9, p. 913, 2020.

GUERGOLETT, K. B; *et al.* *In vitro* fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, v. 196, n. 1, p. 251-258, 2016.

HAIHUA, J. *et al.* *In vitro* gastrointestinal digestion and fermentation models and their applications in food carbohydrates. **Critical reviews in Food Science and Nutrition**, vol 61. n. 19, p. 1-23, 2022.

HASAN, N., YANG, H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. **Peer Journal**. v. 7, p. e7502 2019.

HU, Y. *et al.* Bioaccessibility and bioavailability of phytochemicals: Influencing factors, improvements, and evaluations. **Food Hydrocolloids**, v. 135, p. 108165, 2023.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Áreas territoriais**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/estrutura-territorial/15761-areas-dos-municipios.html?t=acesso-ao-produto&c=1>. Acesso em 22 abr. 2023.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico- químicos para análise de alimentos**. 1 Edição digital. Ed 4. São Paulo. p. 1020. 2008.

JANDHYALA, S. M. *et al.* Role of the normal gut microbiota. **World journal of gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8787–8803, 2015.

JARA-PALACIOS, M. J. *et al.* Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. **Food Research International**, v. 109, p. 433-439, 2018.

JEDDOU, K.B. *et al.* Improvement of Texture and Sensory Properties of Cakes by Addition of Potato Peel Powder with High Level of Dietary Fiber and Protein. **Food Chem.** v. 217, p. 668–677, 2017.

KHANGWAL I., SHUKLA P. Potential prebiotics and their transmission mechanisms: Recent approaches. **Journal of food and drug analysis**. v. 27, p. 649-656, 2019.

LEÃO, D. P. *et al.* Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. **Food Chemistry**, v. 225, p. 146-153, 2017.

LEEMING, E. R. *et al.* Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 2862, 2019.

LIMA, S. K. R. *et al.* Valorization of Fruit Co-Product Flours for Human Nutrition: Challenges, Applications, and Perspectives. **Sustainability**. v. 15, n. 18, p. 13665–13665 2023.

LIMA, M. S. *et al.* Determining 1-kestose, nystose and raffinose oligosaccharides in grape juices and wines using HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Science & Technology**, v. 56, p. 4575–4584, 2019.

LIN, D. *et al.* An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. **Molecules**, v.21, n.10, p. 1374, 2016.

LUCERA, A. *et al.* Fruit and Vegetable By-Products to Fortify Spreadable Cheese. **Antioxidants**, v.61 n. 7, 2018.

MACEDO, E. L. C. *et al.* Effects of yeast fermented soursop and umbu-cajá pulps on the colonic microbiota of middle-aged hypertensive adults. **Food Bioscience**, v. 51, p. 102309–1023092023.

MACHADO, C. F. *et al.* Bancos genéticos de cajá, umbu e espécies afins. **A arca de Noé das frutas nativas brasileiras**, cap. 10. 2021. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/227968/1/Bancos-geneticos-de-caja-2021.pdf>. Acesso em 05 mar. 2022.

MANZOOR, M. *et al.* Effects of Harvest Time on the Fruit Quality of Kinnow and Feutrell's Early Mandarins (*Citrus reticulata* Blanco). **Agronomy**, v. 13, n. 3, p. 802–802, 2023.

MASSA, N. M. L. *et al.*, Effects of digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-product on growth and metabolism of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* indicate prebiotic properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 131, p. 109766, 2020.

MCKINNON K. M. Flow Cytometry: An Overview. **Current protocols in immunology**, n. 120, 2018. v. 120, n. 1, p. 5.1.1–5.1.11, 2018.

MEGUR, A. *et al.* Prebiotics as a Tool for the Prevention and Treatment of Obesity and Diabetes: Classification and Ability to Modulate the Gut Microbiota. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 11, p. 6097, 2022.

MENEZES, F. N. D. D. *et al.* Acerola (*Malpighia glabra* L.) and guava (*Psidium guayaba* L.) industrial processing by-products stimulate probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* growth and induce beneficial changes in colonic microbiota. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 4, p.1323–1336, 2021.

MORO, T. M. A. *et al.* Use of burdock root flour as a prebiotic ingredient in cookies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 540–546, 2018.

NASCIMENTO, M. R. F. *et al.*, Capacidade antioxidante de farinha de caroço de seriguela (*spondias purpurea* l.). In: **NUTRIÇÃO em Foco: Uma abordagem holística**. 3. ed. Piracanjuba-GO: Editora Conhecimento Livre, p. 553-570, 2020.

NOGAL, A.; VALDES, A. M.; MENNI, C. The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. **Gut microbes**, v. 13, n. 1, p. 1–24, 2021.

ONISZCZUK, A. *et al.* Role of Gut Microbiota, Probiotics and Prebiotics in the Cardiovascular Diseases. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1172. 2021.

OYAIZU, M. Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. **The Japanese of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.

PADILHA, C. V. S. *et al.* Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, v. 228, p. 106–115, 2017.

PELLEGRINI, M. *et al.* Bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 73, p. 47-53, 2018.

PEREIRA, L. F. A. *et al.* The importance of reusing waste from the food industry: the case of fruit processing. Research, **Society and Development**, v. 11, n.12, p. e38111234089, 2022.

PERIN, E. C. *et al.* Cajá-manga peel: evolution of sensory, chemical and physical characteristics from four to bread production. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 5, p. 3931–3941, 2021.

PICKARD, J. M. *et al.* Gut Microbiota: Role in Pathogen Colonization, Immune Responses and Inflammatory Disease, **Immunological reviews**, n.1, p. 70–89, 2017.

PHILIPPINI, R.R *et al.* Agroindustrial Byproducts for the Generation of Biobased Products: Alternatives for Sustainable Biorefineries. **Front. Energy Res.** v. 8, 2020.

POPOOLA-AKINOLA, O. O.; RAJI, T. J.; OLAWOYE, B. Lignocellulose, dietary fibre, inulin and their potential application in food. **Heliyon**, v.8, n. 8, p. e10459, 2022.

PORTINCASA, P. *et al.* Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 3, p. 1105, 2022.

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

RIFNA, E. J. *et al.* Recent advances in extraction technologies for recovery of bioactive compounds derived from fruit and vegetable waste peels: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 63, n. 6, p. 719-752, 2023.

RINNINELLA, E. *et al.* What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 14, 2019.

RIVIÈRE, A. *et al.* Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. 979, 2016.

RODRÍGUEZ, I. S.T. *et al.* Physicochemical Properties, Antioxidant Capacity, Prebiotic Activity and Anticancer Potential in Human Cells of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Seed Flour. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4854, 2021.

RODRIGUES, J. P. B., *et al.* Agri-Food Surplus, Waste and Loss as Sustainable Biobased Ingredients: A Review. **Molecules**, v. 27, n. 16, p. 5200, 2022.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. *et al.* Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout *in vitro* gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. **Journal Agric. Food Chem**, v. 61, p.1859-1867, 2013.

ROLIN, P. M. *et al.* Nutritional value, cellulase activity and prebiotic effect of melon residues (*Cucumis melo* L. *reticulatus* group) as a fermentative substrate. **Journal of Food and Nutrition Research** (ISSN 1336-8672), 2018.

ROMANO, M. R. *et al.* **Unidades de Observação em Sistema Agroflorestal (SAF) com umbu-cajazeira, umbuzeiro e cultivos temporários. 2011.** Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/919358/unidades-de->

observacao-em-sistema-agroflorestal-saf-com-umbu-cajazeira-umbuzeiro-e-cultivos-temporarios. Acesso em 18 mai. 2022.

ROWLAND, I. *et al.* Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. **European journal of nutrition**, v. 57, n.1, p. 1–24. 2018.

RUSSO, C. *et al.* The Second Life of Citrus Fruit Waste: A Valuable Source of Bioactive Compounds. **Molecules**, v.26, n. 19, p 5991, 2021.

RUPASINGHE, H. *et al.* Effect of Baking on Dietary Fibre and Phenolics of Muffins Incorporated with Apple Skin Powder. **Food Chem.** v.107, p.1217–1224, 2008.

SANTOS, E. M. *et al.* *Spondias* sp: Shedding Light on Its Vast Pharmaceutical Potential. **Molecules**, v. 28, n. 4, p 1862, 2023.

SANTOS, D.; SILVA, J. A. L.; PINTADO, M. Fruit and vegetable by-products' flours as ingredients: A review on production process, health benefits and technological functionalities. **Food Science and Technology**, v. 154, p. 112707, 2022.

SAURA-CALIXTO, F. Concept and health-related properties of nonextractable polyphenols: the missing dietary polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.11195-11200, 2012.

SALVI, P. S.; COWLES, R. A. Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease. **Cells**, v. 10, n. 07, p. 1775, 2021.

SAYAGO-AYEDI, S. G. *et al.* Prebiotic effect of predigested mango peel on gut microbiota assessed in a dynamic *in vitro* model of the human colon (TIM-2). **Food Research International**, v. 118, p. 89-95, 2019.

SENDER, R.; FUCHS S.; MILO. R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLOS Biology**, v. 14 n. 8, p. e1002533, 2016.

SILVA, Y. P.; BERNARDI, A.; FROZZA, R. L. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, n. 25, 2021.

SILVA, D.; PAGANI, A.; SOUZA, R. Elaboração de cupcake adicionado de farinha de resíduo de umbu-cajá: características sensoriais e químicas. **Revista Ciência (In) Cena**, v. 1, n. 7, ISSN 2317-0816, 2018.

SILVA, G. S. *et al.* Avaliação da qualidade e aceitação de fishburguers de tilápia processados com farinha das cascas de umbu e de umbu-cajá como provável antioxidante natural. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 08, n. 02, p. 1501-1515, 2014.

SILVA-LUZ, C.L. *et al.* Anacardiaceae in Flora e Funga do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB602564>. Acesso em: 23 abr. 2023.

SILVA, J. Y. P. *et al.* Revealing the Potential Impacts of Nutraceuticals Formulated with Freeze-Dried Jabuticaba Peel and *Limosilactobacillus fermentum* Strains Candidates for Probiotic Use on Human Intestinal Microbiota. **Probiotics and antimicrobial proteins**, 2023.

SIQUEIRA A.C.P. *et al.* **Relatório final de atividades do projeto Biodiversidade para Alimentação e Nutrição (BFN) da Região Nordeste**. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza/CE, 2018. Disponível em: [https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/FN/ShortName/9207\\_umbu-caja\\_polpa\\_com\\_casca\\_crua](https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/FN/ShortName/9207_umbu-caja_polpa_com_casca_crua). Acesso em 14 mar. 2023.

SKWAREK, P.; KARWOWSKA, M. Fruit and vegetable processing by-products as functional meat product ingredients a chance to improve the nutritional value. **Food Science and Technology**, v. 189, p. 115442–115442, 2023.

SOUZA, F. X; PORTO FILHO, F. Q; MENDES, N. V. B. **Umbu-cajazeira: descrição e técnicas de cultivo**. – Mossoró: EdUFERSA, 2020. ISBN: 978-65-87108-02-5. Disponível em: <https://livraria.ufersa.edu.br/umbu-cajazeira-descricao-e-tecnicas-de-cultivo/>. Acesso em 12 mar. 2023.

SVIECH, F.; UBBINK, J.; PRATA, A. S. Potential for the processing of Brazilian fruits - A review of approaches based on the state diagram. **LWT**, v. 156, p. 113013, 15 fev. 2022.

TALAPKO, J. *et al.* Homeostasis and Dysbiosis of the Intestinal Microbiota: Comparing Hallmarks of a Healthy State with Changes in Inflammatory Bowel Disease. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2405, 2022.

TAVARES, I. R. G. *et al.* The Role of By-Products of Fruit and Vegetable Processing for the Dietary Treatment of Cardiovascular Risk Factors: A Narrative Review. **Antioxidants**, v. 11, n. 11, p. 2170–2170, 2022.

THEAGARAJAN, R. *et al.* Valorização do bagaço de uva (*Cv. Muscat*) para desenvolvimento de biscoitos funcionais. **Int. J. Ciência Alimentar. Tecnologia**. v. 54, p.1299–1305, 2019.

VALLADARES-DIESTRA, K. K. *et al.* The Potential of Xylooligosaccharides as Prebiotics and Their Sustainable Production from Agro-Industrial by-Products. **Foods**, v. 12, n. 14, p. 2681, 2023.

VENEGAS, D. P. *et al.* Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 277, 2019.

VIZZARI, G. *et al.* Circulating Salicylic Acid and Metabolic Profile after 1-Year Nutritional-Behavioral Intervention in Children with Obesity. **Nutrients** vol. 11, n. 5, p. 1091, 2019.

XAVIER, V. *et al.* Nutritional and technological potential of Umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) processing by-product flour. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. **Ecosystems**, v. 94, n. 1, 2022.



YANG, X. *et al.* Protocatechuic Acid Alleviates Dextran-Sulfate-Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice via the Regulation of Intestinal Flora and Ferroptosis. **Molecules**, v. 28, n. 9, p. 3775–3775, 2023.

WEITKUNAT, K. *et al.* Importance of propionate for the repression of hepatic lipogenesis and improvement of insulin sensitivity in high-fat diet-induced obesity. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 12, p. 2611–2621, 2016.

WOJTUNIK-KULESZA, K. *et al.* Influence of *In Vitro* Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols-A Non-Systematic Review. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1401, 2020.

ZHANG P. Influence of Foods and Nutrition on the Gut Microbiome and Implications for Intestinal Health. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 17, p. 9588, 2022.

ZUÑIGA-MARTÍNEZ, B. S. *et al.* Agro-Industrial Fruit Byproducts as Health-Promoting Ingredients Used to Supplement Baked Food Products. **Foods**, v.11, n. 20, p. 3181, 2022.

## **APÊNDICES**

## **APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**



### **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE, BASEADO NAS DIRETRIZES DA RESOLUÇÃO CNS Nº466/2012, MS.**

A pesquisadora Jordana Nunes de Oliveira convida o/a S.r. (a) a participar do estudo “DESENVOLVIMENTO DE FARINHA DO SUBPRODUTO DO PROCESSAMENTO DO UMBU-CAJÁ (*Spondias* spp.) E SEU POTENCIAL EFEITO PREBIÓTICO”, que será realizado na UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS, Campus São Cristóvão. Para tanto você precisará assinar este TCLE que visa assegurar a proteção, autonomia e o respeito aos participantes desta pesquisa em todas as suas dimensões: física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural e/ou espiritual – e que a estruturação, o conteúdo e forma de obtenção dele observam as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos preconizadas pela Resolução 466/2012.

Sua decisão de participar neste estudo deve ser VOLUNTÁRIA, e ela não resultará em NENHUM custo ou ônus financeiro para você. Todo o material utilizado durante a coleta será fornecido de forma gratuita, e com todas as despesas assumidas pela pesquisadora responsável pela pesquisa, sem nenhum custo para o/a S.r. (a). Em caso de gasto com transporte e/ou alimentação, o S.r. (a) será ressarcido (a) pela pesquisadora responsável pela pesquisa. Como pesquisadora, irei oferecer assistência gratuita de forma imediata e integral ao participante da pesquisa caso venha a ocorrer quaisquer complicações, danos, ou gastos decorrentes desta pesquisa. Caso decida não participar desta pesquisa, ou desistir de participar em qualquer uma das etapas, o participante não sofrerá nenhum tipo de prejuízo ou punição. Em situação onde o participante venha a sofrer qualquer tipo de dano resultante da sua participação na pesquisa, previsto ou não neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o mesmo terá direito à indenização por parte da pesquisadora responsável pela pesquisa, conforme Resolução 466/12.

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar as propriedades prebióticas da farinha subproduto do umbu-cajá por meio da determinação dos seus efeitos *in vitro* sobre o crescimento e aspectos relacionados a atividade metabólica de diferentes cepas probióticas, bem como os seus efeitos

moduladores sobre a microbiota intestinal humana em sistema de fermentação colônica *in vitro*. Trata-se de uma pesquisa de laboratório, onde será realizada uma fermentação colônica *in vitro* (com inóculo fecal humano) por quarenta e oito horas utilizando a fração pré-digerida da farinha de umbu-cajá, sendo acompanhados durante a fermentação alguns compostos e grupos bacterianos encontrados como parte da microbiota intestinal humana para determinação de índice prebiótico.

Informamos ainda que essa pesquisa oferece risco mínimo previsível para sua saúde, relacionados ao constrangimento quanto a esse procedimento. Para minimizar os riscos, todos os dados e informações fornecidos por você serão tratados de forma anônima/sigilosa, não permitindo a sua identificação durante a pesquisa e/ou quando da publicação dos resultados em meios científicos. Além disso, o/a S.r. (a) será orientado (a) quanto a coleta e manuseio das amostras fecais de forma segura e asséptica. Não haverá necessidade de deslocamento e o material para coleta será oferecido gratuitamente pela pesquisadora responsável, sem NENHUM custo para o (a) S.r. (a).

Caso o S.r. aceite participar da pesquisa, sua participação consistirá em: A evacuação das fezes e acondicionamento no frasco coletor estéril (realizada pelo participante) será realizada na sua residência ou local de sua preferência; após esse procedimento, o S.r. (a) fará contato via celular para que a pesquisadora, em até uma hora, faça a busca desse material.

A realização da pesquisa possibilitará identificar efeitos benéficos promotores de saúde a partir do consumo da farinha de umbu-cajá gerando informações de interesse para elaboração de novos ingredientes funcionais, aspectos de corrente interesse ao campo científico, a indústria alimentícia e a comunidade que busca o consumo de uma alimentação mais saudável.

Em virtude de que este TCLE se encontrar em mais de uma página, todas as páginas serão rubricadas, e assinadas ao seu término pelo pesquisador e participantes da pesquisa. Solicitamos a sua colaboração para realizar a doação de material fecal, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e, eventualmente publicação em revista científica, garantindo o sigilo e anonimato.

Caso você tenha qualquer dúvida com relação à pesquisa, entre em contato com a pesquisadora através do E-mail: [jordananunes93@outlook.com](mailto:jordananunes93@outlook.com); e/ou telefone: (83) 99654-4985 e/ou CEP UFS tel.: (79)3194-7208, e-mail: [cep@academico.ufs.br](mailto:cep@academico.ufs.br). A pesquisadora estará à sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido (a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma via deste documento.

Atenciosamente,



---

Assinatura do Participante da Pesquisa

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

## APÊNDICE B – ARTIGO I

### SUMMARY

The umbu-cajazeira (*Spondias* spp.) is a species native to the Northeast region of Brazil, with great economic and social importance for the Semiarid region. Its fruits are commercially exploited for fresh or industrialized consumption. During fruit processing, a large amount of by-products are produced that cause undesirable environmental impact. These by-products can be transformed into flour with the potential to be included in human nutrition. Thus, this study aimed to prepare a flour from the by-product of umbu-cajá processing and evaluate the proximate and microbiological composition. Data were averaged and expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The flour was subjected to drying with forced air circulation at 60 °C for 7h30min. Under these conditions, it presented low moisture content (7.73  $\pm$  0.00), as recommended by ANVISA, low pH (2.80  $\pm$  0.01), high acidity (4.81  $\pm$  0.03), and low lipid content (2.56  $\pm$  0.66). These intrinsic characteristics appear to have contributed to limiting pathogenic microbial growth. The microbiological properties met the limits established by current legislation in Brazil. It was concluded that the use of the by-product of umbu-cajá processing in human nutrition can be recommended, thus improving the nutritional value of the preparations.

**Keywords:** Industrial residues; Whole food use; microbiological quality.

## Introduction

Brazil is the third largest fruit producer in the world, in 2021 the production of fruit species was estimated at 41 million tons [1]. The country has a variety of native and exotic fruit species that are little explored. Among these, the umbu-cajazeira, a tree native to the Northeast region of Brazil, with its fruits belonging to the Anacardiaceae family and the *Spondias* genus. Umbu-cajá is rich in vitamin C and mineral salts [2]. Recent studies have demonstrated antioxidant, antidiabetic, antibacterial and gastroprotective effects of umbu-cajazeira fruits [3].

Despite being exploited in an extractive way, due to the lack of information that allows its commercial exploitation, umbu-cajá presents promising economic activity [4]. The fruit has pleasant sensory characteristics such as flavor and aroma [5]. However, as it is a perishable fruit, it is consumed close to production sites, or used in the preparation of jams, jellies, juices, among others [6, 7].

Thus, the application of technologies, such as the drying method, becomes an interesting strategy by enabling the fruit to be consumed for longer periods of the year. Flour can be incorporated into bakery products to make bread, pizza bases, cookies and muffins improving the nutritional profile of these products [8, 9, 10, 11, 12].

This strategy collaborates with the food industry, as it adds value to the by-product that would otherwise be discarded or underused, as well as contributing to the environment, through correct disposal [13, 14]. Furthermore, recent studies have demonstrated several beneficial effects linked to human health from the consumption of fruit by-product flour, including improvement in insulin resistance, positive modulating effect on the intestinal microbiota, improvement in blood pressure, among others [15, 16, 17]. These results are due to the presence of bioactive compounds such as phenolic compounds, antioxidants, dietary fiber, carotenoids, among others present in these ingredients [18].

However, most of these studies only quantify bioactive compounds, but do not evaluate the microbiological quality of umbu-cajá by-product flour for use in human food. Thus, considering the scarcity of studies that evaluate the microbiological quality of umbu-cajá by-product flour, the objective of the present study was to develop flour from the by-product of umbu-cajá processing, and evaluate its proximate composition and microbiological analysis through the count of Coliforms at 45 °C, *Bacillus cereus* and *Salmonella* sp.

## Materials And Methods

### *Obtaining the sample*

The umbu-cajá processing by-product was obtained through the donation of an industry located in the city of Aracaju – SE, in three processing batches. After collection, the material was distributed in stainless steel trays and indicated for study with forced air circulation (Marconi – MA 035), remaining at a temperature of  $60 \pm 2$  °C for seven and a half hours (7h30min.). After drying, the material was crushed in a domestic processor (low speed, 10 minutes; Nutri Ninja Processor - Auto-IQ), sieved with 0.25 mm sieves (60 mesh) to collect a powder [19]. The flour was stored in polypropylene bags, protected from light and in a cool place, until analysis. All equipment and utensils used were previously sanitized with 70% alcohol to avoid sample contamination.

### *Determination of chemical composition*

The analyzes to determine the proximate composition of the by-product and flour were carried out at the Federal University of Sergipe, Aracaju – SE. Humidity was determined in an oven at 105 °C until constant weight was obtained; The ash was determined in a muffle furnace at 550 °C. The acidity was based on the neutralization titration of acids with a standardized alkali solution (0.1 N NaOH solution) and the use of phenolphthalein indicator. pH was determined by reading a potentiometric pH meter (Kasvi - K39- 0014PA). The carbohydrate content was determined by subtracting the sum of the lipid, protein, moisture and ash contents from 100. The total nitrogen content was quantified by the Kjeldahl method, and the protein content was calculated by multiplying the result by 6.25. The lipid content was determined by Soxhlet extraction, using petroleum ether as the extractor. The determinations were done in triplicate [20].

### *Microbiological Analysis*

The umbu-cajá by-product flour was subjected to microbiological quality in terms of standard counts of Coliforms at 45°C, *Bacillus cereus* and *Salmonella* sp., according to the method described by the American Public Health Association [21, 22]. The results were compared with the standards of the Resolution N°. 12, dated January 2, 2001, the National Agency for Sanitary Surveillance in Brazil, which sets standards for the microbiological quality of the flour group: pasta, bakery products and similar products; and starch subgroup: flours, and powdered or flocked starch and cornmeal [23].



### *Statistical analysis*

The assays were performed in triplicate and expressed as mean  $\pm$  estimated standard deviation. The collected data were tabulated in Microsoft Excel Software and the analysis was evaluated in R Software (Version 4.3.1 Ross Ihaka & Robert Gentleman, University of Auckland, Auckland, New Zealand).

## **Results And Discussion**

### *Physicochemical characterization*

The results of the proximate composition of the by-product from umbu-cajá processing are presented in Table 1. The by-product had a high moisture content ( $84.39 \pm 0.17$ ). The value obtained was close to the result presented for umbu bark ( $81.99 \pm 0.21$ ) [24]. High humidity in fruits, especially in the pulp, is a common characteristic. The pH of the byproduct ( $2.79 \pm 0.02$ ) presented a similar value for umbu fruits ( $2.82 \pm 0.08$ ). pH is related to fruit processing and ripening. Low pH values contribute to the storage of juices at room temperature, as they inhibit the development of microorganisms [25]. The titratable acidity of the umbu-cajá by-product ( $1.48 \pm 0.01$ ) obtained a value similar to that obtained for the seriguella bark (1.44%) [26].

The acidity also plays an important role in the conservation of food products. The ash concentration in umbu-cajá bark ( $6.95 \pm 0.79$ ) was higher than results from ash from fruit by-products [19, 24]. Ash determination reveals the total mineral content present in the sample [27]. The protein content found for the umbu-cajá byproduct ( $1.17 \pm 0.21$ ) was higher than that found for cajarana peel ( $0.54 \pm 0.0$ ) and seriguella peel ( $0.73 \pm 0.09$ ) [28]. Low protein content is an expected result for fruit by-products. The lipid content presented for the byproduct ( $2.08 \pm 0.16$ ) was higher ( $1.25 \pm 0.05$ ) than that found for seriguella peel. The reduced lipid content is associated with reduced oxidation, which could be interesting for the food industry [28].

The proximate composition of the flour is shown in table 1. The moisture content obtained from the flour ( $7.73 \pm 0.00$ ) is in accordance with current Brazilian legislation for flour, which stipulates a maximum of 15% [29]. The moisture value found in this study was lower than that found for semi-ripe umbu peel flour ( $8.16 \pm 0.14$ ) [30]. Moisture is an important factor in food preservation and helps to increase the shelf life of the product.

The flour had low pH ( $2.80 \pm 0.01$ ) and high acidity ( $4.81 \pm 0.03$ ). These characteristics present an advantage in conservation, due to the reduction of microbial growth and enzymatic reaction. Similar values were found for umbu flour ( $3.19 \pm 0.38$  and  $4.96 \pm 0.05$ , respectively) [19]. The ash value obtained from umbu-cajá by-product flour ( $4.48 \pm 0.05$ ) in this study was

higher than that found for umbu bark flour ( $3.76 \pm 0.04$ ) and ( $2.63 \pm 0.09$ ) [24, 19]. The ash content reflected the high concentration of mineral residue after the by-product was subjected to drying at temperatures around  $60^\circ$ . The ash content can be affected by growing conditions, soil, irrigation, among others. According to RDC ANVISA nº 54/2012, a product is considered low-fat if it contains a maximum of 3 g of fat in a 100 g portion. In this study, the lipid content was lower than the value limited by legislation [31].

The total carbohydrate content was also quantified in umbu-cajá flour ( $78.81 \pm 0.18$ ), and presented a value close to that obtained for umbu peel flour (*Spondias tuberosa* Arruda Cam) ( $84.22 \pm 4.22$ ), demonstrating that they are the predominant components in the samples analyzed, and can be considered an energetic food [24]. The protein value found in this study ( $6.42 \pm 0.03$ ) was close to that found for umbu residue flour ( $5.60 \pm 0.12$ ) [19].

#### *Microbiological quality*

The results presented in Table 2 indicate that the flour from the by-product of umbu-cajá processing has acceptable microbiological characteristics for human consumption, which is consistent with standards Recommended by Resolution N°. 12, of January 2, 2001, the National Health Surveillance Agency [23]. The low moisture content associated with the acidic pH of the flour, below 3, may have contributed to providing unfavorable conditions for microbial growth. These favorable results also suggest that the factory adopts good food handling practices, which becomes an essential factor in determining its sanitary standard, thus ensuring the safety of the final product.

#### **Conclusions**

This study is the first to show the microbiological quality of flour from umbu-cajá processing. The flour obtained had low moisture, low pH and low lipid content, which may have helped prevent the growth of pathogenic microorganisms. Furthermore, the results of this study suggest that flour produced from the by-product of umbu-cajá, easily obtained and without additional costs, can be a potential food ingredient in human nutrition and/or as food supplement. However, it is necessary to carry out more studies that evaluate the presence of antinutritional factors, as well as technological functionality related to texture, color or stability during shelf life.

## Acknowledgements

The Fundação de Apoio e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC), for granting the scholarship. To the Federal University of Sergipe.

## REFERENCES

1. Beling, R. R. (Ed.): Anuário brasileiro de horti&fruti 2023. Santa Cruz do Sul, 2023. ISSN 2107-0897.
2. Assis, R. C. - Siqueira, A. C. P. - Oliveira, J. P. - Silva, F. L. F. - Matos, W. O. - Gouveia, S. T. - Maia, C. S. C., Lopes, G. S.: Characterization of Mineral Content in Fruits of Northeast Agrobiodiversity of Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65, 2022, article e22200759. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2022200759>.
3. Santos, E. M. - Ataíde, J. A - Coco, J. C. - Fava, A. L. M. - Silvério, L. A. L.- Sueiro, A. C.- Silva, J. R. A. - Lopes, A. M. - Paiva-Santos, A. C. - Mazzola, P. G.: *Spondias* sp: Shedding Light on Its Vast Pharmaceutical Potential. *Molecules*, 28, 2023, article :1862. <https://doi.org/10.3390/molecules28041862>.
4. Ritzinger, R. – Soares-Filho, W. S. – Carvalho, P. C. L.: Evaluation of umbu-caja germplasm in the state of Bahia, Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8, 2008, pp. 181-186,. <https://pdfs.semanticscholar.org/b5a4/5897dc57d7a746290ddac9be14ea147de3c7.pdf>
5. Gondim, P. J. S. – Silva, S. M. – Pereira, W. E. – Dantas, A. L. – Chaves, J. R. – Santos, L. F: Quality of umbu-cajazeira access fruits (*Spondias* sp.). *Brazilian magazine of Agricultural and Environmental Engineering*, 11, 2017, pp. 1217 – 1221. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662013001100013>.
6. Santos, R. A. R. – Leite-Neta, M. T. S – SILVA, M. A . A. P. – Carnelossi, M. A. G. – Narain, N.: Process optimization for elaboration of cajá-umbu (*Spondias* spp.) fruit jelly: The effect of pulp and pectin contents on sensory attributes and volatile constituents. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 24, 2021, article :100315. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100315>.
7. Kusumaningrum, D. – Seung-Hyun, L. – Wang-Hee, L. – Changyeun, M. – Byoung-Kwan, C.: A Review of Technologies to Prolong the Shelf Life of Fresh Tropical Fruits in Southeast Asia. *Journal of Biosystems Engineering*, 40, 2015, pp. 345–358, <https://doi.org/10.5307/JBE.2015.40.4.345>.
8. Upadhyay, S. - Tiwari, R. - Kumar, S. – Gupta, S. M. - Kumar , V. - Rautela, I. - Kohli, D. - Rawat B. S. – Kaushik, R.: Utilization of Food Waste for the Development of Composite Bread. *Sustainability*, 17, 2023, article: 13079. <https://doi.org/10.3390/su151713079>.
9. Difonzo, G. - Troilo, M. - Allegretta, I. - Pasqualone, A. – Caponio, F.: Grape skin and seed flours as functional ingredients of pizza: Potential and drawbacks related to nutritional, physicochemical and sensory attributes, *LWT*, 175, 2023, article: 114494, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114494>.
10. Weng, M. - Li, Y. – Wu, L. - Zheng1, H. – Lai, P. - Tang, B. - Luo.: Effects of passion fruit peel flour as a dietary fibre resource on biscuit quality. *Food Science and Technology*, 1, 2021, pp. 65-73, ISSN 0101-2061 (Print). <https://doi.org/10.1590/fst.33419>.
11. Baldán, Y. - Riveros, M. - Fabani, M.P. – Rodríguez, R.: Grape pomace powder valorization: a novel ingredient to improve the nutritional quality of gluten-free

- muffins. *Biomass Conv. Bioref.*, 13, 2023, pp. 9997–10009. DOI <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01829-8>.
12. Gómez, M. – Martínez, M. M.: Fruit and vegetable by-products as novel ingredients to improve the nutritional quality of baked goods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 2018, pp. 2119-2135, DOI: 10.1080/10408398.2017.1305946.
  13. Nirmal, N.P. - Khanashyam, A.C. - Mundanat, A.S. - Shah, K. - Babu, K.S. - Thorakkattu, P. - Al-Asmari, F. - Pandiselvam, R.: Valorization of Fruit Waste for Bioactive Compounds and Their Applications in the Food Industry. *Foods*, 12, 2023, 556. <https://doi.org/10.3390/foods12030556>.
  14. Ayala-Zavala, J. F. - Vega-Veja, V. - Rosas-Domínguez, C. - Palafox-Carlos, H. - Villa-Rodríguez, J. A.- Siddiqui, W. - Dávila-Aviña, J. E. – González-Aguilar, G. A.: Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44, 2011, pp. 1866-1874. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>.
  15. Queiroz, M. S. R. - Janebro, D. I. – Cunha, M. A. L. – Medeiros, J. S. – Sabaa-Srur, A. U. O. – Diniz, M. F. F. M. – Santos, S. C.: Effect of the yellow passion fruit peel flour (*Passiflora edulis f. flavicarpa deg.*) in insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutr J.*, 11, 2012, DOI: 10.1186/1475-2891-11-89. PMID: 23088514; PMCID: PMC3507806.
  16. Campos, D. A. – Couscueta, E. – Vila-Boas, A. A. – Silva, S. – Teixeira, J. A. – Pastrana, L. M. – Pintado, M. M.: Impact of functional flours from pineapple by-products on human intestinal microbiota. *Journal of Functional Foods*, 67, 2020, article: 103830. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103830>.
  17. Urquiaga, I. - D'Acuña, S. - Pérez, D. – Dicenta, S. – Echevería, G. – Rigotti, A. – Leighton, F.: Wine grape pomace flour improves blood pressure, fasting glucose and protein damage in humans: a randomized controlled trial. *Biological Research*, 48, 2015, article 49. <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0040-9>.
  18. Soquetta, M. B. - Stefanello, F. S. - Huerta, K. M. - Monteiro, S. S. - Rosa, C. S.. - Terra, N. N.: Characterization of physiochemical and microbiological properties, and bioactive compounds, of flour made from the skin and bagasse of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). *Food chemistry*, 199, 2015, pp. 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.022>.
  19. Xavier, V. L. - Feitoza, G. S. – Barbosa, J. M. L. – Araújo, K. S. - Silva, M. V. – Correias, M. T. S. - Souza, M. P. - Carneiro-Da-Cunha, M. G.: Nutritional And Technological Potential Of Umbu (*Spondias Tuberosa* Arr. Cam.) processing by-product flour. *An. Acade. Bras. Cienc.*, 94, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220200940>.
  20. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2016). 20th ed. Official Methods of Analysis of the AOAC International. Rockville, MD, USA. ISBN: 97-8-093558487-5.
  21. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, D.C.: APHA, 2001.
  22. SILVA, N.D.A.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 2ª ed. São Paulo: Varela, 2001. 295p.
  23. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2001). Aprova Regulamento Técnico sobre Padrões de qualidade microbiológica de alimentos para o grupo de farinhas, massas alimentícias, produtos para panificação e similares; subgrupo amidos, farinhas, féculas e fubá, em pó ou flocados (Resolução-RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001). Retrieved from <http://portal.anvisa.gov.br>.

24. Alves, I. A. – Anjos, D. A. – Ribeiro, J. S. – Souza, C. C. E. – Zanuto, M. E.: Nutritional and functional potential of umbu bark flour (*Spondias tuberosa* Arruda Cam). *Brazilian Agrotechnology Magazine*, 11, 2021, pp. 964 – 974, ISSN 2317-3114. DOI: 10.18378/REBAGRO.V12I2.8883.
25. Menezes, P. H. S. – Souza, A. A. – Silva, E. S. – Medeiros, R. D. – Barbosa, N. C. – Soria, D. G.: Influence of the maturation stage on the physical-chemical quality of fruits of umbu (*Spondias tuberosa*). *Scientia Agropecuaria*, 8, 2017, ISSN 2077 – 9917. DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.01.07>.
26. Neris, T. S. – Loss, R. A. – Guedes, S.: Physicochemical characterization of seriguela (*Spondias purpurea* L.) collected in the municipality of Barra do Bugres/MT at different stages of maturation. *Natural Resources*, 7, 2017, ISSN 2237 – 9290. DOI: <http://dx.doi.org/10.6008/SPC2237-9290.2017.001.0002>.
27. Liu, K.: Effects of sample size, dry ashing temperature and duration on determination of ash content in algae and other biomass. *Alga Research*, 40, 2019, article: 101486. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101486>.
28. Bramont, W. B. - Leal, I. L. - Umsza-Guez, M. A. - Guedes, A. S. - Alves, S. C. O. - Reis, J. H. O. - Barbosa, J. D. V. - Machado, B. A. S.: Comparison of the Centesimal, Mineral and Phytochemical Composition of Pulps and Peel of Ten Different Fruits. *Revista virtual de Química*, 10, 2018, pp. 811-823, ISSN 1984 – 6835. DOI: 10.21577/1984-6835.20180059.
29. Anvisa - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. 2005. Resolution. RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Technical regulations for cereal products, starches, flours and bran. from: [http:// portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/27619](http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/27619).
30. Cangussu, L. B.- Fronza, P. - Franca, A. S. - Oliveira, L. S.: Chemical Characterization and Bioaccessibility Assessment of Bioactive Compounds from Umbu (*Spondias tuberosa* A.) Fruit Peel and Pulp Flours. *Foods*, 11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10112597>.

**Table - 1** - Characterization of the by-product and flour from the by-product of umbu-cajá (*Spondias* spp.), (mean  $\pm$  estimated standard deviation).

| Parameters                               | By-products      | Flour<br>produced |
|------------------------------------------|------------------|-------------------|
| Moisture (%)                             | 84.39 $\pm$ 0.17 | 7.73 $\pm$ 0.00   |
| pH                                       | 2.79 $\pm$ 0.02  | 2.80 $\pm$ 0.01   |
| Ash (%)                                  | 6.95 $\pm$ 0.79  | 4.48 $\pm$ 0.05   |
| Titratable total acidity (% citric acid) | 1.48 $\pm$ 0.01  | 4.81 $\pm$ 0.03   |
| Total carbohydrate (%)                   | 5.41 $\pm$ 0.08  | 78.81 $\pm$ 0.18  |
| Proteins (g/100 g)                       | 1.17 $\pm$ 0.21  | 6.42 $\pm$ 0.03   |
| Lipids (g/100 g)                         | 2.08 $\pm$ 0.16  | 2.56 $\pm$ 0.66   |

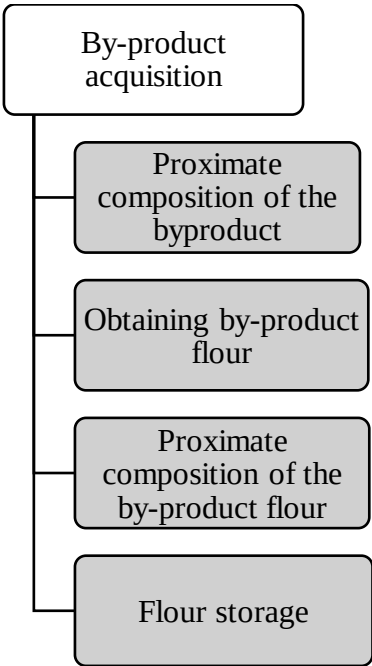
Data represent the mean of triplicate determinations  $\pm$  standard deviation.

**Table - 2** - Microbiological Analysis of umbu-cajá flour (*Spondias* spp.)

| Microorganism                                  | Tolerance*      | Flour produced |
|------------------------------------------------|-----------------|----------------|
| Fecal coliforms (MPN/ g) **                    | $10^2$          | <3             |
| <i>Bacillus cereus</i> CFU.g <sup>-1</sup> *** | $3 \times 10^3$ | <100           |
| <i>Salmonella</i> (25g)                        | Absent          | Absent         |

\*According to Resolution N°. 12 of January 2, 2001, the National Health Surveillance Agency (2001), food group 10, item a. \*\*MPN/g = Most Probable Number per gram. \*\*\*CFU/g = Colony Forming Unit per gram.

**Figure 1** - Process for obtaining flour from the by-product of umbu-cajá (*Spondias* spp.)





## APÊNDICE C – ARTIGO II

### **Umbu-cajá flour and prebiotic potential on colonic microbiota *in vitro***

#### **Abstract**

The effects of umbu-cajá by-product flour (UCF) (*Spondias* spp.) on human colonic microbiota were evaluated during 48 h of *in vitro* colonic fermentation. The relative abundance of distinct bacterial groups, pH values, sugar and organic acid content, metabolomic profile and antioxidant activity were determined during the fermentation. The digested UCF increased the relative abundance of *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. (0.44-7.39%) and *Bifidobacterium* spp. (1.90-8.81%), presenting a positive prebiotic index (5.37-11.86) during colonic fermentation. UCF demonstrated intense microbial metabolic activity during colonic fermentation, evidenced by consumption of sugars (glucose and fructose), production of short-chain fatty acids (acetic, lactic, butyric and propionic) proven from the profile metabolomic, concomitant with a decrease in pH values and an increase in antioxidant activity. The results indicate that UCF is a candidate to use as a potential prebiotic product due to its ability to positively modulate the intestinal microbiota. These results encourage the agro-industrial sector to evaluate the by-products of umbu-cajá processing to develop novel functional and sustainable foods from currently underutilized resources.

**Keywords:** Umbu-cajá; Use of waste; Food flour; Prebiotic properties.

## Introduction

Brazil has an abundance of native and exotic fruit cultivars with great agricultural potential (Sviech, Ubbink & Prata, 2022). Among the fruit species endemic to the Caatinga, the predominant biome of the Northeast region, the umbu-cajá (*Spondias* spp.) stands out. Fruit with a pleasant flavor and peculiar aroma, presents important bioactive compounds, fermentable carbohydrates and antioxidant activity (ASSIS et al., 2020a; ASSIS et al., 2022b). As it is a climacteric fruit, processing is a viable conservation alternative, which overcomes seasonality and perishability problems, allowing the fruit to be consumed for longer periods of the year (Calín-Sánchez et al., 2020).

However, during the fruit industrialization process, a large amount of agro-industry by-products is produced, of which around 20% to 70% are discarded (Banerjee et al., 2017; Akter & Rabeta, 2021). The by-products of industrial fruit processing are composed of crushed seeds, peels and pomace, and may have higher levels of dietary fiber, vitamins and phenolic compounds than the part of the fruit conventionally consumed (CANGUSSU *et al*, 2021).

Therefore, alternatives for the full use of fruit are an interesting strategy because, in addition to reducing waste, it contributes to the fulfillment of the United Nations (UN) 2030 schedule, in particular the Sustainable Development Goals (SDG1, SDG2 and SDG12, respectively), which deal with the eradication of poverty and hunger, and responsible consumption and production (Ipea, 2019). In this context, dehydration proved to be a relatively simple and low-cost technology for obtaining flour, allowing the concentration of bioactive compounds and a high fiber content, potentially prebiotic food components capable of promoting health benefits (Leão *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2020).

Prebiotics promote the growth of beneficial species in the colon at the expense of pathogenic ones (Gibson *et al.*, 2017). These effects are linked to the presence of fermentable carbohydrates, capable of modulating the intestinal microbiota, benefiting the organism that harbors them. Studies have shown a positive modulating effect on the colonic microbiota from the consumption of by-product flour from fruits such as pineapple, jackfruit and melon, from the increase in populations of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium*, and production of short-chain fatty acids (Campos *et al*, 2020; Rodríguez *et al.*, 2021; Rolin *et al.*, 2018).

Studies on the effects of umbu-cajá by-product flour on human intestinal microbiota are scarce. Results of a previous study that evaluated *in vitro* the effects of soursop and umbu-cajá pulps fermented with yeast on the microbiota of hypertensive individuals resulted in positive

modulating effects of this microbiota, with consumption of sugars, production of short-chain fatty acids, reduction of pH, growth of *Bifidobacterium* spp./ *Lactobacillus* spp., and decrease of *Eubacterium rectale*/*Clostridium coccoides* and *Clostridium histolyticum* (Macedo *et al.*, 2023).

In this context, the present study analyzed the prebiotic potential of umbu-cajá by-product flour in the colonic microbiota of healthy adult individuals, by monitoring metabolic activity, and relative abundance of specific intestinal microbial groups, using the fluorescent in situ hybridization coupled with multiparametric flow cytometry

## **Materials and methods**

### *Flour preparation*

The solid by-product of umbu-cajá (approximately 20 kg) was obtained from Pomar Polpas de Frutas, Aracaju, Sergipe, Brazil. The solid by-product was transported in isothermal boxes to the Laboratory of Bromatology food, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Brazil, stored in a freezer at -18° C. The by-product was dried in a dryer with forced air circulation (Marconi MA 035) ( $60 \pm 2$  °C, 7h30min), to bring the moisture content to <15%. After drying, the material was crushed in a domestic processor (Nutri Ninja - Auto-IQ) (low speed, 10 min) to obtain a fine powder (Aderne *et al.*, 2021). The flour obtained was hermetically packed in polypropylene bags, vacuum sealed, and kept at room temperature and protected from light in a dry place for up to 6 months. The yield of the flour was calculated by dividing the final mass of product by the initial raw material and express as % w/w (Xavier *et al.*, 2022).

### *Determination of the physical-chemical characteristics of the UCF*

Moisture (method 925.10), pH (method 981.12), ash (method 923.03), Total titratable acidity was carried out by titration with 0.1 N NaOH, to pH 8.2-8.4 (AOAC, 2002), crude protein (method 920.87;  $N \times 5.75$ ) and fat contents (method 940.26) of UCF was determined according to standard methods (AOAC, 2016). The content of available carbohydrates was determined by difference from the moisture, ash, fat and protein (Ferreira *et al.*, 2015). The contents of insoluble, soluble, and total dietary fiber were determined using an enzymatic–gravimetric method (method 991.43) (AOAC 2016).

An extract was prepared to determine the levels of sugars (glucose, fructose and maltose) and organic acids (acetic, lactic, butyric and propionic). Two g of UCF were homogenized with 10 mL of ultrapurified water (Milli-Q® Integral Water Purification, EMD

Millipore Corporation, Billerica, USA) for 10 min, centrifuged ( $4000 \times g$ , 15 min,  $24^{\circ}\text{C}$ ) (MPW-351R centrifuge, MPW Medical Instruments, Warsaw, Poland) and the supernatant was filtered (qualitative filter paper and regenerated cellulose,  $0.45 \mu\text{m}$ ; Whatman®, GE Healthcare, Chicago, USA). This methodology was described by Albuquerque et al., 2021.

To determine the content of phenolic compounds, methanolic extracts were prepared. Two g of the flour were acidified with 0.1 M HCl (Neon, São Paulo, Brazil) until reaching pH 2, and mixed with 10 ml of methanol:water (70:30 v/v) using the Refrigerated Incubator with Shaking (TE 424, Tecnal, São Paulo, Brazil) (60 min,  $25^{\circ}\text{C}$ ), kept in the dark. The mixtures were centrifuged ( $4000 \times g$ , 15 min,  $24^{\circ}\text{C}$ ) and the supernatants were filtered (regenerated cellulose,  $0.45 \mu\text{m}$  pore size) (Albuquerque *et al.*, 2021)

The levels of sugars, organic acids and phenolic compounds were determined by high performance liquid chromatography using a liquid chromatograph (model 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, St. Clara, CA, USA) equipped with a quaternary solvent pump (G1311C model), degasser, thermostatic column compartment (G1316A model) and automatic auto sampler (G1329B model), coupled with a diode array detector (DAD) (G1315D model) and refractive index detector (RID) (G1362A model). Data were processed using OpenLAB CDS ChemStation Edition™ software (Agilent Technologies, St. Clara, USA). The sample peaks observed in HPLC were identified by comparing their retention times with the respective standards (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for sugars, organic acids and phenolic compounds.

#### *In vitro antioxidant activity during colonic fermentation*

The antioxidant activity of UCF was evaluated by the ABTS<sup>•+</sup>, DPPH, ABTS and FRAP assays (Table 1) at time zero, 24, and 48 h of colonic fermentation. The extract was obtained according to the phenolic compounds methodology described in section 2.2. ABTS radical scavenging activity was measured according to Re et al. (1999). ABTS<sup>•+</sup> was prepared 16 hours before analysis by adding potassium persulfate and ABTS<sup>•+</sup> stock solution. On the day of analysis, the radical was stabilized at 720nm and diluted in ethanol. In a dark environment, an aliquot of 30  $\mu\text{L}$  of each concentration of the extract was transferred into a microplate, then adding 300  $\mu\text{L}$  of the ABTS<sup>•+</sup> radical (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). After six minutes, a spectrophotometer was read at a wavelength of 734nm. The results were expressed as a percentage of reducing activity (%) based with the equation:

$$\text{Eq. 1 - \% activity: } \{[(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100\}$$

Where: “Sample Abs” and “Control Abs” are, respectively, the absorbance observed in the sample and in the system (without antioxidant).

DPPH<sup>•</sup> radical scavenging activity was analyzed according to Brand-Williams et al. (1995) with some modifications for microplates. Aliquot of 50 µL of the extract was taken and diluted in 150 µL of 400 mM DPPH<sup>•</sup> solution (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) diluted in methanol. After 30 minutes of rest, the reduction of the radical was verified at 515 nm in a spectrophotometer. All determinations were carried out in triplicate and accompanied by a control (without antioxidant). The decrease in optical density values of the samples was correlated with that of the control and the percentage of reducing activity was established, based with the equation:

$$\text{Eq. 2 - \% activity } \{[(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100\}$$

Where: “Sample Abs” and “Control Abs” are, respectively, the absorbance observed in the sample and in the system (without antioxidant).

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay was carried out according to (OYAIZU, 1986), with some modifications for microplates. In a dark environment, aliquot of 9 µL of the extract were removed, 27 µL of distilled water and 270 µL of FRAP reagent (0.3 mol L<sup>-1</sup> acetate solution, TPTZ and ferric chloride) were added. The microplate was kept in an oven (37°C for 30 minutes). Then, readings were taken on a spectrophotometer at a wavelength of 595 nm. All readings were taken in triplicate and the results were expressed in µM equivalents of trolox equivalents, using the trolox curve ( $y = 0.0009x + 0.1422$ ;  $R^2=0.993$ ).

#### *In vitro simulated digestion of UCF*

The UCF was submitted to an in vitro digestion, mimicking physiological gastrointestinal conditions in three sequential phases (oral, gastric and intestinal, including dialysis), with adjustment of pH, time, temperature, rotation and specific enzymes in each step, in order to be transformed into material with characteristics similar to those that reach the human colon (Wojtunik-Kulesza et al., 2020). Initially, 10g of the flour was mixed with 50 mL of sterile distilled water and manually stirred for 5 min. The oral phase was simulated by the addition of mixture of α-amylase (3.33 mg) and 1 mol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> (1.04 mL, pH 7) was added to UCF solution and maintained at 37 °C for 30 min with stirring (130 rpm). For the gastric phase, the pH was adjusted to 2 – 2.5 with 1 mol L<sup>-1</sup> HCl, pepsin added (0.45 g in 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl, 4.16 mL) and maintained at 37 °C for 2 h with stirring (130 rpm). To simulate the intestine phase Bile (0.58 g) and pancreatin (0.93 g) mixed with 20.8 mL of 0.5 mol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> were

incorporated into the mixture, the pH was adjusted to 6.5 - 7 with  $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$  and maintained at  $37^\circ \text{C}$  for 2 h with stirring (45 rpm). Enzymes and reagents used to simulate the gastrointestinal digestion were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

The final digested UCF solution was transferred to a regenerated cellulose dialysis tubing  $1 \text{ kDa}$  nominal molecular weight cut-off (Spectra/Por® 6, Spectrum Europe BV, Breda, Netherlands) and dialyzed against  $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  at  $5 \pm 0.5^\circ \text{C}$  to remove low molecular mass digestion products. After 15 h, dialyzed fluids were replaced and process continued for 2 h. The dialyzed material was frozen ( $-18^\circ \text{C}$ ), freeze-dried (temperature  $-55 \pm 2^\circ \text{C}$ , vacuum pressure  $<138 \text{ }\mu\text{Hg}$ , freeze-drying speed  $1 \text{ mm/h}$ ) for 14 – 16 h with a liophilizer (Liotop, São Paulo, Brazil) and stored ( $5 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ) in hermetically sealed polyethylene bags for a maximum period of four weeks (Albuquerque *et al.*, 2021).

#### *Preparation of human fecal inoculum*

Inoculum preparation was performed using fresh fecal samples from six donors (three men and three women, aged between 22 and 28 years). The donors declared not to suffer from colonic conditions and to have an omnivorous diet, did not use probiotic foods or concentrated prebiotics, and had not used antibiotics during the six months before the study.

Volunteers received specific instructions for sample collection and a hygienic collection/storage kit containing gloves, mask, 70% alcohol and a sterile kit bottle (GUERGOLETTTO *et al.*, 2016). After collection, the flasks with the feces were placed in packaging with an anaerobic generator system (AnaeroGen™, Oxoid, Basingstoke England) and sent to the laboratory. Collected fecal samples were mixed with an equal amount of feces from each donor ( $1:1:1:1:1:1$ , w w<sup>-1</sup>), diluted ( $1:10$ , w v<sup>-1</sup>) in sterile phosphate-buffered saline (PBS  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 7.4) and homogenized for 2 min with stirring (200 rpm). Mixed fecal sample was filtered using triple layer gauze to remove larger particles and stored in sterile flasks under anaerobic conditions at  $37 \pm 0.5^\circ \text{C}$  (AnaeroGen™) (Albuquerque *et al.*, 2021).

#### *Preparation of fermentation media*

The basal nutrient ( $1 \text{ L}$ ) medium for colonic fermentation was composed of 4,5 g of NaCl, 4,5 g of KCl, 1,5 g of  $\text{NaHCO}_3$ , 0,69 g of  $\text{MgSO}_4$ , 0,8 g of L-cisteína HCl, 0,5 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,4 g of bile salt, 0,08 g of  $\text{CaCl}_2$ , 0,005 g of  $\text{FeSO}_4$  and 1 mL de Tween 80. As an anaerobic indicator,  $4 \text{ mL L}^{-1}$  of resazurin solution (0.025%, v v<sup>-1</sup>) was added to the medium, in distilled water and sterilized by autoclavation was used to dilute the components

(121 °C, 1 atm, 15 min). The pH of the basal medium was adjusted to 6.8 with the addition of HCl (1 mol L<sup>-1</sup>) (Andrade et al., 2020).

Digested UCF was used for fermentation with human fecal paste preculture. The total volume of the fermentation slurry was 50 mL. The final fermentation volume was 40% of basal nutrient medium, 40% human fecal inoculum (v v<sup>-1</sup>) and (w v<sup>-1</sup>) 20% of digested UCF. Fermentation batch-cultures with fructooligosaccharides (FOS, a well-known prebiotic, 20%, w/v) and with no added substrate were tested as positive and negative controls, respectively. After preparation, the cultures were incubated under anaerobiosis (AnaeroGen™) for 48 h at 37 ± 1 °C (Albuquerque et al., 2021, Massa et al 2022). Ingredients used to prepare fermentation media were obtained from Sigma-Aldrich.

#### *Quantification of bacterial groups by fluorescent in situ hybridization coupled with multiparametric flow cytometry*

To evaluate the ability of digested UCF to induce changes in the composition of the colonic bacterial population during *in vitro* colonic fermentation, the fluorescent in situ hybridization (FISH) technique was used with selected oligonucleotide probes designed to target specific regions of the 16S rRNA gene of these microorganisms combined with multiparametric flow cytometry (MFC) (Conterno et al., 2019). A total of six commercially synthesized probes labeled with the Cy3 fluorophore were used, (Lab 158 specific for *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp., Bif 164 specific for *Bifidobacterium*, Rfla 729 *Ruminococcus albus* - *R. Flavefaciens*, Bac 303 specific for *Bacteroides* - *Prevotella*, Chis 150 specific for *Clostridium histolyticum* and Erec 482 specific for *Eubacterium rectale* - *Clostridium coccooides*) (Sigma-Aldrich) (Silva et al., 2023). To enumerate the total population of bacteria, by staining double stranded DNA, the SYBR Green marker (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used. FISH-MFC includes four basic procedures: sample fixation and permeabilization, hybridization, washing to remove excess probes and detection by flow cytometry.

At the time zero (just after homogenization of batch-culture medium components) and after 24 and 48 h of fermentation, 375 µL aliquots obtained from the batch culture fermentation were diluted in 1125 µL of filtered 4% (w v<sup>-1</sup>) paraformaldehyde (PFA) and fixed overnight at 4 ± 0.5 °C, centrifuged (10600× g, 5 min, 4 °C), washed twice (10600× g, 5 min, 4 °C) with sterile PBS 1 M, resuspended in 300 µL PBS:ethanol 99% (1:1 v v<sup>-1</sup>), filtered with a 0.45 µm-pore size filter (Whatman®, GE Healthcare, Chicago, EUA) and stored (-20 °C). Ten µL aliquots of fixed cells were resuspended in 190 µL of sterile PBS 1X (Gibco®, Gaithersburg,

USA; pH 7.2), centrifuged ( $2146\times$  g, 15 min, 4 °C), resuspended in 200  $\mu$ L of Tris-EDTA buffer (100 milimolTris-HCl and 50 milimol EDTA; pH 8) and centrifuged ( $2146\times$  g, 15 min, 4 °C).

Samples were treated with 200  $\mu$ L of Tris-EDTA with lysozyme (1 mg mL<sup>-1</sup>) and incubated for 10 min in the dark at room temperature ( $25 \pm 0.5$  °C) to permeabilize cells for use with probes Lab 158, Bif 164 and Rfla 729, being followed by centrifugation ( $4,000 \times$  g, 15 min, 4 °C). Samples were resuspended in 45  $\mu$ L of hybridization buffer [(0.9 mol L<sup>-1</sup> NaCl, 20 milimolTris– HCl (pH 7.5), 0.1% (w v<sup>-1</sup>) sodium dodecyl sulphate (SDS)] and 5  $\mu$ L of Cy3-labelled fluorescent oligonucleotide probe (50 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>) and maintained under appropriate hybridization temperature (45 or 50 °C) in the dark for 4 h. After this hybridization step, samples were centrifuged ( $4,000 \times$  g, 15 min, 25 °C), resuspended with 200  $\mu$ L of hybridization buffer without SDS and maintained under appropriate wash temperature (45 or 50 °C) in the dark for 30 min. After this wash step, samples were centrifuged ( $2146\times$  g, 15 min, 25 °C), resuspended with 200  $\mu$ L PBS 1X and 20  $\mu$ L SYBR Green (1:1000 stock diluted in dimethyl sulfoxide  $\geq 99.9\%$ , Sigma-Aldrich), incubated for 10 min in the dark under room temperature ( $25 \pm 0.5$  °C), centrifuged ( $2146 \times$  g, 15 min, 25 °C) and resuspended with 200  $\mu$ L PBS 1X.

A blank sample (without the fluorescently Cy3-labelled oligonucleotide probe and without the SYBR Green) and a sample only with SYBR Green were prepared for every sample, following the same steps as the hybridized samples to set flow cytometer gate threshold, which allows to measure the population of selected microbial groups and exclude false-positive results due to potential sample autofluorescence.

The multiparametric flow cytometry measurements were done with a flow cytometer (BD Accuri C6, New Jersey, USA) with 488 nm excitation from a blue solid-state laser. The MFC principle consists of passing fluorescent signals from individual cells through a laser zone, being collected as logarithmic signals (pulse area measurements) by channels FL1 (SYBR Green) and FL2 (Lab 158, Bif 164, Rfla 729, Bac 303, Chis 150, and Erec 482). Sample acquisition was operated at a low flow rate, threshold level was adjusted for forward scatter (FSC) of 30.000 and a total of 10.000 events were collected for each sample. Fluorescence emission cytograms were recorded with BD Accuri C6 Software (Becton Dickinson and Company). Results were expressed as abundance (relative percentage) of cells hybridized with each bacterial groupspecific Cy3 probe (recorded as fluorescent events) in relation to total bacteria enumerated with SYBR Green staining (Conterno *et al.*, 2019).



### *Determination of prebiotic index of UCF*

The prebiotic index in fermentation medium with UCF, FOS and NC was determined by calculating the relative abundance (percentage) of each bacterial group measured based on FISH-FC results (Silva et al., 2023; Albuquerque et al., 2021), for which the following equation was used:

**Eq. 3** - Prebiotic index:  $(\% \text{ Lab}) + (\% \text{ Bif}) + (\% \text{ Rfla}) - (\% \text{ Bac}) - (\% \text{ Chis}) - (\% \text{ Erec})$

Where: %Lab = abundance found for Lab after 24 or 48 h – abundance found for Lab at time zero; %Bif = abundance found for Bif after 24 or 48 h – abundance found for Bif at time zero; %Rfla = abundance found for Rfla after 24 or 48 h – abundance found for Bif at time zero; %Bac = abundance found for Bac after 24 or 48 h – abundance found for Bac at time zero; %Chis = abundance found for Chis after 24 or 48 h – abundance found for Chis at time zero; and %Erec = abundance found for Erec after 24 or 48 h – abundance found for Erec at time zero.

Positive results for the prebiotic index indicate an overall beneficial alteration of the gut microbiota, while negative results indicate an undesirable overall alteration.

### *Evaluation of bacterial metabolism during colonic fermentation*

Indicators of metabolic activity (pH, sugars, organic acids and global metabolic profile) were evaluated in different colonic fermentation media (Umbu-cajá, Fructooligosaccharides (FOS) and No source), and at different times (0, 24 and 48 hours). For this, aliquots (3mL) were removed throughout the fermentation (Albuquerque et al., 2021; Silva et al., 2023). These indicators of metabolic activity were evaluated in different colonic fermentation media (Umbu-cajá, Fructooligosaccharides (FOS) and No source), and at different times (0, 24 and 48 hours). The pH analysis, carried out in the different media (Umbu-cajá, Fructooligosaccharides (FOS) and No source), for 0, 24 and 48 hours was carried out using a potentiometric pH meter (Q400AS, Quimis, São Paulo, Brazil) until a constant Reading (IAL, 2008) The analyzes of sugars and organic acids in the different media (Umbu-cajá, Fructooligosaccharides (FOS) and No source), during 0, 24 and 48 hours were carried out according to the methodology described in section 2.2 (Albuquerque *et al.*, 2021).

Metabolite analysis was carried out at the Multiuser Characterization and Analysis Laboratory (LMCA) at UFPB. The quantification and identification of metabolites were carried out using the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopic method. The analyzes were carried out using Bruker equipment, model Avance Neo, operating at 500 MHz

for  $^1\text{H}$ -NMR and 125 MHz for  $^{13}\text{C}$  (Bruker, Billerica, MA, USA). To obtain the spectrum sequence, the following parameters were used: Ic1pngpf2; temperature 26 °C; number of scans: 64; scan dumer: 16; receiver gain: 32; acquisition time: 3.27 seconds.

To carry out this analysis, 2 mL of each sample was diluted (1:1) in a solution with HPLC grade methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) and deuterated water ( $\text{D}_2\text{O}$ ) (9:1, v v<sup>-1</sup>), centrifuged (MPW®, 4000 RPM, 10 minutes, 4° C) and filtered with a 0.45 µm membrane filter (Millipore®). The sample data analysis consisted of peaks that vary according to the signal intensity in the different regions evaluated. Spectra processing was performed using the MestReNova® (MNova) software version 5.2.3.

### *Antioxidant activity*

The antioxidant activity in media with digested UCF was evaluated at 0, 24 and 48 hours of fermentation using the ABTS<sup>+</sup>, DPPH, and FRAP assays, according to the methodology described in section 2.3 (Table 5). (Re et al., 1999; Brand-williams, Cuvelier & BERSET, 1995; Oyaizu *et al.*, 1986).

### *Statistical analysis*

The assays were carried out in triplicate and expressed as mean ± estimated standard deviation. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test; and unpaired Student's t test. P values <0.5 were considered significant (5% significance level). Principal Component Analysis (PCA) was performed with a matrix of 9 lines (3 lines for UCF, FOS and no source, and at three different times), and 13 columns, (6 columns for abundance of the evaluated bacterial groups, 1 for o Prebiotic Index, 2 for sugars and 4 for SCFA). The collected data were tabulated in Microsoft Excel Software and analysis was evaluated in R Software (Version 4.3.1 Ross Ihaka & Robert Gentleman, University of Auckland, Auckland, New Zealand).

## **Results**

### *Physicochemical characteristics of UCF*

The UCF showed low values of moisture < 10%, very acidic pH, high acidity, low protein and lipid content and high total fiber content, standing out the content of insoluble fiber (57,46 ± 0,28 %). Glucose and fructose concentrations were higher than maltose. The lactic acid was present in greater amounts when compared to the other acids. Succinic, malic and

formic acid had similar values. Flavonols were the phenolic compounds that presented the highest amount of compounds, of which quercetin-3-O-glucoside had the highest value (36,73 mg 100g<sup>-1</sup>). UCF showed high antioxidant activity for all tested methods. The antioxidant activity of UCF was higher using the FRAP method when compared to DPPH and ABTS (Table 1).

#### *Relative abundance of bacterial populations during colonic fermentation*

This analysis aims to quantify bacterial populations present in the intestinal microbiota during colonic fermentation. The changes that occurred in the relative abundance (%) of bacterial groups during the 48 h of colonic fermentation are observed in Table 2. *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. increased in media with FOS and UCF during colonic fermentation ( $p \leq 0.05$ ). The highest abundance of *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. was found at 48 h in the media with UCF ( $7.39 \pm 0.32\%$ ), followed by medium with FOS ( $6.51 \pm 0.19\%$ ) and NC ( $0.12 \pm 0.03\%$ ). At 24h of fermentation, media with UCF and FOS showed growth ( $p \leq 0.05$ ) in populations of *Bifidobacterium* spp. Higher values ( $p \leq 0.05$ ) of *Bifidobacterium* spp. during the 48h of fermentation were found in medium with UCF ( $8.81 \pm 0.37\%$ ), followed by medium with FOS ( $5.15 \pm 0.29\%$ ).

The relative abundance of *R. albus*/*R. flavefaciens* was higher in media with FOS ( $0.64 \pm 0.16\%$ ) and UCF ( $0.47 \pm 0.13\%$ ) at 48 h of fermentation ( $p \leq 0.05$ ). On the other hand, *R. albus*/*R. flavefaciens* decreased in the negative control medium when compared to the 0h fermentation time ( $p \leq 0.05$ ). *Bacteroides* spp./ *Prevotella* spp. decreased ( $p \leq 0.05$ ) in all media during the 24h of fermentation, with lower relative abundance ( $p \leq 0.05$ ) found in media with UCF. For the negative control, *Bacteroides* spp./ *Prevotella* spp. did not change during the 48 h of fermentation (from  $6.99 \pm 0.38\%$  to  $6.42 \pm 0.26\%$ ) ( $p > 0.05$ ). *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp. decreased in all fermentation media when compared to values found at 0 h ( $p \geq 0.05$ ).

At 48 h of colonic fermentation there was an increase in the relative abundance ( $p \leq 0.05$ ) of *Clostridium histolyticum*. Higher values in medium with UCF was found at 48 h ( $6.09 \pm 0.38\%$ ). Media with FOS decreased over the 48h of fermentation. The relative abundance of *E. rectale* - *C. coccoides* decreased ( $p \leq 0.05$ ) in media with FOS (from  $6.99 \pm 0.42$  to  $5.09 \pm 0.22\%$ ) when compared to time 0h. The abundance of *E. rectale* - *C. coccoides* decreased ( $p \leq 0.05$ ) at the 48 h of fermentation in media with UCF (from  $5.87 \pm 0.28$  to  $5.31 \pm 0.17\%$ ) and FOS ( $6.99 \pm 0.42$  to  $3.10 \pm 0.14\%$ ), while the negative control maintained similar values (from  $6.43 \pm 0.30$  to  $6.64 \pm 0.26\%$ ).

### *Prebiotic index of UCF during colonic fermentation*

Aiming to quantify and compare microbial populations in UCF, a prebiotic index was calculated with data obtained from FISH-CFM analysis. Prebiotic indices calculated after 24 and 48 h of in vitro colonic fermentation for the media with UCF and FOS were positive, while negative control had a negative prebiotic index (Table 3). At 48 h of incubation, the prebiotic index for FOS exhibited the highest rating (from  $10.20 \pm 1.28$  to  $20.71 \pm 1.66$ ) ( $p \leq 0.05$ ) when compared to UCF (from  $5.37 \pm 1.16$  to  $11.86 \pm 1.47$ ).

### *Bacterial metabolism behavior during colonic fermentation*

This analysis evaluates the metabolic activity exerted by the microbial population present in the microbiota during colonic fermentation. The results of the variation of pH values and contents of sugars and organic acids during colonic fermentation in medium with UCF, FOS and NC are presented in Table 4. During colonic fermentation, there was a decrease ( $p < 0.05$ ) in the values of pH in all evaluated media. The lowest pH value at 48 h of fermentation was found in the media with UCF ( $4.13 \pm 0.30$ ), and FOS ( $4.56 \pm 0.22$ ), followed by medium NC ( $6.22 \pm 0.38$ ).

Fructose and glucose contents in media with UCF, FOS and NC during 48 h of in vitro colonic fermentation are observed in Table 4. Glucose and fructose content were below the limit of detection in UCF medium during 24 and 48 hours of colonic fermentation. Glucose content was not detected in FOS medium during 48 h of colonic fermentation. The fructose content decreased in the FOS medium during the 48 hours of colonic fermentation.

Organic acid contents in the media analyzed during 48 hours of fermentation are shown in Table 4. In general, there was an increase in the content of organic acids in the media with UCF and FOS during the 48 h of colonic fermentation. Propionic acid was the organic acid produced in greatest quantity in the UCF medium, followed by acetic, butyric and lactic acids, throughout the 48 hours of colonic fermentation. The lactic acid content was detected during colonic fermentation in NC.

Comparison of the spectral profiles of media with UCF and FOS at time zero and 48 h of colonic fermentation allowed the identification of 57 distinct chemical constituents (Fig. 1) (The results of the presence or loss of signal intensity are shown in supplementary material data, S1). We identified a number of metabolites in media with UCF and FOS, including metabolites in amino acid metabolism (leucine, isoleucine, valine, threonine, alanine, lysine, ornithine, glycine, putrescine, glutamate, proline, methylamine, phenylalanine, 2-oxoisovalerate, 2-methylbutyrate, gamma-aminobutyric acid (GABA), uracil, 5-aminopentanoate, asparagine,

methionine); and energy metabolism (lactate, acetate, succinate, fructose, aspartate, formate, isocaproate, ketoisovalerate, n-butyrate, propionate, citrate, valerate, malonate, 3-methyl-2-oxoisovalerate, phenylacetate,  $\alpha$ -Xylose,  $\beta$ -Xylose,  $\beta$ -Glucose,  $\alpha$ -Glucose, D-galactose, UDP-glucuronate, dihydroxyacetone, 5-aminosalicylate) (WANG et al., 2017). In addition to these, choline metabolism (trimethylamine (TMA)); ketone body metabolism (3-hydroxybutyrate); microbial-derived metabolism (isobutyrate, p-cresol, 3, N- acetyl-5-aminosalicylate) and some other metabolites such as bile salts, ethanol and total lipids were also found.

The proline and methylamine metabolites had reduced signal intensity of colonic fermentation in medium with UCF. Some metabolites were only detected in medium with UCF at 48 h of colonic fermentation, for example, 3-hydroxyphenylacetate and asparagine.

#### *Antioxidant capacity during the colon fermentation*

Antioxidant activity was evaluated by ABTS, DPPH and FRAP assays (Table 5). When compared to 24 h of colonic fermentation, there was a decrease ( $p \leq 0.05$ ) in antioxidant activity. However, at 24 h of colonic fermentation, antioxidant activity increased ( $p \leq 0.05$ ) in all ABTS, DPPH or FRAP assays tested (Re et al., 1999; Brand-williams, Cuvelier & BERSET, 1995; Oyaizu et al., 1986).

#### *Principal Component Analysis (PCA)*

PCA was used to evaluate the differences between digested the media during colonic fermentation considering the distinct microbial groups evaluated, the prebiotic index, the contents of sugars and organic acids. The analysis explained the data with a total variance of 66.99% (Dim 1: 50.36% and Dim 2: 16.63%).

### **Discussion**

The moisture content obtained ( $7.73 \pm 0.00\%$ ) is in accordance with current Brazilian legislation for edible vegetable flours, which limit the maximum value to 15% (Anvisa, 2005). UCF showed low values of moisture, pH and lipids associated with high acidity. These intrinsic characteristics limit the growth of microbial agents and enzymatic activity, and the low lipid content reduces oxidation, allowing greater stability and safety during storage at room temperature, in addition to prolonging the shelf life of the flour (Alp & Bulantekin, 2021). Low protein content in fruit by-products is an expected result. The presence of soluble and insoluble fiber content in UCF demonstrates the availability of carbohydrates resistant to digestion and absorption in the small intestine that can reach the colon, becoming a substrate for colonic

bacterial fermentation (Ioniță-Mîndrican et al., 2021). The variety of phenolic compounds (mainly flavonols) found in flour may have contributed to the high antioxidant capacity of UCF (Kamal et al., 2023).

According to the results of the FISH-MFC analysis, the highest positive prebiotic activity indices were found in the UCF medium during the 48h of fermentation, indicating the ability of the flour to stimulate beneficial, which is characteristic of potential prebiotic (Zang et al., 2018). The medium with UCF induced an increase in bacterial populations associated with beneficial effects on the intestinal microbiota, such as *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. and *R. albus*/*R. flavefaciens*, during 48 hours of *in vitro* colonic fermentation (Sanders et al., 2019). The growth of beneficial populations concomitant with the decrease in pH and production of short-chain fatty acids indicates intense bacterial metabolic activity (Markowiak-Kopeć & Śliżewska, 2020). Consequently, the restricted growth observed in the negative control fermentation medium indicates that this medium lacks adequate nutrients to support the proliferation of the tested bacterial populations. Therefore, any upsurge in bacterial populations within the UCF fermentation medium can be attributed to its capacity to foster bacterial growth (Melo et al., 2020).

Although the glucose and fructose content were not detected during the 24 and 48 hours of colonic fermentation in the medium with UCF, it was quantified at time 0 h. This result may indicate the consumption of sugars throughout colonic fermentation. The presence of hexose monosaccharides in UCF (glucose and fructose) may have enhance the use of UCF as a fermentable substrate for beneficial bacteria, since intestinal bacteria such as *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp., and *Bifidobacterium* spp. have a strictly fermentative metabolism, obtaining energy through the anaerobic breakdown of carbohydrates resistant to digestion and absorption in the upper gastrointestinal tract, resulting in the synthesis of organic acids such as lactate and acetate (Rivière et al., 2016).

Both genera of bacteria can convert lactic and acetic acid to butyric acid through cross-feeding, the preferred source of energy for colonocytes (Moens, Verce, Vuyst, 2017). The production of butyrate concomitant with the decrease in pH during 48h of colonic fermentation appears to be related to the increase in the relative abundance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. in the middle with UCF. The SCFAs have many health benefits, such as anti-inflammatory, immunoregulatory, anti-obesity, anti-diabetes, anticancer, hepatoprotective, cardiovascular protective, and neuroprotective activities (Xiong et al., 2022).

Another factor that may have contributed to the increase in the abundance of *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. is linked to the presence of flavonoids in UCF (Rha et al.,

2019). These compounds are linked to sugars, called glycosides, and thus become more stable than free flavonoids (Šamec *et al.*, 2021). In the intestinal microbiota, they increase the proportion of beneficial bacteria (*Lactobacillus* spp. / *Enterococcus* spp.) and decrease the proportion of pathogenic bacterial *Clostridium coccooides* / *Eubacterium rectale* (Pan *et al.*, 2023).

Fermentation in media with UCF promoted an increase in all organic acids analyzed during 48h fermentation, with higher levels of propionic acid. This SCFA is part of the metabolism of the phylum Bacteroidetes (*Bacteroides* spp./ *Prevotella* spp.) through the succinate pathway, the main route for propionate formation (Reichardt, Duncan, Young *et al.*, 2014). The increase in propionate is in line with the greater relative abundance of Bacteroidetes after 24h, suggesting that propionate may have been produced by Bacteroidaceae and Prevotellaceae.

In addition to Bacteroidaceae - Prevotellaceae, another bacterium that acts in the production of propionate from the result of  $\beta$ -glucan fermentation is *Clostridium histolyticum* (Hughes *et al.*, 2008). Bacteroidaceae - Prevotellaceae and *Clostridium histolyticum* are saccharolytic species capable of producing high concentrations of beneficial SCFAs from sugars (Rowland *et al.*, 2018). The presence of propionate in the intestinal microbiota is capable of promoting anti-inflammatory action, increasing the absorption of minerals, in addition to reducing pH in the colon (Yan *et al.*, 2022; Haghikia *et al.*, 2022). This result may explain the gradual increase in propionate production during the 48h of fermentation in UCF medium, concomitant with the increase in the abundance of *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp and *C. histolyticum* populations, indicating a level of cross- feeding (Peterson *et al.*, 2022).

Bacteria of the genus *Ruminococcus* are found abundantly in the intestinal microbiota. *R. albus* and *R. flavefaciens* are cellulolytic species that produce SCFAs, mainly acetate, as a final result of fermentation (Reau & Suen, 2018). Acetate acts as a substrate for the biosynthesis of fatty acids in the liver, and is source of energy for muscle and brain tissue, in addition to decreasing the pH of the colon (Liu & Li, 2019). The increase in the relative abundance of *R. albus* and *R. flavefaciens* and the greater increase in acetic acid after 24h of colonic fermentation seem to confirm the results. Another factor that may have contributed to the increase in the population of *R. albus* and *R. flavefaciens* is linked to the higher content of insoluble fibers present in the UCF.

*E. rectale*/*C. coccooides* are known as butyrate producers (Singh *et al.*, 2023; Abbeele *et al.*, 2013). These microbial groups showed decreased abundance during 48h of colonic fermentation. When compared to *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. and *Bifidobacterium*

spp, the relative abundance of *E. rectale*/*C. coccoides* was lower in medium with UCF, and there was no increase during colonic fermentation (48h). These results may indicate that butyrate production occurred by *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. and *Bifidobacterium* spp. Another factor that may have contributed to the decrease in the abundance of *E. rectale*/*C. coccoides* during colonic fermentation is related to the presence of flavonols, since these compounds act by inhibiting the growth of pathogenic bacteria (Song et al., 2021). The presence of phenolic compounds in the flour may have contributed to the increase in antioxidant activity in the fermentation medium with UCF at 48 h (Xavier et al., 2022).

Metabolic profiles showed a large number and variety of metabolites during colonic fermentation, regardless of the fermentation medium. Most of these chemical compounds are commonly found in human fecal samples. These results corroborate the quantification of sugars and organic acids. Proline synthesis occurs from glutamate (Jones et al., 2021). The decrease in the intensity of proline signals after 48 h in the medium with UCF suggests that this metabolite may have been degraded by beneficial bacterial groups present in the intestinal microbiota, including *Bifidobacterium* (Ji et al., 2018).

Asparagine is synthesized from aspartate (Lomelino et al., 2017). The decrease in the intensity of aspartate signals after 24 h of colonic fermentation in medium with UCF, concomitant with the increase in the intensity of asparagine signals over the 48 h of fermentation, may indicate that this compound was metabolized to obtain asparagine. Asparagine can act to protect the intestinal barrier, maintaining microbiota homeostasis (Zhu et al., 2017).

The metabolite 3-hydroxyphenylacetate, also known as 3-hydroxyphenylacetic acid is the main metabolite of quercetin, a flavonoid. The quercetin degradation pathway begins with the formation of dihydroquercetin, which is subsequently degraded into 3-(3,4-dihydroxyphenyl) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, after successive degradations forming 3-hydroxyphenylacetic acid (Dias et al., 2022). This degradation chain may be associated with the presence of 3-hydroxyphenylacetate during 48 h of colonic fermentation. Bacterial species/strains present in the intestinal microbiota produce branched-chain fatty acids (BCFAs) such as isobutyrate, isovalerate or 2-methylbutyrate from the catabolism of valine, leucine and isoleucine (Ezzine et al., 2022).

PCA analysis offers a generalized view of data dimensionality. There is no specific variance value, therefore, there may be adaptations for different types and structures of data, depending on the context and analytical requirements (Jolliffe & C  dima, 2016). UCF was the treatment showed higher concentrations of acetic, butyric and propionic acid, and greater



abundances of *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp, and *R. albus* and *R. flavefaciens*. PCA Map evidenced the positive effect of UCF on the modulation of beneficial intestinal microbial groups (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. and *R. albus* and *R. flavefaciens*).

## Conclusion

UCF showed an increase in the populations of *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. and *R. Albus/R. flavefaciens*, confirmed by the positive prebiotic index throughout in vitro colonic fermentation. There was intense metabolic activity, confirmed by the consumption of sugars and production of SCFA (acetate, lactate, butyrate and propionate), corroborating the results found in the metabolomic profile e analyses PCA. SCFA production resulted in a decrease in pH values during fermentation. Furthermore, UCF showed high antioxidant activity and phenolic compounds. The results indicate that UCF has the ability to modulate the colonic microbiota of healthy individuals. Due to the content of dietary fiber, phenolic compounds and antioxidant activity, umbu-cajá by-product flour can be used by the food industry for incorporation into functional and sustainable bakery products using umbu-cajá by- product resources. Furthermore, it can be used for food supplementation.

## Conflicts of interest

Authors confirm no conflicts of interest with respect to the work described in this manuscript.

## Acknowledgements

FAPITEC - SE (Notice FAPITEC/SE/FUNTEC nº 04/2021, Masters and Doctorate with product technological.

## References

- Abbeele, P.V., Belzer, C., Goossens, M., Kleerebezem, M., De Vos, W. M., Thas, O., De Weirdt, R., Kerckhof, F. M., & Van de Wiele, T. (2013). Butyrate-producing *Clostridium* cluster XIVa species specifically colonize mucins in an *in vitro* gut model. *The ISME journal*, 7(5), 949–961. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.158>.
- Aderne, I., Anjos, D. A., Souza, C. C. E., & Zanuto, M. E. (2021). Potencial nutricional e funcional da farinha da casca de umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Cam.). *Revista Brasileira De Agrotecnologia*, 11(2), 964–974. <https://doi.org/10.18378/REBAGRO.V12I2.8883>
- Albuquerque, T. M. R., Magnani, M., Lima, M. S., Castellano, L. R. C., & de Souza, E. L. (2021). Effects of digested flours from four different sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) root

varieties on the composition and metabolic activity of human colonic microbiota *in vitro*. *Journal of Food Science*, 86, 3707–3719. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15852>.

Ali K., Iqbal M., Yuliana ND, et al. (2013). Identification of bioactive metabolites against adenosine A1 receptor using NMR-based metabolomics. *Metabolomics*, 9 (4):778–785. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0498-9>

Alp, D., & Bulantekin, O. (2021). The microbiological quality of various foods dried by applying different drying methods: a review. *Eur Food Res Technol*, 247, 1333–1343. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03731-z>

Andrade, R. M. S. de, Silva, S., Costa, C. M. D. S. F., Veiga, M., Costa, E., Ferreira, M. S. L., Gonçalves, E. C. B. A., & Pintado, M. E. (2020). Potential prebiotic effect of fruit and vegetable byproducts flour using in vitro gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 137, Article 109354. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109354>

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2005. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0263\\_22\\_09\\_2005.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0263_22_09_2005.html)

Assis, R. C., de Lima Gomes Soares, R., Siqueira, A. C. P., de Rosso, V. V., de Sousa, P. H. M., Mendes, A. E. P., de Alencar Costa, E., de Góes Carneiro, A. P., & Maia, C. S. C. (2020). Determination of water-soluble vitamins and carotenoids in Brazilian tropical fruits by High Performance Liquid Chromatography. *Heliyon*, 6(10), Article e05307. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05307>

Assis, R. C., Siqueira, A. C. P., Oliveira, J. P. da S., Silva, F. L. F. da ., Matos, W. O., Gouveia, S. T., Maia, C. S. C., & Lopes, G. S.. (2022). Characterization of Mineral Content in Fruits of Northeast Agrobiodiversity of Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65, e22200759. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2022200759>

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2002). 17th ed. Official Methods of Analysis of the AOAC International. Gaithersburg, MD, USA, p. 480.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2016). 20th ed. Official Methods of Analysis of the AOAC International. Rockville, MD, USA. ISBN: 97-8-093558487-5

Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14, 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

Akter, B. & Rabeta, M. S. (2021). Synbiotic and antioxidant activity of fruit by-products and their effect on human health. *Food Research*, 5 (1): 24 - 35. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(1\).40](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(1).40)

Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A. F., & Arora, A. (2017). Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food chemistry*, 225, 10 –22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.093>

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technol*, 28: 25-30.  
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Calín-Sánchez, Á., Lipan L., Cano-Lamadrid M., Kharaghani, A., Masztalerz, K., Carbonell-Barrachina, A. A., & Figiel, A. (2020). Comparison of Traditional and Novel Drying Techniques and Its Effect on Quality of Fruits, Vegetables and Aromatic Herbs. *Foods*, 9 (9): 1261. <https://doi.org/10.3390%2Ffoods9091261>

Campos, D. A., Coscueta, E. R., Vilas-Boas, A. A., Silva, S., Teixeira, J. A., Pastrana, L. M., & Pintado, M. M. (2020). Impact of functional flours from pineapple by-products on human intestinal microbiota. *Journal of Functional Foods*, 67, Article 103830.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103830>

Cangussu, L. B., P Leão, D., Oliveira, L. S., & Franca, A. S. (2021). Profile of bioactive compounds in pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) peel flours. *Food chemistry*, 350, 129221.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129221>

Conterno, L., Martinelli, F., Tamburini, M., Fava, F., Mancini, A., Sordo, M., ... & Tuohy, K. (2019). Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects. *European Journal of Nutrition*, 58(1), 63–81.<https://doi.org/10.1007/s00394-017-1572-2>

Dias, P., Pourová, J., Vopršalová, M., Nejmanová, I., & Mladěnka, P. (2022). 3-Hydroxyphenylacetic Acid: A Blood Pressure-Reducing Flavonoid Metabolite. *Nutrients*, 14(2), 328. <https://doi.org/10.3390/nu14020328>

Ezzine, C., Loison, L., Montbrion, N., Bôle-Feysot, C., Déchelotte, P., Coëffier, M., & Ribet, D. (2022). Fatty acids produced by the gut microbiota dampen host inflammatory responses by modulating intestinal SUMOylation. *Gut microbes*, 14(1), Article 2108280.  
<https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2108280>

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific.  
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

Gowda, N. G. A., & Raftery, D. (2021). NMR-Based Metabolomics. *Advances in experimental medicine and biology*, 1280, 19–37.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-51652-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-51652-9_2)

Haghikia, A., Zimmermann, F., Schumann, P., Jasina, A., Roessler, J., ... & Andmesser, U. (2022). Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *European heart journal*, 43(6), 518–533.  
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab644>

Hughes SA, Shewry PR, Gibson GR, McCleary BV, Rastall RA (2008). *In vitro* fermentation of oat and barley derived beta-glucans by human faecal microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(3):482-493. <https://doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00478.x>

Ioniță-Mîndrican, C. B., Ziani, K., Mititelu, M., Oprea, E., Neacșu, S. M., Moroșan, E., Dumitrescu, D. E., Roșca, A. C., Drăgănescu, D., & Negrei, C. (2022). Therapeutic Benefits and Dietary Restrictions of Fiber Intake: A State of the Art Review. *Nutrients*, 14(13), 2641. <https://doi.org/10.3390/nu14132641>

Ji, Y., Guo, Q., Yin, Y., Blachier, F., & Kong, X. (2018). Dietary proline supplementation alters colonic luminal microbiota and bacterial metabolite composition between days 45 and 70 of pregnancy in Huanjiang mini-pigs. *Journal of animal science and biotechnology*, 9, 18. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0233-5>

Jolliffe, I. T., & Cadima, J. (2016). Principal components analysis: a review and recent developments. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 374(2065), Article 20150202. <http://dx.doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>

Kamal, M., Chowdhury, G.F., Shishir, M.R.I., Sabuz, A.A., Islam, M., Khan, H. H.(2023). Impacts of drying on physicochemical properties, bioactive compounds, antioxidant capacity, and microstructure of jackfruit seed flour (2023). *Biomass Conversion Biorefinery* <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04763-z>

La Reau, A. J., & Suen, G. (2018). The Ruminococci: key symbionts of the gut ecosystem. *Journal of Microbiology*, 56(3), 199–208. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8024-4>

Leão, D. P., Franca, A. S., Oliveira, L. S., Bastos, R., & Coimbra, M. A. (2017). Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. *Food chemistry*, 225, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.027>

Liu, L., Fu, C., & Li, F. (2019). Acetate Affects the Process of Lipid Metabolism in Rabbit Liver, Skeletal Muscle and Adipose Tissue. *Animals: an open access journal from MDPI*, 9(10), 799. <https://doi.org/10.3390/ani9100799>

Lomelino, C. L., Andring, J. T., McKenna, R., & Kilberg, M. S. (2017). Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease. *The Journal of biological chemistry*, 292(49), 19952–19958. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.819060>

Macedo, E, L, C., Pimentel, T. C., Morais, J. S., Melo, D. S., Souza, A. C., ... & Magnani, M. (2023) Effects of yeast fermented soursop and umbu-cajá pulps on the colonic microbiota of middle-aged hypertensive adults. *Food Bioscience*, 51, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102309>

Massa, N. M. L., de Oliveira, S. P. A., Rodrigues, N. P. A., Menezes, F. N. D. D., Lima, Magnani, M. S., M., & de Souza, E. L. (2022). *In vitro* colonic fermentation and potential prebiotic properties of pre-digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-products. *Food Chemistry*, 388, Article 133003. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133003>

Markowiak-Kopeć, P., & Śliżewska, K. (2020). The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients*, 12(4), 1107. <https://doi.org/10.3390/nu12041107>

Melo, F. H. C., Menezes, F. N. D. D., Souza, J. M. B., Lima, M. S., Borges, G. S. C., Souza, E. L., & Magnani, M. (2020). Prebiotic activity of monofloral honeys produced by stingless bees in the semi-arid region of Brazilian Northeastern toward *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Bifidobacterium lactis* BB-12. *Food Research International*, v. 18, Article 108809 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108809>

Moens F, Verce M, De Vuyst L. (2017) Lactate- and acetate-based cross-feeding interactions between selected strains of lactobacilli, bifidobacteria and colon bacteria in the presence of inulin-type fructans. *International Journal of Food Microbiology*, 241:225-236. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.019>

Oyaizu, M. (1986) Studies on Products of Browning Reactions: Antioxidative Activities of Product of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307-315. <http://dx.doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>

Pan, L., Ye, H., Pi, X., Liu, W., Wang, Z., Zhang, Y., & Zheng, J. (2023). Effects of several flavonoids on human gut microbiota and its metabolism by *in vitro* simulated fermentation. *Frontiers in microbiology*, 14, 1092729. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1092729>

Peterson, C. T., Perez Santiago, J., Iablokov, S. N., Chopra, D., Rodionov, D. A., & Peterson, S. N. (2022). Short-Chain Fatty Acids Modulate Healthy Gut Microbiota Composition and Functional Potential. *Current microbiology*, 79(5), 128. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02825-5>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine*, 26(9-10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

Reichardt, N., Duncan, S. H., Young, P., Belenguer, A., McWilliam Leitch, C., Scott, K. P., Flint, H. J., & Louis, P. (2014). Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *The ISME journal*, 8(6), 1323–1335. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.14>

Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in microbiology*, 7, 979. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>

Rodríguez, T. I. S., Alcántara Quintana, L. E., Algara Suarez, P., Ruiz Cabrera, M. A., & Grajales Lagunes, A. (2021). Physicochemical Properties, Antioxidant Capacity, Prebiotic Activity and Anticancer Potential in Human Cells of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Seed Flour. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(16), 4854. <https://doi.org/10.3390/molecules26164854>

Rolin, P. M., Macedo, G., & Santos, E. Nutritional value, cellulase activity and prebiotic effect of melon residues (*Cucumis melo* L. *reticulatus* group) as a fermentative substrate (2018). *Journal of Food and Nutrition Research* (ISSN 1336-8672), 57, 315–327

Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition*, 57(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>

Rha, C.-S., Seong, H., Jung, Y.S., Jang, D., Kwak, J.-G.; Kim, D.-O.; Han, N. S. (2019). Estabilidade e fermentabilidade de flavonóis de chá verde na digestão gastrointestinal simulada *in vitro* e na fermentação fecal humana. *Internacional Journal of Molecular Science*, 20 , 5890. <https://doi.org/10.3390/ijms20235890>

Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., & Salopek-Sondi, B. (2021). The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. *Plants*, 10(1), 118. <https://doi.org/10.3390/plants10010118>

Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(10), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>

Singh, V., Lee, G., Son, H., Koh, H., Kim, E. S., Unno, T., & Shin, J. H. (2023). Butyrate producers, "The Sentinel of Gut": Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics. *Frontiers in microbiology*, 13, 1103836. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1103836>

Silva, J. Y. P., Nascimento, H. L. A., Albuquerque, T. M. R. Sampaio, K. B., Lima, M. S. Monteiro, M., Leite, I. B., ... & Souza, E. L. (2023). Revealing the Potential Impacts of Nutraceuticals Formulated with Freeze-Dried Jabuticaba Peel and *Limosilactobacillus fermentum* Strains Candidates for Probiotic Use on Human Intestinal Microbiota. *Probiotics and antimicrobial proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10134-x>

Song, H., Shen, X., Deng, R., Zhang, Y., & Zheng, X. (2021). Dietary anthocyanin-rich extract of açai protects from diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin resistance with modulation of gut microbiota in mice. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 86, 111176. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111176>

Sviech, F. Ubbink, J. & Prata, A. S. (2022). Potential for the processing of Brazilian fruits - A review of approaches based on the state diagram. *Food Science and thecnology*, 156, 113013. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113013>

Xavier, V. L., Feitoza, G. S., Barbosa, J. M. L., Araújo, K. S. D., Silva, M. V. D., Correia, M. T. S., Souza, M. P. D., & Carneiro-da-Cunha, M. D. G. (2022). Nutritional and technological potential of Umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) processing by-product flour. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*, 94(1), Article e20200940. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220200940>

Xiong, R.-G., Zhou, D.-D., Wu, S.-X.; Huang, S.-Y., Saimaiti, A., Yang, Z.-J., ... & Li, H. B. (2022). Health Benefits and Side Effects of Short-Chain Fatty Acids. *Foods*, 11, 2863. <https://doi.org/10.3390/foods11182863>

Yan, J., Pan, Y., Shao, W., Wang, C., Wang, R., ... & Dong, S. (2022). Beneficial effect of the short-chain fatty acid propionate on vascular calcification through intestinal microbiota remodelling. *Microbiome*, 10(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01390-0>

Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of In Vitro Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols-A Non-Systematic Review. *Nutrients*, 12(5), 1401. <https://doi.org/10.3390/nu12051401>

Zhang, S., Hu, H., Wang, L., Liu, F., & Pan, S. (2018). Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin. *Food chemistry*, 244, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.071>

Zhu, H., Pi, D., Leng, W. (2017). Asparagine preserves intestinal barrier function from LPS-induced injury and regulates CRF/CRFR signaling pathway. *Innate Immunity*, 23(6), 546 - 556. <https://doi.org/10.1177/1753425917721631>

**Table - 3** - Physicochemical parameters of umbu-cajá flour (UCF; average  $\pm$  estimated standard deviation; n = 3) used in assays to evaluate prebiotic properties.

| Parameters                               | Values            |
|------------------------------------------|-------------------|
| Moisture (%)                             | 7.73 $\pm$ 000    |
| pH                                       | 2.80 $\pm$ 0.01   |
| Ash (%)                                  | 4.48 $\pm$ 0.05   |
| Titratable total acidity (% citric acid) | 4.81 $\pm$ 0.03   |
| Carbohydrate (%)                         | 142.80 $\pm$ 0.61 |
| Proteins (g/100 g)                       | 6.42 $\pm$ 0.03   |
| Lipids (g/100 g)                         | 2.56 $\pm$ 0.66   |
| Total Dietary Fiber (%)                  | 63.99 $\pm$ 0.43  |
| Soluble Dietary Fiber (%)                | 6.53 $\pm$ 0.15   |
| Insoluble Dietary Fiber (%)              | 57.46 $\pm$ 0.28  |
| <b>Carbohydrates (g/L)</b>               |                   |
| Glucose                                  | 1.92 $\pm$ 0.31   |
| Fructose                                 | 3.31 $\pm$ 0.53   |
| Maltose                                  | 0.96 $\pm$ 0.12   |
| <b>Organic acids (g/L)</b>               |                   |
| Formic acid                              | 0.11 $\pm$ 0.28   |
| Malic acid                               | 0.16 $\pm$ 0.63   |
| Succinic acid                            | 0.18 $\pm$ 0.14   |
| Lactic acid                              | 0.36 $\pm$ 0.14   |
| <b>Phenolic compounds (mg/100 g)</b>     |                   |
| Phenolic acids                           |                   |
| Gallic acid                              | 2.33 $\pm$ 0.01   |
| Caftaric acid                            | 3.33 $\pm$ 0.00   |
| Chlorogenic acid                         | 9.84 $\pm$ 0.05   |
| <i>p</i> -Coumaric acid                  | 7.82 $\pm$ 0.01   |
| Flavons                                  |                   |
| Hesperidin                               | 1.55 $\pm$ 0.04   |
| Naringenin                               | 1.83 $\pm$ 2.59   |
| Flavanols                                |                   |
| Catechin                                 | 1.19 $\pm$ 0.13   |
| Epigallocatechin gallate                 | 5.29 $\pm$ 0.05   |
| Epicatechin                              | 2.98 $\pm$ 0.96   |



|                                   |               |
|-----------------------------------|---------------|
| Procyanidin A2                    | 1.01 ± 0.01   |
| Procyanidin B1                    | 7.89 ± 0.09   |
| Procyanidin B2                    | 9.81 ± 0.02   |
| Myricetin                         | 3.65 ± 0.04   |
| Quercetin 3-Glucoside             | 36.96 ± 0.31  |
| Kaempferol 3-glucoside            | 2.93 ± 0.04   |
| Isorhamnetin                      | 4.67 ± 4.97   |
| <i>trans</i> -Resveratrol         | 6.00 ± 0.05   |
| <b>Antioxidant activity</b>       |               |
| DPPH <sup>•</sup> (% inhibition)  | 72.01 ± 3.96  |
| ABTS <sup>•+</sup> (% inhibition) | 73.91 ± 6.85  |
| FRAP (μmol FeSO <sub>4</sub> /g)  | 758.77 ± 34.3 |

Abbreviations: ABTS<sup>•+</sup> cation-2,2-azinobis (3-ethylbenzo-tiazoline) -6-sulfonic acid; DPPH<sup>•</sup>, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; FRAP, ferric-reducing ability of plasma; FeSO<sub>4</sub>, ferrous sulfate;

**Table - 4** - Relative abundance (% average  $\pm$  estimated standard deviation; n = 3) and prebiotic index of different bacterial groups in medium with digested umbu-cajá flour (UCF), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC; without fermentable substrate) at 0, 24 and 48 h of colonic fermentation.

| Bacterial groups                                       | Fermentation medium | Time of fermentation            |                                 |                                 |
|--------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                                                        |                     | 0 h                             | 24 h                            | 48 h                            |
| <i>Lactobacillus</i> spp./<br><i>Enterococcus</i> spp. | UCF                 | 0.44 $\pm$ 0.15% <sup>Ab</sup>  | 2.67 $\pm$ 0.21% <sup>Bc</sup>  | 7.39 $\pm$ 0.32% <sup>Cc</sup>  |
|                                                        | FOS                 | 0.42 $\pm$ 0.18% <sup>Ab</sup>  | 1.86 $\pm$ 0.18% <sup>Bb</sup>  | 6.51 $\pm$ 0.19% <sup>Cb</sup>  |
|                                                        | NC                  | 0.11 $\pm$ 0.05% <sup>Aa</sup>  | 0.20 $\pm$ 0.08% <sup>Aa</sup>  | 0.12 $\pm$ 0.03% <sup>Aa</sup>  |
| <i>Bifidobacterium</i> spp.                            | UCF                 | 1.90 $\pm$ 0.14% <sup>Ab</sup>  | 3.12 $\pm$ 0.26% <sup>Bb</sup>  | 8.81 $\pm$ 0.37% <sup>Cc</sup>  |
|                                                        | FOS                 | 1.33 $\pm$ 0.17% <sup>Aa</sup>  | 3.65 $\pm$ 0.22% <sup>Bc</sup>  | 5.15 $\pm$ 0.29% <sup>Cb</sup>  |
|                                                        | NC                  | 1.39 $\pm$ 0.20% <sup>Ca</sup>  | 0.11 $\pm$ 0.05% <sup>Aa</sup>  | 0.32 $\pm$ 0.10% <sup>Ba</sup>  |
| <i>Ruminococcus albus</i> /<br><i>R. flavefaciens</i>  | UCF                 | 1.21 $\pm$ 0.16% <sup>Cb</sup>  | 0.12 $\pm$ 0.04% <sup>Aa</sup>  | 0.47 $\pm$ 0.13% <sup>Bb</sup>  |
|                                                        | FOS                 | 0.42 $\pm$ 0.11% <sup>Aa</sup>  | 0.53 $\pm$ 0.12% <sup>Ab</sup>  | 0.64 $\pm$ 0.16% <sup>Ab</sup>  |
|                                                        | NC                  | 0.31 $\pm$ 0.06% <sup>Ba</sup>  | 0.10 $\pm$ 0.03% <sup>Aa</sup>  | 0.21 $\pm$ 0.08% <sup>ABa</sup> |
| <i>Bacteroides</i> spp./<br><i>Prevotella</i> spp.     | UCF                 | 10.54 $\pm$ 1.21% <sup>Cc</sup> | 6.21 $\pm$ 0.33% <sup>Ab</sup>  | 8.64 $\pm$ 0.42% <sup>Bc</sup>  |
|                                                        | FOS                 | 8.43 $\pm$ 0.55% <sup>Cb</sup>  | 5.45 $\pm$ 0.24% <sup>Ba</sup>  | 3.87 $\pm$ 0.18% <sup>Aa</sup>  |
|                                                        | NC                  | 6.99 $\pm$ 0.38% <sup>Ba</sup>  | 5.76 $\pm$ 0.31% <sup>Aa</sup>  | 6.42 $\pm$ 0.26% <sup>Bb</sup>  |
| <i>C. histolyticum</i>                                 | UCF                 | 2.77 $\pm$ 0.17% <sup>Aa</sup>  | 3.99 $\pm$ 0.28% <sup>Ba</sup>  | 6.09 $\pm$ 0.38% <sup>Cc</sup>  |
|                                                        | FOS                 | 5.77 $\pm$ 0.25% <sup>Cc</sup>  | 4.32 $\pm$ 0.20% <sup>Bab</sup> | 3.65 $\pm$ 0.24% <sup>Aa</sup>  |
|                                                        | NC                  | 3.88 $\pm$ 0.23% <sup>Ab</sup>  | 4.66 $\pm$ 0.31% <sup>Bb</sup>  | 4.21 $\pm$ 0.29% <sup>ABb</sup> |
| <i>E. rectale</i> /<br><i>C. coccoides</i>             | UCF                 | 5.77 $\pm$ 0.35% <sup>ABa</sup> | 5.87 $\pm$ 0.28% <sup>Bb</sup>  | 5.31 $\pm$ 0.17% <sup>Ab</sup>  |
|                                                        | FOS                 | 6.99 $\pm$ 0.42% <sup>Cb</sup>  | 5.09 $\pm$ 0.22% <sup>Ba</sup>  | 3.10 $\pm$ 0.14% <sup>Aa</sup>  |
|                                                        | NC                  | 6.43 $\pm$ 0.30% <sup>Ab</sup>  | 6.21 $\pm$ 0.34% <sup>Ab</sup>  | 6.64 $\pm$ 0.26% <sup>Ab</sup>  |

A – C: Different superscript capital letters in the same row for the same fermentation medium denote differences ( $p \leq 0.05$ ), based on Tukey's test; a-c: different superscript small letters in the same column at the same time interval and bacterial group denote difference ( $p \leq 0.05$ ), based on Tukey's test.

**Table - 5** - Prebiotic index (mean  $\pm$  estimated standard deviation; n = 3) calculated for medium with digested umbu-cajá flour (UCF), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC; without fermentable substrate) at 24 and 48 h of colonic fermentation.

| Fermentation medium | Prebiotic index                |                                |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                     | 24 h                           | 48 h                           |
| UCF                 | 5.37 $\pm$ 1.16 <sup>Ab</sup>  | 11.86 $\pm$ 1.47 <sup>Bb</sup> |
| FOS                 | 10.20 $\pm$ 1.28 <sup>Ac</sup> | 20.71 $\pm$ 1.66 <sup>Bc</sup> |
| NC                  | -0.91 $\pm$ 0.23 <sup>Aa</sup> | -1.13 $\pm$ 0.25 <sup>Ba</sup> |

A – B: Different superscript capital letters in the same row for the same fermentation media denote differences ( $p \leq 0.05$ ), based on Student's t test; a-c: different superscript small letters in the same column at the same time interval denote difference ( $p \leq 0.05$ ), based on Tukey's test.

**Table - 6** - pH values and contents of sugars, lactic acid and short chain fatty acid (SCFA; g L-1; average  $\pm$  estimated standard deviation; n = 3) in medium with digested umbu-cajá flour (UCF), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC; without fermentable substrate) at time 0, 24 and 48 h of colonic fermentation.

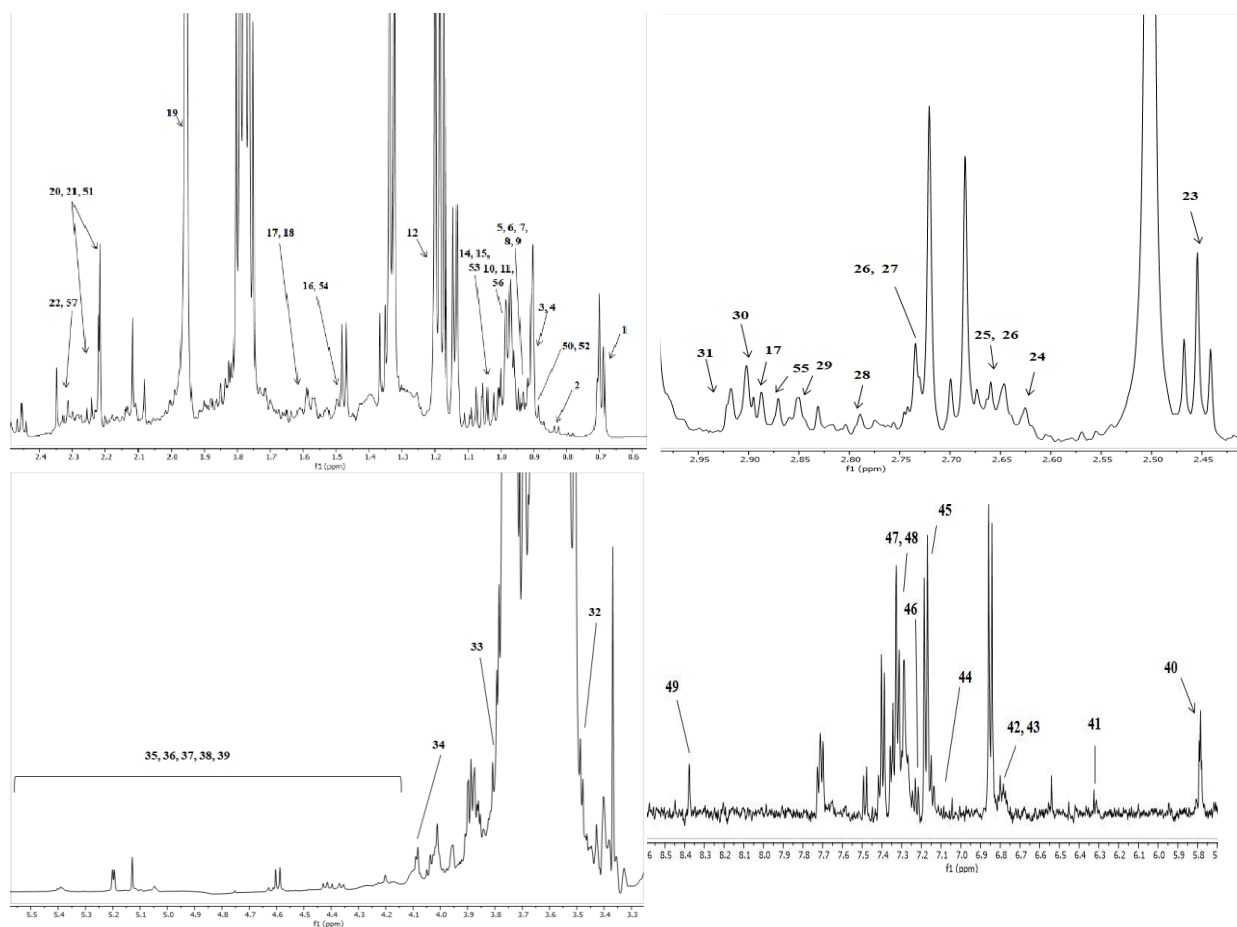
| Parameter      | Fermentation medium | Time of fermentation      |                            |                           |
|----------------|---------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                |                     | 0 h                       | 24 h                       | 48 h                      |
| pH values      |                     |                           |                            |                           |
| pH             | UCF                 | 6.78 ± 0.04 <sup>Aa</sup> | 4.11 ± 0.04 <sup>Ba</sup>  | 3.40 ± 0.04 <sup>Aa</sup> |
|                | FOS                 | 6.73 ± 0.02 <sup>Ab</sup> | 5.50 ± 0.02 <sup>Bb</sup>  | 4.81 ± 0.02 <sup>Cb</sup> |
|                | NC                  | 6.77 ± 0.02 <sup>Aa</sup> | 5.18 ± 0.02 <sup>Bb</sup>  | 4.77 ± 0.02 <sup>Cc</sup> |
| Sugars         |                     |                           |                            |                           |
| Glucose        | UCF                 | 0.42 ± 0.04 <sup>b</sup>  | <LOD                       | <LOD                      |
|                | FOS                 | <LOD                      | <LOD                       | <LOD                      |
|                | NC                  | 0.24 ± 0.02 <sup>Aa</sup> | 0.47 ± 0.03 <sup>B</sup>   | 1.98 ± 0.12 <sup>C</sup>  |
| Fructose       | UCF                 | 0.51 ± 0.03 <sup>b</sup>  | <LOD                       | <LOD                      |
|                | FOS                 | 9.17 ± 1.22 <sup>Bc</sup> | 9.03 ± 1.05 <sup>Bb</sup>  | 6.87 ± 0.52 <sup>Ab</sup> |
|                | NC                  | 0.39 ± 0.02 <sup>Ba</sup> | 0.21 ± 0.03 <sup>Aa</sup>  | 1.50 ± 0.24 <sup>Ca</sup> |
| Organic acids  |                     |                           |                            |                           |
| Lactic acid    | UCF                 | <LOD                      | 0.13 ± 0.01 <sup>Aa</sup>  | 0.18 ± 0.02 <sup>Ba</sup> |
|                | FOS                 | 1.12 ± 0.09 <sup>Ab</sup> | 1.36 ± 0.11 <sup>Bc</sup>  | 1.39 ± 0.13 <sup>Bc</sup> |
|                | NC                  | 0.30 ± 0.02 <sup>Aa</sup> | 0.31 ± 0.04 <sup>Ab</sup>  | 0.33 ± 0.02 <sup>Ab</sup> |
| Acetic acid    | UCF                 | 0.17 ± 0.02 <sup>Aa</sup> | 0.47 ± 0.05 <sup>Bb</sup>  | 0.63 ± 0.04 <sup>Cb</sup> |
|                | FOS                 | 0.26 ± 0.01 <sup>Ab</sup> | 0.32 ± 0.02 <sup>Ba</sup>  | 0.54 ± 0.03 <sup>Ca</sup> |
|                | NC                  | 0.23 ± 0.02 <sup>b</sup>  | <LOD                       | <LOD                      |
| Propionic acid | UCF                 | 0.44 ± 0.03 <sup>Ac</sup> | 0.55 ± 0.02 <sup>Ba</sup>  | 0.72 ± 0.04 <sup>Ca</sup> |
|                | FOS                 | 0.32 ± 0.02 <sup>Ab</sup> | 0.61 ± 0.03 <sup>Bb</sup>  | 0.74 ± 0.03 <sup>Ca</sup> |
|                | NC                  | 0.18 ± 0.01 <sup>a</sup>  | <LOD                       | <LOD                      |
| Butyric acid   | UCF                 | 0.43 ± 0.02 <sup>Ab</sup> | 0.47 ± 0.02 <sup>ABa</sup> | 0.53 ± 0.04 <sup>Ba</sup> |
|                | FOS                 | 0.48 ± 0.03 <sup>Ab</sup> | 0.54 ± 0.02 <sup>Bb</sup>  | 0.61 ± 0.03 <sup>Cb</sup> |
|                | NC                  | 0.21 ± 0.01 <sup>a</sup>  | <LOD                       | <LOD                      |

<LOD: below the limit of detection. A – C: Different superscript capital letters in the same row for the same fermentation medium denote differences ( $p \leq 0.05$ ), based on Tukey's test; a-c: different superscript small letters in the same column at a same time interval and measured parameter denote difference ( $p \leq 0.05$ ), based on Tukey's test.

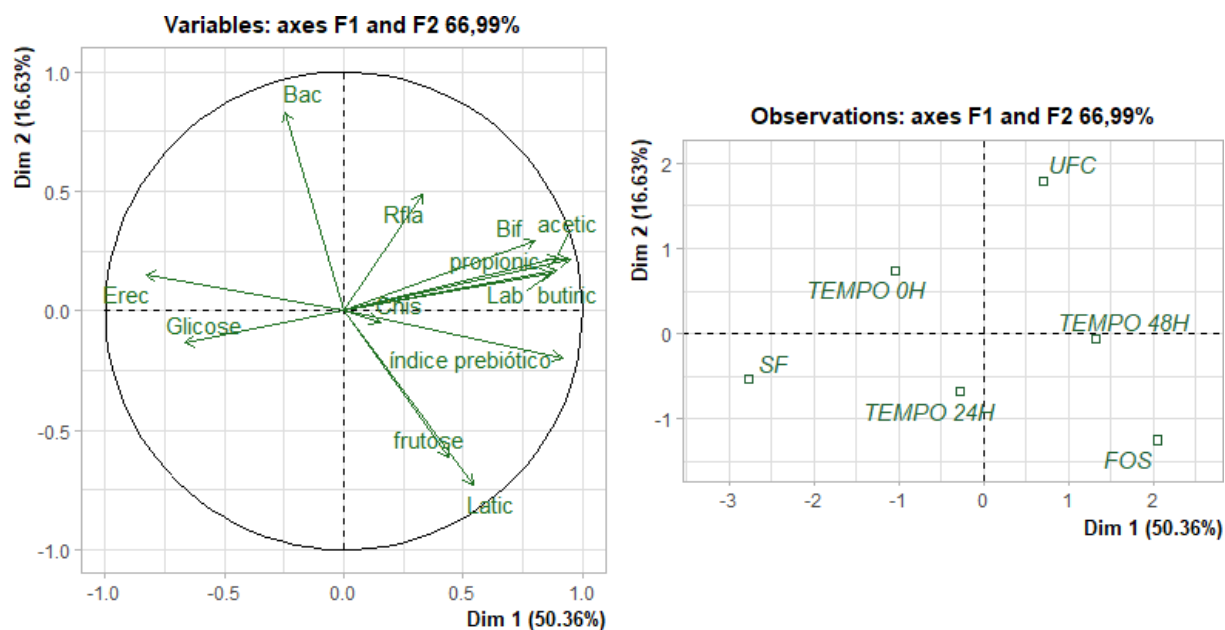
**Table - 7 -** Antioxidant activity of UCF at times 0, 24 and 48 of colonic fermentation.

| <b>Amostra</b>  | <b>DPPH</b><br><b>(% de varredura)</b> | <b>ABTS</b><br><b>(% de captação)</b> | <b>FRAP</b><br><b>(<math>\mu</math>M Eq. Trolox)</b> |
|-----------------|----------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>UCF 0 h</b>  | 40.16 $\pm$ 2.33 <sup>Ac</sup>         | 84.69 $\pm$ 1.11 <sup>Bc</sup>        | 327.95 $\pm$ 36.38 <sup>Cd</sup>                     |
| <b>UCF 24 h</b> | 16.27 $\pm$ 2.64 <sup>Aa</sup>         | 53.65 $\pm$ 1.20 <sup>Bb</sup>        | 78.76 $\pm$ 9.40 <sup>Bc</sup>                       |
| <b>UCF 48 h</b> | 22.96 $\pm$ 3.01 <sup>Ab</sup>         | 62.17 $\pm$ 2.04 <sup>Bc</sup>        | 136.22 $\pm$ 14.52 <sup>Cc</sup>                     |

UCF: Umbu-cajá flour. FOS: Fructooligosaccharides. Data represent the mean of triplicate determinations  $\pm$  estimated standard deviation. A – C: Different superscript capital letters in the same row for the same fermentation medium denote differences ( $p \leq 0.05$ ), based on Tukey's test; a-c: different superscript small letters in the same column at a same time interval and measured parameter denote difference ( $p \leq 0.05$ ), based on Tukey's test.



**Figure 2** - Representative  $^1\text{H}$  NMR spectra of media with UCF and FOS, at time 0 and 48h of in vitro colonic fermentation. 1: biliary salts; 2: methylbutyrate; 3: valerate; 4; 5: n-butyrate; 6: isoleucine; 7: valine; 8: propionate; 9: isobutyrate; 10: 3-methyl-2-oxoisovalerate; 11: 2-oxoisovalerate; 12: ethanol; 13: 3-hydroxybutyrate; 14: threonine; 15: lactate; 16: alanine; 17: lysine; 18: ornithine; 19: acetate; 20: proline; 21: glutamate; 22: 5-aminopentanoate; 23: succinate; 24: methylamine; 25: methionine; 26: citrate; 27: aspartate; 28: asparagine; 29: trimethylamine; 30: putrescine; 31: malonate; 32: glycine; 33: fructose; 34: dihydroxyacetone; 35:  $\alpha$ -Xylose; 36:  $\beta$ -Xylose; 37:  $\beta$ -Glucose; 38:  $\alpha$ -Glucose; 39: D-galactose; 40: UDP-glucuronate; 41: 3 hydroxyphenylacetate; 42: p-cresol; 43: tyrosine; 44: 5-aminosalicylate; 45: phenylalanine; 46: uracil; 47: N-acetyl-5-aminosalicylate; 48: phenylacetate; 49: formate; 50: caprylate; 51: isocaproate; 52: isovalerate; 53: 3-Hydroxyisovalerate; 54: Total lipids; 55: gamma-aminobutyric acid (GABA); 56: Ketoisovalerate and 57: acetone.



**Figure 3** - Principal component analysis (PCA) variables with relative abundance of hybridized bacterial groups, short-chain fatty acids, and sugars analyzed during *in vitro* colonic fermentation in UCF, FOS and NC treatments at times zero, 24 and 48 h. Lab: *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp.; Bif: *Bifidobacterium* spp.; Rfla: *Ruminococcus albus*/R. *flavefaciens*; Bac: *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp.; Chis: *Clostridium histolyticum* and Erec: *Eubacterium rectal*/*Clostridium coccoides*.

**S1.** Identification of metabolites in 0h and 48h of *in vitro* colonic fermentation analyzed by <sup>1</sup>H-NMR.

| Number | Chemical constituents     | FOS |     | UMBU |     |
|--------|---------------------------|-----|-----|------|-----|
|        |                           | 0h  | 48h | 0h   | 48h |
| 1      | biliary salts             | x   | x   | x    | x   |
| 2      | 2-methylbutyrate          | x   | x   | x    | x   |
| 3      | valerate                  | x   | x   | x    | x   |
| 4      | n-butyrate                | x   | x   | x    | x   |
| 5      | leucine                   | x   | x   | x    | x   |
| 6      | isoleucine                | x   | x   | x    | x   |
| 7      | valine                    | x   | x   | x    | x   |
| 8      | propionate/propionic acid | x   | x   | x    | x   |
| 9      | isobutyrate/butyric acid  | x   | x   | x    | x   |
| 10     | 3-methyl-2-oxoisovalerate | x   | x   | x    | x   |
| 11     | 2-oxoisovalerate          | x   | x   | x    | x   |
| 12     | ethanol                   | x   | x   | x    | x   |
| 13     | 3-hydroxybutyrate         | x   | x   | x    | x   |
| 14     | threonine                 | x   | x   | x    | x   |
| 15     | lactate/lactic acid       | x   | x   | x    | x   |
| 16     | alanine                   | x   | x   | x    | x   |
| 17     | lysine                    | x   | x   | x    | x   |
| 18     | ornithine                 | x   | x   | x    | x   |
| 19     | acetate/acetic acid       | x   | x   | x    | x   |
| 20     | proline                   | x   | x   | x    |     |
| 21     | glutamate                 | x   | x   | x    | x   |
| 22     | 5-aminopentanoate         | x   | x   |      | x   |
| 23     | succinate/succinic acid   | x   | x   | x    | x   |
| 24     | methylamine               | x   | x   | x    |     |
| 25     | methionine                |     |     | x    | x   |
| 26     | citrate/citric acid       |     |     | x    |     |
| 27     | aspartate                 |     |     | x    |     |
| 28     | asparagine                |     |     | x    | x   |
| 29     | trimethylamine            | x   | x   | x    | x   |
| 30     | putrescine                | x   | x   | x    | x   |



|    |                                |   |   |   |   |
|----|--------------------------------|---|---|---|---|
| 31 | malonate                       | x | x | x | x |
| 32 | glycine                        | x | x | x | x |
| 33 | fructose                       | x | x | x | x |
| 34 | dihydroxyacetone               | x | x | x |   |
| 35 | $\alpha$ -Xylose               |   |   | x |   |
| 36 | $\beta$ -Xylose                |   |   | x |   |
| 37 | $\beta$ -Glucose               |   |   | x |   |
| 38 | $\alpha$ -Glucose              |   |   | x |   |
| 39 | D-galactose                    |   |   | x |   |
| 40 | UDP-glucuronate                |   |   | x |   |
| 41 | 3-hydroxyphenylacetate         |   |   |   | x |
| 42 | p-cresol                       | x | x | x | x |
| 43 | tyrosine                       |   | x | x | x |
| 44 | 5-aminosalicylate              | x | x | x | x |
| 45 | phenylalanine                  |   | x | x | x |
| 46 | uracil                         |   | x | x |   |
| 47 | N-acetyl-5-aminosalicylate     | x | x | x | x |
| 48 | phenylacetate                  | x | x | x | x |
| 49 | formate/formic acid            | x | x | x | x |
| 50 | caprylate                      | x | x | x |   |
| 51 | isocaproate                    | x | x | x | x |
| 52 | isovalerate                    | x | x | x |   |
| 53 | 3-Hydroxyisovalerate           | x | x | x |   |
| 54 | Total lipids                   | x | x | x | x |
| 55 | gamma-aminobutyric acid (GABA) | x | x | x | x |
| 56 | Ketoisovalerate                | x | x | x | x |
| 57 | acetone                        | x | x |   | x |

## **ANEXOS**

## ANEXO A- COMPROVANTE DE CADASTRO NO SISGEN



### Ministério do Meio Ambiente CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

#### Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AE32BEB

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AE32BEB**  
Usuário: **Jordana Nunes de Oliveira**  
CPF/CNPJ:  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

#### Espécie

**spondias spp**

#### Fonte do CTA

**CTA de origem não identificável**

Título da Atividade: **Desenvolvimento de farinha de umbu-cajá**

#### Equipe

**Jordana Nunes de Oliveira** **INDEPENDENTE**

Data do Cadastro: **02/06/2023 13:23:38**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **13:24 de 02/06/2023**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**

## ANEXO B - CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** DESENVOLVIMENTO DE FARINHA DO SUBPRODUTO DO PROCESSAMENTO DO UMBU-CAJÁ (*Spondias spp.*) E SEU POTENCIAL EFEITO PREBIÓTICO

**Pesquisador:** JORDANA NUNES DE OLIVEIRA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 70755823.0.0000.5546

**Instituição Proponente:** PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.419.531

#### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo "Informações Básicas da Pesquisa" (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_2076630.pdf) e do "Projeto Detalhado / Brochura Investigador" (Projeto\_Detalhado\_Brochura\_Modificado.pdf), postados em 11/09/2023.

#### Introdução,

O Brasil apresenta uma extensão territorial de 8.547.403 km<sup>2</sup>, o que o faz ocupar o 5º lugar dos maiores países do planeta (IBGE, 2022). Com toda essa área e apresentando grandes biomas, o país possui uma grande variedade de frutas nativas que vêm apresentando crescente utilização agroindustrial. Dentre essas frutas pertencente à família Anacardiaceae, têm-se o umbu-cajá (*Spondias spp.*), nativo e mais comercializado no Nordeste brasileiro, com demanda crescente de produção, tem sua utilização sujeita à variação sazonal (GONDIM et al., 2013; ARAÚJO et al., 2019). O crescimento da população mundial e da demanda por produtos saudáveis, aumentou de maneira significativa nas últimas décadas o processamento de frutas (SAGAR et al., 2018). Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), entre um quarto e um terço dos alimentos produzidos por ano para consumo humano é perdido ou é desperdiçado, o equivalente a cerca de 1.3 bilhão de toneladas de alimentos (FAO, 2014). Deste quantitativo, 60 % de perdas e desperdícios são de produtos hortícolas, e a indústria processadora

**Endereço:** Rua Cláudio Batista s/nº  
**Bairro:** Sanatório  
**UF:** SE  
**Município:** ARACAJU  
**Telefone:** (79)3194-7208  
**CEP:** 49.060-110  
**E-mail:** cep@academico.ufs.br



de polpa de frutas e sucos gera cerca de 40 % dos resíduos agroindustriais (SAGAR et al., 2018; JÚNIOR et al., 2006). Durante o processamento de frutas são gerados resíduos que na maioria das vezes são descartados de maneira inadequada, podendo ocasionar problemas ambientais. Esses resíduos descartados são compostos de sementes trituradas, cascas e uma pequena quantidade de polpa amassada, considerados boas fontes de carboidratos fermentáveis, que, quando submetidos a processos e tecnologias adequadas podem ser utilizados na elaboração de produtos potencialmente prebióticos (ANDRADE et al., 2020). O interesse em subprodutos com fontes de fibras aumentou, uma vez que a literatura demonstrou o seu efeito modulador positivo na microbiota intestinal. A melhora na saúde intestinal a partir do consumo de subprodutos de frutas como acerola, laranja e casca de limão demonstram resultados que apoiam sua utilização como candidatos com potencial prebióticos (MÍGUEZ, 2020; VIEIRA, 2017). Nesse sentido, prebiótico é definido como um grupo de carboidratos que não são digeridos pelo ser humano, contudo, fornecem substrato que impulsiona o desenvolvimento de microrganismos, da microbiota intestinal e beneficiam o organismo que os abrigam (KHANGWAL; PATYOOSH, 2019). Para analisar os efeitos dos alimentos na microbiota intestinal em humanos, os testes em modelos in vivo são utilizados, porém são onerosos e podem demandar maior tempo para conclusão. Em contrapartida, o modelo in vitro mostra-se uma alternativa viável e de rápida execução, podendo configurar uma etapa prévia aos testes in vivo (HAIHUA, 2021). Considerando a composição nutricional dos frutos de umbu-cajá e o seu potencial efeito benéfico à saúde, a sua elevada produção na região Nordeste do Brasil e o caráter sazonal da sua frutificação que pode restringir a utilização dos frutos, é importante demonstrar formas de aproveitamento de resíduos gerados na indústria processadora de frutas para o desenvolvimento de novas fontes de alimentos. Alternativas que permitam o uso dos resíduos da agroindústria processadora de umbu-cajá constituem-se em uma estratégia interessante para prolongar a utilização do fruto durante o ano, além de contribuírem para minimizar o impacto ambiental associado ao descarte destes resíduos. Assim, o presente estudo tem como objetivo desenvolver e caracterizar uma farinha a partir do subproduto do processamento do umbu-cajá, e avaliar o seu potencial prebiótico em sistema de fermentação in vitro.

#### Hipótese,

Espera-se que a farinha de umbu-cajá consiga demonstrar índices prebióticos positivos após 0, 24 e 48 horas de fermentação. Diminuição do pH ao longo do tempo observado e consumo de açúcares e produção de ácidos orgânicos e compostos fenólicos.

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº  
Bairro: Sanatório CEP: 49.060-110  
UF: SE Município: ARACAJU  
Telefone: (79)3194-7208 E-mail: cep@academico.ufs.br



#### Metodologia Proposta,

#### OBTENÇÃO DO RESÍDUO:

Será coletado na indústria processadora de polpa de frutas - POMAR Polpa de Frutas LTDA, localizada no bairro Inácio Barbosa, na cidade de Aracaju – SE. Posteriormente, armazenado em embalagens de polipropileno, acondicionado em caixas isotérmicas e transportado até o Laboratório de Bromatologia (LBA) será acondicionado em freezer a -18 °C. Após o descongelamento dos resíduos, serão pesados, distribuídos em bandejas e colocados em estufa com circulação de ar forçada (Marconi – MA 035) a 60 °C por aproximadamente 7h30min a fim de alcançar um teor de umidade <15%. Após a secagem o material será triturado em processador doméstico (baixa velocidade, 10 minutos (Processador Nutri Ninja - Auto-IQ), peneirados com peneiras de 0,25 mm (60 mesh) para obter um pó. A farinha será embalada em sacos de polipropileno estéreis selados à vácuo e ficaram armazenadas em local fresco e seco por até 6 meses, sob temperatura ambiente e proteção da luz.

#### DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E PARÂMETROS FÍSICO QUÍMICOS

O resíduo e a farinha produzida serão submetidos às análises físico-químicas quanto ao teor de umidade por secagem direta em estufa estabilizada a 105 °C até obtenção de peso constante; cinzas por carbonização seguida de incineração em forno mufla estabilizado a 550 °C; pH por leitura em potenciômetro; acidez; para determinação de proteína pelo método de Kjeldahl, cujo fator 5,75 foi utilizado; determinação de gordura pela extração de lipídeos ligados às proteínas e carboidratos através da utilização de solventes polares, todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados correspondem a média  $\pm$  desvio padrão. (IAL, 2008; AOAC, 2016). Os conteúdos de fibras dietéticas serão determinados usando um kit de ensaio enzimático-gravimétrico (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Extratos metanólicos da farinha será preparados para determinação dos compostos fenólicos. Extrato aquoso da farinha será preparado para determinar as quantidades de açúcares (frutose, glicose e maltose), ácidos orgânicos (acético, butírico e propiônico) oligossacarídeos (rafinose e FOS: kestose e nistose), compostos fenólicos.

#### DIGESTÃO GASTROINTESTINAL IN VITRO

A farinha de umbu cajá será submetida a uma digestão in vitro a fim de serem transformadas em materiais com características semelhantes àqueles que alcançam o cólon

humano. Inicialmente, 10 g da farinha será misturada com 50mL de água destilada esterilizada em frascos de vidro com tampa e homogeneizadas manualmente por 5 min. A mistura de  $\alpha$ -amilase (3.33 mg) e  $\text{CaCl}_2$  1 mM (1.04 mL, pH 7) será adicionada a solução das farinhas e mantidas a 37 °C

Endereço: Rua Cláudio Batista s/n°

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cep@academico.ufs.br

por 30 min sob agitação de 130 rpm. Posteriormente, o pH da mistura será ajustado para 2 – 2.5 usando HCl 1 M, adicionado de pepsina (0,45 g em 0,1 M HCl, 4,16 mL) e mantida a 37 °C por 2 horas sob agitação de 130rpm. Bile (0,58 g) e pancreatina (0,93 g) misturados com 20,8 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M serão incorporados a mistura. O pH será ajustado para 6,5 – 7 usando NaHCO<sub>3</sub> 1 M e mantidos a 37°C por 2 horas sob agitação de 45 rpm. O material resultante do processo digestivo será submetido à diálise em membrana de celulose regenerada de 1 kDa de peso molecular (Spectra/Por® 6, Spectrum Europe BV, Breda, Holanda), previamente hidratada por 30 min em água destilada aquecida (60 °C). As membranas contendo o material serão imersas em NaCl 0,01 M e incubadas a 5 ± 0,5 °C, para remover produtos da digestão de baixo peso molecular. Após 15 horas, os fluidos da diálise serão trocados e a diálise continuará mais 2 horas. As amostras dializadas congeladas a -80 °C por 24 horas, liofilizadas (temperatura -55 ± 2 °C, pressão do vácuo <138 µHg, velocidade 1 mm/h) por 14 - 16 horas usando liofilizador de bancada (modelo L -101, LIOTOP, São Carlos, Brasil) e armazenadas sob refrigeração serão mantidas em sacos de polietileno hermeticamente fechados por até 4 semanas. Por fim, preparação das amostras fecais e do meio de fermentação para Enumeração bacteriana.

**Critérios de inclusão,**

- Referente a idade: Adultos com faixa etária entre 22 e 28 anos
- Ambos os sexos: sendo três homens e três mulheres
- Sem antecedentes de transtornos metabólicos e/ou gastrointestinal e
- Residentes na cidade de Aracaju-SE.
- Dieta onívora

**Critérios de exclusão,**

- Residentes fora da cidade de Aracaju-SE
- Diarreia aguda recente e/ou distúrbios gastrointestinais crônicos.
- Voluntários consumindo alimentos probióticos ou prebióticos concentrados, antibióticos ou qualquer outro medicamento de uso controlado por, pelo menos, seis meses antes da coleta.

**Metodologia de Análise de Dados\*.**

Os dados das análises físico químicas serão tabulados com auxílio de planilha eletrônica e serão calculadas as médias ± desvio padrão. Será realizada a análise de variância (ANOVA) e,

Endereço: Rua Cláudio Batista s/n°

Bairro: Sanatório

UF: SE

Telefone: (79)3194-7208

Município: ARACAJU

CEP: 49.060-110

E-mail: cep@academico.ufs.br





posteriormente, será aplicado o teste t pareado de Student ( $p < 0,05$ ) para a comparação entre as médias nas análises do resíduo e da farinha correspondente. Os ensaios de fermentação utilizando inóculo fecal serão realizados em duplicata. Os resultados de todos os ensaios serão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados serão submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para normalidade e para o teste t de Student ou análises de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey, considerando  $p < 0,05$ . Para o tratamento estatístico, será utilizado o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avaliar o potencial prebiótico da farinha do subproduto de umbu-cajá utilizando sistema de fermentação in vitro (com inóculo fecal humano).

**Objetivo Secundário:**

Elaborar uma farinha a partir do subproduto agroindustrial de umbu-cajá;

- Determinar as características físico-químicas do subproduto e da farinha de umbu-cajá
- Determinar a composição nutricional da farinha de umbu-cajá;
- Determinar o potencial prebiótico da farinha produzida a partir do subproduto de umbu-cajá em sistema de fermentação in vitro.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Informamos ainda que essa pesquisa oferece risco mínimo previsível para sua saúde, relacionados ao contrangimento quanto ao procedimento. Para minimizar os riscos, todos os dados e informações fornecidos por você serão tratados de forma anônima/sigilosa, não permitindo a sua identificação durante a pesquisa e/ou quando da publicação dos resultados em meios científicos, assim como serão orientados quanto a coleta e manuseio das amostras fecais de forma segura e asséptica. Não haverá necessidade de gasto com deslocamento e/ou alimentação.

**Benefícios:**

Como benefício, a realização da pesquisa possibilitará a identificação dos efeitos benéficos promotores de saúde a partir do consumo da farinha de umbu-cajá gerando informações de interesse para elaboração de novos ingredientes funcionais, aspectos de corrente interesse ao

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

CEP: 49.060-110

E-mail: cep@academico.ufs.br





campo científico, a indústria alimentícia e a comunidade que busca o consumo de uma alimentação mais saudável.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O umbu-cajá (*Spondias spp.*) é uma fruta tropical típica do nordeste brasileiro, considerado um híbrido natural entre o umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) e a cajazeira (*Spondias lutea*). O subproduto proveniente do processamento industrial de umbu-cajá possui elevado valor nutricional, devido a quantidade de fibras alimentares, compostos fenólicos e vitaminas, que juntos podem apresentar potencial prebiótico. Assim, a utilização do resíduo de umbu-cajá pode, além de contribuir para a sustentabilidade do sistema alimentar, prolongando a utilização dos seus frutos em períodos fora das safras, gerar subproduto com potencial prebiótico. O objetivo deste estudo é de desenvolver uma farinha a partir do subproduto do processamento do umbu-cajá (SUC) e avaliar o potencial efeito prebiótico em sistema de fermentação *in vitro*. Inicialmente será realizada a secagem do SUC seguida da caracterização da composição nutricional e parâmetros físico-químicos. Em seguida, a farinha do SUC será submetida à digestão gastrointestinal *in vitro* visando avaliar a mudança na microbiota fecal humana usando a técnica de fluorescência de hibridização *in situ* acoplada com citometria de fluxo multiparamétrica durante as 48 horas da fermentação, determinando ao final do processo os índices prebióticos. A atividade metabólica da microbiota colônica também será monitorada (pH, consumo de açúcares e produção de ácidos orgânicos) nos tempos 0, 24, e 48h de fermentação colônica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações"

**Recomendações:**

- As pendências deverão ser respondidas em formulário próprio, disponível em [cep.ufs.br/modelos](http://cep.ufs.br/modelos) de termos/carta resposta às pendências.
- Solicita-se que cada resposta referente as pendências elencadas sejam transcritas na carta resposta para apreciação ética do Protocolo de Pesquisa.
- As alterações deverão ser apresentadas em destaque (com outra cor no texto do documento).
- As alterações realizadas no documento Informações Básicas do Projeto deverão ser realizadas também no documento Projeto Detalhado / Brochura Investigador. Salienta-se que as informações destes documentos devem estar em consonância.
- O pesquisador deverá anexar os arquivos na Plataforma Brasil de forma permitir as opções

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: [cep@academico.ufs.br](mailto:cep@academico.ufs.br)



Continuação do Parecer: 6.419.531

"COPIAR" e "COLAR", exceto as cartas e termos que contenham assinaturas e são inseridas somente em arquivos em pdf, após serem escaneados.

- Todos os arquivos de documentos submetidos junto ao protocolo de pesquisa deverão apresentar boa resolução e legibilidade.

- Tendo em vista que as atividades presenciais das instituições já retomaram, o pesquisador deverá postar todos os documentos de apresentação obrigatória e que necessitam de assinaturas, com assinatura física ou digitais. Postagem de documentos com assinatura digitalizada será considerada pendências.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após análise ética, de acordo com a Resolução 486/12, Resolução 510/16 e a Norma Operacional 01/2003, o novo Protocolo de Pesquisa apresenta resposta para pendências e inadequações elencadas no PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP Nº 6.216.385, listadas abaixo:

**1ª PENDÊNCIA:** Quanto ao documento Informações Básicas do Projeto, referente ao arquivo PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_2076630.pdf, postado em 21/06/2023.

Pesquisas já iniciadas não podem ser analisadas pelos CEPs. Solicita-se uma declaração do Pesquisador de que a pesquisa ainda não iniciou e só será iniciada depois da tramitação e aprovação no CEP. Também precisa ser alterado o Cronograma.

ATENDIDA

No texto analisado, não ficou claro como será realizado o processo de seleção e convocação dos potenciais participantes para o projeto. Solicitamos, portanto, que forneça informações adicionais sobre a estratégia de recrutamento a ser adotada, os locais ou instituições onde a coleta de dados ocorrerá, bem como as medidas que serão tomadas para assegurar a representatividade e a diversidade da amostra. Detalhes claros sobre o recrutamento são essenciais para garantir a transparência e a adequação ética de sua pesquisa.

ATENDIDA

|                                    |                              |
|------------------------------------|------------------------------|
| Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº | CEP: 49.060-110              |
| Bairro: Sanatório                  |                              |
| UF: SE                             | Município: ARACAJU           |
| Telefone: (79)3194-7208            | E-mail: cep@academico.ufs.br |



Continuação do Parecer: 6.419.531

**2ª PENDÊNCIA:** Quanto ao documento Projeto Detalhado / Brochura Investigador, referente ao arquivo "Plataforma\_Brasil.pdf", postado na Plataforma Brasil em 23/02/2023 Em conformidade com a Norma Operacional 001/2003 do CNS o Projeto Brochura Deve apresentar os itens elencados: tema, objetivo, relevância social, local de realização da pesquisa, população a ser estudada, garantias éticas aos participantes, método a ser utilizado, cronograma, orçamento, critérios de inclusão e exclusão, riscos e benefícios, critérios de encerramento ou suspensão, resultados e divulgação. Solicita-se inserir os itens não contemplados neste documento.

ATENDIDA

**3ª PENDÊNCIA:** Quanto ao documento TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência referente ao arquivo "TCLE.pdf" postado na Plataforma Brasil em 08/04/2022.

- Omite informação acerca do ressarcimento: A Resolução CNS N° 466 de 2012, item II.21, define ressarcimento como "compensação material, exclusivamente de despesas do participante e seus acompanhantes, quando necessário, tais como transporte e alimentação". Ainda, o item IV.3.g orienta que o TCLE deve conter obrigatoriamente "explicitação da garantia de ressarcimento e como serão cobertas as despesas tidas pelos participantes da pesquisa e dela decorrentes". Solicita-se Adequação

ATENDIDA

- Omite informação acerca da assistência gratuita, e quem se responsabilizará por ela: A Resolução CNS N° 466 de 2012 define dano associado (ou decorrente) da pesquisa o "agravo imediato ou posterior, direto ou indireto, ao indivíduo ou à coletividade, decorrente da pesquisa" (item II.6). Ainda no item V.6, a citada Resolução define que "O pesquisador, o patrocinador e as instituições e/ou organizações envolvidas nas diferentes fases da pesquisa devem proporcionar assistência imediata, nos termos do item II.3, bem como responsabilizarem-se pela assistência integral aos participantes da pesquisa no que se refere às complicações e danos decorrentes da pesquisa". Solicita-se Adequação

ATENDIDA

Endereço: Rua Cláudio Batista s/n°

Bairro: Sanatório

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

CEP: 49.060-110

E-mail: cep@academico.ufs.br



- Omite informação acerca da indenização: A Resolução CNS N° 466 de 2012 (item IV.3) define que "os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, do patrocinador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa" (item V.7). Solicita-se Adequação

ATENDIDA

- Omite informação acerca do direito a ter uma via do TCLE: o item IV.3.f da Resolução CNS N° 466 de 2012 afirma de forma clara que o TCLE deverá conter a "garantia de que o participante da pesquisa receberá uma via do termo de Consentimento Livre e Esclarecido". Solicita-se Adequação.

ATENDIDA

- Utiliza a palavra "CÓPIA": Não raramente, o pesquisador declara que uma "CÓPIA" do TCLE ficará com o participante de pesquisa e outra com o pesquisador. Entende-se que os termos "VIA" e "CÓPIA", mesmo que similares do ponto de vista semântico, não têm o mesmo significado prático, já que o primeiro compreende o documento original, enquanto o segundo pode não ser fiel ao documento primário. Desta forma, não se deve utilizar o termo "CÓPIA" para designar o documento, mas "VIA". Solicita-se Adequação.

ATENDIDA

- Não assegura que todas as páginas serão rubricadas: Muitas vezes, o pesquisador assegura que o participante receberá uma via do TCLE, mas não informa que todas as páginas serão rubricadas. A Resolução CNS N° 466 de 2012 afirma no item IV.5.d que o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s) (...)". Solicita-se Adequação

Endereço: Rua Cláudio Batista s/n°

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cep@academico.ufs.br



Continuação do Parecer: 6.419.531

ATENDIDA

- O pesquisador deverá paginar o TCLE (caso possua mais de uma página ao ser impresso do site). Solicitase que seja inserida de forma a indicar, também, o número total de páginas, por exemplo: páginas 1/2 e 2/2. Solicita-se Adequação

ATENDIDA

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do Protocolo de Pesquisa.

**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_DO_PROJETO_2076630.pdf | 11/09/2023<br>21:13:56 |                           | Aceito   |
| Outros                                                    | Carta_resposta.pdf                            | 11/09/2023<br>21:02:56 | JORDANA NUNES DE OLIVEIRA | Aceito   |
| Declaração de Pesquisadores                               | DECLARACAO_NAO_FOI_INICIADAassinado .pdf      | 11/09/2023<br>21:01:48 | JORDANA NUNES DE OLIVEIRA | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_modificado.pdf                           | 11/09/2023<br>21:01:21 | JORDANA NUNES DE OLIVEIRA | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Projeto_Detalhado_Brochura_Modificado.pdf     | 11/09/2023<br>21:00:33 | JORDANA NUNES DE OLIVEIRA | Aceito   |
| Folha de Rosto                                            | Folha_de_rosto_modificado.pdf                 | 11/09/2023<br>20:59:56 | JORDANA NUNES DE OLIVEIRA | Aceito   |
| Outros                                                    | Termo_compromisso.pdf                         | 21/08/2023<br>11:36:25 | JORDANA NUNES DE OLIVEIRA | Aceito   |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                | TERMO_DE_INFRAESTRUTURA.pdf                   | 20/08/2023<br>14:52:15 | JORDANA NUNES DE OLIVEIRA | Aceito   |

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cep@academico.ufs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SERGIPE - UFS



Continuação do Parecer: 5.419.531

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ARACAJU, 10 de Outubro de 2023

---

**Assinado por:**

**ANA BEATRIZ GARCIA COSTA RODRIGUES**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Cláudio Batista s/nº

**Bairro:** Sanatório

**CEP:** 49.060-110

**UF:** SE

**Município:** ARACAJU

**Telefone:** (79)3194-7208

**E-mail:** cep@academico.ufs.br