UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

SUELLEN SILVA DE ALMEIDA

EFEITO DO BIOPROCESSAMENTO ENZIMÁTICO DE PÃES SOBRE O METABOLISMO DE SEUS COMPOSTOS FENÓLICOS EM INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS E COM OBESIDADE

Rio de Janeiro

2025

Suellen Silva de Almeida

EFEITO DO BIOPROCESSAMENTO ENZIMÁTICO DE PÃES SOBRE O METABOLISMO DE SEUS COMPOSTOS FENÓLICOS EM INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS E COM OBESIDADE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciência.

Orientadores:

Prof. Dr. Daniel Perrone Moreira

Profª. Drª. Mariana Costa Monteiro

Profª. Drª. Nathália Moura Nunes

Rio de Janeiro

2025

CIP - Catalogação na Publicação

A447e

Almeida , Suellen Silva de
Efeito do bioprocessamento enzimático de pães sobre o metabolismo de seus compostos fenólicos em indivíduos eutróficos e com obesidade / Suellen Silva de Almeida . -- Rio de Janeiro, 2025.
133 f.

Orientador: Daniel Moreira Perrone .
Coorientadora: Mariana Costa Monteiro .
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, 2025.

1. compostos fenólicos . 2. metabolismo . I. Perrone , Daniel Moreira, orient. II. Monteiro , Mariana Costa , coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Suellen Silva de Almeida

EFEITO DO BIOPROCESSAMENTO ENZIMÁTICO DE PÃES SOBRE O METABOLISMO DE SEUS COMPOSTOS FENÓLICOS EM INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS E COM OBESIDADE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciência.

Aprovada em: 26/05/2025

Dr. Daniel Perrone Moreira - IQ/UFRJ

Dra. Priscilla Filomena Amaral - EQ/UFRJ

Dra. Eliane Fialho de Oliveira – INJC/UFRJ

Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto - USP

Dra. Ayla Sant'Ana da Silva - INT

In memoriam

Dedico este trabalho ao meu tio-avô Sissi que nos deixou há cerca de um ano. Ele acompanhou com entusiasmo a minha trajetória acadêmica e fez questão de estar presente na minha defesa de mestrado, transbordando orgulho e alegria. Tenho certeza de que, se estivesse aqui, estaria novamente ao meu lado, emocionado e imensamente orgulhoso por ver sua sobrinha-neta se tornar doutora.

AGRADECIMENTOS

Meu doutorado foi muito mais longo do que eu imaginava ou gostaria. Durante esse período, o mundo precisou se adaptar à uma situação inesperada e, assim como todos, também precisei parar, me reinventar e recomeçar. Não foi fácil, mas foi possível graças às boas pessoas que estiveram ao meu lado durante esse processo

Agradeço profundamente aos meus pais, que, com amor e cuidado infinitos, fizeram da minha vida uma jornada tranquila e feliz. Obrigada por todos os sacrifícios feitos em nome da minha educação e por sempre incentivarem meus desejos e sonhos. Não tenho dúvidas de que a confiança de vocês no meu potencial, o apoio constante e a torcida incondicional foram o motor que me impulsionou nos momentos mais difíceis. Este diploma é, verdadeiramente, de vocês.

Agradeço à minha irmã, minha companheira de vida. Saber que posso contar com você para dividir medos, alegrias e fofocas torna tudo mais leve. Obrigada por estar sempre comigo, ontem, hoje e para sempre.

Agradeço ao meu cunhado, um quase irmão que sempre acredita no meu potencial.

Agradeço ao meu namorado. Sua confiança no meu potencial e sua ajuda e compreensão principalmente nessa reta final foram essenciais para que este momento se concretizasse.

Agradeço aos amigos que fiz no LBNA. A presença de vocês foi muito importante nessa trajetória. Obrigada por cada risada, pela parceria nos longos dias de trabalho, pelos conselhos, pelos momentos de desabafo e pela torcida nas minhas conquistas.

Agradeço ao Genilton, amigo de quase duas décadas, companheiro desde a iniciação científica. Você foi meu espelho para entrar na pós-graduação e, sem dúvida, uma presença essencial para eu conseguir sair dela.

Agradeço à Ana Beatriz. Até hoje não entendo como duas pessoas tão diferentes podem se entender tão bem. Obrigada por compartilhar comigo todas as angústias e alegrias desses anos.

Agradeço aos meus alunos de iniciação científica Rodrigo Costa e Rafa Carvalho. Foi um privilégio enorme orientar vocês. O esforço e dedicação de ambos foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese. Ver vocês voando para longe me encheu de orgulho.

Agradeço aos participantes do estudo clínico. O avanço da ciência só é possível graças a pessoas generosas e comprometidas como vocês.

Agradeço aos meus orientadores. Muito obrigada por terem tido a sensibilidade de entender que em alguns momentos ao longo desses anos eu precisei de tempo e espaço. .

Obrigada por me incentivarem a ir além, por torcerem por mim e por me acolherem com respeito e generosidade. Esses anos de convivência me fizeram admirar cada um dos três cada vez mais. Mais do que ciência vocês me ensinaram o valor da amizade. Presenciar o carinho e o respeito com que vocês se tratam é inspirador.

Agradeço aos membros da Banca Examinadora, por aceitarem o convite e por contribuírem com este trabalho.

Por fim, agradeço a Deus.

“Aprendam o que vocês quiserem aprender. Se formem no que vocês quiserem se formar. A única coisa que é importante na vida é vocês serem generosos com aqueles que não tiveram as chances que vocês tiveram. O Brasil precisa disso.”

Luís Inácio Lula da Silva, Paris, 2020

RESUMO

A biodisponibilidade de compostos fenólicos pode ser limitada pela forma como se apresentam na matriz alimentar e pela elevada variabilidade interindividual no metabolismo, influenciada por diversos fatores, dentre os quais pode-se destacar a composição da microbiota intestinal, a qual difere entre indivíduos eutróficos e com obesidade. Estratégias como tratamentos hidrotérmicos e bioprocessamento enzimático, aplicados isoladamente ou de forma combinada, têm se mostrado promissoras para a liberação de compostos fenólicos da fração insolúvel, impactando positivamente a bioacessibilidade e biodisponibilidade desses compostos. Nesta tese, inicialmente avaliou-se a cinética de produção das enzimas amilase, peptidase, xilanase e feruloil-esterase por fermentação em estado sólido de coprodutos agroindustriais (farelo de cacau, farelo de trigo e resíduo de malte cervejeiro), visando sua aplicação no bioprocessamento de pão integral. Todos os coprodutos fermentados apresentaram atividade das enzimas de interesse, destacando-se o resíduo de malte cervejeiro e o farelo de trigo pelas maiores atividades de xilanase (547,9 ± 11,4 U/g) e feruloil-esterase (1732,2 ± 278 mU/g) nas primeiras 48 horas de fermentação. O bioprocessamento de pães com esses coprodutos fermentados resultou em um aumento de 159% e 198% no teor de ácido ferúlico solúvel, respectivamente, evidenciando que a produção de enzimas por fermentação em estado sólido é uma opção sustentável e eficaz para a valorização de subprodutos agroindustriais e o enriquecimento nutricional de pães. Como alternativa à produção enzimática por fermentação, avaliou-se também o efeito da autoclavagem e do bioprocessamento enzimático, de forma isolada e combinada. Foi utilizada a enzima comercial Pentopan® 500 GB, utilizada industrialmente para proporcionar um efeito positivo no volume e na aparência de pães, e que possuía atividade de xilanase (15,0 ± 0,6 U/mg) e feruloil esterase (6,7 ± 1,5 mU/mg). Além disso, foram testados diferentes métodos de secagem para identificar a técnica mais eficaz na liberação de ácido ferúlico, visando ao desenvolvimento de um pão com maior potencial para aplicação em estudo clínico. A combinação de autoclavagem e bioprocessamento enzimático, associada à secagem a 95 °C por 30 minutos, promoveu um aumento de 11 vezes no teor de compostos fenólicos solúveis no farelo de trigo. A aplicação deste farelo processado no desenvolvimento de pães resultou em produtos com teor de ácido ferúlico solúvel (9,02 mg/100 g) superior aos valores relatados na literatura. Por fim, foi conduzido um estudo clínico (n=9) do tipo cruzado, randomizado e cego, envolvendo indivíduos eutróficos (n=5) e com obesidade (n=4), que consumiram pão controle (dose de ácido ferúlico solúvel = 2,16 ± 0,27 mg) e pão bioprocessado

(dose de ácido ferúlico = 11,13 ± 0,37 mg). O bioprocessamento aumentou a resposta glicêmica dos voluntários com obesidade, não alterou a excreção urinária de ácido hipúrico ao longo de 48 h, mas impactou significativamente, aumentando em 14 vezes a excreção total de ácido ferúlico. O índice de massa corporal parece não ter influenciado o perfil de excreção dos metabólitos analisados, o que pode ser justificado pelo tamanho amostral pequeno ou pela ausência de detecção de metabólitos colônicos, de excreção tardia, relacionados à ação da microbiota intestinal.

ABSTRACT

The bioavailability of phenolic compounds may be limited by their form in the food matrix and by the high interindividual variability in metabolism, influenced by various factors, among which the composition of the gut microbiota stands out, differing between eutrophic and obese individuals. Strategies such as hydrothermal treatments and enzymatic bioprocessing, applied either individually or in combination, have shown promise in releasing phenolic compounds from the insoluble fraction, thereby positively affecting their bioaccessibility and bioavailability. In this thesis, the production kinetics of the enzymes amylase, peptidase, xylanase, and feruloyl esterase through solid-state fermentation of agro-industrial co-products (cocoa bran, wheat bran, and brewer's spent grain) were initially evaluated for potential application in the bioprocessing of whole grain bread. All fermented co-products exhibited activity of the target enzymes, with brewer's spent grain and wheat bran standing out due to higher xylanase (547.9 ± 11.4 U/g) and feruloyl esterase (1732.2 ± 278 mU/g) activities within the first 48 hours of fermentation. The bioprocessing of breads with these fermented co-products led to increases of 159% and 198% in soluble ferulic acid content, respectively, demonstrating that enzyme production via solid-state fermentation is a sustainable and effective approach for valorizing agro-industrial by-products and enhancing the nutritional quality of breads. As an alternative to enzyme production through fermentation, the effects of autoclaving and enzymatic bioprocessing—applied individually or in combination—were also assessed. The commercial enzyme Pentopan® 500 BG, used industrially to improve bread volume and appearance, was employed; it exhibited xylanase (15.0 ± 0.6 U/mg) and feruloyl esterase (6.7 ± 1.5 mU/mg) activities. Additionally, different drying methods were tested to identify the most effective technique for releasing ferulic acid, aiming at developing a bread with higher potential for clinical study application. The combination of autoclaving and enzymatic bioprocessing, along with drying at 95 °C for 30 minutes, promoted an 11-fold increase in the content of soluble phenolic compounds in wheat bran. The application of this processed bran in bread formulation resulted in products with soluble ferulic acid content (9.02 mg/100 g) exceeding values reported in the literature. Finally, a randomized, blinded, crossover clinical study (n=9) was conducted, involving eutrophic (n=5) and obese (n=4) individuals, who consumed both a control bread (soluble ferulic acid dose = 2.16 ± 0.27 mg) and a bioprocessed bread (ferulic acid dose = 11.13 ± 0.37 mg). Bioprocessing increased the glycemic response in obese volunteers, did not alter urinary excretion of hippuric acid over 48 hours, but significantly

impacted ferulic acid excretion, increasing it 14-fold. Body mass index did not appear to influence the excretion profile of the metabolites analyzed, which may be attributed to the small sample size or to the lack of detection of colonic metabolites, typically excreted later and related to gut microbiota activity.

TRABALHOS DECORRENTES DA PRESENTE TESE

Artigos publicados em periódicos:

Costa, R. S., S.S. de Almeida, S.S., Cavalcanti, E.d'.C., Moura-Nunes, N., Monteiro, M., & Perrone, D. (2021). Enzymes produced by solid state fermentation of agro-industrial by-products release ferulic acid in bioprocessed whole-wheat breads. *Food Research International*, *140*, 109843.

Resumos de conferências científicas:

Costa, R. S. ; Almeida, S. S. ; Perrone, D. Produção de enzimas por fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais liberação de ácido ferúlico em pães integrais bioprocessados. Semana de Integração Acadêmica da UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2020.

Carvalho, R. F. ; Almeida, S. S. ; Perrone, D. Quantificação de xilanase e feruloil-esterase em extratos enzimáticos comerciais. Semana de Integração Acadêmica da UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2023.

Almeida, S. S.; Moura-Nunes, N.; Monteiro, M. ; Perrone, D. Enzymatic bioprocessing of bread increased glycemic response and urinary excretion of ferulic acid in normoweight and obese individuals. 11th International Conference on Polyphenols and Health, Boston, MA, EUA, 2024.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos principais ácidos hidroxicinâmicos..... 25
Figura 2. Estruturas dos principais ácidos hidroxibenzóicos..... 26
Figura 3. Estrutura química básica dos flavonóides..... 27
Figura 4. Representações da estrutura da parede celular primária da planta e da rede formada entre os componentes estruturais e os compostos fenólicos. (A) Celulose; (B) Hemicelulose; (C) Proteínas estruturais; (D) Pectina; (E) Ácidos fenólicos; (F) Lignina..... 29
Figura 5. Representação do metabolismo de compostos fenólicos..... 31
Figura 6. Estrutura anatômica do grão de trigo..... 39
Figura 7. Esboço da ação da endo-1,4-β-xilanase na clivagem de ligações 1,4-β-d-xilosídicas internas em resíduos de β-1,4-d-xilapiranose de xilanas (XIL). A hidrólise da extremidade não redutora de resíduos terminais de α-L-arabinofuranosídeo em α-L-arabinosídeos pela α-L-arabinofuranosidase resulta na liberação de monômeros de arabinose feruloilada (ARA). O ataque final das ligações éster entre a arabinose e o ácido ferúlico (FER) com a feruloil esterase resulta na liberação de ácido ferúlico livre..... 45
Figura 8. Parâmetros de controle da fermentação em estado sólido: atividade de água (A), pH (B) e umidade (C)..... 60
Figura 9. Atividades das enzimas feruloil-esterase (A), xilanase (B), amilase (C) e protease (D) presentes nos extratos brutos obtidos dos produtos de fermentação em estado sólido de resíduo de malte cervejeiro, farelo de cacau e farelo de trigo..... 61
Figura 10. Volume aparente (A) e densidade aparente (B) das amostras de pão..... 64
Figura 11. Teor de ácido ferúlico no pão controle (PC), pão bioprocessado adicionado de farelo de trigo (PBFT) e pão bioprocessado adicionado de resíduo de malte cervejeiro (PBRM)..... 66
Figura 12. Esquema metodológico das condições de processamento do farelo de trigo..... 72
Figura 13. Teor de ácido ferúlico nas frações solúvel, insolúvel e total no farelo de trigo controle e farelo de trigo aquecido (95°C; 10 min) e liofilizado. Resultado expresso como média ± desvio padrão (mg/ 100 g, em base seca)..... 77
Figura 14. Teor de ácido ferúlico total expresso em mg/ 100g de base seca 78
Figura 15. Teor de ácido ferúlico solúvel expresso em mg/ 100g de base seca……..... 79
Figura 16. Teor de ácido ferúlico solúvel do pão controle e pão com farelo autoclavado, bioprocessado e aquecido, expresso em mg/ 100g, em base seca..... 80
Figura 17. Área sob a curva (AUC) (mg*min/dL) do delta da resposta glicêmica, expressa como média ± desvio padrão..... 92

Figura 18. Área abaixo da curva (AUC) (mg*min/dL) do delta da curva glicêmica dos participantes com obesidade (A) e eutróficos (B). Resultados expressos como média ± desvio padrão..... 93
Figura 19. Excreção total de ácido hipúrico ao longo de 48 horas após o consumo do pão controle e do pão bioprocessado. Resultados expressos como média ± desvio padrão..... 94
Figura 20. Excreção de ácido hipúrico ao longo das 48 horas após o consumo do pão controle e do pão bioprocessado. Resultados expressos como média ± desvio padrão..... 95
Figura 21. Excreção total de ácido hipúrico ao longo de 48 horas após o consumo do pão controle e do pão bioprocessado, agrupado entre os participantes eutróficos e com obesidade. Resultados expressos como média ± desvio padrão..... 96
Figura 22. Excreção total de ácido ferúlico ao longo de 48 horas após o consumo do pão controle e do pão bioprocessado. Resultados expressos como média ± desvio padrão..... 97
Figura 23. Excreção total de ácido ferúlico ao longo de 48 horas após o consumo do pão controle e do pão bioprocessado, agrupado entre os participantes eutróficos e com obesidade. Resultados expressos como média ± desvio padrão..... 98
Figura 24. Excreção total de ácido ferúlico ao longo 48 horas após o consumo do pão controle e do pão bioprocessado, agrupado entre os participantes eutróficos e com obesidade. Resultados expressos como média ± desvio padrão..... 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos in vitro que investigaram a bioacessibilidade de compostos fenólicos em pão após bioprocessamento enzimático..... 48
Tabela 2. Estudos clínicos que investigaram o efeito do bioprocessamento enzimático na biodisponibilidade de compostos fenólicos..... 49
Tabela 3. Formulação do pão controle (PC), pão bioprocessado adicionado de farelo de trigo fermentado (PBFT) e pão bioprocessado adicionado de resíduo de malte cervejeiro fermentado (PBRM)..... 57
Tabela 4. Atividade das enzimas presentes nos extratos brutos, derivados de fermentação em estado sólido de coprodutos agroindústrias, utilizados para o bioprocessamento de pães..... 63
Tabela 5. Formulação do pão controle..... 74
Tabela 6. Características dos participantes do estudo..... 87
Tabela 7. Teor (mg/100 g) de compostos fenólicos solúveis, insolúveis e total nos pães controle e bioprocessados..... 90

LISTA DE ABREVIAÇÕES

CEPLAC – Comitê Executivo do Plano da Lavoura de Cacau

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DAD – Detector de arranjo de diodos

DNS – Ácido dinitro salicílico

FAO – Food and Agriculture Organization

FES – Fermentação em estado sólido

GRAS – Generally recognized as safe

IMC – Índice de massa corporal

NCD-RisC – Non-Communicable Diseases Risk Factor Collaboration

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development

U – Unidade de atividade enzimática

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
2 OBJETIVOS 23
2.1 OBJETIVO GERAL 23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23
3 REVISÃO DE LITERATURA 24
3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS 24
3.2 METABOLISMO DE COMPOSTOS FENÓLICOS 30
3.2.1 Fatores que influenciam o metabolismo de compostos fenólicos 32
3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS EM CEREAIS 37
3.3.1 Compostos fenólicos do trigo e seus subprodutos 38
3.4 ESTRATÉGIAS DE LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM CEREAIS 41
3.4.1 Processamentos mecânicos 41
3.4.2 Processamentos hidrotérmicos 42
3.4.3 Processamentos biotecnológicos 43
3.5 EFEITO DO BIOPROCESSAMENTO ENZIMÁTICO NO METABOLISMO DE COMPOSTOS FENÓLICOS 47
4 ENZIMAS PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS LIBERARAM ÁCIDO FERÚLICO EM PÃES INTEGRAIS BIOPROCESSADOS 52
4.1 INTRODUÇÃO 52
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS 54
4.2.1 Matérias primas 54
4.2.2 Micro-organismo 54
4.2.3 Fermentação em estado sólido 54
4.2.4 Determinação da atividade de água, umidade e pH das amostras fermentadas 55
4.2.5 Atividades enzimáticas dos extratos brutos 55
4.2.5.1 Extração enzimática 55
4.2.5.2 Atividade de feruloil esterase 55
4.2.5.3 Atividade de xilanase 56
4.2.5.4 Atividade de amilase 56
4.2.5.5 Atividade de protease 56
4.2.6 Produção do pão 57
4.2.7 Propriedades físicas do pão 58
4.2.8 Análise do teor de ácido ferúlico solúvel 58
4.2.9 Análises estatísticas 59
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 59
4.3.1 Os extratos enzimáticos brutos de farelo de trigo e resíduo de malte cervejeiro apresentaram os perfis enzimáticos mais adequados 59

4.3.2 O uso de resíduo de malte cervejeiro fermentado prejudicou o volume e a densidade dos pães bioprocessados .....
4.3.3 O bioprocessamento enzimático com ambos os coprodutos fermentados liberaram ácido ferúlico em pão integral 65
4.4 CONCLUSÃO 67
5 INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE PROCESSAMENTO E DO MÉTODO DE SECAGEM NO PERFIL DE SOLUBILIDADE E NO TEOR DE ÁCIDO FERÚLICO DE AMOSTRAS DE FARELO DE TRIGO 68
5.1 INTRODUÇÃO 68
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS 70
5.2.1 Matéria prima 70
5.2.2 Preparado Enzimático 70
5.2.3 Atividade enzimática 70
5.2.3.1 Feruloil esterase **.....** 70
5.2.3.2 Xilanase 71
5.2.4 Condições de processamento do farelo de trigo 71
5.2.4.1 Aquecimento a 95ºC por 10 minutos 72
5.2.4.2 Autoclavagem 73
5.2.4.3 Bioprocessamento enzimático 73
5.2.4.4 Secagem a 50 ºC por 24 horas 73
5.2.4.5 Secagem a 95 ºC por 30 minutos 73
5.2.4.6. Secagem por liofilização 73
5.2.5 Aplicação do farelo de trigo bioprocessado na produção de pão 73
5.2.6 Análise da liberação de ácido ferúlico 74
5.2.6 Extração de ácido ferúlico 74
5.2.6.1 Extração de ácido ferúlico 74
5.2.6.2 Análise do teor de ácido ferúlico 75
5.2.7 Análises estatísticas 75
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES 76
5.3.1 Atividade enzimática 76
5.3.2 Efeito do aquecimento a 95ºC por 10 minutos sobre o perfil de ácido ferúlico 76
5.3.3 Efeito do processamento e da secagem do farelo de trigo sobre o teor de ácido ferúlico 77
5.3.4. Efeito do processamento e secagem do farelo de trigo sobre a liberação de ácido ferúlico 78
5.3.5. Potencial de aplicação do farelo de trigo processado em pães 80
5.4 CONCLUSÃO 81
6 BIOPROCESSAMENTO ENZIMÁTICO DE PÃO E SUA INFLUÊNCIA NA RESPOSTA GLICÊMICA E BIODISPONIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS: UM ESTUDO CLÍNICO CRUZADO EM INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS E COM OBESIDADE 82
6.1 INTRODUÇÃO 82
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS 84

6.2.1 Produção dos pães e bioprocessamento do farelo de trigo 84
6.2.2 Análise de compostos fenólicos dos pães 85
6.2.3 Estudo Clínico 87
6.2.4 Análise de metabólitos urinários por CLAE-DAD 88
6.2.5 Análises estatística 89
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 89
6.3.1 Composição fenólica dos pães 89
6.3.2 Efeito do bioprocessamento enzimático na resposta glicêmica 91
6.3.3 Excreção de metabólitos urinários 93
6.4 CONCLUSÃO 100
7 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS 101
8 REFERÊNCIAS 102
9 ANEXOS 114
Anexo 1 – Certificado de análise Pentopan 114
Anexo 2 - Aprovação do Comitê de Ética 115
Anexo 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido 121
Anexo 4 - Ilustração de divulgação do estudo clínico 124
Anexo 5 - Questionário aplicado aos participantes do estudo clínico 125
Anexo 6 - Esquema de randomização do estudo clínico 128
Anexo 7 - Imagens com instruções sobre a alimentação ao longo do estudo clínico .. 129
Anexo 8 - Instruções enviadas aos participantes sobre o estudo clínico 133

1 INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos relacionam o consumo de cereais integrais, seus subprodutos e alimentos derivados com a redução do risco de desenvolvimento e melhora da progressão de algumas doenças crônicas não transmissíveis, tais como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 e alguns tipos de câncer (Tang *et al*., 2015; Wu *et al*., 2015; Aune *et al*., 2013; Hu *et al*., 2020). Esses benefícios para a saúde não são atribuídos a um composto único, mas ao efeito combinado de diversos componentes dos cereais integrais, como as fibras e outros compostos bioativos, especialmente os compostos fenólicos (Fardet, 2010).

Compostos fenólicos estão presentes em matrizes alimentares de origem vegetal na forma insolúvel (covalentemente ligados a componentes estruturais da parede celular, como celulose, hemicelulose, lignina, pectina e proteínas estruturais) ou na forma solúvel (livres ou conjugados a glicosídeos) (Acosta-Estrada, *et al*., 2014). No trigo, o composto fenólico mais abundante é o ácido ferúlico (representa até 90% dos fenólicos totais do grão de trigo), que está presente quase que exclusivamente na forma insolúvel (Wang *et al*., 2014).

Os benefícios à saúde relacionados ao consumo de compostos fenólicos são altamente dependentes de sua bioacessibilidade e biodisponibilidade, que por sua vez variam de acordo com fatores relacionados ao indivíduo (capacidade digestiva, absortiva e metabólica) e ao alimento (interação com componentes da matriz alimentar) (Shahidi & Peng, 2018). Compostos fenólicos solúveis são considerados mais bioacessíveis que as formas insolúveis (Laddomada *et al*., 2015), sendo preferencialmente absorvidos no intestino delgado. Após absorção e biotransformação, os metabólitos atingem tecidos onde podem exercer diversos efeitos biológicos. Os compostos fenólicos insolúveis, por outro lado, são pouco absorvidos no trato gastrointestinal, atingindo a região do cólon onde são extensivamente metabolizados pela microbiota, gerando metabólitos que podem ser absorvidos ou apresentar atividade biológica *in situ* (Manach *et al*., 2004; Mosele *et al*., 2015). O metabolismo dos compostos fenólicos é caracterizado por uma grande variabilidade interindividual que está relacionada a fatores como genética, ecologia da microbiota intestinal e plasticidade enzimática do hospedeiro e da microbiota (Bento-Silva *et al.*, 2019). Essa variação interindividual no metabolismo de compostos fenólicos pode ser usada para classificar os indivíduos em fenótipos metabólicos com origens associadas, dentre outros fatores, a diferenças na microbiota intestinal entre os indivíduos (Rowland *et al.*, 2018). A composição da microbiota colônica é única e influenciada por diversos fatores como genética, padrão alimentar, condições de saúde, uso de antibióticos

e composição corporal (Seganfredo *et al.*, 2017). Eutróficos e indivíduos com obesidade têm diferenças na diversidade microbiana e podem apresentar alterações nos genes bacterianos envolvidos nas vias metabólicas de alguns nutrientes (Mörkl *et al.*, 2017; Remely *et al.*, 2015). As diferenças na composição da microbiota colônica de indivíduos com diferentes composições corporais, o importante papel desempenhado pela microbiota intestinal na fisiologia de processos como digestão e metabolismo (Seganfredo *et al.*, 2017) e o efeito significativo da variação interindividual na biodisponibilidade e potencial bioatividade de compostos fenólicos (Shahidi & Peng, 2018) indicam que grupos com diferentes perfis microbianos como eutróficos e indivíduos com obesidade podem metabolizar de maneira distinta essa classe de compostos bioativos.

Diversas estratégias com potencial para aumentar a bioacessibilidade e, consequentemente, viabilizar o aumento da biodisponibilidade de compostos fenólicos em cereais foram relatadas na literatura. Dentre elas, o bioprocessamento enzimático mostrou-se uma abordagem promissora na liberação de compostos fenólicos insolúveis (Anson *et al*., 2011; Almeida *et al*., 2020) podendo ter sua ação potencializada quando associada a outros métodos de processamento, como os hidrotérmicos e térmicos (Bautista-Expósito et al., 2020; Wang, He & Cheng, 2014). Dentre as enzimas utilizadas no bioprocessamento de cereais com o objetivo de liberar compostos fenólicos dos componentes estruturais da célula vegetal, destacam-se a xilanase e a feruloil-esterase, que podem ser obtidas comercialmente ou produzidas por técnicas mais econômicas e sustentáveis como a fermentação em estado sólido (Amorim *et al*., 2017). Essas enzimas, que integram o complexo xilanolítico, degradam as moléculas de hemicelulose da parede celular vegetal, como os arabinoxilanos e suas ramificações, liberando ácido ferúlico (Neeta *et al*., 1999; Wu *et al*., 2017).

A determinação dos teores e da bioacessibilidade *in vitro* de compostos fenólicos de pães integrais é importante para prever seus potenciais efeitos na saúde humana, mas não é suficiente para esclarecer e entender os efeitos *in vivo*. Assim sendo, estudos clínicos são importantes para determinar a biodisponibilidade e compreender o metabolismo dessa classe de compostos bioativos. Estudos sobre a biodisponibilidade de compostos fenólicos em pães bioprocessados enzimaticamente (Anson et al., 2011; Lappi et al., 2013; Turner et al., 2021) confirmam o efeito positivo da aplicação dessa técnica de processamento no metabolismo de compostos fenólicos, mas limitações nos estudos existentes e lacunas no conhecimento, especialmente no que se refere à dados sobre a variabilidade interindividual do metabolismo de compostos fenólicos por conta das diferenças na composição da microbiota colônica de

indivíduos eutróficos e com obesidade, evidenciam a necessidade de investigações adicionais para elucidar esses tópicos pouco esclarecidos de forma mais abrangente.

Considerando o alto e difundido consumo de pães pela população mundial, a possibilidade de aumento da bioacessibilidade de compostos fenólicos através de técnicas de processamento e a existência de considerável variabilidade individual na sua metabolização, torna-se relevante aprofundar as pesquisas sobre biodisponibilidade de compostos fenólicos de pães através da avaliação do efeito do bioprocessamento enzimático sobre o metabolismo de compostos fenólicos de pães em indivíduos eutróficos e com obesidade.

A presente tese foi organizada em três capítulos. O primeiro capítulo teve como objetivo avaliar a cinética de produção de enzimas por fermentação em estado sólido de coprodutos agroindustriais, visando sua aplicação no bioprocessamento de pão integral. No entanto, devido à paralisação das atividades presenciais imposta pela pandemia de COVID-19, não foi possível seguir com a ideia original de utilizar as enzimas produzidas por fermentação para dar seguimento ao desenvolvimento da tese. Diante disso, o grupo de pesquisa optou por dar continuidade ao estudo utilizando uma enzima comercial. No segundo capítulo, foi avaliada a utilização da enzima comercial, fornecida por uma empresa especializada, em combinação com uma técnica de processamento hidrotérmico. Além disso, diferentes métodos de secagem foram testados para identificar qual técnica seria capaz de promover a maior liberação de ácido ferúlico, resultando em um pão com maior potencial para ser usado como intervenção no estudo clínico da última etapa da tese. O terceiro capítulo aborda o estudo clínico, que avaliou o efeito do bioprocessamento enzimático de pão integral sobre a resposta glicêmica e o metabolismo de compostos fenólicos em indivíduos eutróficos e com obesidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do bioprocessamento enzimático de pão integral sobre o metabolismo dos compostos fenólicos em indivíduos eutróficos e com obesidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a cinética de produção das enzimas amilase, peptidase, xilanase e feruloil-esterase por fermentação em estado sólido de coprodutos agroindustriais (farelo de cacau, farelo de trigo e resíduo de malte cervejeiro) visando sua aplicação no bioprocessamento de pão integral.

Avaliar o efeito da autoclavagem e do bioprocessamento enzimático, isolados e combinados, e o efeito de diferentes métodos de secagem no perfil de solubilidade e nos teores de ácido ferúlico do farelo de trigo.

Avaliar o efeito do bioprocessamento enzimático de pão integral sobre a resposta glicêmica e o metabolismo dos compostos fenólicos em indivíduos eutróficos e com obesidade.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos tem sido objeto de estudo por seu potencial efeito terapêutico à saúde e de aplicação comercial e tecnológica. Por suas características químicas, esta classe heterogênea de compostos constituem um grupo relevante de substâncias com propriedades benéficas para a saúde, com efeitos antioxidante, antimutagênico, antimicrobiano, pró oxidantes, anti-hipertensivo, antiartrítico, vasodilatador, antitrombótico, anti-inflamatório e anticancerígeno, e com potencial promissor na prevenção de doenças, como diabetes, obesidade, câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose e doenças neurodegenerativas (Silva et al., 2023; Araújo et al., 2021; Aatif, 2023). Além disso, esses compostos possuem potencial para aplicações comerciais em diversos setores industriais, como na formulação de corantes alimentícios, embalagens bioativas, cosméticos, tintas, fertilizantes, têxteis e plásticos (Araújo et al., 2021). No entanto, a eficácia de seus benefícios biológicos e tecnológicos depende de fatores como concentração, bioacessibilidade após ingestão, grau de polimerização e interações moleculares (Araújo et al., 2021).

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sintetizados a partir da fenilalanina e da tirosina através da via do ácido chiquímico, tanto durante o desenvolvimento normal da planta, como em resposta a condições de estresse como infecções, oscilações pluviométricas, temperaturas extremas e radiação ultravioleta (Naczk & Shahidi, 2006). Essa classe de compostos é essencial para a sobrevivência das plantas por suas importantes ações de defesa, proteção, sinalização, e atração de polinizadores e animais para dispersão de sementes (Vuolo, Lima & Junior, 2019).

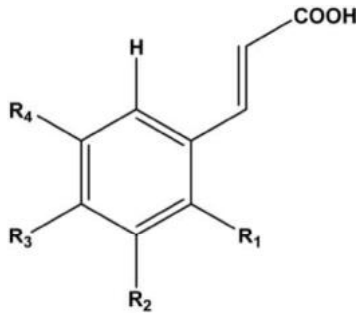
Quimicamente, os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila e variam de moléculas fenólicas simples a compostos altamente polimerizados (Bravo, 1998). Esses compostos orgânicos geralmente são solúveis em água por estarem frequentemente combinados com açúcares como glicosídeos (Silva et al., 2023). Os compostos fenólicos são classificados em distintos grupos funcionais com base na quantidade de anéis aromáticos presentes na estrutura molecular e na natureza dos elementos estruturais aos quais esses anéis estão conjugados (Manach et al., 2004). São divididos em duas grandes classes: não flavonoides e flavonoides (Rocha et al., 2011). Na classe dos compostos não flavonoides estão incluídos os ácidos fenólicos, taninos, ligninas e

estilbenos. A classe dos flavonoides é subdividida em flavonas, isoflavonas, flavanóis, flavonóis, flavanonas e antocianidinas (Manach et al., 2004).

Os ácidos fenólicos se caracterizam, de maneira geral, como fenóis que possuem um grupo ácido carboxílico funcional. Estes ácidos podem ser divididos em dois grupos distintos: os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (**Figura 1**) e os derivados dos ácidos hidroxibenzóicos (**Figura 2**), e a diversidade entre eles resulta das variações no número e na posição dos grupos hidroxila no anel aromático (Stalikas, 2007).

Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comuns do que os ácidos hidroxibenzóicos e consistem principalmente dos ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico. Esses ácidos raramente existem em sua forma livre e são mais comumente encontradas em conjugação com outros componentes, como polifenóis, glicose, ácido quínico ou componentes estruturais da célula vegetal (Silva et al., 2023), exceto em alimentos processados que passaram por congelamento, esterilização ou fermentação (Manach et al., 2004).

Figura 1. Estruturas dos principais ácidos hidroxicinâmicos**.**

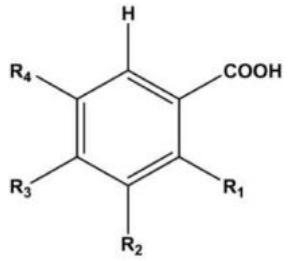


Ácido hidroxicinâmico

Nome	**R_1**	**R_2**	**R_3**	**R_4**
Ácido cinâmico	H	H	H	H
Ácido *m*-cumárico	H	OH	H	H
Ácido *p*-cumárico	H	H	OH	H
Ácido ferúlico	H	OCH_3	OH	H
Ácido sinápico	H	OCH_3	OH	OCH_3
Ácido cafeico	H	OH	OH	H

Fonte: Adaptado de Stalikas (2007)

Figura 2. Estruturas dos principais ácidos hidroxibenzóicos.



Ácido hidroxibenzóico

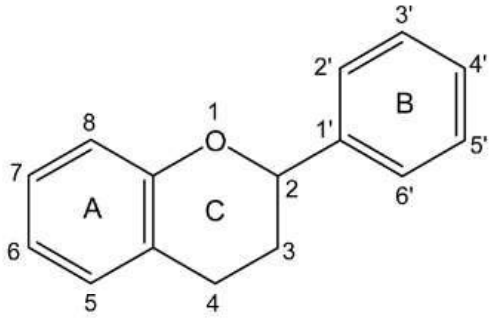
Nome	R_1	R_2	R_3	R_4
Ácido benzóico	H	H	H	H
Ácido *p*-hidroxibenzóico	H	H	OH	H
Ácido vanílico	H	OCH_3	OH	H
Ácido gálico	H	OH	OH	OH
Ácido protocatecuico	H	OH	OH	H
Ácido siríngico	H	OCH_3	OH	OCH_3
Ácido salicílico	OH	H	H	H

Fonte: Adaptado de Stalikas (2007)

Apesar de terem em comum um alto grau de polimerização e o alto peso molecular, os compostos fenólicos não flavonoides estilbenos, taninos e ligninas possuem características estruturais e funções específicas (Manach et al., 2004). Os estilbenos possuem um esqueleto de duas frações fenólicas conectadas por uma cadeia de dois carbonos e podem apresentar substituições nos anéis aromáticos, ocorrendo em formas livres, glicosiladas e isoméricas (Silva et al., 2023). O resveratrol, presente em uvas vermelhas e vinho tinto, e o pterostilbeno, majoritariamente presente em mirtilos e uvas, são exemplos desta classe de compostos em fontes alimentares (Chan et al., 2019). Os taninos são polifenóis solúveis em água, encontrados em diversos alimentos e classificados como hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) ou condensados, frequentemente complexados com outras biomoléculas, como alcaloides, polissacarídeos e proteínas (Silva et al., 2023). Podem ser encontrados em diversas fontes alimentares, como: frutas, vinhos, chás, café, oleaginosas, leguminosas e chocolate, e podem conferir características sensoriais aos alimentos como adstringência e amargor (Manach et al., 2004). Já a lignina é resultante da condensação de subunidades fenilpropanoides e estão presentes em baixa concentração em vegetais, nozes, frutas, leguminosas, cereais, sementes e óleos vegetais (Silva et al., 2023; Bhatia et al., 2024).

Os flavonoides correspondem a 2/3 dos compostos fenólicos dietéticos, estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são o grupo mais bioativo dentre essa classe de metabólitos secundários (Bhatia et al., 2024). Estruturalmente, os flavonoides consistem em dois anéis aromáticos A e B, ligados por uma ponte de três carbonos, geralmente na forma de anel aromático (**Figura 3**).

Figura 3. Estrutura química básica dos flavonóides. Fonte: Stalikas (2007)



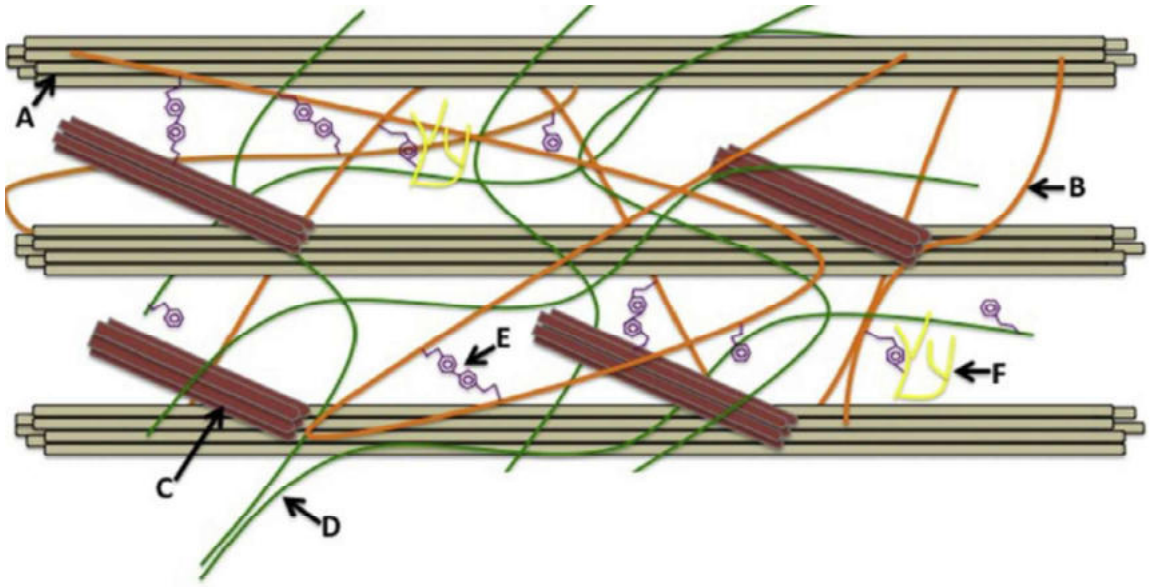
Variações na substituição do anel C resultam nas subclasses de flavonoides, já das substituições e padrão de metilação e hidroxilação dos anéis A e B derivam os diferentes compostos em cada classe. As subclasses de flavonoides são os flavonóis, as flavonas, as isoflavonas, as flavanonas, as antocianidinas e os flavanóis (Bhatia et al., 2024; Manach et al., 2004). Os flavonoides geralmente ocorrem como derivados glicosilados e desempenham funções diversas. Flavonas, flavonóis e antocianidinas podem atuar como pigmentos e suas cores vibrantes podem ajudam a atrair insetos polinizadores, enquanto sua adstringência, presente em catequinas e outros flavonóis, contribui para a defesa contra insetos herbívoros. Além disso, os flavonoides participam da fotossíntese, regulando canais iônicos e eliminando espécies reativas de oxigênio geradas pelo transporte de elétrons. Eles também desempenham um papel crucial na proteção das plantas contra a radiação UV, absorvendo a luz ultravioleta e neutralizando os radicais livres produzidos por essa exposição (Stalikas, 2007).

A composição fenólica nos alimentos é altamente heterogênea, refletindo a diversidade estrutural dessa classe de metabólitos vegetais. Alguns compostos fenólicos são amplamente distribuídos nos alimentos, como o ácido cafeico e a quercetina. O ácido cafeico, tanto livre quanto esterificado, é um dos ácidos fenólico mais abundante e representa entre 75% e 100% do conteúdo total de ácido hidroxicinâmico da maioria das frutas (Manach et al, 2004). A quercetina é encontrada em diversas fontes alimentares, como frutas, vegetais, cereais, leguminosas, chá, vinho e infusões (Tarascou et al., 2010). Outros compostos ocorrem de forma

mais restrita ou em altas concentrações em famílias, espécies ou órgãos vegetais específicos, como as isoflavonas na soja e as dihidrochalconas na maçã (Tarascou et al., 2010; Cheynier, 2012). Inúmeros fatores podem afetar o teor de compostos fenólicos nos alimentos, como a maturação no momento da colheita, fatores ambientais endoclimáticos (tipo de solo, nível de exposição solar e de precipitação) e agronômicos (forma de cultivo, número de frutos por árvore, níveis de estresse ao longo do cultivo), métodos de processamento aplicados e tempo e forma de armazenamento (Manach et al., 2004).

Compostos fenólicos estão distribuídos de forma não uniforme nos alimentos e podem estar presentes na forma insolúvel (ligados à matriz) ou na forma solúvel (livre ou conjugado). De forma geral, os fenólicos solúveis estão presentes nos vacúolos das células vegetais e são encontrados em maior concentração em frutas e vegetais. Os fenólicos insolúveis, por sua vez, estão localizados na parede celular primária das células vegetais. Fenólicos insolúveis são mais abundantes em tecidos vegetais protetores, como pericarpo, tegumento e casca, e são encontrados majoritariamente em grãos e cereais (Acosta-Estrada, et al., 2014, Rocchetti et al., 2022). Existem evidências de que a transferência de fenólicos para a matriz da parede celular ocorra através da movimentação das vesículas citoplasmáticas e de Golgi contendo fenólicos para a membrana plasmática, onde os compostos são secretados para a matriz da parede celular. Além disso, os fenólicos no citoplasma podem ser transportados para a membrana plasmática por meio de transportadores e através da membrana plasmática, atingir a matriz da parede celular. Na parede celular, os compostos fenólicos podem formar ligações covalentes com substâncias da parede celular, como celulose, hemicelulose, arabinoxilanos, proteínas estruturais e pectina, por meio de ligações éster, éter e C-C (**Figura 4**) (Acosta-Estrada, et al., 2014, Rocchetti et al., 2022). O grupo carboxila de ácidos fenólicos, tanto do grupo dos ácidos benzoicos quanto dos cinâmicos, pode formar ligações éster com grupos hidroxila de substâncias da parede celular e pode também produzir ligações éter por meio da ligação entre grupos hidroxila de compostos fenólicos e grupos hidroxila de substâncias da parede celular, bem como ligações C-C, quando criam diretamente uma ligação covalente entre o átomo de carbono dos fenólicos e o átomo de carbono das substâncias da parede celular. As ligações covalentes assim formadas desempenham um papel importante na conexão das substâncias da parede celular, reforçando a estrutura rígida da matriz da parede celular (Rocchetti et al., 2022).

Figura 4. Representações da estrutura da parede celular primária da planta e da rede formada entre os componentes estruturais e os compostos fenólicos. (**A**) Celulose; (**B**) Hemicelulose; (**C**) Proteínas estruturais; (**D**) Pectina; (**E**) Ácidos fenólicos; (**F**) Lignina. Fonte: ACOSTA-ESTRADA et al. (2014).



Os compostos fenólicos insolúveis em alimentos são importantes contribuintes para o conteúdo fenólico total e em consequência para suas propriedades funcionais *in vivo*. A proporção de compostos fenólicos insolúveis nos alimentos apresenta ampla variabilidade, dependendo significativamente da matriz alimentar. Em plantas, esses compostos desempenham um papel fundamental na resposta a condições de estresse (como radiação UV, patógenos ou herbívoros) e participam da morfogênese e do crescimento vegetal. Consequentemente, seu conteúdo real é bastante variável e fortemente relacionado ao genótipo, condições ambientais e outros fatores (Rocchetti et al., 2022). Em frutas, esse percentual pode variar de forma expressiva, oscilando entre aproximadamente 6% em maçã até 76% em *cranberry* (Acosta-Estrada, et al., 2014). Nos vegetais, a variação é igualmente marcante, com valores inferiores a 2% em repolho, podendo alcançar teores de até 40% em batata. Por outro lado, nos cereais, os compostos fenólicos insolúveis representam a fração majoritária, com percentuais superiores a 62%, podendo ultrapassar 90% em determinadas variedades, como o milho vermelho e a variedade de feijão *Phaseolus vulgaris* (Acosta-Estrada, et al., 2014).

A solubilidade dos compostos fenólicos desempenha um papel importante na determinação de seus efeitos benéficos à saúde, uma vez que influencia diretamente sua bioacessibilidade e biodisponibilidade (Acosta-Estrada et al., 2014). Dessa forma, não é apenas a quantidade desses compostos presente nos alimentos que determina seu efeito bioativo, mas principalmente a quantidade disponível para absorção do trato gastrointestinal e a quantidade

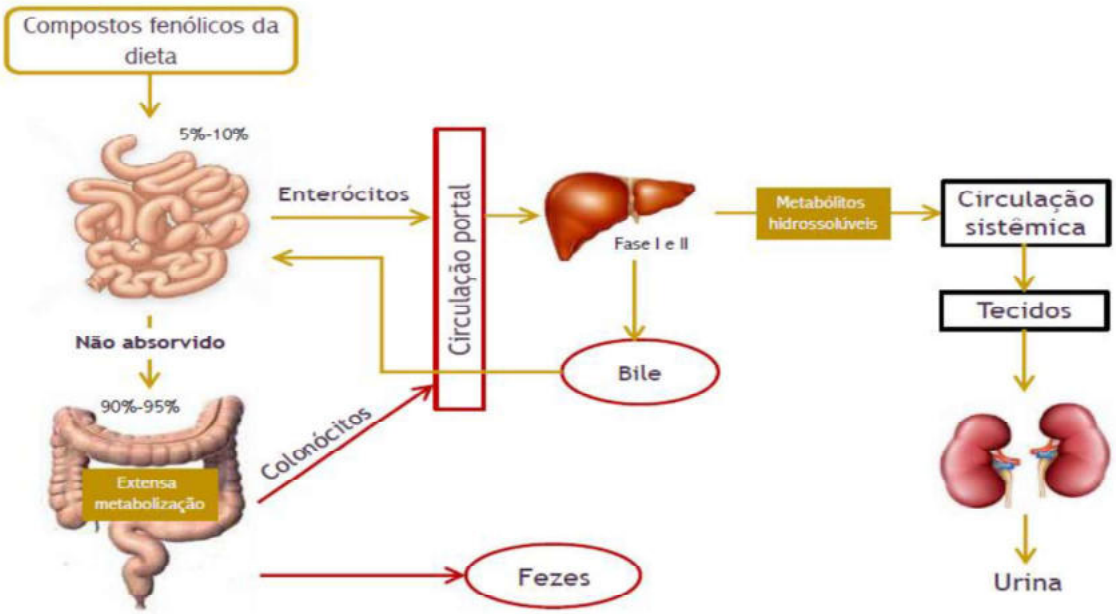
de compostos que é absorvida, distribuída pelo sistema circulatório e submetida a metabolização (Wang et al., 2014; Barba et al., 2017).

3.2 METABOLISMO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os benefícios à saúde relacionados ao consumo de compostos fenólicos são altamente dependentes da sua bioacessibilidade (quantidade de compostos que é liberada da matriz alimentar no trato gastrointestinal tornando-se disponível para a absorção) (Barba et al., 2017) e biodisponibilidade (fração de compostos que é absorvida, distribuída pelo sistema circulatório e submetida a metabolização e eliminação) (Shahidi & Peng, 2018). A bioacessibilidade e biodisponibilidade dos compostos fenólicos por sua vez variam de acordo com fatores relacionados ao indivíduo (condição metabólica) e ao alimento (interação com componentes da matriz alimentar) (Shahidi & Peng, 2018).

Menos de 10% dos compostos fenólicos ingeridos são absorvidas no intestino delgado através dos enterócitos. Os compostos fenólicos que se encontram conjugados a compostos estruturais da célula seguem para a região do colón onde vão ser extensamente metabolizados pela microbiota colônica, gerando metabólitos colônicos que podem exercer uma ação local ou serem absorvidos. Os compostos absorvidos no intestino delgado e os metabólitos absorvidos após metabolização colônica chegam através da circulação portal ao fígado onde vão sofrer etapas de biotransformação, para então atingir através da circulação sistêmica os tecidos alvos, sendo finalmente eliminados pela urina ou fezes (**Figura 5**) (Laddomada et al., 2015; Mosele et al., 2015).

Figura 5. Representação do metabolismo de compostos fenólicos



Compostos fenólicos solúveis são considerados mais bioacessíveis que as formas insolúveis (Laddomada et al., 2015), sendo preferencialmente absorvidos no intestino delgado. A absorção de compostos fenólicos no intestino delgado ocorre por meio de diferentes mecanismos, que variam conforme suas características físico-químicas, como solubilidade e estrutura molecular. Esses compostos podem ser transportados através da membrana dos enterócitos por difusão passiva, transporte facilitado ou ativo, além da via paracelular através das junções estreitas. Uma vez absorvidos, são encaminhados para a circulação sistêmica ou sistema linfático por transportadores localizados na membrana basolateral, podendo também serem recaptados e devolvidos ao lúmen intestinal por mecanismos de efluxo (Dominguez-Avila et al., 2017).

Após absorção, os compostos fenólicos sofrem extensa biotransformação mediada por reações de fase I (oxidação, redução ou hidrólise) e reações de fase II (glucuronidação, metilação e sulfatação); e os metabólitos gerados são transportados para a circulação ou excretados de volta para o lúmen intestinal, atingindo tecidos onde podem exercer diversos efeitos biológicos (Manach et al., 2004; Dominguez-Avila et al, 2017). Esses processos de biotransformação ou desintoxicação metabólica que ocorrem no fígado são importantes para restringir os efeitos tóxicos dos compostos e facilitar sua eliminação biliar e urinária pelo aumento da sua hidrofilicidade. Os fenólicos são secretados pela via biliar para o duodeno, onde são submetidos à ação de enzimas bacterianas, especialmente a β-glucuronidase, nos segmentos

distais do intestino. Essa reciclagem entero-hepática pode levar a uma presença mais longa de polifenóis no corpo. (Manach et al., 2004; Mosele et al., 2015; López-Verena et al., 2021).

Os compostos fenólicos presentes nos alimentos na forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros não são absorvidos na sua forma nativa, e precisam ser hidrolisados por enzimas intestinais ou atingir a região do colón para serem metabolizados pela microbiota colônica através de reações de fissão, hidrólise, desmetilação, redução, descarboxilação, hidroxilação e isomerização. Os metabólitos de baixo peso molecular gerados são mais facilmente absorvidos por difusão passiva pelas células colônicas ou podem agir *in situ* (Manach et al., 2004; Mosele et al., 2015; Dominguez-Avila et al., 2016; López-Yerena et al., 2021). A forte interação entre compostos fenólicos e a microbiota intestinal tem sido reconhecida como um fator-chave para explicar a bioatividade de compostos com baixa absorção. Os polifenóis exercem efeitos moduladores sobre a microbiota, regulando sua composição ao promover o crescimento de microrganismos benéficos e inibir patógenos, além de influenciar diretamente a atividade metabólica bacteriana (Cheng et al. 2023). Adicionalmente, os polifenóis são metabolizados pela microbiota em derivados bioativos, frequentemente com maior biodisponibilidade e potencial funcional ampliado em relação às moléculas originais. Esses mecanismos integrados elucidam a relação entre a limitada absorção intestinal dos polifenóis e seus efeitos fisiológicos expressivos no organismo (Cheng et al. 2023). Embora a maioria dos compostos fenólicos ingeridos não atinja os tecidos-alvo em uma concentração que lhes permita exercer atividades biológicas, eles podem exercer efeitos promotores da saúde no trato gastrointestinal por meio de suas interações com nutrientes ingeridos, enzimas digestivas e transportadores (Dominguez-Avila et al., 2017).

3.2.1 Fatores que influenciam o metabolismo de compostos fenólicos

O metabolismo de compostos fenólicos pode ser influenciado por diversos fatores tanto relacionados ao alimento, como a estrutura química dos compostos e sua interação com outros componentes da matriz alimentar, quanto com fatores relacionados ao indivíduo, como fatores genéticos, fisiológicos e ambientais. Antes de atingir a circulação sistêmica, os compostos fenólicos interagem com um grande número de micro e macromoléculas no lúmen gastrointestinal e no fígado, como nutrientes de alimentos, enzimas digestivas e transportadores celulares. Todas essas interações podem afetar de maneira recíproca as funcionalidades das moléculas envolvidas e alterar os parâmetros de absorção e metabolismo dos compostos fenólicos (Dominguez-Avila et al., 2017).

A ligação dos compostos fenólicos a componentes da matriz alimentar influencia na acessibilidade desses compostos para a absorção na fração superior do trato gastrointestinal e em consequência na sua biodisponibilidade. Os anéis aromáticos hidrofóbicos e os grupos hidroxila hidrofílicos permitem que os compostos fenólicos criem interações fracas e fortes com diferentes tipos de moléculas, principalmente macromoléculas, como polissacarídeos, proteínas e lipídios (Ribas-Agustí et al., 2018). Os polissacarídeos presentes na parede celular de frutas e vegetais, como celulose, hemiceluloses e pectinas, desempenham papel importante na modulação da biodisponibilidade de compostos fenólicos. Esses polímeros podem formar interações físicas e químicas com os fenólicos, interferindo na sua liberação durante a digestão (Acosta-Estrada et al., 2014). Compostos fenólicos, como antocianinas e ácidos fenólicos, se ligam a polissacarídeos por forças de hidrogênio e interações hidrofóbicas, sendo essa afinidade influenciada pelo pH, temperatura, peso molecular e estrutura química. Essas interações afetam diretamente o perfil de liberação e absorção dos compostos fenólicos ao longo do trato gastrointestinal (Ribas-Agustí et al., 2018). A força e o tipo de ligação entre fibras e fenólicos variam amplamente, dependendo principalmente da composição dos polissacarídeos de parede celular por conta do variado grau de conjugação dos fenólicos com diferentes polissacarídeos de acordo com a estrutura química de ambos (Dominguez-Avila et al., 2017). A biodisponibilidade reduzida dos compostos fenólicos que estão associados a fibras é compensada pelos benefícios à saúde dos metabólitos e produtos de degradação derivados do metabolismo bacteriano no trato gastrointestinal inferior. Além disso, alguns compostos fenólicos possuem características probióticas, promovendo o crescimento de bactérias benéficas e inibindo bactérias patogênicas. (Dominguez-Avila et al., 2017).

O amido é capaz de interagir com diferentes tipos de compostos fenólicos e formar complexos por meio de ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas a depender de suas estruturas químicas (Ribas-Agustí et al., 2018). A formação desses complexos pode proteger os compostos fenólicos durante o processo digestivo, promovendo sua liberação controlada no intestino delgado e facilitando o transporte dos compostos fenólicos até o intestino grosso, onde podem exercer efeitos bioativos. Além disso, essa interação modifica a digestibilidade do amido, reduzindo as frações de amido rapidamente digeríveis, enquanto aumenta a quantidade de amido resistente, que exerce funções semelhantes às da fibra alimentar (Dominguez-Avila et al., 2017; Ribas-Agustí et al., 2018). Tanto estudos *in vitro* quanto em humanos indicam que a presença desses complexos diminui a atividade enzimática do amido, contribuindo para a redução do índice glicêmico e promovendo benefícios metabólicos associados ao aumento do amido resistente na dieta (Dominguez-Avila et al., 2017). Compostos fenólicos têm

demonstrado capacidade de interagir com enzimas digestivas, em especial com a α-amilase, resultando na inibição da hidrólise do amido e, consequentemente, na redução da taxa de absorção de glicose. Essa modulação enzimática, observada tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*, sugere um mecanismo pelo qual os compostos fenólicos podem contribuir para o controle glicêmico, retardando a digestão de carboidratos e suavizando os picos pós-prandiais de glicose. O efeito inibitório depende da estrutura química dos compostos, sendo potencializado pela presença de grupos específicos, como o galoil, que pode em alguns casos ser comparável ao de fármacos antidiabéticos como a acarbose. Além disso, a combinação de compostos fenólicos com inibidores comerciais de α-amilase pode promover efeitos sinérgicos, reforçando seu potencial como coadjuvantes no manejo dietético do diabetes (Dominguez-Avila et al, 2017).

A presença de lipídios na dieta tem papel fundamental na biodisponibilidade e bioacessibilidade de compostos fenólicos, influenciando positivamente sua solubilização e absorção, como demonstrado em diversos modelos experimentais com quercetina e outros flavonoides. Esse efeito é atribuído, em grande parte, ao aumento da micelização, que favorece a estabilidade e o transporte dos compostos fenólicos durante a digestão. Além disso, o aumento da biodisponibilidade promovido pela presença de lipídios pode potencializar os efeitos bioativos desses compostos em tecidos extraintestinais, ampliando sua eficácia metabólica (Dominguez-Avila et al., 2017).

Compostos fenólicos interagem com proteínas por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, formando complexos que podem alterar as propriedades estruturais e funcionais de ambos os componentes. Essas interações afetam desde a sensação de adstringência, como no caso dos taninos, até a digestibilidade e a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos. Fatores como a estrutura química dos compostos fenólicos, a composição e o estado conformacional das proteínas influenciam diretamente a afinidade e a estabilidade dessas interações. Além de modificar a bioatividade dos fenólicos, as proteínas, especialmente de matrizes lácteas, podem atuar como veículos de proteção, favorecendo sua estabilidade durante o processamento e a digestão, embora essa incorporação também possa impactar características tecnológicas e sensoriais dos alimentos (Dominguez-Avila et al., 2017).

O metabolismo dos compostos fenólicos é influenciado por uma variedade de fatores fisiológicos, como idade, estado de saúde, composição corporal e ecologia da microbiota intestinal, além de fatores genéticos, como polimorfismos que modulam a atividade de enzimas metabólicas. Essas variáveis contribuem para uma acentuada variabilidade interindividual na forma como esses compostos são metabolizados pelo organismo (Bento-Silva et al., 2019).

A metabolização de xenobióticos, como os compostos fenólicos, é controlada por sistemas enzimáticos que são afetados pela expressão de genes específicos que podem variar entre determinadas populações fazendo com que indivíduos ou grupos sejam categorizados de acordo com a forma como metabolizam determinados compostos (Bento-Silva et al., 2019). Essa variação interindividual no metabolismo de compostos fenólicos pode ser usada para classificar os indivíduos em metabotipos, ou seja, fenótipos metabólicos específicos de um dado composto fenólico ou de uma classe de compostos. Dentre os metabotipos já descritos, pode-se destacar aqueles relacionados ao metabolismo da daidzeína, isoflavona que pode gerar *O*-desmetilangolensina ou equol como metabólitos colônicos, dando origem aos metabotipos "produtores de equol" e "não produtores de equol" (Silva *et al*., 2020), assim como ao metabolismo dos elagitaninos, que podem gerar diversas urolitinas como metabólitos colônicos, dando origem aos metabotipos A, B ou 0 (Inada *et al*., 2019). Polimorfismos genéticos foram descritos para uma série de enzimas metabolizadoras, como as envolvidas nos processos de acetilação e oxidação, que resultam em fenótipos metabólicos predominantes em diferentes grupos populacionais, como observado na população da Europa e América do norte que tem maior frequência de acetiladores lentos quando comparado com os habitantes da região Ásia-Pacífico (Bento-Silva et al., 2019). A origem desses metabotipos parece estar associada, dentre outros fatores, a diferenças na microbiota intestinal entre os indivíduos (Rowland *et al.*, 2018).

A composição e diversidade da microbiota intestinal estão fortemente correlacionadas com a saúde geral do hospedeiro e com a homeostase metabólica, logo diferenças na microbiota intestinal entre os indivíduos podem ter influência sobre o metabolismo de compostos fenólicos (Rowland et al., 2018). A interação entre polifenóis e a microbiota intestinal desempenha papel essencial na modulação da bioatividade desses compostos. Apesar da limitada biodisponibilidade dos polifenóis, sua ampla presença na dieta, diversidade estrutural e capacidade antimicrobiana favorecem interações significativas no ambiente intestinal. Tais interações ocorrem de modo bidirecional: os polifenóis podem influenciar tanto a composição quanto o metabolismo da microbiota, enquanto a microbiota, por sua vez, é responsável pela biotransformação dos polifenóis em metabólitos bioativos (Cheng et al.,2023).

A composição microbiana intestinal é única e fortemente influenciada por fatores como genética, via de parto, padrão alimentar, condições sanitárias, uso de antibióticos e composição corporal (Seganfredo et al., 2017). Nesse sentido, quando comparados aos indivíduos eutróficos, os com obesidade têm uma menor diversidade microbiana (depleção de espécies), apresentam alterações a nível de filo e gênero (Firmicutes são mais abundantes e Bacteroidetes são reduzidos) e apresentam alterações nos genes bacterianos envolvidos nas vias metabólicas

de alguns nutrientes (Mörkl et al., 2017; Remely et al., 2015). O importante papel desempenhado pela microbiota intestinal na fisiologia de processos como digestão e metabolismo (Seganfredo et al., 2017) e o efeito significativo da variação interindividual na biodisponibilidade e potencial bioatividade de compostos fenólicos (Shahidi & Peng, 2018) indicam que grupos com diferentes perfis microbianos como eutróficos e obesos podem metabolizar de maneira distinta essa classe de compostos bioativos.

A obesidade é reconhecida como uma doença crônica, complexa e multifatorial, caracterizada pelo acúmulo excessivo ou anormal de gordura corporal, um estado de inflamação crônica de baixo grau e a alterações no metabolismo energético, o que representa risco significativo para a saúde. Essa condição resulta de um desequilíbrio prolongado entre a ingestão calórica e o gasto energético, sendo influenciada por fatores genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais (World Health Organization, 2024; Bray et al., 2017). Sua classificação é feita de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC), um indicador em nível populacional que estima a relação entre peso e altura em adultos. Esse parâmetro permite categorizar os indivíduos em faixas de risco relacionadas ao acúmulo de gordura corporal, sendo que valores de IMC ≥ 30 kg/m² indicam obesidade. A classificação é subdividida em três graus: obesidade grau I (IMC de 30,0 a 34,9 kg/m²), grau II (35,0 a 39,9 kg/m²) e grau III ($\geq$ 40,0 kg/m²), também conhecida como obesidade mórbida (World Health Organization, 2000).

Um estudo recente da rede mundial de cientistas da saúde *Non-Communicable Diseases Risk Factor Collaboration* (NCD-RisC) (2024) revelou que mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo convivem com a obesidade. Nos últimos 30 anos, a prevalência de obesidade em adultos mais que dobrou, enquanto entre crianças e adolescentes (de 5 a 19 anos), esse número quadruplicou. No Brasil, o percentual de adultos com obesidade em 2023 foi de 24,3%, com um aumento de aproximadamente 105% nos últimos 16 anos (Ministério da Saúde, 2024). Além de suas várias implicações para a saúde, a obesidade pode influenciar negativamente a biodisponibilidade de nutrientes e compostos bioativos, ao interferir na função intestinal, alterar a regulação dos sistemas de metabolização ou desequilibrar a microbiota intestinal, essencial para o metabolismo de compostos fenólicos (Redan et al., 2016).

Outras condições de saúde ou fisiológicas podem influenciar significativamente o metabolismo de compostos fenólicos, impactando tanto sua absorção quanto sua biodisponibilidade no organismo. Entre essas condições destacam-se as doenças hepáticas e intestinais. O fígado e o intestino desempenham papéis centrais na transformação e no transporte desses compostos, e alterações nessas estruturas provocadas por enfermidades, pelo uso crônico de álcool, uso de medicamentos e consumo de substâncias que alterem a microbiota

intestinal, podem comprometer a eficiência metabólica e alterar o perfil de compostos fenólicos circulantes (Manach et al., 2004; Clifford, 2004)

3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS EM CEREAIS

Os cereais são definidos como frutos ou sementes comestíveis da família das gramíneas, que podem ser classificados como nus, contendo apenas germe, endosperma e membrana da semente (exemplo: trigo, milho e centeio), ou revestidos por uma casca (exemplo: arroz, aveia, cevada e sorgo) (Graças-Costa & Souza, 2023). A projeção para a próxima década é que a produção global de cereais alcance 3,1 bilhões de toneladas anuais, com a demanda por cereais sendo dominada pelo uso alimentar (41%) principalmente de trigo e arroz, seguido de perto pelo uso de ração (37%) dominado pelo milho e outros grãos (OECD/FAO; 2023). Os principais cereais empregados na alimentação humana e animal incluem trigo, arroz, milho, cevada, aveia, centeio e sorgo, além de espécies menos comuns, como milheto, triticale e espelta, e pseudocereais como amaranto, trigo-sarraceno e quinoa (Graças-Costa & Souza, 2023). Cereais tem como importante característica nutricional seu elevado teor de carboidratos, o que torna essa classe de alimentos a principal fonte energética da dieta humana. Além disso, sua composição média inclui água (12–13%), proteínas (9–13%), lipídios (2–5%), fibras (0,5–2%) e minerais (1–3%) (Graças-Costa & Souza, 2023).

O consumo de cereais integrais (contendo endosperma, germe e farelo) tem sido associado a uma diminuição na incidência de algumas doenças, como doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, diabetes tipo 2 e obesidade (Shahidi, 2009), por conta da ação sinérgica das fibras e dos compostos bioativos presentes nesses alimentos, dentre eles os pertencentes a classe dos compostos fenólicos (Shahidi et al., 2019).

O perfil e o teor total de compostos fenólicos em cereais variam amplamente dependendo do tipo, da variedade, bem como da localização e das condições de cultivo do grão (Angelino et al., 2017). O teor de compostos fenólicos também é influenciado pelo nível de processamento dos cereais, uma vez que a quantidade e perfil dessa classe de compostos bioativos variam de acordo com sua localização no grão. Cereais refinados possuem uma composição bioativa abaixo do esperado em comparação com grãos integrais devido à remoção do germe e do farelo, onde a maior parcela dos compostos bioativos, e compostos fenólicos, estão localizados (Shahidi, Danielski & Ikeda; 2021). Em cereais as subclasses fenólicas mais significativas são os flavonoides, ácidos fenólicos e taninos (proantocianidinas e taninos hidrolisáveis) (Cheynier et al., 2012; Shahidi et al., 2019). Os compostos fenólicos

(principalmente ácidos fenólicos) estão concentrados na fração de farelo dos grãos de cereais e existem em formas livres, conjugadas solúveis e ligadas insolúveis (Wang; He & Chen, 2014).

Dentre os ácidos fenólicos, o ácido ferúlico é o mais abundante em grãos de cereais, seguido pelos ácidos p-cumárico, sinápico e cafeico (Angelino et al., 2017). Compostos pertencentes a esse subgrupo estão majoritariamente na forma insolúvel associados a macromoléculas em matrizes de cereais, como celulose, hemicelulose e pectina (Wang; He & Chen, 2014). Ácidos fenólicos também podem formar estruturas poliméricas conhecidas como taninos hidrolisáveis, que podem ser ésteres de ácidos gálicos (galotaninos) ou elágicos (elagitaninos) (Shahidi E Yeo, 2016). Os grãos de cereais são fontes abundantes de flavonoides, que podem estar presentes como compostos insolúveis ou solúveis. Os flavonoides solúveis podem ocorrer na forma livre, ou podem ser conjugados com polissacarídeos (glicosídeos) ou esterificados/eterificados em ácidos graxos (Shahidi E Yeo, 2016). Os flavonoides monoméricos podem formar oligômeros e polímeros, obtendo maior complexidade. Esses polifenóis são conhecidos como proantocianidinas; estruturas poliméricas compostas de catequina e epicatequina (ShahidI, Danielski & Ikeda; 2021). Além dos ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, outros compostos fenólicos relevantes em cereais incluem as lignanas e os alquil-resorcinóis, sendo estes últimos classificados como lipídios fenólicos. As lignanas são encontradas em cereais como centeio, trigo, cevada e aveia, já os alquil-resorcinóis estão presentes no trigo, centeio, cevada, milheto e milho (ShahidI, Danielski & Ikeda; 2021).

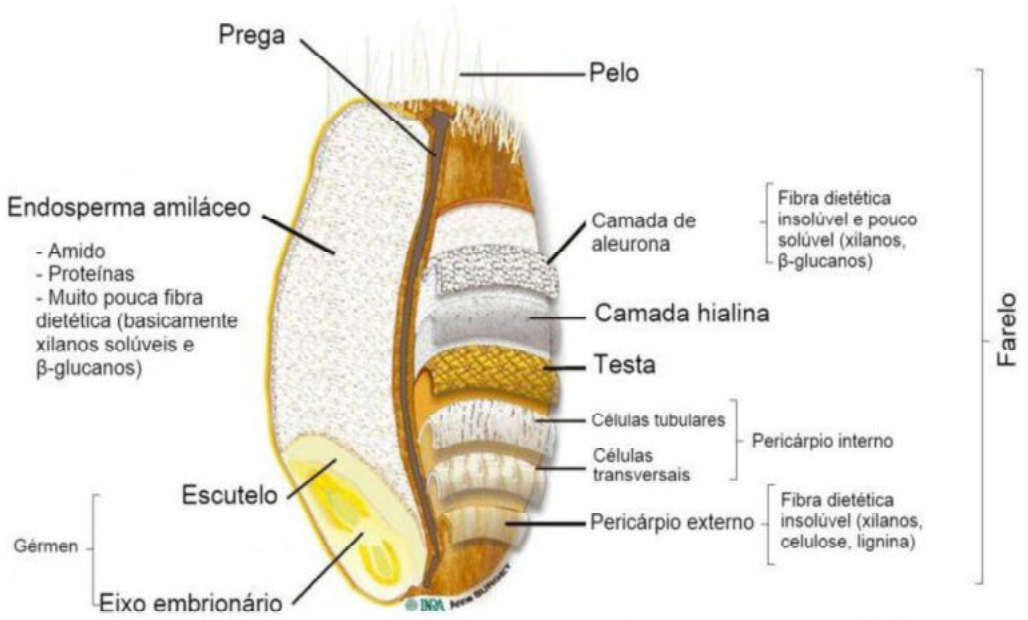
3.3.1 Compostos fenólicos do trigo e seus subprodutos

O trigo (*Triticum spp*.) é um cereal amplamente cultivado a nível mundial devido à sua relevância nutricional e econômica. A previsão preliminar da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) (2023) projeta a produção global de 796 milhões de toneladas de trigo em 2025. O trigo pode ser cultivado em diferentes variedades, sendo as mais comuns o trigo duro (*Triticum durum*), utilizado na fabricação de massas, e o trigo mole (*Triticum aestivum*), predominante na produção de pães e bolos (Khalid, Hameed & Tahir, 2023). Sua composição nutricional inclui carboidratos, proteínas, como as gluteninas e gliadinas, que conferem propriedades viscoelásticas essenciais para a panificação, além de minerais como cobre, magnésio, zinco, fósforo e ferro, bem como vitaminas do complexo B e E, riboflavina, niacina, tiamina e fibras alimentares (Khalid, Hameed & Tahir, 2023).

O grão de trigo é constituído por farelo, gérmen e endosperma (**Figura 6**) que representam, respectivamente, cerca de 14%, 83% e 3% da estrutura do grão (Atwell, 2011).

Por conta das características de composição de cada uma das frações do grão de trigo, são observadas diferenças significativas no teor de compostos fenólicos entre farinhas integrais (produzidas com grãos inteiros), farinhas refinadas (compostas exclusivamente pelo endosperma do grão) e subprodutos da moagem como o farelo (Ragaee, Seetharaman & Abdel-Aal, 2014). As diferenças na composição das diferentes frações do trigo se refletem na composição fenólica de seus produtos derivados, como pães. Anson et al, (2009) ao determinar o teor de compostos fenólicos de pão branco, pão integral e pão integral adicionado de farelo de trigo encontrou, respectivamente, teores de 97 mg/100 g, 900 mg/100 g e 1.470 mg/100 g. Esses resultados reforçam a presença majoritária dos compostos fenólicos nas frações do gérmen e do farelo de trigo.

Figura 6. Estrutura anatômica do grão de trigo. Fonte: Adaptado de Delcour & Hoseney, 2010.



No trigo, o ácido ferúlico representa cerca de 90% do total de ácidos fenólicos, sendo aproximadamente 99% na forma insolúvel (Wang; He & Chen, 2014). A fração insolúvel do ácido ferúlico presente no farelo de trigo realiza ligações cruzadas com os polímeros da parede celular do farelo, sendo formados dímeros (ácidos 8-5'-, 5-5'-, 8-O-4'-, e 5-8'-diferúlicos) por meio de reações de polimerização oxidativa (Kroon & Williamson, 1999; Han; Dye; Mackie, 2023).

A forma estrutural com que o ácido ferúlico se apresenta nos alimentos e seu perfil de solubilidade tem forte influência no seu metabolismo. Ácido ferúlico livre é rapidamente absorvido no estômago e jejuno por difusão passiva transcelular e também por mecanismos

mediados por transportadores; enquanto suas formas conjugadas, como ésteres com açúcares (ex.: 5-O-feruloil-L-arabinofuranose) ou polissacarídeos (ex.: feruloil-arabinoxilanos), apresentam absorção limitada e demandam ação enzimática da microbiota colônica para liberação do ácido ferúlico. Após a absorção, o ácido ferúlico é amplamente metabolizado no fígado por reações de conjugação, formando predominantemente sulfoglicuronídeos, glicuronídeos e sulfatos. A metabolização microbiana também contribui significativamente, gerando uma diversidade de compostos fenólicos de menor peso molecular, como ácido vanílico, catecol, ácido *p*-cumárico e ácido cafeico, por meio de reações como hidrogenação, desmetilação e descarboxilação. Esses metabólitos, junto ao ácido ferúlico conjugado, são distribuídos aos tecidos periféricos ou excretados na urina e bile, podendo participar do ciclo entero-hepático. As vias metabólicas do ácido ferúlico refletem sua complexa biodisponibilidade, modulada por fatores estruturais e microbiológicos, que resultam na formação de metabólitos bioativos com potenciais efeitos fisiológicos (Chen et al., 2023).

O farelo de trigo é um subproduto do processo de moagem do trigo com produção anual estimada de 90 milhões de tonelada (Yin et al., 2018). É composto majoritariamente pela camada de aleurona e camada intermediária, mas também contém outras partes do grão de trigo, como o endosperma amiláceo e o pericarpo externo (Antoine et al., 2004). Este material apresenta elevado valor nutricional, contendo cerca de 45 g/100 g de fibras, 20 g/100 g de proteínas, 20 g/100 g de amido, 5 g/100 g de lipídios e 5 g/100 g de minerais, e é fonte de compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos (LI et al., 2022).

O farelo de trigo contém uma vasta variedade de ácidos fenólicos. Entre os derivados de ácidos hidroxibenzóicos, destacam-se os ácidos p-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico e gálico. Contudo, os compostos fenólicos mais abundantes no trigo são os derivados de ácidos hidroxicinâmicos, com ênfase no ácido ferúlico, seus desidrodímeros e desidrotrímeros, além dos ácidos sinápico e *p*-cumárico (Ladomadda & Mita, 2015). O teor de compostos fenólicos no farelo de trigo é de aproximadamente 43 mg/ g, sendo o ácido ferúlico o composto fenólico majoritário, e proveniente principalmente do pericarpo e aleurona do grão de trigo (Ladomadda & Mita, 2015). Aproximadamente 98% do ácido ferúlico no farelo de trigo se encontra na forma insolúvel, ligado aos componentes estruturais da parede celular por meio de ligações éster entre seu grupo carboxílico e o 5-O do grupo hidroxila de um resíduo de α-L-arabinofuranosil em uma glucoroarabinoxilana. O ácido ferúlico e outros ácidos hidroxicinâmicos podem formar ligações cruzadas por meio de dímeros do éster que realizam ligações intermoleculares entre cadeias de arabinoxilanas, o que os torna essenciais para a estrutura da célula vegetal,

aumentando a força mecânica da parede celular (Ladomadda & Mita, 2015; Li et al., 2022; Dilokpimol et al., 2016).

Os compostos fenólicos presentes no farelo de trigo estão associados com o controle glicêmico e demonstraram excelente capacidade de regular o estado oxidativo celular, prevenindo danos oxidativos em moléculas biológicas, contribuindo para a prevenção de inflamações e redução do risco de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 e alguns tipos de câncer, como o de cólon (Li et al., 2022; Acosta-Estrada et al., 2014). Sua capacidade antioxidante também é de interesse para a indústria de alimentos, estando associado ao aumento da vida de prateleira de alimentos industrializados, especialmente aqueles sujeitos a processos de deterioração oxidativa (Butt et al., 2008).

3.4 ESTRATÉGIAS DE LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM CEREAIS

Diversas estratégias com potencial para aumentar a bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos em cereais e seus subprodutos têm sido relatadas na literatura, incluindo tratamentos mecânicos, como moagem e microfluidização, tratamentos térmicos, como vaporização, aquecimento por micro-ondas, torrefação e autoclavagem, além da aplicação de técnicas de bioprocessamento, como germinação, fermentação e uso de enzimas. (Angelino et al., 2017; Wang, He & Chen, 2014). De maneira geral essas técnicas atuam através da redução de tamanho de partícula, quebra das estruturas da parede celular de matrizes de cereais ou degradação de polímeros de fibra (Wang, He & Chen, 2014). Algumas tecnologias de processamento usualmente aplicadas a grãos e cereais para transformar as matérias-primas em produtos prontos para o consumo, com boas características sensoriais e elevada qualidade nutricional, também podem influenciar sua fração fenólica, impactando em seu potencial efeito benéfico para a saúde (Wang, He & Chen, 2014).

3.4.1 Processamentos mecânicos

Processos mecânicos de redução do tamanho de partículas, como a moagem fina, moagem em moinho de bolas e nano-moagem, podem aumentar significativamente a bioacessibilidade de compostos fenólicos em cereais. Isso ocorre pela redução no tamanho das partículas dos grãos que aumentam a área superficial e facilita o acesso dos solventes extratores e das enzimas digestivas aos fenólicos que antes estavam presos à matriz celular (Wang, He &

Chen, 2014). Estudos demonstram que esse processo pode não apenas elevar a quantidade de compostos fenólicos extraíveis, como também potencializar suas atividades antioxidantes mesmo sem afetar o teor total do composto ou a sua forma química (solúvel, conjugada ou insolúvel). O aumento da atividade antioxidante pode estar relacionado com a liberação dos fenólicos ligados ou com uma melhor exposição desses compostos após a quebra da parede celular. Além disso, a moagem pode romper ligações covalentes dos fenólicos com fibras, aumentando ainda mais a disponibilidade dos fenólicos durante a digestão, o que reforça o papel da moagem na melhora da bioacessibilidade e do potencial antioxidante desses compostos (Zhou et al., 2004; Rosa et al., 2013; Hemery et al., 2010; Van Craeyveld et al., 2009).

A bioacessibilidade e atividade antioxidante de compostos fenólicos de cereais como farelo de trigo e milho também pode ser potencializada pelo processo mecânico de microfluidização. A microfluidização é uma técnica que utiliza alta pressão para forçar partículas em suspensão a passarem por microcanais, promovendo redução significativa de seu tamanho, formação de poros e aumento da área superficial (Wang, He & Chen, 2014). A microfluidização se mostra um processo mais eficiente que processos mecânicos convencionais, como a moagem por bolas, já que evita o colapso da matriz de fibras e expõe mais eficientemente compostos fenólicos ligados (Raghavendra et al., 2006).

3.4.2 Processamentos hidrotérmicos

Diversas técnicas de processamento térmico, como aplicação de vapor, autoclavagem, secagem em tambor, torrefação e aquecimento por micro-ondas, são utilizados no processamento de cereais para melhorar a palatabilidade, estabilidade e segurança dessa classe de alimentos, e podem também aumentar a capacidade de extração de compostos fenólicos (Wang, He & Chen, 2014).

Em tratamentos hidrotérmicos que combinem calor com alta pressão, como a autoclavagem, a liberação de compostos fenólicos está associada a quebra da parede celular vegetal e a hidrólise parcial dos polissacarídeos em consequência das condições de alta pressão e alta temperatura durante o processo e a rápida despressurização ao final do processo (Bautista-Expósito et al, 2020). Além do aumento no teor de compostos fenólicos solúveis, a autoclavagem também pode aumentar substancialmente a capacidade antioxidante de cereais por conta da liberação de fenólicos, mas também de aumento de extractabilidade de outros antioxidantes bioativos e uma possível formação de outros compostos, como produtos da reação de Maillard (Dona, 2011).

A técnica de cocção por extrusão, processo contínuo que utiliza alta temperatura, alta pressão e condições de alto cisalhamento, pode apresentar dois efeitos opostos sobre os compostos fenólicos nos grãos de cereais. Por um lado, causa decomposição de compostos fenólicos termolábeis e polimerização de alguns compostos fenólicos, diminuindo o conteúdo fenólico extraível. Por outro lado, altera matrizes de parede celular, que promove a quebra de ligações covalentes em complexo de polifenóis de alto peso molecular, resultando em melhoria na acessibilidade desses compostos (Wang, He & Chen, 2014).

A liberação de compostos fenólicos durante o processamento térmico pode ocorrer de maneira diferenciada para cada composto, dependendo de suas interações estruturais e do tipo de ligação com a matriz vegetal. No caso de grãos de aveia, observou-se que a autoclavagem promoveu alterações significativas no perfil fenólico, resultando em expressivos aumentos nos teores de ácido ferúlico, *p*-cumárico e vanilina, enquanto o ácido cafeico foi completamente degradado. Essas variações foram atribuídas tanto à ruptura das ligações covalentes entre ácidos hidroxicinâmicos e componentes da parede celular, facilitada pelo calor e pressão, quanto à instabilidade térmica específica do ácido cafeico. Além disso, o aumento da vanilina foi associado à degradação térmica do ácido ferúlico e sua subsequente oxidação em presença de oxigênio (Bryngelsson et al., 2002).

Tratamentos térmicos também podem ter efeitos mínimos ou negativo sobre o teor de compostos fenólicos de cereais, por conta da degradação de parte desses compostos. Os efeitos diferenciados desses tratamentos podem estar associados ao tipo de grão, à natureza do composto, sua localização na matriz alimentar, bem como à severidade e à duração do processamento térmico (Wang, He & Chen, 2014). Sensoy et al. (2006) observaram que a torrefação não alterou significativamente os fenólicos totais em trigo sarraceno, enquanto Zhang et al. (2010) e Chandrasekara et al. (2012) relataram declínios variáveis nos fenólicos totais, flavonoides e na atividade antioxidante, dependendo do tipo de cereal, da severidade do tratamento e da metodologia analítica. Isso ressalta a importância de modular as condições de processamento para alcançar um equilíbrio entre o aumento da bioacessibilidade e a degradação excessiva das substâncias de interesse.

3.4.3 Processamentos biotecnológicos

Processos biotecnológicos, como germinação, fermentação e tratamentos enzimáticos têm sido utilizados como estratégicas para aumentar a bioacessibilidade de compostos fenólicos em cereais (Angelino et al., 2017).

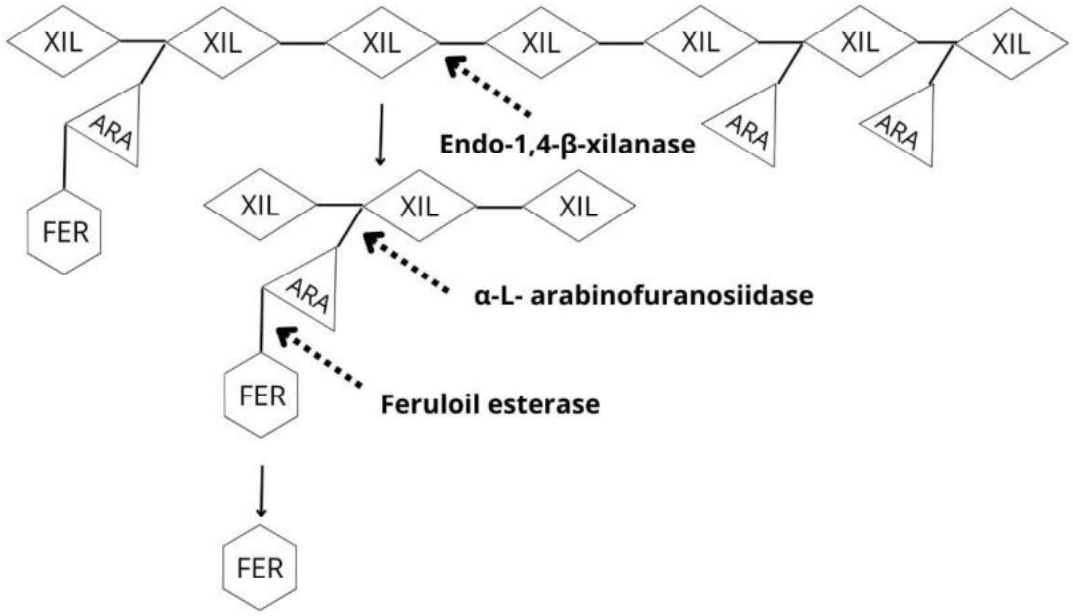
A germinação, processo pelo qual uma planta cresce a partir de uma semente, tem se mostrado uma estratégia eficaz para aumentar os compostos fenólicos solúveis em grãos de cereais. Durante a germinação, altos níveis de enzimas hidrolíticas, como amilase e proteases, se acumulam na semente e hidrolisam amido e reservas de proteína para transportar nutrientes para o embrião e atender as necessidades de crescimento da planta (Wang, He & Chen, 2014). Esse processo de indução da síntese ou ativação de enzimas promove modificações estruturais e a síntese de metabólitos bioativos, que podem causar um efeito positivo na liberação de fenólicos (Bondia-Pons et al., 2009).

A fermentação, por sua vez, exerce efeito positivo na liberação de compostos fenólicos através da ação das enzimas produzidas pelos microrganismos fermentadores. Nas fermentações prolongadas, a redução do pH durante o processo favorece a atividade das hidrolases, que promovem a hidrólise extensiva de ésteres e glicosídeos de ácidos fenólicos e pode contribuir para a degradação de arabinoxilanos (Angelino et al., 2017). A magnitude dos efeitos benéficos da fermentação sobre os compostos fenólicos depende principalmente dos tipos de grãos, espécies de microrganismos e condições do processo fermentativo, incluindo temperatura, pH e tempo de fermentação (Wang, He & Chen, 2014).

A combinação dos processos de germinação e fermentação exerce um efeito aditivo sobre a liberação de compostos fenólicos, uma vez que a germinação promove o aumento das fontes fermentáveis, como açúcares e compostos nitrogenados, enquanto ambas as etapas potencializam a atividade de enzimas responsáveis pela degradação da parede celular, favorecendo a liberação e, consequentemente, a bioacessibilidade dos ácidos fenólicos (Angelino et al., 2017).

Enzimas comumente utilizados na indústria de panificação para melhorar características tecnológicas da farinha e/ou farelos utilizados como ingredientes na produção de pães também podem alterar o perfil de solubilidade de compostos fenólicos em cereais e pães através da liberação de ácidos fenólicos de ésteres de fibras (Angelino et al., 2017). Dentre as enzimas utilizadas no bioprocessamento de cereais com o objetivo de liberar compostos fenólicos dos componentes estruturais da célula vegetal, destacam-se as enzimas do complexo xilanolítico xilanase e feruloil-esterase (**Figura 7**). O uso de enzimas hidrolíticas, como xilanases, para a hidrólise de componentes estruturais das células vegetais, promovem alterações nas características físico-químicas dos materiais bioprocessados e facilita a ação de outras enzimas do complexo xilanolítico, como as feruloil-esterases, na clivagem de ligações éster entre o ácido ferúlico, composto fenólico majoritário no trigo, e a arabinose dos arabinoxilanos (Coda et al., 2014).

Figura 7. Esboço da ação da endo-1,4-β-xilanase na clivagem de ligações 1,4-β-d-xilosídicas internas em resíduos de β-1,4-d-xilapiranose de xilanas (XIL). A hidrólise da extremidade não redutora de resíduos terminais de α-L-arabinofuranosídeo em α-L-arabinosídeos pela α-L-arabinofuranosidase resulta na liberação de monômeros de arabinose feruloilada (ARA). O ataque final das ligações éster entre a arabinose e o ácido ferúlico (FER) com a feruloil esterase resulta na liberação de ácido ferúlico livre. Fonte: Adaptado de Juhnevica-Radenkova et al. (2021)



Xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas extracelulares pertencentes à classe das hemicelulases responsáveis pela degradação da β-1,4-xilana, polissacarídeo de cadeia linear, em xilose. Essa classe de enzimas catalisa especificamente a hidrólise das ligações β-1,4 presentes na xilana, que é componente da hemicelulose, um dos principais constituintes da parede vegetal (Sungurtas et al., 2004). Na matriz complexa das paredes celulares vegetais, as xilanas estão fortemente associadas à celulose e à lignina por ligações covalentes e interações não covalentes, o que contribui para a estabilidade estrutural da parede celular (Botella et al., 2007). A eficiência da degradação da xilana pelas xilanases geralmente depende da atuação conjunta de um complexo enzimático denominado complexo xilanolítico, que inclui β-xilosidases, α-L-arabinofuranosidases, α-glucuronidases e esterases de ácidos fenólicos, como feruloil e *p*-cumaroil esterases, responsáveis por romper as ligações entre os ácidos fenólicos e os polissacarídeos da parede celular (Neeta, Abhay & Mala, 1999). Na panificação as xilanases são usadas principalmente na fabricação de pães integrais e têm um efeito positivo nas propriedades da massa, aumentando sua extensibilidade, e aumentando a qualidade do produto final por conta da solubilização de arabinoxilanos insolúveis e da redução de sua capacidade de

reter água, resultando na redistribuição da água a outros componentes da farinha, principalmente o glúten (Goesaert et al., 2005; Butt et al., 2008). No entanto, quantidades excessivas de xilanase resultam em massas fracas e pegajosas e pães com estrutura do miolo e distribuição alveolar irregular e cor da crosta com características indesejáveis. Isso ocorre devido à ampla degradação de arabinoxilanos e, consequentemente, à perda da capacidade de retenção de água da massa (Hilhorst et al., 2002).

A feruloil-esterase (EC 3.1.1.73) é uma enzima integrante do complexo xilanolítico, cuja função principal consiste em hidrolisar as ligações éster que unem o ácido ferúlico às cadeias polissacarídicas da xilana, atuando de forma sinérgica com as xilanases que expõem seus sítios de ação durante a degradação da parede celular vegetal (Long et al., 2016). O ácido ferúlico é majoritariamente encontrado associado à matriz lignocelulósica por meio de ligações éster entre seu grupo carboxílico e o 5-O do grupo hidroxila de resíduos de α-L-arabinofuranosil presentes em glucoroarabinoxilanas (Dilokpimol et al., 2016). As feruloil-esterases apresentam diversas aplicações industriais, incluindo sua utilização na liberação de açúcares fermentescíveis para produção de bioetanol (Tabka et al., 2006) e na melhoria de bebidas alcoólicas (Dilokpimol et al., 2016). Além disso, o ácido ferúlico liberado por essa reação enzimática é um composto de elevado valor agregado precursor na síntese de compostos aromáticos, como a vanilina e o guaiacol, de interesse para as indústrias alimentícia e cosmética (Di Gioia et al., 2011).

O efeito do uso de enzimas pode ser potencializado quando associado a outros processos como tratamentos hidrotérmicos. A despolimerização e solubilização de polissacarídeos como celulose e hemicelulose gerada pela combinação de alta pressão e calor do processo de autoclave favorece a exposição dos componentes celulares à ação de enzimas. Fazendo com que essas técnicas quando associadas aumentem significativamente a liberação de compostos fenólicos em comparação a aplicação das técnicas isoladas (Bautista-Exposito et al., 2020).

O bioprocessamento enzimático de cereais e subprodutos, como pães, é feito majoritariamente com enzimas comerciais que permitem um maior controle da ação enzimática e reprodutibilidade por serem produtos purificados ou isolados e com atividade enzimática conhecida (Kirk *et al*., 2002). Porém com o uso de enzimas comerciais limitado por seu alto custo, processos de fermentação em estado sólido se apresentam como um processo sustentável com papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos por promover a síntese de compostos de alto valor agregado, como enzimas, em decorrência do crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos (Rosales *et al*., 2018). Já foi relatada na literatura a produção de enzimas de interesse no bioprocessamento de pães e cereais, como xilanase,

feruloil-esterase, amilase e protease, por fermentação em estado sólido de diversos coprodutos industriais (Yin *et al*., 2018; Amorim *et al*., 2017; Outeiriño *et al*., 2019), além da viabilidade de aplicação desses materiais na formulação de pães (Waters *et al*., 2012; Almeida *et al*., 2020). Embora a produção de enzimas por processos fermentativos possa resultar em um espectro enzimático mais amplo que as versões comerciais, sua concentração e atividade podem variar de acordo com as condições de fermentação, o tipo de microrganismo e o substrato disponível (Angelino et al., 2017).

3.5 EFEITO DO BIOPROCESSAMENTO ENZIMÁTICO NO METABOLISMO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PÃES

O efeito do bioprocessamento enzimático na bioacessibilidade de compostos fenólicos em pães tem sido investigada em diversos estudos que avaliaram através de diferentes técnicas de digestão simulada in vitro a quantidade de compostos fenólicos que estariam acessíveis para absorção ao longo da digestão (**Tabela 1**).

As variações nos valores de bioacessibilidade observadas entre os estudos que avaliaram o impacto do bioprocessamento enzimático em pães podem ser atribuídas a múltiplos fatores experimentais. Diferenças na formulação dos pães, como o uso de farinhas de diferentes tipos ou a adição de frações de farelo, influenciam diretamente a quantidade e a forma em que os compostos fenólicos se encontram ligados à matriz. Além disso, o momento de adição das enzimas, que podem ser incorporadas diretamente à farinha ou aplicadas previamente em bioprocessamento de componentes como o farelo, bem como a combinação, a quantidade e o tipo de enzimas utilizadas impactam fortemente a liberação dos compostos fenólicos durante o processamento. Como apontado nos estudos, a ação conjunta de diferentes enzimas ou a ativação de enzimas endógenas por fermentação podem aumentar substancialmente a bioacessibilidade, enquanto o uso isolado ou em diferentes concentrações pode limitar esse efeito. Por fim, o método de digestão utilizado nos ensaios *in vitro* (estático ou dinâmico) e a redução do tamanho de partícula da matriz alimentar também são fatores determinantes que explicam a ampla variação nos resultados relatados (Angelino et al., 2017).

Tabela 1. Estudos in vitro que investigaram a bioacessibilidade de compostos fenólicos em pão após bioprocessamento enzimático

Referência	Cereal	Tipo de pão	Efeito na bioacessibilidade
Anson et al. (2009)	Trigo	Pão branco e Pão integral com farelo fermentado e bioprocessado enzimaticamente (β-glucanase, xilanase, α-amilase e feruloil esterase)	Aumento de 5,5% da bioacessibilidade de ácido ferúlico, 9,9% do ácido p cumárico e 5,0% do ácido sinápico
Mandak & Nystrom (2013)	Trigo	Pão integral, Pão integral com xilanase, pão integral com celulase e pão integral com xilanase e celulase	Aumento de 0,03% na bioacessibilidade de ácido ferúlico após o tratamento com xilanase e com celulase e 0,25% após o tratamento combinado das duas enzimas
Koistinen et al. (2017)	Trigo e centeio	Pão branco e pão com farelo de centeio fermentado e bioprocessado enzimaticamente (xilanase, amilase e feruloil esterase)	Aumento de 88% da bioacessibilidade de ácido ferúlico, 94% do ácido p cumárico e 91% do ácido sinápico
De Almeida et al. (2020)	Trigo	Pão integral e Pão integral bioprocessado enzimaticamente (xilanase e feruloil esterase)	Aumento de 36% na bioacessibilidade de ácido ferúlico

Apesar de ser um importante indício de que o bioprocessamento enzimático tem efeito positivo na liberação de compostos fenólicos, a determinação da bioacessibilidade *in vitro* não é suficiente para determinar como o uso de enzimas na produção de pães pode modificar o metabolismo de compostos fenólicos e de prever potenciais efeitos desse processamento na saúde humana. Sendo assim, estudos clínicos são importantes para compreender o efeito da aplicação desta técnica no metabolismo dessa classe de compostos bioativos.

O efeito positivo do bioprocessamento enzimático na biodisponibilidade de compostos fenólicos de pães já foi relatada na literatura (**Tabela 2**).

Tabela 2. Estudos clínicos que investigaram o efeito do bioprocessamento enzimático na biodisponibilidade de compostos fenólicos

Referência	Amostras	Tipo de estudo	Voluntários	Análise de metabólitos
Anson ***et al***. (2011)	Pão branco, pão branco com farelo de centeio e pão branco com farelo de centeio bioprocessado	Randomizado, cego e cruzado	*n* = 8 IMC = 20 a 30 kg/m²	Plasma 24 h Urina 24 h
Lappi ***et al***. (2013)	Pão branco, pão branco com farelo de centeio, pão branco com farelo de centeio bioprocessado	Randomizado e cruzado	*n* =15 IMC médio = 26 kg/m²	Urina 24 h
Turner ***et al***. (2021)	Pão branco não fermentado, pão integral não fermentado e pão integral não fermentado bioprocessado	Randomizado, cego e cruzado	*n* = 19 IMC = 24,2 ± 2,4 kg/m²	Plasma 7 h

Anson et al. (2011) concluiu com seu estudo que o bioprocessamento pode aumentar notavelmente a biodisponibilidade de ácidos fenólicos e seus metabólitos circulantes. Foi analisado o efeito do bioprocessamento do farelo em pão de trigo integral sobre a biodisponibilidade de ácidos fenólicos após o consumo de pão de trigo integral contendo farelo nativo (pão controle) ou farelo bioprocessado por fermentação de levedura combinada com tratamento enzimático (xilanase, celulase, β-glucanase e feruloil esterase). O bioprocessamento aumentou em 4 vezes o teor de ácido ferúlico solúvel no pão, e em mais de 1,5 vezes o teor de outros ácidos fenólicos, como o ácido sinápico, vanílico e 4-cumárico. Amostras de urina e sangue foram coletadas por 24 h para analisar os ácidos fenólicos e seus metabólitos. As biodisponibilidades de ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido sinápico e ácido 3,4-dimetoxibenzoico do pão bioprocessado foram de 2 a 3 vezes maiores que as do pão controle. O ácido fenilpropiônico e o ácido 3-hidroxifenilpropiônico foram os principais metabólitos colônicos dos fenóis não bioacessíveis.

Lappi et al. (2013) analisou através do consumo de pães de trigo branco fortificados com farelo de centeio bioprocessado com enzimas xilanase e feruloil esterase e leveduras, pão

de centeio integral e pão de trigo branco o efeito do bioprocessamento na absorção de ácidos fenólicos em humanos saudáveis. Foi feita coleta e análise de urina no estado basal e ao longo de 24 horas em períodos de quatro, oito e doze horas para analisar ácidos fenólicos e seus metabólitos, e de seis amostras de sangue ao longo de quatro horas para estudar o efeito da ingestão de pão nas respostas pós-prandiais de glicose e insulina. O bioprocessamento do farelo de centeio aumentou a proporção de ácido ferúlico livre e arabinoxilano solúvel no pão, em 12 e 2,5 vezes respectivamente. A ingestão do pão de trigo branco fortificado com farelo de centeio bioprocessado aumentou a excreção urinária de ácido ferúlico, particularmente durante as primeiras quatro horas, indicando aumento da absorção pelo intestino delgado. As respostas pós-prandiais de glicose e insulina foram semelhantes entre esses pães. O bioprocessamento do farelo de centeio não afetou a excreção de metabólitos dos ácidos benzoico, fenilpropiônico e fenilacético.

No estudo conduzido por Turner et al. (2021), observou-se que o consumo de pão não fermentado rico em fibras submetido a bioprocessamento enzimático resultou em um aumento significativo nos níveis plasmáticos de ácido ferúlico 2 horas após o consumo em comparação tanto ao pão branco quanto ao pão de controle rico em fibras não bioprocessado. O bioprocessamento com uma β-glucanase comercial, que também possui atividades de xilanase e feruloil esterase, aumentou em 6 vezes o teor de ácido ferúlico solúvel. Os autores destacam que o bioprocessamento enzimático prévio facilitou a liberação de ácido ferúlico da matriz alimentar ainda durante a panificação, permitindo uma absorção mais eficiente e precoce no trato gastrointestinal, em contraste com pães tradicionais nos quais a liberação depende primariamente da ação da microbiota no cólon. Além do aumento da biodisponibilidade do ácido ferúlico, o estudo demonstrou que esse efeito foi acompanhado por uma melhora significativa na vasodilatação aguda dependente do endotélio, sugerindo um benefício vascular associado à maior disponibilidade do composto fenólico.

Embora estudos clínicos tenham demonstrado que o bioprocessamento enzimático de pães pode influenciar o metabolismo de compostos fenólicos, é importante destacar que, até o momento, os participantes dessas investigações não foram estratificados de acordo com a composição corporal, como o índice de massa corporal (IMC) ou outros parâmetros antropométricos. Este aspecto é particularmente relevante, uma vez que a composição corporal está intimamente associada ao perfil da microbiota intestinal, que desempenha um papel central no metabolismo dos compostos fenólicos, especialmente daqueles de natureza insolúvel que são predominantes em pães e produtos derivados de cereais. Esses fenólicos, geralmente ligados de forma covalente à matriz alimentar, alcançam o cólon em sua maior parte intactos, onde são

extensamente metabolizados pela microbiota, resultando em metabólitos bioativos que podem variar de acordo com a composição microbiana individual. Diante disso, estudos que desconsiderem a variabilidade interindividual, especialmente no contexto da composição corporal e, consequentemente, da microbiota intestinal, podem subestimar ou mascarar os reais efeitos do bioprocessamento enzimático no metabolismo e biodisponibilidade dos fenólicos. Portanto, futuras pesquisas que considerem esses fatores são fundamentais para compreender de maneira mais precisa a eficácia dessa abordagem tecnológica na promoção de benefícios à saúde.

4 ENZIMAS PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS LIBERARAM ÁCIDO FERÚLICO EM PÃES INTEGRAIS BIOPROCESSADOS

Rodrigo dos Santos Costa, Suellen Silva de Almeida, Elisa d'Avila Costa Cavalcanti, Denise Maria Guimarães Freire, Nathália Moura-Nunes, Mariana Monteiro, Daniel Perrone. (2021). Enzymes produced by solid state fermentation of agro-industrial by-products release ferulic acid in bioprocessed whole-wheat breads, *Food Research International*, 140, 109843. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109843.

4.1 INTRODUÇÃO

O pão é um dos alimentos mais consumidos em todo o mundo e apresenta uma grande variedade de ingredientes, formatos, tamanhos e texturas de acordo com a cultura regional. O consumo de pão pode chegar até 100 g/dia em diversos países (Angelino et al., 2017). Pães integrais contêm alto teor de carboidratos e proteínas, além de vitaminas (principalmente do complexo B), fibras, minerais e compostos fenólicos. Estudos têm associado o consumo de compostos fenólicos à prevenção e redução de doenças cardiovasculares, diabetes e alguns tipos de câncer devido às suas propriedades antioxidantes, antimutagênicas e anti-inflamatórias (Acosta-Estrada et al., 2014; Reboredo-Rodríguez et al., 2018).

O grão de trigo (*Triticum astivum*) é rico em compostos fenólicos, sendo o ácido ferúlico o mais abundante, representando até 90% do seu conteúdo total (Yin et al., 2018). No entanto, até 99% deste composto está ligado à parede celular da matriz vegetal (Adom & Liu, 2002) e, portanto, menos disponível para absorção pelo corpo humano. Nesse sentido, estudos recentes relataram um aumento na biodisponibilidade de compostos fenólicos quando os alimentos foram submetidos a tratamento enzimático (Angelino et al., 2017; Anson et al., 2011). Dentre as enzimas utilizadas no bioprocessamento de alimentos com essa finalidade destacam-se a xilanase e a feruloil esterase. Essas enzimas integram o complexo xilanolítico, que degrada as hemiceluloses da parede celular vegetal, como as arabinoxilanas e suas ramificações, liberando ácido ferúlico (Neeta et al., 1999; Wu et al., 2017). Além disso, essas enzimas são comumente aplicadas na indústria de panificação, visando melhorar as propriedades tecnológicas e nutricionais dos pães. Embora o processamento enzimático da massa de pão seja preferível ao tratamento químico (Dahiya et al., 2018), o uso de enzimas comerciais é limitado devido ao seu alto custo.

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo verde que vem chamando a atenção para a produção de enzimas devido ao seu baixo custo, alto rendimento e ótimo aproveitamento de coprodutos e resíduos agroindustriais. Consiste no cultivo de microrganismos em um substrato sólido com água suficiente para manter a umidade e garantir o metabolismo microbiano (Rosales et al., 2018). O resíduo de malte cervejeiro, que tem produção estimada em 39 milhões de toneladas por ano (Lynch et al., 2016), é um dos subprodutos da agroindústria com potencial para ser utilizado como substrato para FES. Consiste na parte insolúvel do grão de cevada obtida após a preparação e filtração da cerveja. Outro subproduto é o farelo de cacau, originado da casca do grão do cacau (*Theobroma cacao L.)* durante a fabricação do chocolate. O farelo de cacau é obtido após a separação das sementes e durante a etapa de colheita, e é de grande preocupação ambiental na América do Sul e na África, pois nessas regiões são produzidas aproximadamente 16 milhões de toneladas desse subproduto (Vásquez et al., 2019). Já o farelo de trigo é um coproduto originado da indústria panificadora, representando a camada externa do grão composta por aleurona e pericarpo e obtida nas fases iniciais da moagem do trigo. A produção anual estimada é de 90 milhões de toneladas com baixo valor comercial e sendo utilizada principalmente na alimentação humana e animal (Prinsen et al., 2014).

Existe uma vasta literatura sobre produção de enzimas por FES e aplicação de enzimas na panificação (Kornbrust et al., 2012; Outeiriño et al., 2019; Zadeike et al., 2018). No entanto, poucos trabalhos relatam estes dois procedimentos em conjunto. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo utilizando *Aspergillus awamori* em resíduo de malte cervejeiro, farelo de cacau e farelo de trigo com aplicação adicional da amostra fermentada no desenvolvimento de massa de pão.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo inicial utilizar três coprodutos agroindustriais (resíduo de malte cervejeiro, farelo de cacau e farelo de trigo) para produção de enzimas por FES usando um microrganismo GRAS (do inglês, *generally recognized as safe*), *A. awamori*. É relatado que este fungo produz xilanase (Amorim et al., 2017) e tem a maior capacidade de produção de feruloil-esterase e amilase quando comparado com outras espécies de *Aspergillus* (Yin et al., 2018). Além disso, *A. awamori* tem sido estudado para enriquecimento nutricional alimentar por FES e apresentou liberação eficiente de compostos fenólicos de diferentes matrizes vegetais, embora esses estudos não analisem o conjunto de enzimas envolvidas nessa liberação (Dhull et al., 2020; SALAR, Purewal, & Sandhu, 2017; Costa Maia et al., 2020). Em seguida, investigamos o efeito das enzimas produzidas nas

propriedades tecnológicas (volume e densidade) e funcionais (teor de ácido ferúlico solúvel) do pão de trigo integral bioprocessado.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Matérias primas

Três coprodutos industriais foram utilizados no presente estudo. O farelo de trigo (Arma Zen, Rio de Janeiro, Brasil) foi adquirido em um mercado local na cidade do Rio de Janeiro (Brasil). O resíduo de malte cervejeiro foi doado pela indústria de cerveja artesanal Allegra® (Rio de Janeiro, Brasil) e foi liofilizado (LP 50, Liotop®) por aproximadamente 24 horas para evitar o crescimento microbiano durante o armazenamento. O farelo de cacau foi fornecido pelo Comitê Executivo do Plano da Lavoura do Cacau – CEPLAC (Ilhéus, Brasil), instituição pública de pesquisa vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. Tanto o farelo de cacau como o resíduo de malte cervejeiro foram moídos em moinho de facas laboratorial e depois particionados em agitador de peneira (tela de malha 20; Tyler). Todos os subprodutos apresentaram tamanhos de partículas variando de 1,18 a 1,70 mm.

4.2.2 Microrganismo

A cepa *Aspergillus awamori* IOC-3914 foi obtida da coleção de culturas do Instituto Oswaldo Cruz (IOC, Rio de Janeiro, Brasil). A cultura estoque do fungo foi cultivada durante sete dias em meio ágar batata dextrose (Vetec®, Duque de Caxias, Brasil) em incubadora a 30°C para ser utilizada na FES. Os esporos foram então colhidos usando uma alça de inoculação com tampão fosfato de sódio (50 mmol/L, pH 7,0). A concentração utilizada foi de 10^7 esporos/g de meio, determinada em câmara de Neubauer.

4.2.3 Fermentação em estado sólido

A fermentação dos coprodutos foi realizada em duplicata em biorreatores tipo bandeja de escala laboratorial (Bécheres de 10 cm de diâmetro) com 15 g de substrato, resultando em uma camada de substrato com 1 cm de altura. Apenas o farelo de cacau foi suplementado com 2% (m/m) de ureia (Sigma Aldrich®, EUA) para melhorar seu teor de nitrogênio (Amorim et al., 2017). Os biorreatores com os coprodutos foram esterilizados em autoclave e o teor de

umidade inicial de cada substrato foi ajustado à capacidade máxima de retenção de água do material: 55% (m/m) para o resíduo de malte cervejeiro, 60% (m/m) para o farelo de cacau e 70% (m/m) para o farelo de trigo. Após a inoculação (10^7 esporos/g de meio sólido seco), os biorreatores foram incubados em câmara de fermentação, a 30 °C e saturação ar-água de 90%, por 96 h. Amostras de cada réplica de fermentação de subproduto foram coletadas da câmara às 24 h, 48 h, 72 h e 96 h para análises posteriores.

4.2.4 Determinação da atividade de água, umidade e pH das amostras fermentadas

A atividade de água (Aw) foi determinada por meio de medidor de atividade de água (Aqualab®, EUA) e o teor de umidade, por meio do analisador de umidade MX-50 (A&D®, EUA) (Amorim et al., 2017). O pH das soluções aquosas das amostras fermentadas (1 g/10 mL de água destilada) foi determinado utilizando um medidor de pH (HI 2002, Edge®, EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.5 Atividades enzimáticas dos extratos brutos

4.2.5.1 Extração enzimática

As enzimas foram extraídas adicionando água destilada às amostras fermentadas (5 mL/g), seguida de mistura em agitador rotativo (35 °C, 200 rpm, 20 min). A suspensão resultante foi filtrada com gaze e centrifugada a 3.000 rpm por 5 min (Minispin, Eppendorf®, Alemanha) (Amorim et al., 2017). Os extratos enzimáticos brutos foram armazenados a 4 °C por no máximo 12 horas até os ensaios de atividade enzimática.

4.2.5.2 Atividade de feruloil esterase

A atividade da feruloil esterase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Mastihuba et al. (2002), com pequenas modificações, utilizando 300 µL de uma solução de ferulato de etila 1,33 mmol/L em tampão fosfato 50 mmol/L (pH 6,5) com 100 µL de extrato enzimático bruto. A reação foi mantida por 30 min a 40 °C e foi interrompida pela adição de 133 µL de uma solução de ácido sulfúrico 35 mmol/L seguida de neutralização com 133 µL de uma solução de hidróxido de sódio 70 mmol/L. As amostras foram filtradas (filtro de seringa de éster de celulose de 0,45 µm, Analítica®, São Paulo, Brasil) e a quantidade de ácido ferúlico liberado na solução foi avaliada por HPLC com detecção de absorbância UV.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido ferúlico por minuto nas condições do ensaio. Quatro repetições foram realizadas para cada determinação.

4.2.5.3 Atividade de xilanase

A atividade da xilanase foi determinada pelo método do açúcar redutor descrito por Miller (1959). Dez microlitros de extratos enzimáticos brutos foram incubados com 90 µL de uma solução de xilana de Birchwood (Sigma Aldrich®, EUA) a 1% (p/v). A reação foi realizada por 5 min a 40 °C, sendo então interrompida pela adição de 300 µL de solução de ácido dinitro salicílico (DNS), seguido de aquecimento a 100 ºC por 5 min e resfriamento até temperatura ambiente. As absorbâncias foram medidas a 540 nm num espectrofotómetro ultravioleta visível (UV) visível (UV-1800, Shimadzu®).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por minuto, nas condições do ensaio. Três repetições foram realizadas para cada determinação.

4.2.5.4 Atividade de amilase

A atividade da amilase também foi determinada utilizando o método do açúcar redutor de Miller (1959) em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu®) a 540 nm. Os volumes de cada extrato enzimático bruto e da solução de substrato (1% de amido, p/v, Sigma Aldrich, EUA) foram os mesmos descritos na seção 2.5.3.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por minuto, nas condições do ensaio. Três repetições foram realizadas para cada determinação.

4.2.5.5 Atividade de protease

A atividade da protease foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por de Castro, Castilho, & Freire (2014). A reação entre 50 µL de extrato enzimático bruto e 500 µL de solução de substrato (azocaseína 0,5%, p/v, Sigma Aldrich®, EUA) foi mantida a 40 °C por 5 min. Em seguida, foi adicionada uma solução de ácido clorídrico 1 M para interromper a reação. A solução obtida foi centrifugada e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 345 nm em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu®).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária que promova um aumento de uma unidade de absorbância a 345 nm por minuto, nas condições do ensaio. Três repetições foram realizadas para cada determinação.

4.2.6 Produção do pão

Foram produzidos três pães, em duplicata: pão controle (PC), pão bioprocessado adicionado de farelo de trigo fermentado (PBFT) e pão bioprocessado adicionado de resíduo de malte cervejeiro fermentado (PBRM). As formulações foram baseadas em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (ALMEIDA et al., 2020). O pão controle foi produzido utilizando farinha de trigo integral (405 g), farelo de trigo (45 g), açúcar mascavo (12 g), sal de cozinha (4,5 g), fermento biológico instantâneo (contendo *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado e emulsificante monoestearato de sorbitano) (4,5 g), azeite virgem extra (22,5 mL) e água (320 mL). Para produzir PBFT, parte do farelo de trigo (9 g) foi substituída por farelo de trigo fermentado por 24 h e parte da água (45 mL) foi substituída pelo extrato enzimático bruto correspondente. Para produzir PBRM, parte do farelo de trigo (9 g) foi substituída por resíduo de malte fermentado por 48 h e parte da água (45 mL) foi substituída pelo extrato enzimático bruto correspondente (**Tabela 3**). Todos os ingredientes foram adquiridos em supermercados locais do Rio de Janeiro (Brasil).

Tabela 3. Formulação do pão controle (PC), pão bioprocessado adicionado de farelo de trigo fermentado (PBFT) e pão bioprocessado adicionado de resíduo de malte cervejeiro fermentado (PBRM).

Ingredientes	**PC**	**PBFT**	**PBRM**
Farinha de trigo integral (g)	405	405	405
Farelo de trigo (g)	45	36	36
Açúcar mascavo (g)	12	12	12
Sal (g)	4.5	4.5	4.5
Fermento biológico instantâneo (g)	4.5	4.5	4.5
Azeite de oliva (mL)	22.5	22.5	22.5
Farelo de trigo fermentado (g)	-	9	-
Resíduo de malte fermentado (g)	-	-	9
Água (mL)	320	320	320

As amostras foram produzidas em panificadora automática (MultiPane, Britânia®, Brasil) programada para realizar uma mistura inicial da farinha de trigo, farelo de trigo, água e extrato enzimático (7 min a 28 °C), seguida de um período de autólise (35 min a 28 °C), mistura dos ingredientes restantes (27 min a 28 °C), fermentação (130 min a 39 °C) e forneamento (60 min a 164 °C).

4.2.7 Propriedades físicas dos pães

Após resfriamento à temperatura ambiente, os pães foram pesados em balança comercial (Mettler P1000N®, EUA) e tiveram seu volume aparente estimado pelo Método AACC 10-05.01, com adaptações. A densidade aparente foi determinada como a razão entre a massa e o volume dos pães. Por fim, os pães foram moídos em processador de alimentos e armazenados sob vácuo em sacos plásticos a -20 °C até a análise.

4.2.8 Análise do teor de ácido ferúlico solúvel

Em artigo publicado recentemente pelo nosso grupo de pesquisa em condições semelhantes, o ácido ferúlico foi o único composto fenólico liberado por bioprocessamento enzimático (Almeida et al., 2020). Portanto, apenas este composto foi analisado no presente estudo. A extração de ácido ferúlico solúvel em amostras de farelo de trigo, farelo de trigo fermentado, resíduo de malte cervejeiro fermentado e pães foi realizada em duplicata de acordo com a metodologia descrita por Dinelli et al. (2011). Uma alíquota de 1 g de amostra foi extraída com 10 mL de etanol aquoso 80% sob agitação por 10 min e depois centrifugada (3.600 rpm, 5 min, 10 °C) (Sorvall ST 16R, TX-400 4 x 400 mL Swinging Bucket Rotor, Thermo Scientific™, Osterode, Alemanha). O sobrenadante foi coletado e o resíduo re-extraído. Os sobrenadantes coletados foram reunidos, o solvente foi removido em evaporador rotativo (R-215, Büchi®, Flawil, Suíça) e o resíduo seco foi reconstituído com 10 mL de água.

O ácido ferúlico foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um sistema LC (Shimadzu®, Kyoto, Japão) composto por uma bomba quaternária (LC-20AT), um detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M20A), um degaseificador (DGU-20A5) e um controlador (CBM-20A) conectado a um computador equipado com o Software LabSolutions (Shimadzu Corporation®, versão 5.82, 2015). Uma coluna de fase reversa (C18, 5 μm, 250 mm × 4,6 mm, Phenomenex®) foi utilizada para separação cromatográfica aplicando uma eluição gradiente (Alves & Perrone, 2015). A fase móvel consistiu de 1% de acetonitrila e

0,3% de ácido fórmico em água (eluente A) e 1% de acetonitrila em metanol (eluente B), com vazão de 1,0 mL/min e 10 µL de volume de injeção. Antes da injeção, a coluna foi equilibrada com 18,2% de B e logo após a injeção da amostra, essa proporção foi aumentada para 20,2% em 1 min, depois elevada constantemente para 60,4% até 20 min, quando foi modificada para a proporção inicial de 18,2% e foi mantida constante até 35 min.

A identificação do ácido ferúlico foi feita pela comparação do tempo de retenção e do espectro UV de um padrão comercial (Sigma-Aldrich, EUA). A padronização externa foi realizada para quantificação e os resultados foram expressos em mg/100 g de pão. Para rastrear a origem do ácido ferúlico nos pães, foi determinada a quantidade de ácido ferúlico solúvel proveniente dos ingredientes que mudaram nas formulações PBFT e PBRM em comparação ao PC e o teor final foi corrigido.

4.2.9 Análises estatísticas

Todos os dados foram processados utilizando o software Prism para Windows, versão 6.01 (GraphPad Software Inc.). Para comparar as atividades enzimáticas entre os tempos de fermentação para cada coproduto, foi realizada ANOVA seguida por pós teste de comparações múltiplas de Tukey. As atividades enzimáticas dos extratos utilizados no processamento do pão foram comparadas pelo teste t de Student não pareado. O volume, a densidade aparente e o teor de ácido ferúlico solúvel dos pães bioprocessados foram comparados ao PC usando ANOVA seguido por pós teste de Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

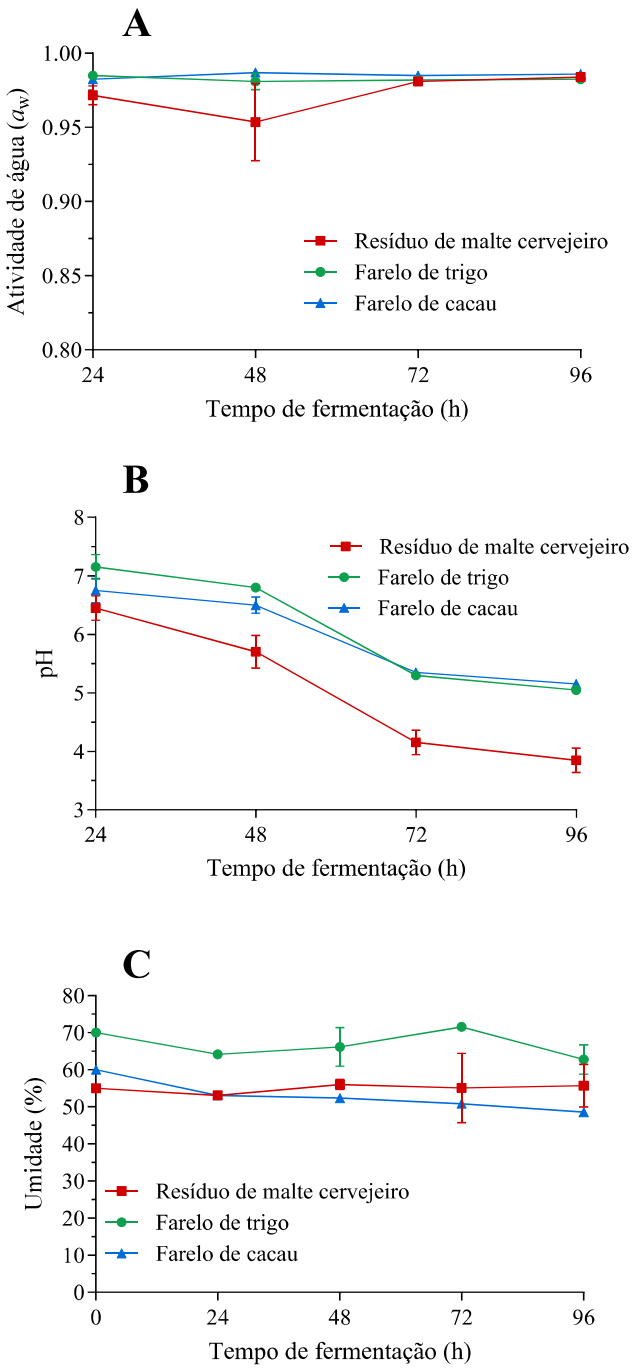
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1 Os extratos enzimáticos brutos de farelo de trigo e resíduo de malte cervejeiro apresentaram os perfis enzimáticos mais adequados

É sabido que tanto a cultura iniciadora quanto o substrato de fermentação influenciam a produção de enzimas e, portanto, a aplicação em produtos alimentícios (Dhull et al., 2020; Salar et al, 2017; Salar, PurewaL, & Bhatti, 2016). Em nosso estudo, três coprodutos industriais foram avaliados como substrato para FES com *A. awamori*, a fim de produzir enzimas com potencial para aplicação em panificação, como amilase e xilanase, que estão comercialmente disponíveis para uso pela indústria para melhorar propriedades tecnológicas de pães. Durante 96 horas de

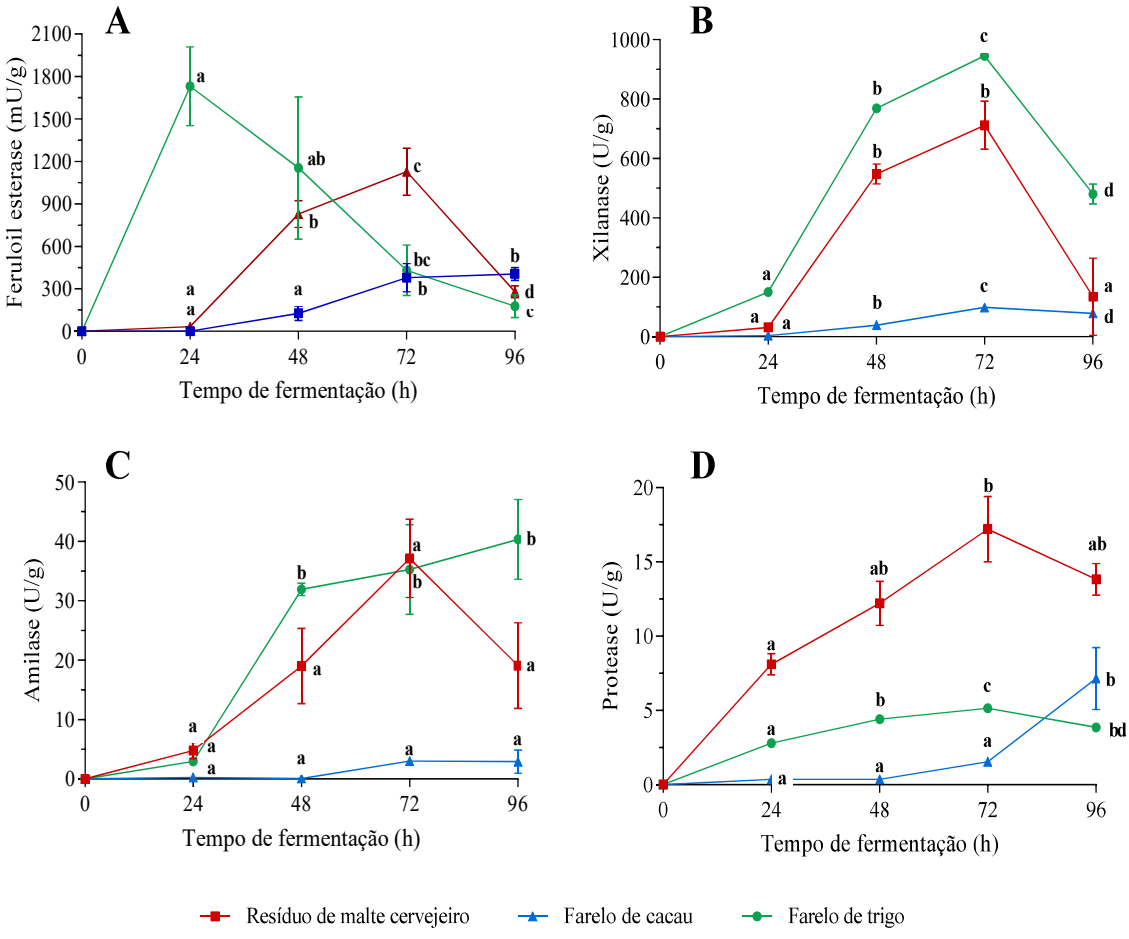
fermentação, o farelo de cacau, o farelo de trigo e o resíduo de malte cervejeiro foram capazes de suportar o crescimento do fungo. Os parâmetros de controle da FES apresentaram comportamento desejável, com manutenção da atividade de água e teor de umidade e uma pequena redução nos valores de pH (**Figura 8**).

Figura 8. Parâmetros de controle da fermentação em estado sólido: atividade de água (A), pH (B) e umidade (C).



O extrato fermentado de farelo de trigo apresentou a maior atividade de feruloil esterase (1.730 mU/g) às 24 h de fermentação (**Figura 9A**), seguido pelo extrato fermentado de resíduo de malte cervejeiro (1.128 mU/g), que exibiu alta atividade apenas às 72 h de fermentação.

Figura 9. Atividades das enzimas feruloil-esterase (A), xilanase (B), amilase (C) e protease (D) presentes nos extratos brutos obtidos dos produtos de fermentação em estado sólido de resíduo de malte cervejeiro, farelo de cacau e farelo de trigo. Cada valor é uma média de três ensaios replicados ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa nas atividades enzimáticas entre tempos de fermentação de cada subproduto (ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey, p <0,05).



O farelo de cacau apresentou atividade de feruloil esterase muito menor (405,8 mU/g) e apenas às 96 h de fermentação. Outros estudos que avaliaram resíduo de malte cervejeiro como substrato para FES encontraram atividades semelhantes de feruloil esterase usando *Penicillium brasilianum* (1.542 mU/g) e *Aspergillus brasiliensis* (1.050 mU/g), com tempos de fermentação mais longos (até 120 h). No entanto, estes autores complementaram o meio com NH_4SO_4, KH_2PO_4 e extrato de levedura para aumentar o conteúdo de nitrogênio, carbono ou

minerais (Panagiotou et al. 2006; Outeiriño et al. 2019). Vale ressaltar que, no presente trabalho, encontramos valores semelhantes sem suplementos e utilizando um microrganismo GRAS, pois objetivamos produzir um material fermentado comestível para produção de pão.

O extrato fermentado de farelo de trigo também apresentou a maior atividade de xilanase (868,1 U/g às 72 h de fermentação), seguido novamente pelo extrato fermentado de resíduo de malte cervejeiro (547,9 U/g às 48 h de fermentação) (**Figura 9B**). A hemicelulose do farelo de trigo e do resíduo de malte é composta principalmente por arabinoxilanas, representando até 70% e 40% do seu peso seco total, respectivamente (Ikram et al., 2017; YIN et al., 2018). Bhardwaj et al., (2019) relataram que a xilana é um indutor bem conhecido da produção de xilanase. Assim, esperava-se que esses subprodutos apresentassem maiores atividades de xilanase quando comparados ao farelo de cacau (maior atividade de xilanase de 98 U/g às 72 h de fermentação), que possui baixo teor de hemicelulose (Lecumberri et al., 2007). Além disso, Teles et al. (2018) associaram a baixa produção de xilanase por FES ao alto teor de lignina do substrato, pois os microrganismos teriam dificuldade de acesso à celulose e à hemicelulose. Nesse sentido, o maior teor de lignina do farelo de cacau relatado na literatura (32,41 g/100 g) (Lecumberri et al., 2007) em comparação ao do resíduo de malte cervejeiro (11,9 a 27,8 g/100 g) (Ikram et al., 2017) e do farelo de trigo (11,50 g/100 g) (Teles et al., 2018) também podem explicar nossos resultados. Para a panificação, todo o complexo de enzimas xilanolíticas é interessante, uma vez que estas enzimas trabalham juntas na degradação dos polissacarídeos de xilana e, portanto, empregamos um método que quantifica a atividade xilanolítica global, incluindo endo e exo atividades.

O extrato de farelo de trigo também apresentou maior atividade de amilase (40,3 U/g às 96 h de fermentação), seguido pelo resíduo de malte cervejeiro (37,2 U/g às 72 h de fermentação), enquanto o farelo de cacau apresentou atividade muito baixa ao longo das 96 h de fermentação (**Figura 9C**). Xu et al. (2008) relataram maiores atividades de amilase (3.300 a 5.800 U/g) usando *A. oryzae* como microrganismo, resíduo de malte como substrato e licor de maceração de milho, $MgSO_4$ e $CaCl_2$ como suplementos. Tal como acontece com as xilanases, diferentes tipos de amilases também atuam sinergicamente na degradação do amido e são importantes para a panificação. Assim, o método utilizado para quantificar a atividade da amilase foi um método não específico, que inclui atividades de endo e exo-amilase.

A maioria dos estudos que abordam a FES para produção de enzimas xilanolíticas não investiga a produção concomitante de peptidases. No entanto, considerando a futura aplicação no bioprocessamento de pão, consideramos que esta avaliação é essencial devido ao efeito potencialmente negativo que esta enzima pode causar na massa do pão, pois pode enfraquecer

a rede de glúten e, consequentemente, alterar sua textura. O resíduo de malte cervejeiro apresentou a maior atividade proteolítica (17,2 U/g às 72 h de fermentação), seguida pelo farelo de cacau (7,1 U/g às 96 horas de fermentação) e farelo de trigo (5,1 U/g às 72 h de fermentação) (**Figura 9D**). Para efeito de comparação, vários outros estudos que objetivaram a produção de protease relataram atividades variando de 114 a 9.545 U/g (Souza et al., 2015).

Considerando a aplicação de enzimas produzidas por FES para o bioprocessamento de pão, pretendemos ter um pool enzimático com a maior atividade de feruloil esterase, associada a atividades razoavelmente altas de xilanase e amilase e baixas atividades de protesase. Com base nisso, o farelo de trigo fermentado por 24 h foi selecionado, pois apresentou a atividade máxima da feruloil esterase para a fermentação do farelo de trigo. Além disso, o resíduo de malte cervejeiro fermentado por 48 h também foi selecionado, pois apresentou quase a mesma atividade de feruloil esterase que 72 h (**Figura 8A**), mas com uma economia de tempo significativa (17,27 mU/g*h para 48 h e 13,01 mU/g* h por 72 h). O uso do farelo de cacau fermentado foi considerado inviável por apresentar atividades enzimáticas insuficientes para o bioprocessamento do pão.

As atividades enzimáticas dos extratos de farelo de trigo e resíduo de malte cervejeiro selecionados para aplicação em pães são mostradas na **Tabela 4**. Os coprodutos fermentados foram adicionados integralmente às massas de pães, evitando a necessidade de extração, purificação e formulação de enzimas, reduzindo assim o custo de produção de pães e garantindo o aproveitamento integral da biomassa do coproduto.

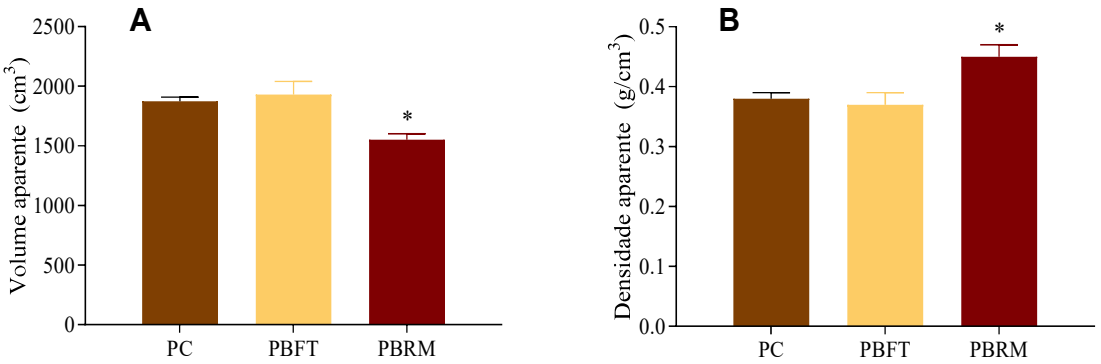
Tabela 4. Atividade das enzimas presentes nos extratos brutos, derivados de fermentação em estado sólido de coprodutos agroindústrias, utilizados para o bioprocessamento de pães.

	Farelo de trigo fermentado (24 h)	**Resíduo de malte cervejeiro fermentado (48 h)**
Feruloil esterase (mU/g)	1,731.2 ± 278	828.9 ± 166.9
Xilanase (U/g)	150.3 ± 5.0	547.9 ± 11.4
Amilase (U/g)	3.0 ± 0.1	19.0 ± 6.4
Protease (U/g)	2.7 ± 0.1	12.2 ± 1.5

4.3.2 O uso de resíduo de malte cervejeiro fermentado prejudicou o volume e a densidade dos pães bioprocessados

O PBRM apresentou menor volume e, portanto, maior densidade quando comparado ao PC ($p < 0,05$), enquanto esses parâmetros foram semelhantes entre o PBFT e o PC (**Figura 10**).

Figura 10. Volume aparente (A) e densidade aparente (B) das amostras de pão. A presença do símbolo (*) indica diferença significativa em relação à amostra controle (ANOVA seguida pelo pós-teste de Dunnett, $p<0,05$). PC = pão controle; PBFT = pão bioprocessado adicionado de farelo de trigo fermentado; PBRM = pão bioprocessado adicionado de resíduo de malte cervejeiro fermentado.



Durante o período de fermentação dos pães, embora a massa do PBRM tenha apresentado maior aumento de volume, os gases produzidos não foram retidos ao final do processo. É provável que o perfil enzimático do resíduo de malte fermentado, que apresenta maiores atividades de xilanase, amilase e protease quando comparado ao farelo de trigo fermentado (**Tabela 4**), possa ter causado esse efeito indesejável, fazendo com que a massa perdesse sua capacidade de retenção de ar. Na indústria de panificação, o uso de xilanase é um procedimento comum para melhorar as propriedades tecnológicas dos pães. O aumento das hemiceluloses hidrossolúveis devido à degradação das insolúveis em água permite que a massa incorpore mais água, o que leva ao aumento do volume final, à redução da firmeza e consequentemente à melhoria das propriedades reológicas dos pães (Dahiya et. al., 2018). Porém, uma ação excessiva da xilanase pode levar ao contrário: redução do volume final e comprometimento das propriedades reológicas. Além disso, o momento em que a xilanase é adicionada à massa também parece ser de grande importância, uma vez que foi demonstrado que maiores rendimentos de glúten na massa de pão ocorreram quando a xilanase foi adicionada após a mistura dos demais ingredientes, durante a fase de diluição, e menor teor de glúten. rendimentos, quando a enzima foi adicionada no início do preparo da massa (Wang et al., 2004).

Outras duas enzimas presentes nos extratos brutos, amilase e protease, também são importantes nas propriedades tecnológicas dos produtos de panificação. A amilase atua diretamente no amido da farinha de trigo aumentando a quantidade de açúcares fermentáveis que serão utilizados pelo microrganismo, gerando dióxido de carbono como produto. O ar incorporado à massa permite seu desenvolvimento e crescimento e, portanto, produz um produto final mais aerado, com estrutura de miolo mais fino (Kornbrust, Forman, & Matveeva, 2012), e menor dureza e envelhecimento do miolo (Tebben *et al*., 2018; Matsushita *et al*., 2017). As proteases têm uma aplicação muito específica, sendo utilizadas principalmente na produção de biscoitos, bolachas, bolos ou *wafers* (Kornbrust *et al*., 2012). Altos teores desta enzima, principalmente na farinha de trigo mole, podem afetar negativamente a massa, tornando-a mais macia, menos elástica e mais pegajosa (Zadeike *et al*., 2018).

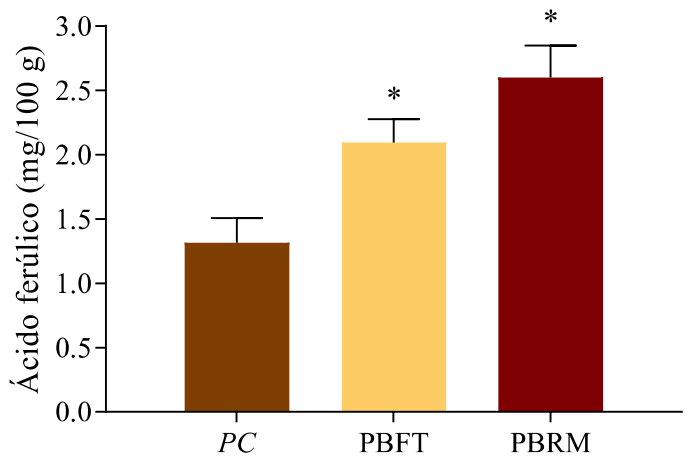
Vale ressaltar que os pães integrais, como os elaborados no presente estudo, contêm elevados teores de fibras derivadas da farinha de trigo integral e do farelo, o que pode prejudicar a formação da rede de glúten (Tebben *et al*., 2018). Por esta razão, a indústria panificadora normalmente incorpora glúten adicional a estes pães, a fim de aumentar a elasticidade da massa, melhorando assim a capacidade de retenção de ar e o volume final (Tebben *et al*., 2018).

4.3.3 O bioprocessamento enzimático com ambos os coprodutos fermentados liberaram ácido ferúlico em pão integral

PBFT e PBRM apresentaram maiores teores ($p<0,05$) de ácido ferúlico solúvel (2,09 mg/100 g e 2,60 mg/100 g, respectivamente) do que o PC (1,32 mg/100 g) (**Figura 11**). O teor de ácido ferúlico aumentou 159% para PBFT e 198% para PBRM. Considerando o teor de ácido ferúlico solúvel do farelo de trigo (1,80 ± 0,10 mg/100 g), farelo de trigo fermentado (6,37 ± 0,48 mg/100 g) e resíduo de malte cervejeiro fermentado (9,78 ± 0,20 mg/100 g) e a pequena quantidade desses ingredientes nos pães, pode-se concluir que o bioprocessamento enzimático foi o principal fator responsável pelo aumento do teor de ácido ferúlico solúvel nos pães. Juntos, esses resultados confirmam nossa hipótese de que o bioprocessamento enzimático teria um efeito positivo na liberação de ácido ferúlico ligado à matriz alimentar. Já foi relatado que a aplicação de enzimas no bioprocessamento de pão aumenta o teor de ácido ferúlico solúvel em até 430% (Anson *et al*., 2009). Nesse trabalho, porém, as enzimas ficaram em contato com a massa por um período maior (20 h) em comparação ao empregado no presente trabalho (3,3 h), possivelmente explicando a maior liberação de ácido ferúlico. Angelino et al. (2017) sugeriram que algumas técnicas de processamento, como o bioprocessamento enzimático, podem

representar estratégias valiosas para aumentar o conteúdo fenólico nas matérias-primas e para aumentar a quantidade de compostos bioacessíveis e biodisponíveis. Recentemente, Almeida et al. (2020) relataram que o bioprocessamento enzimático semelhante ao presente estudo liberou compostos fenólicos do pão, aumentou sua bioacessibilidade e acelerou a liberação de ácido ferúlico durante a fermentação intestinal. Mateo Anson et al. (2011) demonstraram que o bioprocessamento aumenta a biodisponibilidade do ácido ferúlico e outros ácidos fenólicos do pão integral e tem efeitos imunomoduladores no modelo *ex vivo*. Considerando que os benefícios para a saúde do consumo de compostos fenólicos são altamente dependentes da sua bioacessibilidade e biodisponibilidade (Shahidi & Peng, 2018), os pães com maior teor de ácido ferúlico solúvel são potencialmente mais saudáveis. Numa revisão, Silva & Batista (2017) relataram que o ácido ferúlico está associado a efeitos benéficos contra distúrbios relacionados ao estresse oxidativo, incluindo câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas.

Figura 11. Teor de ácido ferúlico no pão controle (PC), pão bioprocessado adicionado de farelo de trigo (PBFT) e pão bioprocessado adicionado de resíduo de malte cervejeiro (PBRM). A presença do símbolo (*) indica diferença significativa em relação à amostra controle (ANOVA seguida pelo pós-teste de Dunnett, $p<0,05$).



Vale ressaltar que embora o extrato enzimático de farelo de trigo apresentasse maior atividade de feruloil-esterase em comparação ao extrato enzimático de resíduo de malte cervejeiro, a quantidade de ácido ferúlico liberado foi maior no PBRM em comparação ao PBFT. Pode-se supor que a maior atividade de xilanase do extrato de resíduo de malte cervejeiro pode ter desempenhado um papel significativo na degradação das arabinoxilanas e que a feruloil-esterase poderia ter seu efeito restringido pela baixa atividade de xilanase. Estudos anteriores sugerem que a feruloil esterase e a xilanase atuam sinergicamente com outras

enzimas xilanolíticas para degradar os polissacarídeos de arabinoxilano em fragmentos menores (Bhardwaj et al., 2019; Tabka et al., 2006). Os resíduos de xilose estão ligados através de ligações β-1,4-glicosídicas formando a estrutura estrutural dos arabinoxilanos. O ácido ferúlico pode ser encontrado nesta estrutura, seja através de ligação éster para substituir alguns resíduos de arabinose ou através de ligações cruzadas entre cadeias de arabinoxilano através de pontes de ésteres diferulados (Ikram et al., 2017). Portanto, deve existir um equilíbrio entre as atividades da feruloil esterase e da xilanase aplicadas na massa de pão, uma vez que ambas as enzimas provavelmente contribuem para a liberação de compostos fenólicos.

4.4. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram desenvolvidos pães bioprocessados com maior teor de ácido ferúlico solúvel utilizando sólidos fermentados de baixo custo como fonte enzimática. Este conceito reúne diversas vantagens em relação a outros relatados na literatura: a utilização de coprodutos agroindustriais para a produção de enzimas possibilita a valorização desses materiais de segunda geração; a adição integral dos sólidos fermentados à massa do pão resulta num processo de desperdício zero; o baixo custo dos sólidos fermentados com enzimas permite uma aplicação mais ampla deste bioprocesso na indústria da panificação; e, finalmente, um pão mais barato e potencialmente mais saudável poderá ser consumido por um maior número de consumidores.

O *Aspergillus awamori* apresentou alta capacidade de produção de enzimas por fermentação em estado sólido sobre farelo de trigo e resíduo de malte cervejeiro. A aplicação de farelo de trigo fermentado no bioprocessamento de pães liberou ácido ferúlico sem prejudicar suas propriedades tecnológicas. Assim, esta estratégia revelou-se adequada para a gestão deste coproduto agroindustrial, uma vez que aumenta o seu valor agregado com um conceito de desperdício zero.

5 INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE PROCESSAMENTO E DO MÉTODO DE SECAGEM NO PERFIL DE SOLUBILIDADE E NO TEOR DE ÁCIDO FERÚLICO DE AMOSTRAS DE FARELO DE TRIGO

5.1 INTRODUÇÃO

O farelo de trigo é um subproduto do processo de moagem do trigo composto majoritariamente pela camada de aleurona (49%) e camada intermediária (30%), e por outras partes do grão de trigo, como o endosperma amiláceo (15%) e o pericarpo externo (6%) (Antoine et al., 2004). Este material apresenta elevado valor nutricional, contendo cerca de 45% de fibras, 20% de proteínas, 20% de amido, 5% de lipídios e 5% de minerais, além de ser fonte de compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos (Li et al., 2022).

As camadas externas do grão de trigo podem conter uma ampla gama de ácidos fenólicos, incluindo ácidos hidroxibenzóicos, como os ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico e gálico, e ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos ferúlico, desidrodímeros de ácido ferúlico, desidrotrímeros de ácido ferúlico, ácido sinápico, e ácido *p*-cumárico. O ácido ferúlico, principal composto fenólico do farelo de trigo é oriundo majoritariamente do pericarpo, aleurona e camada intermediária do grão, seus dímeros e trímeros são majoritariamente oriundos do pericarpo, enquanto os outros compostos são encontrados em maior concentração no aleurona do grão (Ladomadda & Mita, 2015). O teor de compostos fenólicos no farelo de trigo é de aproximadamente 43 mg/ 100 g (Ladomadda & Mita, 2015), e o ácido ferúlico, composto majoritário, representa cerca de 90% do total de ácidos fenólicos dessa matriz alimentar, estando aproximadamente 99% na forma insolúvel (WANG; HE & CHEN, 2014). Os compostos insolúveis se encontram ligados a componentes estruturais da parede celular por meio de ligações éster, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Ladomadda & Mita, 2015; Li et al., 2022).

A forma com que o composto está presente no alimento, seja livre ou ligado à matriz estrutural, influencia diretamente sua bioacessibilidade (a fração liberada no trato gastrointestinal disponível para absorção), sua biodisponibilidade (a fração efetivamente absorvida, distribuída e metabolizada) e sua ação biológica (Shahidi & Peng, 2018). O perfil de baixa solubilidade dos compostos fenólicos no farelo de trigo diminui a acessibilidade e reduz a absorção no trato digestivo superior, fazendo com que a maior parte dos compostos fenólicos necessitem de extensa ação enzimática e metabolização da microbiota colônica para serem

liberados e absorvidos e exercerem efeitos bioativos (Jakobek & Matic, 2019). Os compostos fenólicos presentes no farelo de trigo demonstraram ter capacidade de regular o estado oxidativo celular, evitando danos oxidativos a moléculas biologicamente importantes e desempenhando um papel na prevenção da inflamação e na redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, como diabetes mellitus tipo 2 e câncer de cólon (Zhou, Su E Yu, 2004). Porém, esses benefícios à saúde dependem da bioacessibilidade e da biodisponibilidade dos compostos fenólicos, logo a aplicação de técnicas de processamento que liberem esses compostos é crucial para aumentar a sua bioacessibilidade e modular o valor funcional do farelo de trigo (Li et al., 2022).

Diversas estratégias com potencial para aumentar a bioacessibilidade de compostos fenólicos em cereais e seus subprodutos têm sido relatadas na literatura, incluindo tratamentos mecânicos, térmicos e enzimáticos (Angelino *et al*., 2017; Wang, He & Chen, 2014). O bioprocessamento enzimático aumentou a bioacessibilidade de compostos fenólicos em pães de trigo (Almeida et al, 2020; Anson et al., 2009) por conta da ação sinérgica das enzimas do complexo xilanolítico, xilanase e feruloil-esterase, que promovem a degradação de arabinoxilanos e a liberação de ácido ferúlico (Juhnevica-Radenkova et al., 2021). Em tratamentos hidrotérmicos que combinem calor com alta pressão, como a autoclavagem, a liberação de compostos fenólicos está associada a quebra da parede celular vegetal e a hidrólise parcial dos polissacarídeos em consequência das condições de alta pressão e alta temperatura (Bautista-Expósito et al, 2020).

Por outro lado, os tratamentos térmicos podem ter um efeito negativo sobre os compostos fenólicos de cereais, promovendo a degradação de parte desses compostos. Os efeitos diferenciados desses tratamentos podem estar associados ao tipo de grão, à natureza e à localização dos compostos fenólicos na matriz alimentar, bem como à severidade e à duração do processamento térmico (Wang, He & Chen, 2014). Isso ressalta a importância de modular as condições de processamento para alcançar resultados desejáveis, como o o aumento da bioacessibilidade sem que ocorra a degradação excessiva das substâncias de interesse.

O presente trabalho tem como objetivo aprofundar o conhecimento sobre a influência de métodos de processamento e secagem no perfil de solubilidade e no teor de ácido ferúlico no farelo de trigo. Essa investigação será realizada através da avaliaçãodo impacto da autoclavagem e do bioprocessamento enzimático, tanto isolado quanto combinados, além do efeito de diferentes intensidades de calor durante os processos de secagem na liberação de ácido ferúlico. Além de verificar a viabilidade de aplicação do farelo bioprocessado na produção de

pães com potencial bioativo, devido ao provável aumento da quantidade de ácido ferúlico solúvel.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Matéria Prima

O farelo de trigo do tipo fino (Arma Zen®, Rio de Janeiro, Brasil) foi obtido em um mercado local na cidade do Rio de Janeiro (Brasil).

5.2.2 Preparado Enzimático

O preparado enzimático Pentopan® 500 BG foi doado pela empresa Novozymes®. O preparado enzimático é comercializado para utilização em indústria de alimentos com atividade declarada de xilanase (endo-1,4). A empresa forneceu os certificados de segurança e conformidade, bem como as especificações de pureza para a enzima utilizada (**Anexo 1**)..

5.2.3 Atividade enzimática

Foram determinadas as atividades das enzimas feruloil esterase e xilanase do preparado enzimático Pentopan®. As análises foram realizadas em triplicata e as atividades foram expressas em atividade por miligrama de preparado enzimático (U/ mg de Pentopan®).

5.2.3.1 Feruloil esterase

A atividade da enzima feruloil-esterase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Costa et al. (2021). A solução de etil ferulato (300 µL; 1,33 mM) em tampão fosfato (0,05 M; pH 6,5) foi utilizada como substrato de reação. Foram adicionados ao substrato 100 µL de uma solução de Pentopan® 25 mg/ mL e a reação foi mantida à 40 ºC por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 133 µL de uma solução de ácido sulfúrico 0,35 M e posteriormente neutralizada com 133 µL de hidróxido de sódio 0,7 M. Nos brancos da análise, as soluções de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio foram adicionadas antes do substrato. As amostras foram filtradas (filtro de seringa de éster de celulose de 0,45 µm, Analítica®, São Paulo, Brasil) e a quantidade de ácido ferúlico liberado na solução foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência associada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (Shimadzu®, Kyoto, Japão), utilizando uma coluna de cromatografia Kromasil® C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm), com volume de injeção de 25 µL. A corrida realizada foi do tipo isocrática, tendo como fase móvel uma mistura de metanol (58%) e acetonitrila (1%), com fluxo de

1mL/min. No comprimento de onda de 325 nm foram detectados os sinais analíticos referentes ao etil ferulato e ao ácido ferúlico, substrato e produto da reação enzimática da feruloil-esterase. A identificação do ácido ferúlico se deu por comparação do tempo de retenção e espectro de absorção no UV com padrão comercial e a sua quantificação foi feita por meio de curva de calibração. A quantidade inicial de ácido ferúlico presente nos brancos dos ensaios foi descontada.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de ácido ferúlico por minuto nas condições do ensaio. Quatro repetições foram realizadas para cada determinação.

5.2.3.2 Xilanase

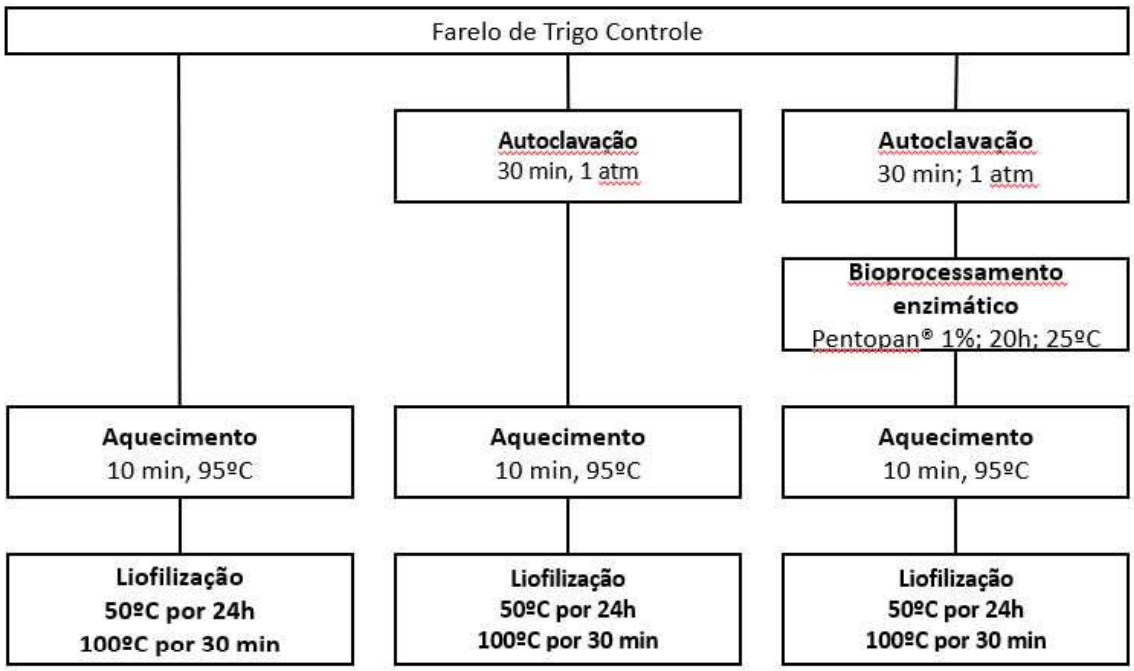
A atividade da enzima xilanase foi determinada através do método do açúcar redutor de Miller (1959). Foi utilizada como substrato de reação uma solução de xilana de Birchwoord (Sigma-Aldrich®, EUA) 1% (p/v) em tampão universal (pH 5,0). A reação ocorreu utilizando 10μL de uma solução de Pentopan® (25 mg/mL) e 90 μL de solução de xilana a 40 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 300 μL de solução DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) seguida de aquecimento a 100 °C por 5 minutos, resfriamento até temperatura ambiente e adição de 1,0 mL de água destilada. A absorbância da solução em 540 nm foi determinada em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu®).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol de açúcar redutor por minuto, nas condições reacionais.

5.2.4 Condições de processamento do farelo de trigo

A **Figura 12** apresenta um resumo dos processamentos empregados e as amostras de farelo de trigo obtidas.

Figura 12. Esquema metodológico das condições de processamento do farelo de trigo.



Para verificar o efeito dos diferentes métodos de secagem na liberação de ácido ferúlico das amostras após processamento, foram aplicadas três diferentes formas de secagem nos farelos processados: secagem por estufa (50 °C, 24 horas), por ebulição (100 ºC, 30 minutos) e por liofilização.

Os diferentes métodos de secagem foram aplicados em amostras de farelo de trigo processados em três diferentes condições, sendo elas: a condição de farelo de trigo aquecido, farelo de trigo autoclavado aquecido, e farelo de trigo autoclavado, bioprocessado enzimaticamente e aquecido**.** Todos os tratamentos foram realizados em triplicata de processo.

5.2.4.1 Aquecimento a 95ºC por 10 minutos

Para mimetizar o processo de aquecimento necessário para a inativação das enzimas presentes no preparado enzimático após a etapa de bioprocessamento enzimático, o farelo de trigo foi aquecido a 95 °C por 10 minutos. O aquecimento se deu em placa aquecedora sob agitação manual com bastão de vidro e a temperatura foi monitorada por termômetro. Os farelos que não foram bioprocessados enzimaticamente também passaram por esse processamento térmico para padronizar o processo e permitir a comparação dos resultados obtidos.

5.2.4.2 Autoclavagem

A autoclavagem foi realizada em bécher de 50 mL contendo 5 g de amostra e 25 mL de água. Os bécheres foram tampados com gaze e submetidos à autoclavagem por 30 minutos a 1 atm. Após o tempo de autoclavagem, os farelos foram mantidos a temperatura ambiente até o resfriamento da amostra.

5.2.4.3 Bioprocessamento enzimático

O volume de água das amostras autoclavadas foi reconstituído a 25 mL e foi adicionado ao farelo de trigo autoclavado 0,05 g do preparado enzimático comercial Pentopan® (Novozyme®) (1%, p/p, em relação ao peso de farelo de trigo). A suspensão de farelo de trigo autoclavado com a enzima foi mantida sob agitação orbital a 360 rpm por 20 h a temperatura ambiente.

5.2.4.4 Secagem a 50 ºC por 24 horas

As amostras foram colocadas em recipiente plano de vidro e secas em estufa a 50 °C por 24 h.

5.2.4.5 Secagem a 95 ºC por 30 minutos

As amostras foram levadas à ebulição (~95 °C) em placa de aquecimento por um período de 30 minutos sob agitação mecânica, para diminuição de quase a totalidade da água presente. A secagem final da amostra foi feita por liofilização.

5.2.4.6 Secagem por liofilização

As amostras foram liofilizadas em equipamento FreeZone 2.5 Liter -50C Benchtop Freeze Dryer (LABCONCO®).

5.2.5 Aplicação do farelo de trigo bioprocessado na produção de pão

Para avaliação do efeito da aplicação do farelo de trigo bioprocessado e seco na produção de pão foi produzido um pão controle conforme a formulação descrita na **Tabela 5**. No pão bioprocessado, o farelo de trigo *in natura* foi substituído pelo farelo de trigo bioprocessado e seco por ebulição.

Tabela 5 – Formulação do pão controle

Ingrediente	Quantidade
Farinha de trigo refinada (g)	360
Farelo de trigo (g)	90
Açúcar refinado (g)	12
Sal refinado (g)	4,5
Fermento biológico seco (g)	4,5
Azeite de oliva (mL)	22,5
Água (mL)	320

Os pães foram produzidos em panificadora automática (MultiPane, Britânia ™, Brasil) programada para realizar as etapas de mistura (27 min /28 °C), fermentação (130 min / 39 °C) e cozimento (60 min / 164 °C). Todos os ingredientes foram adquiridos em estabelecimentos comerciais da cidade do Rio de Janeiro (Brasil) e foram adicionados ao equipamento conforme as orientações do fabricante.

5.2.6 Análise da liberação de ácido ferúlico

5.2.6.1 Extração de ácido ferúlico

A extração dos compostos fenólicos solúveis e insolúveis das amostras de farelo de trigo processado e das amostras de pão foi realizada de acordo com metodologia descrita por Almeida e colaboradores (2020), em triplicata.

Para a extração dos compostos fenólicos solúveis, cerca de 1 g de amostra foi extraído com 10 mL de solução gelada de etanol:água (80:20, v/v) por 10 minutos por agitação em vórtex (Vortex Gene®), sendo posteriormente centrifugadas (2500 × g, 5 minutos, 10 °C; Sorval ST 16R, Thermo Scientific®). O sobrenadante foi coletado e o resíduo re-extraído. Os sobrenadantes coletados foram reunidos, evaporados em rotaevaporador (R215, Buchi®) e o resíduo seco foi reconstituído com 10 mL de água ultrapura.

A extração dos fenólicos insolúveis foi realizada por meio de etapas sucessivas de hidrólise alcalina e hidrólise ácida. Para realizar a hidrólise alcalina, o resíduo obtido após extração dos compostos fenólicos solúveis foi incubado com 12 mL de água destilada e 5 mL de NaOH 10 M sob agitação a 360 rpm, ao abrigo de luz, a temperatura ambiente por 16 horas. Após esse período, o pH foi ajustado para 2,0 com HCl concentrado e a mistura foi extraída por 30 segundos com 15 mL de acetato de etila. Após centrifugação (2500 × g, 5 minutos, 10 °C), o sobrenadante foi coletado e o resíduo re-extraído mais duas vezes. Os sobrenadantes foram reunidos, evaporados em rotaevaporador e o resíduo seco reconstituído em 10 mL de solução metanol:água (80:20, v/v). Para realizar a hidrólise ácida, o resíduo obtido após a hidrólise

alcalina foi incubado com 2,5 mL de HCl concentrado a 85 °C por 30 minutos. A mistura proveniente da hidrólise foi extraída por 30 segundos com 15 mL de acetato de etila. Após centrifugação (2500 × g, 5 minutos, 10 °C) o sobrenadante foi coletado e o precipitado re-extraído mais duas vezes. Os sobrenadantes foram reunidos, evaporados em rotaevaporador e o precipitado seco reconstituído em 10 mL de solução metanol:água (80:20, v/v). Todos os extratos obtidos foram filtrados em membrana de éster de celulose de 0,45 μm e, em seguida, armazenados a -20 °C até o momento das análises.

5.2.6.2 Análise do teor de ácido ferúlico

Para determinação do teor de ácido ferúlico, os extratos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLEA-DAD) (Shimadzu®, Kyoto, Japão) usando uma coluna de cromatografia Kinetex® C18 (5 μm, 250 mm x 4,6 mm). A fase móvel empregada foi um gradiente entre uma solução aquosa de ácido fórmico 0,3% contendo acetonitrila 1% (eluente A) e uma solução de acetonitrila 1% em metanol (eluente B). O fluxo empregado foi de 1,0 mL/min, com volume de injeção de 25 μL e a coluna foi equilibrada a 18,2% do eluente B. Após a injeção da amostra, o eluente B aumentou para a proporção de 20,2% em 1 minuto, aumentando constantemente até 43,4% em 18 minutos. Em seguida, continuou aumentando para 85,9% em 23 minutos, mantendo-se constante até 30 minutos e reduzindo novamente para 18,2% em 40 minutos. O DAD operou na faixa entre 190 e 370 nm, sendo o comprimento de onda de 325 nm usado para a quantificação do ácido ferúlico. A identificação do ácido ferúlico se deu por comparação do tempo de retenção e espectro de absorção no UV com padrão comercial e a sua quantificação foi feita por meio de curva de calibração.

5.2.7 Análises estatísticas

Os dados adquiridos foram analisados usando o programa Prism para Windows, versão 10.3.0 (GraphPad Software Inc.). Foi usado o teste t de Student não pareado para avaliar os efeitos do aquecimento mimetizando a inativação enzimática na liberação de ácido ferúlico quando comparado ao controle e na análise de pão controle com o pão aplicado com farelo autoclavado e bioprocessado seguido por secagem à 95 °C por 30 minutos. Foi realizada a análise por ANOVA de dois fatores, seguido pelo pós-teste de Tukey para avaliar os efeitos do tratamento por calor e métodos de processamento no teor de ácido ferúlico em farelo de trigo. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

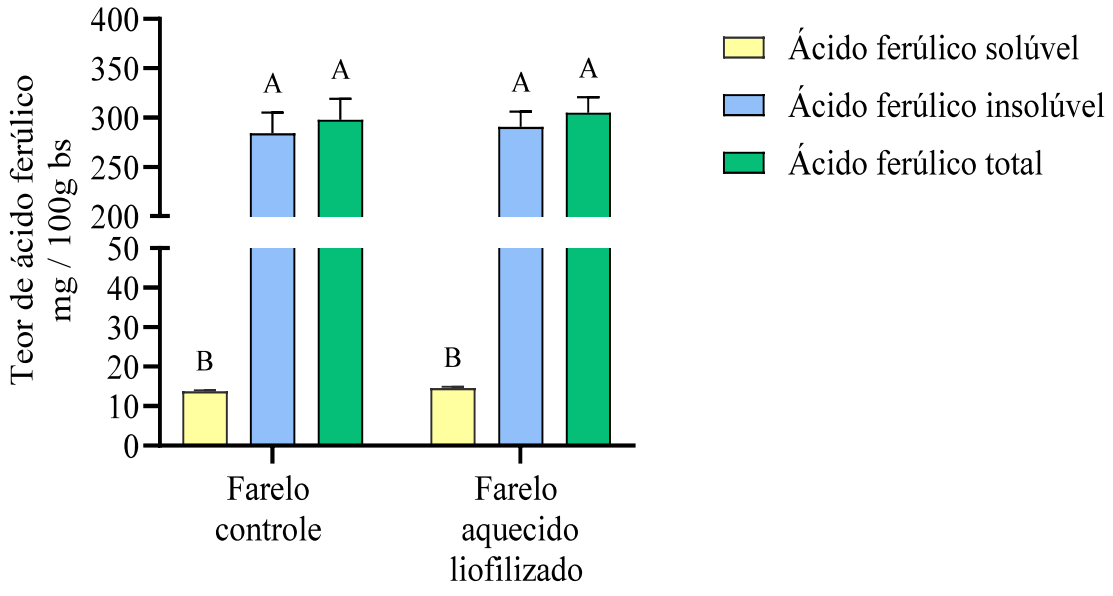
5.3.1 Atividade enzimática

O preparado enzimático comercial Pentopan® apresentou uma atividade de xilanase de 15,0 ± 0,6 U/mg e uma atividade de feruloil esterase de 6,7 ± 1,5 mU/mg. Segundo Costa et al. (2021), a feruloil esterase e a xilanase atuam sinergicamente na degradação dos polissacarídeos de arabinoxilano, gerando fragmentos menores e liberando ácido ferúlico. É importante ressaltar que uma maior atividade de xilanase é fundamental, pois desempenha um papel significativo na degradação dos arabinoxilanos, que poderia restringir a ação da feruloil esterase caso fosse insuficiente.

5.3.2 Efeito do aquecimento a 95ºC por 10 minutos sobre o perfil de ácido ferúlico

O aquecimento a 95 ºC por 10 minutos não alterou significativamente o teor de ácido ferúlico total e o teor de ácido ferúlico nas frações solúvel e insolúvel do farelo de trigo (**Figura 13**). Estes resultados demonstram que o processo de aquecimento nas condições que mimetizam o processo de inativação enzimática não causou degradação de ácido ferúlico, e, portanto, a amostra de farelo de trigo aquecido (95°C; 10 min) e liofilizado é um controle adequado para a comparação com as amostras submetidas aos demais processos e à etapa de secagem.

Figura 13. Teor de ácido ferúlico nas frações solúvel, insolúvel e total no farelo de trigo controle e farelo de trigo aquecido (95°C; 10 min) e liofilizado. Resultado expresso como média ± desvio padrão (mg/ 100 g, em base seca). Diferentes letras indicam diferença significativa entre as amostras (ANOVA de dois fatores seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

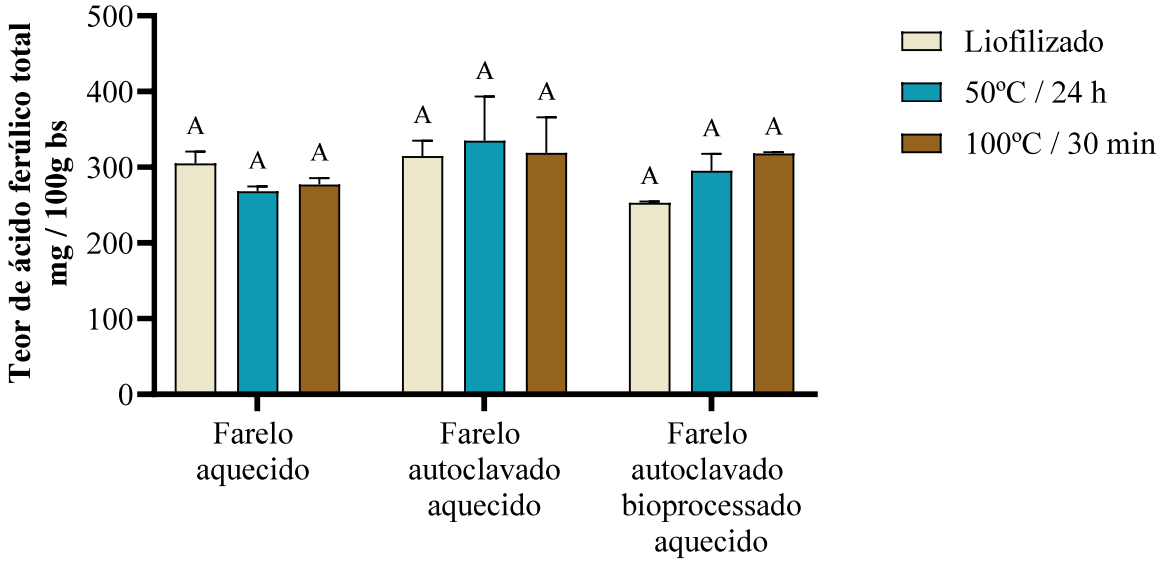


5.3.3 Efeito do processamento e da secagem do farelo de trigo sobre o teor de ácido ferúlico

Os métodos de processamento e de secagem empregados não afetaram o teor total de ácido ferúlico no farelo de trigo (**Figura 14**), indicando que não houve degradação ou geração de ácido ferúlico no decorrer dos diferentes processos aplicados no farelo de trigo.

Hithmani e Srinivasan (2014), ao avaliarem o teor de polifenóis de trigo (*Triticum aestivum*) após aquecimento, observaram uma redução de 27% após cozimento sob pressão, redução de 18% após aquecimento por ebulição por 10 minutos, redução de 34% após aquecimento em micro-ondas, e aumento de 50% após forneamento.Os autores demonstram que o teor total de compostos fenólicos foi afetado pela degradação ou surgimento de outros compostos presentes no trigo, como ácido vanílico, ácido siríngico, ácido cinâmico e ácido salicílico. Apesar de o teor total ter sido impactado pelos diferentes métodos de aquecimento empregados, o teor de ácido ferúlico não foi afetado.

Figura 14 – Teor de ácido ferúlico total expresso em mg/ 100g de base seca. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Diferentes letras indicam diferença entre as amostras (ANOVA de dois fatores seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).



Aydin & Gocmen (2015) observaram que a secagem em estufa (60 °C; 24h) de farinha de abóbora aumentou em 4% o teor total de seus compostos fenólicos quando comparada com

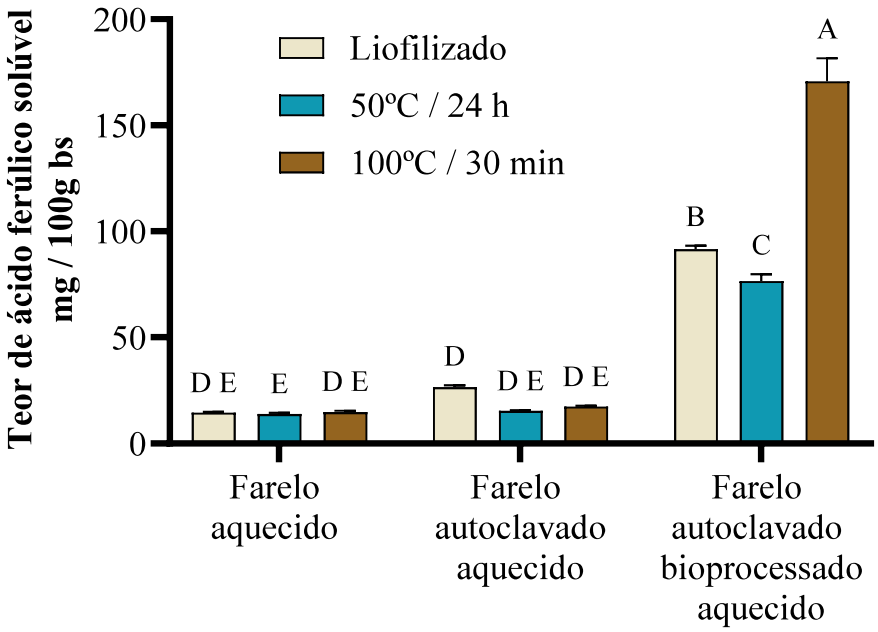
a secagem por liofilização. Esse efeito não foi observado para o ácido ferúlico, cujos teores não foram alterados pelos diferentes métodos de secagem.

Os resultados da literatura, associados ao resultado encontrado no presente estudo, sugerem que o ácido ferúlico apresenta maior resistência a diferentes processamentos térmicos frente a outros compostos. E que, pela predominância de ácido ferúlico na composição fenólica, o teor total de compostos fenólicos do farelo de trigo foi pouco impactado.

5.3.4 Efeito do processamento e da secagem do farelo de trigo sobre a liberação de ácido ferúlico

Os processos combinados de autoclavagem e bioprocessamento enzimático aumentaram em até 11 vezes o teor de ácido ferúlico solúvel do farelo de trigo (**Figura 15**). A hipótese proposta é que a combinação de autoclavagem e bioprocessamento enzimático mostrou-se eficiente para aumentar os teores de ácido ferúlico solúvel, uma vez que o processo de autoclavagem provoca o rompimento das paredes celulares, liberando o ácido ferúlico dessas estruturas e facilitando o acesso da feruloil esterase aos substratos intracelulares (Exposito-Bautista et al., 2020).

Figura 15. Teor de ácido ferúlico solúvel expresso em mg/ 100g de base seca. Resultados expressos como média ±desvio padrão. Diferentes letras indicam diferença entre as amostras (ANOVA de dois fatores seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).



Bautista-Expósito et al. (2020) observaram um aumento de 41 vezes na liberação de ácido ferúlico da matriz celular no farelo de trigo após pré-processamento por autoclavagem, ao passo que o presente estudo não detectou diferença significativa entre o controle e o farelo apenas autoclavado. A discrepância entre esses resultados não é imediatamente explicável, uma vez que os métodos empregados foram idênticos; tal variação pode estar relacionada ao equipamento utilizado ou à qualidade da matéria-prima. Além disso, os mesmos autores relataram um aumento de 330 vezes no teor de ácido ferúlico solúvel quando a autoclavagem foi combinada com bioprocessamento enzimático. A menor eficiência na combinação dos métodos de processamento, no presente estudo, pode estar associada a uma menor eficácia da autoclavagem na liberação de ácido ferúlico.

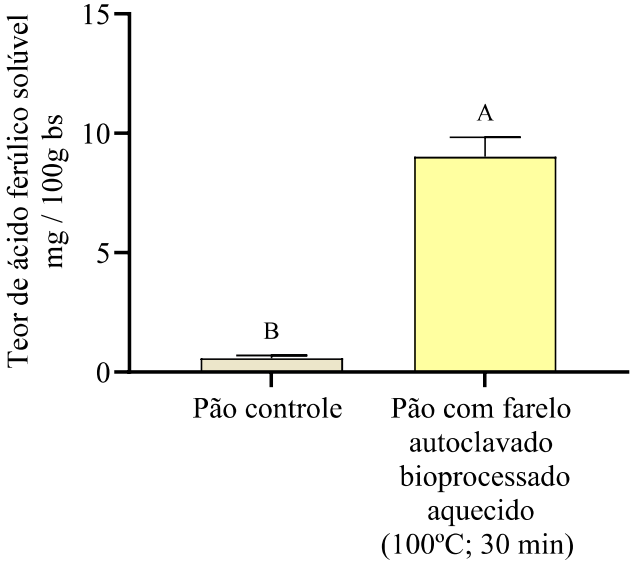
Os diferentes métodos de secagem empregados afetaram o farelo de trigo somente quando os métodos de processamento autoclavação e bioprocessamento enzimático foram combinados (**Figura 15**). No farelo processado nas condições previamente descritas, o método de secagem a 95ºC por 30 minutos foi o que apresentou a maior liberação de ácido ferúlico da matriz do farelo. Em contraste, a secagem a 50ºC por 24 horas resultou em uma leve redução no teor de ácido ferúlico solúvel, quando comparado ao método de secagem controle de liofilização.

A maior liberação de ácido ferúlico após a secagem a 95ºC pode ser explicada, conforme Han, Dye e Mackie (2023), pelo fato de que o processamento térmico em altas temperaturas pode danificar os constituintes celulares, promovendo a extração aumentada de ácido ferúlico intracelular. Além disso, de acordo com Caloinoiu & Vodnar (2020), o estresse térmico a 100º C pode degradar compostos polifenólicos conjugados, como taninos, resultando em um aumento de vários compostos fenólicos de estrutura química mais simples, incluindo ácido vanílico, ferúlico, *p*-cumárico e siríngico.

5.3.5. Potencial de aplicação do farelo de trigo processado em pães

O teor de ácido ferúlico solúvel no pão produzido com adição do farelo submetido a autoclavagem, bioprocessamento enzimático, aquecimento (95 °C, 10 min) e secagem (95 °C, 24 h) (9,02 mg/100 g, base seca) foi 15 vezes maior do que o encontrado no pão controle com adição de farelo de trigo não processado (0,58 mg/100 g, base seca) **(Figura 16).**

Figura 16. Teor de ácido ferúlico solúvel do pão controle e pão com farelo autoclavado, bioprocessado e aquecido, expresso em mg/ 100g, em base seca. Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=8). Diferentes letras indicam diferença significativa entre as amostras (Teste t de Student não pareado, $p < 0,05$).



O teor de ácido ferúlico solúvel do pão produzido com o farelo de trigo autoclavado, bioprocessado, aquecido e seco a 95 °C por 30 minutos (9,02 mg/100 g, base seca) foi superior aos teores informados em outros trabalhos que adicionaram farelo de trigo bioprocessado em pães. Costa e colaboradores (2020) adicionaram farelo de trigo bioprocessado por fermentação em estado sólido a um pão de farinha de trigo integral e produziram pães com teor de ácido ferúlico solúvel igual a 2,1 mg/100 g de base seca. Almeida e colaboradores (2019) avaliaram o bioprocessamento de pães usando enzimas provenientes de fermentação em estado sólido de farelo de cacau, e produziram pães de trigo integral bioprocessado com teor de ácido ferúlico solúvel igual a 3,5 mg/100 g de base seca.

5.4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, concluiu-se que o aquecimento a 95°C por 10 minutos, realizado para a inativação enzimática após o bioprocessamento, não alterou significativamente os teores de ácido ferúlico solúvel e insolúvel em comparação ao controle. O método de processamento que combinou autoclavagem e bioprocessamento enzimático apresentou o melhor desempenho em relação aos demais tratamentos, evidenciando a eficiência do bioprocessamento enzimático na liberação de ácido ferúlico da matriz. Além disso, quando

associado à secagem a 95°C por 30 minutos, houve um aumento significativo na liberação de ácido ferúlico, em comparação ao controle de secagem, sugerindo um efeito sinérgico entre os métodos no aumento do ácido ferúlico na fração solúvel. Por fim, a aplicação do farelo processado por autoclavagem, bioprocessamento, aquecimento e secagem a 95°C por 30 minutos na elaboração de pães resultou em um aumento considerável no teor de ácido ferúlico solúvel desse alimento..

6 BIOPROCESSAMENTO ENZIMÁTICO DE PÃO E SUA INFLUÊNCIA NA RESPOSTA GLICÊMICA E BIODISPONIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS: UM ESTUDO CLÍNICO CRUZADO EM INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS E COM OBESIDADE

6.1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos podem estar presentes nos alimentos na forma insolúvel (ligados covalentemente à matriz alimentar ou polimerizados) ou na forma solúvel (livres ou conjugados). Em grãos e cereais, predominam os compostos fenólicos insolúveis, ligados a componentes estruturais da parede celular, como celulose, arabinoxilanos (hemicelulose), lignina, pectina e proteínas estruturais (Acosta-Estrada, et al., 2014; Rocchetti et al., 2022). Os benefícios à saúde associados ao consumo de compostos fenólicos estão diretamente relacionados à sua bioacessibilidade e biodisponibilidade, que por sua vez são influenciadas por fatores relacionados ao indivíduo (condição metabólica, fatores genéticos, composição da microbiota colônica, etc.) e ao alimento (interação com componentes da matriz alimentar) (Shahidi & Peng, 2018).

Compostos fenólicos solúveis são considerados mais bioacessíveis que as formas insolúveis (Laddomada et al., 2015), sendo preferencialmente absorvidos no intestino delgado. Uma vez absorvidos, são biotransformados por reações de fase I (oxidação, redução ou hidrólise) e, principalmente, reações de fase II (glucuronidação, metilação e sulfatação), originando metabólitos que podem exercer efeitos biológicos em diferentes tecidos. Os compostos fenólicos insolúveis, por outro lado, são pouco absorvidos no trato gastrointestinal, alcançando o colón, onde são extensamente metabolizados pela microbiota colônica através de reações de fissão, hidrólise, desmetilação, redução, descarboxilação, hidroxilação e isomerização. Os metabólitos de baixo peso molecular formados podem ser mais facilmente absorvidos ou agir *in situ* no cólon (Manach et al., 2004; Mosele et al., 2015; López-Yerena et al., 2021).

O metabolismo dos compostos fenólicos apresenta uma grande variabilidade interindividual, atribuída a fatores como genética, composição da microbiota intestinal e plasticidade enzimática do hospedeiro e da microbiota (Bento-Silva *et al.*, 2019). A microbiota intestinal, cuja composição é única para cada indivíduo, parece exercer papel central na homeostase metabólica e na metabolização dos compostos fenólicos (Li et al., 2023; Rowland

et al., 2018). A composição da microbiota pode ser influenciada por fatores como genética, tipo de parto, padrão alimentar, condições sanitárias, uso de antibióticos e composição corporal (Seganfredo *et al.*, 2017). Nesse sentido, quando comparados aos indivíduos eutróficos, os indivíduos com obesidade têm uma menor diversidade microbiana (depleção de espécies), apresentam alterações a nível de filo e gênero (*Firmicutes* são mais abundantes e *Bacteroidetes* são reduzidos) e apresentam alterações nos genes bacterianos envolvidos nas vias metabólicas de alguns nutrientes (Mörkl *et al.*, 2017; Remely *et al.*, 2015). Tais alterações podem impactar diretamente a metabolização de compostos fenólicos, sugerindo padrões metabólicos distintos entre indivíduos eutróficos e com obesidade.

Segundo dados recentes da *Non-Communicable Diseases Risk Factor Collaboration* (NCD-RisC) (2024), mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo vivem atualmente com obesidade. Nos últimos 30 anos, a prevalência de obesidade em adultos mais que dobrou, enquanto entre crianças e adolescentes (de 5 a 19 anos), esse número quadruplicou. Além de suas várias implicações para a saúde, a obesidade pode influenciar negativamente a biodisponibilidade de nutrientes e compostos bioativos, afetando a função intestinal, a atividade de sistemas enzimáticos de metabolização, e o equilíbrio da microbiota intestinal, essencial para o metabolismo de compostos fenólicos (Redan et al., 2016)

O consumo de polifenóis tem sido apontado como uma estratégia nutricional promissora para atenuar a resposta glicêmica pós-prandial, devido à sua capacidade de inibir a atividade de enzimas digestivas de carboidratos (α-glicosidase e α-amilase), inibir os transportadores de glicose e modular a absorção de glicose na corrente sanguínea (Wu et al., 2018; Pasmans et al., 2022). Em estudos com uma ampla variedade de alimentos de origem vegetal, observou-se que a concentração, a composição e a bioatividade dos compostos fenólicos com potencial para o controle glicêmico variam consideravelmente entre espécies, partes da planta e diferentes genótipos ou variedades. Essa variabilidade está associada a fatores como as condições ambientais e de cultivo, o armazenamento pós-colheita e os processos de transformação dos alimentos (Sarkar et al., 2022).

Dentre as estratégias para aumentar o teor de compostos fenólicos solúveis e, consequentemente, aumentar a sua biodisponibilidade em cereais e pães, destacam-se o uso de técnicas hidrotérmicas e de bioprocessamento enzimático, aplicadas às matérias-primas e/ou durante a panificação (Angelino et al., 2017, Tiozon et al., 2022). O bioprocessamento enzimático tem se mostrado eficaz na liberação de compostos fenólicos insolúveis, promovendo o aumento de sua fração solúvel e antecipando sua liberação ao longo da digestão simulada (Anson et al., 2011; Almeida et al., 2020). Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa,

observou-se que o bioprocessamento enzimático pode reduzir o impacto da ação da microbiota intestinal na bioacessibilidade dos compostos fenólicos (Almeida et al., 2020). Dentre as enzimas mais utilizadas no bioprocessamento de cereais destacam-se a xilanase e a feruloil esterase, pertencentes ao complexo xilanolítico, capazes de degradar hemiceluloses da parede celular vegetal, como os arabinoxilanos, liberando o ácido ferúlico, principal composto fenólico presente nos grãos de trigo (Neeta et al., 1999; Wu et al., 2017).

Embora a avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de compostos fenólicos forneça informações importantes, esse tipo de abordagem experimental não é suficiente para predizer potenciais efeitos na saúde e nem para avaliar a eficácia das técnicas de processamento aplicadas. Nesse contexto, estudos clínicos são fundamentais para compreender como os compostos fenólicos são metabolizados *in vivo*, especialmente em diferentes contextos fisiológicos. Evidências demonstram que o bioprocessamento enzimático pode aumentar a biodisponibilidade de compostos fenólicos de pães (Lappi et al., 2013; Anson et al., 2011). No entanto, os possíveis efeitos da obesidade no metabolismo dessa classe de compostos ainda carecem de investigação mais aprofundada.

Considerando o amplo consumo de pães pela população mundial, a potencial modulação da biodisponibilidade de compostos fenólicos pelo bioprocessamento enzimático e a variabilidade interindividual em sua metabolização, torna-se relevante investigar os efeitos do bioprocessamento enzimático sobre a resposta glicêmica e sobre o metabolismo de compostos fenólicos de pães em indivíduos eutróficos e com obesidade.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Produção dos pães e bioprocessamento do farelo de trigo

O pão controle foi elaborado com farinha de trigo refinada (360 g), farelo de trigo (90 g), açúcar (12 g), sal de mesa (4,5 g), fermento biológico seco (4,5 g), azeite extravirgem (22,5 mL) e água (320 mL). Para a elaboração do pão bioprocessado, o farelo de trigo foi substituído por farelo de trigo submetido previamente a bioprocessamento enzimático. O volume de água adicionado à formulação foi ajustado de acordo com o teor de umidade do farelo bioprocessado, a fim de manter a consistência adequada da massa. Todos os ingredientes foram adquiridos em supermercados locais, com exceção do preparado enzimático Pentopan® 500 BG, doado pela empresa Novozymes®. Esse preparado enzimático é amplamente utilizado

na indústria de alimentos, sendo reconhecido por sua segurança, pureza e conformidade com os padrões estabelecidos para uso alimentar.

Para o bioprocessamento, o farelo de trigo foi submetido inicialmente a um pré-tratamento térmico (Bautista-Expósito et al., 2020). Preparou-se uma suspensão de farelo de trigo em água destilada na proporção de 1:20 (*p*/*v*), a qual foi autoclavada a 121 ºC e 1 atm por 30 minutos. Após resfriamento, foi adicionado o preparado enzimático Pentopan® 500 BG na proporção de 1% em relação ao peso do farelo. O preparado enzimático Pentopan® possui atividade declarada de xilanase (endo-1,4) e feruloil esterase. A hidrólise enzimática foi realizada a 40 ºC, sob agitação constante (150 rpm), durante 20 horas. Após esse período, o farelo bioprocessado foi submetido a secagem (100 ºC por 30 minutos) para redução do teor de umidade. Após o resfriamento, o farelo bioprocessado foi utilizado como ingrediente na formulação do bioprocessado, substituindo o farelo convencional.

Os pães foram produzidos em panificadora automática (MultiPane, Britânia ™, Brasil), programada para realizar de forma contínua as etapas de mistura (27 min a 28 ºC), fermentação (130 min a 39 ºC) e cozimento (60 min a 164 ºC). Todos os procedimentos foram conduzidos seguindo as boas práticas de fabricação, observando os critérios de higiene e segurança previstos para a produção de alimentos. Após o forneamento os pães foram resfriados até atingir temperatura ambiente, posteriormente foram porcionados em fatias de 100 g e as porções foram armazenadas a -20 ºC até o momento de análise e consumo.

6.2.2 Análise de compostos fenólicos dos pães

Para obter amostras representativas dos pães controle e bioprocessado ofertados aos voluntários ao longo de todo o estudo clínico, alíquotas de cada um dos pães produzidos foram moídas e, em seguida, homogeneizadas. As amostras de pão foram extraídas em triplicata, de acordo com metodologia descrita por Almeida et al. (2020). Para a extração, aproximadamente 2 g mix de amostra foram extraídos com 10 mL de solução gelada de etanol:água (80:20, *v*/*v*) por 10 minutos, sob agitação em vórtex (Vortex Gene®). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (2500 × *g*, 5 minutos, 10 °C; (Sorval ST 16R, Thermo Scientific®). O sobrenadante foi coletado e o resíduo sólido foi submetido a uma segunda extração nas mesmas condições. Os sobrenadantes coletados foram reunidos, evaporados em rotaevaporador (R215, Buchi®), e o resíduo seco foi reconstituído com 10 mL de água ultrapura.

A extração dos compostos fenólicos insolúveis foi realizada em duas etapas sucessivas, envolvendo hidrólise alcalina seguida de hidrólise ácida. Para a hidrólise alcalina, o resíduo

obtido após extração dos compostos fenólicos solúveis foi incubado com 12 mL de água destilada e 5 mL de NaOH 10 M, sob agitação constante (360 rpm), ao abrigo de luz e à temperatura ambiente, por 16 horas. Após esse período, o pH foi ajustado para 2,0 com HCl concentrado. Em seguida, a mistura foi extraída com 15 mL de acetato de etila por 30 segundos. A amostra foi centrifugada (2500 × *g*, 5 minutos, 10 °C) e o sobrenadante coletado. O resíduo sólido foi re-extraído mais duas vezes nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram reunidos, evaporados em rotaevaporador, e o resíduo seco foi reconstituído em 10 mL de solução metanol:água (80:20, *v*/*v*).

Para a etapa da hidrólise ácida, o resíduo resultante da hidrólise alcalina foi incubado com 2,5 mL de HCl concentrado a 85 °C por 30 minutos. Após esse período, a mistura foi extraída com 15 mL de acetato de etila por 30 segundos, seguida de centrifugação (2500 × *g*, 5 minutos, 10 ºC). O sobrenadante foi coletado e o precipitado re-extraído mais duas vezes. Os sobrenadantes foram reunidos, evaporados em rotaevaporador e o resíduo seco foi reconstituído em 10 mL de solução metanol:água (80:20, *v*/*v*). Todos os extratos obtidos foram filtrados em membrana de éster de celulose de 0,45 μm e armazenados a -20 ºC até o momento das análises.

Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu®, Kyoto, Japão), equipado com DAD (SPD-M40), bomba quaternária (Nexera LC-40D XR), injetor automático (SIL-40C XR), forno de coluna (CTO-40C), controlador de sistema CBM-20A e degaseificador DGU-405. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Kinetex® C18 (5 μm, 50 mm x 2,1 mm), mantida a 50 ºC. A fase móvel consistiu em um sistema gradiente formado por solução aquosa de ácido fórmico 0,3% (eluente A) e acetonitrila (eluente B). A temperatura do injetor foi mantida a 10 ºC e os volumes de injeção utilizados foram de 10 μL ou 1 μL, conforme a necessidade de adequação da concentração dos compostos analisados à faixa linear da curva padrão, evitando diluições adicionais. A coluna foi equilibrada com 100% do eluente A. Após a injeção da amostra, a composição do solvente foi mantida em 100% do eluente A até 1,5 min com fluxo de 0,4 mL/min. Em seguida, o eluente B foi aumentado gradualmente até atingir de 25% B aos 12 min. A proporção de eluente B foi então aumentada para 95%, com fluxo ajustado para 0,6 mL/min, até 13 min., e posteriormente reduzido para 0% de B em 13,1 min, permanecendo constante até 16 min. A detecção foi realizada em espectro de varredura entre 230 e 325 nm. A identificação dos compostos foi feita por comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção UV com padrões comerciais. A quantificação foi realizada com base em curvas de calibração obtidas a partir dos padrões correspondentes. Os dados foram adquiridos pelo software Lab Solutions (Shimadzu Corporation®, versão 5.117).

6.2.3 Estudo clínico

O estudo clínico foi conduzido de acordo com os princípios éticos para pesquisa médica envolvendo seres humanos descritos na Declaração de Helsinque e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil (nº de aprovação 4.938.714) (**Anexo 2**). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 3**) antes de iniciar o estudo.

Os participantes foram recrutados por meio de abordagem direta, além de contatos realizados via e-mail e telefone. A divulgação do estudo foi feita através das redes sociais das instituições às quais o grupo de pesquisa está vinculado, por meio de postagens com informações sobre os objetivos, critérios de elegibilidade e formas de contato com os pesquisadores responsáveis (**Anexo 4**). Os interessados em participar do estudo responderam a um questionário para triagem inicial, com o objetivo de verificar o atendimento aos critérios de inclusão e exclusão (**Anexo 5**).

Os critérios de inclusão foram: ser adulto de ambos os sexos (19 a 59 anos), ter índice de massa corporal (IMC) entre 18,5 e 24,9 kg/m^2 (eutrófico) ou entre 30,0 e 39,9 kg/m^2 (obesidade grau I e II), e função intestinal regular (entre uma evacuação a cada dois dias e duas evacuações diárias). Foram considerados os seguintes critérios de exclusão: autorrelato de doenças intestinais agudas, crônicas ou inflamatórias, alergias alimentares relacionadas ao trigo, doença celíaca, doenças hepáticas, diagnóstico de diabetes, uso recente e/ou rotineiro de antibióticos e/ou probióticos, tabagismo, transtorno por uso de álcool, gestação e lactação.

Trinta e cinco indivíduos responderam ao questionário inicial, dos quais vinte atenderam aos critérios de elegibilidade e foram incluídos no estudo. No entanto, onze participantes desistiram antes de iniciar o estudo, resultando em 9 participantes que completaram todas as etapas do estudo. As características dos participantes estão apresentadas na **Tabela 6**.

Tabela 6. Características dos participantes do estudo.

Grupo	IMC (kg/m^2)	Idade (anos)
Eutróficos (***n*** = 5)	22,5 ± 0,8	33 ± 6
Obesos (***n*** = 4)	38,0 ± 2,2	35 ± 8

O estudo clínico foi do tipo cruzado, randomizado e cego (**Anexo 6**). Cada participante foi submetido a duas intervenções distintas: consumo de pão controle e consumo de pão

bioprocessado, com um período de *washout* de pelo menos duas semanas entre cada intervenção. Os participantes foram instruídos, verbalmente e por escrito, a restringir o consumo de alimentos fontes de compostos fenólicos, tais como frutas, hortaliças, cereais integrais, oleaginosas, cacau, chás, café, vinho e cerveja e seus produtos derivados, nas 48 h anteriores ao estudo e durante todo o período de coleta de urina de 48 h (**Anexo 7 e Anexo 8**). Para controle da aderência à dieta, foram solicitados registros alimentares referentes ao período de restrição, os quais também serviram de base para a repetição da dieta durante a segunda intervenção.

Cada teste consistiu na ingestão aguda de 100 g de pão após jejum noturno de 8 horas. Os participantes foram instruídos a consumir o pão em até 10 minutos, juntamente com 150 mL de água. Nas oito horas seguintes, os participantes beberam 50 mL de água a cada 30 minutos. Além disso, a cada duas horas foram fornecidas refeições padronizadas, isentas de compostos fenólicos, compostas de 30 g biscoito do tipo cream cracker e 34 g de queijo processado. Adicionalmente, uma porção de macarrão instantâneo foi oferecida 4 h após o consumo do pão, como uma refeição.

A coleta de urina foi realizada em diferentes intervalos: basal (coletada a partir do início do jejum noturno até imediatamente antes da ingestão do pão) e nos seguintes intervalos após a ingestão do pão: 0-2 h, 2-4 h, 4-6 h, 6-8 h, 8-12 h, 12-24 h, 24-36 h e 36-48 h. O volume total de urina em cada intervalo de coleta foi quantificado. Alíquotas de 10 mL de urina foram acidificadas com 2% de ácido fórmico (200 µl) e armazenadas a -80 ºC até a realização das análises.

A resposta glicêmica dos participantes foi avaliada com o objetivo de verificar o efeito do bioprocessamento enzimático do pão sobre a concentração de glicose no sangue. As medições foram realizadas por meio de um sistema portátil de monitoramento da glicose (glicosímetro), utilizando amostras de sangue capilar obtidas por punção digital. As medições foram realizadas no tempo zero (imediatamente antes do consumo de pão) e nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após o consumo do pão.

6.2.4 Análise de metabólitos urinários por CLAE-DAD

Para análise dos metabólitos urinários, alíquotas de todos os intervalos de coleta de urina foram submetidas à hidrólise enzimática com solução aquosa de β-glucuronidase Tipo H-2 de *Helix pomatia* (Sigma-Aldrich, USA), conforme protocolo descrito por Silva et al. (2019). Inicialmente, o pH de cada alíquota de urina (500 µL) foi ajustado para 5,0 com tampão de

acetato de sódio 1,1 M. Em seguida, foram adicionados 10 µL da enzima, e as amostras homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 37 ºC por 2 h. Após a incubação, o pH foi ajustado para 2,5 com HCl 1 M, e a amostras foram centrifugadas a 17.000 × *g* por 10 min, à temperatura ambiente (Eppendorf, MiniSpin®). O sobrenadante obtido foi filtrado em filtro PVDF de 0,22 µm e armazenado a -80 ºC até o momento da análise.

As urinas hidrolisadas foram analisadas por CLAE-DAD, seguindo a metodologia descrita no item 2.2. O detector operou na faixa de 190 a 370 nm. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção no UV com padrões comerciais. A quantificação foi realizada por curvas de calibração construídas com os respectivos padrões analíticos. Os dados foram adquiridos pelo software Lab Solutions (Shimadzu Corporation®, versão 5.117).

A excreção urinária dos compostos foi expressa em µmol excretado em cada intervalo de coleta de urina.

6.2.5 Análises estatísticas

Todos os dados foram processados no software GraphPad Prism para Windows, versão 10.3 (GraphPad Software Inc.). Os testes de normalidade de Shapiro–Wilk e Kolmogorov–Smirnov foram aplicados aos dados. A comparação do teor de compostos fenólicos entre os pães controle e bioprocessado foi realizada por meio do teste-*t* não pareado. Para os dados obtidos no estudo clínico, as comparações entre as duas intervenções (pão controle e pão bioprocessado), referentes à área sob a curva (AUC) glicêmica e ao teor total de ácido hipúrico excretado foram realizadas utilizando o teste-*t* pareado. A comparação do teor total de ácido ferúlico excretado entre as duas intervenções foi realizada com o teste de *Wilcoxon* pareado, em razão da não normalidade dos dados. As comparações entre os teores excretados dos ácidos hipúrico e ferúlico pelos indivíduos eutróficos e com obesidade, após o consumo de ambos os pães, foram realizadas por meio de ANOVA-one way, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.3.1 Composição dos pães

Foram identificados três compostos fenólicos nos dois pães produzidos (controle e bioprocessado), sendo eles os ácidos ferúlico, sinápico e *p*-cumárico (**Tabela 7**). Todos os compostos fenólicos identificados já foram descritos na literatura como compostos presentes em pães elaborados com farinha de trigo (Angelino et al., 2017; Abdel-Aal & Rabalski, 2022). Além dos identificados no presente estudo, outros compostos fenólicos já foram identificados em pães de trigo, como os ácidos cafeico, vanílico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico e siríngico (Almeida et al., 2020; Angelino et al., 2017; Yu & Beta, 2015; Angeloni & Collor, 2015). A composição fenólica de pães de trigo pode variar conforme características extrínsecas e intrínsecas do grão, tais como local de plantio e variedade, grau de refino da farinha utilizada, ingredientes adicionados e formas de preparo (ANGELINO et al., 2017).

Tabela 7. Teor (mg/100 g) de compostos fenólicos solúveis, insolúveis e total nos pães controle e bioprocessados.

Compostos fenólicos	**Pão controle**	**Pão bioprocessado**
Fenólicos solúveis		
Ácido ferúlico	$2,16 \pm 0,27^{b}$	$11,13 \pm 0,37^{a}$
Fenólicos insolúveis		
Ácido ferúlico	$33,52 \pm 2,36^{a}$	$20,14 \pm 1,76^{b}$
Ácido sinápico	$7,75 \pm 0,58^{a}$	$5,60 \pm 0,53^{b}$
Ácido *p*-cumárico	$4,27 \pm 0,39^{a}$	$3,20 \pm 0,42^{a}$
Fenólicos totais	$\mathbf{47,87 \pm 1,96^{a}}$	$\mathbf{40,07 \pm 3,28^{b}}$

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Diferentes letras no mesmo composto indicam diferença significativa entre os pães (teste *t* não pareado, $p < 0,05$).

O ácido ferúlico foi o composto majoritário, correspondendo a até 78% do total de compostos fenólicos identificados nos pães. A maior parte dos compostos fenólicos dos pães está na fração insolúvel, sendo 95% no pão controle e 72% no pão bioprocessado. Segundo Wang, He & Chen (2014) o ácido ferúlico é o ácido fenólico mais abundante nos grãos de cereais, seguido pelos ácidos *p*-cumárico, sinápico e cafeico. No trigo, ele representa aproximadamente 90% do total de ácidos fenólicos, dos quais cerca de 99% estão na forma insolúvel. Nos cereais, os ácidos fenólicos insolúveis formam ligações éter com a lignina através dos grupos hidroxila no anel aromático, além de estabelecerem ligações éster com carboidratos estruturais e proteínas por meio dos grupos carboxílicos (Acosta-Estrada et al., 2014).

O bioprocessamento apresentou um efeito positivo significativo no aumento do teor do ácido ferúlico solúvel, com o pão bioprocessado exibindo teor cinco vezes superior ao do pão controle. Esse resultado está em concordância com estudos prévios relatados na literatura (Anson et al., 2011; Turner et al., 2021), que também observaram aumentos expressivos (4 a 6 vezes) nos teores de ácido ferúlico solúvel em pães bioprocessados com preparados enzimáticos comerciais com atividade de xilanase e feruloil esterase, as mesmas enzimas utilizadas neste estudo.

A liberação de ácido ferúlico no pão bioprocessado pode ser atribuída à ação combinada dos processos aplicados ao farelo de trigo utilizado no pão bioprocessado, a saber: autoclavação, bioprocessamento enzimático e secagem por aquecimento. A autoclavação promove a ruptura das paredes celulares, favorecendo o acesso da feruloil esterase aos substratos intracelulares e, consequentemente, aumentando a liberação de ácido ferúlico (Exposito-Bautista et al., 2020). A secagem térmica utilizada para a redução do teor de umidade do farelo bioprocessado também pode ter contribuído para esse efeito. Conforme proposto por Han, Dye e Mackie (2023), o processamento em altas temperaturas pode danificar as estruturas celulares, favorecendo a extração de compostos intracelulares como o ácido ferúlico. Portanto, a associação dessas etapas tecnológicas resultou em um aumento desses teores no pão bioprocessado.

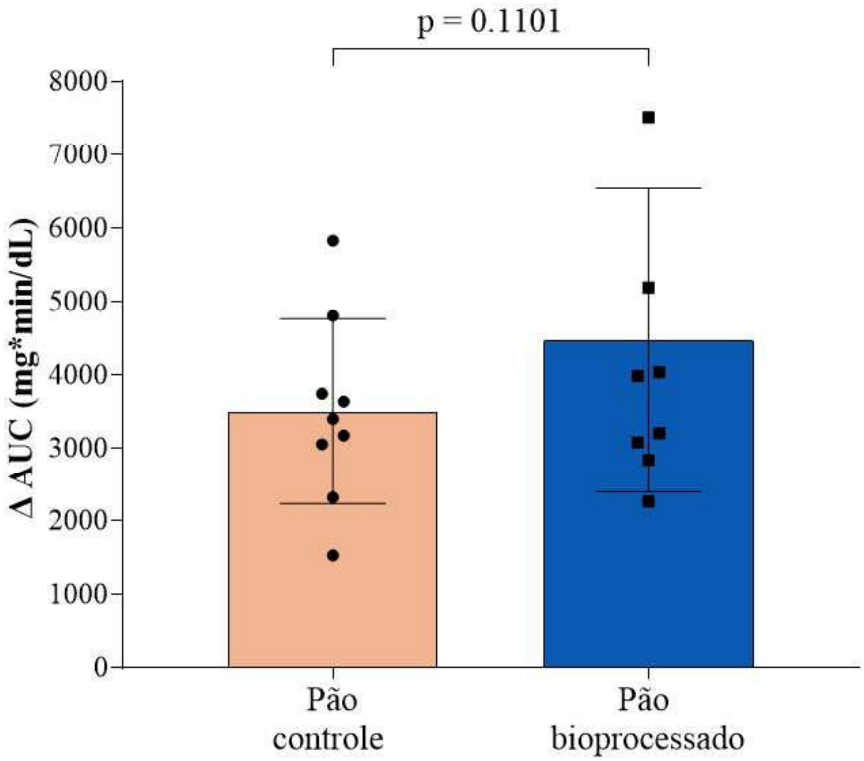
A redução do teor de ácido sinápico no pão bioprocessado (**Tabela 7**) provavelmente está associada à degradação desse composto durante os processos aplicados. De acordo com Reungoat et al. (2021), o ácido sinápico pode ser degradado tanto pela exposição a altas temperaturas quanto pela ação enzimática, originando produtos que não foram investigados no presente estudo, como o canolol, produto da descarboxilação térmica do ácido sinápico. Isso sugere que as condições de bioprocessamento aplicadas podem ter promovido a conversão do ácido sinápico em outros compostos, contribuindo para a diminuição de seu teor no pão bioprocessado. Nesse sentido, a identificação e quantificação desses produtos derivados representam um aspecto a ser explorado em estudos futuros, a fim de ampliar a compreensão dos efeitos do bioprocessamento sobre a composição fenólica de pães bioprocessados.

6.3.2 Efeito do bioprocessamento enzimática na resposta glicêmica

O bioprocessamento não alterou a resposta glicêmica dos voluntários quando considerados todos os participantes do estudo clínico (**Figura 17**). No entanto, é amplamente reconhecido que os compostos fenólicos possuem potencial de modular a digestão de

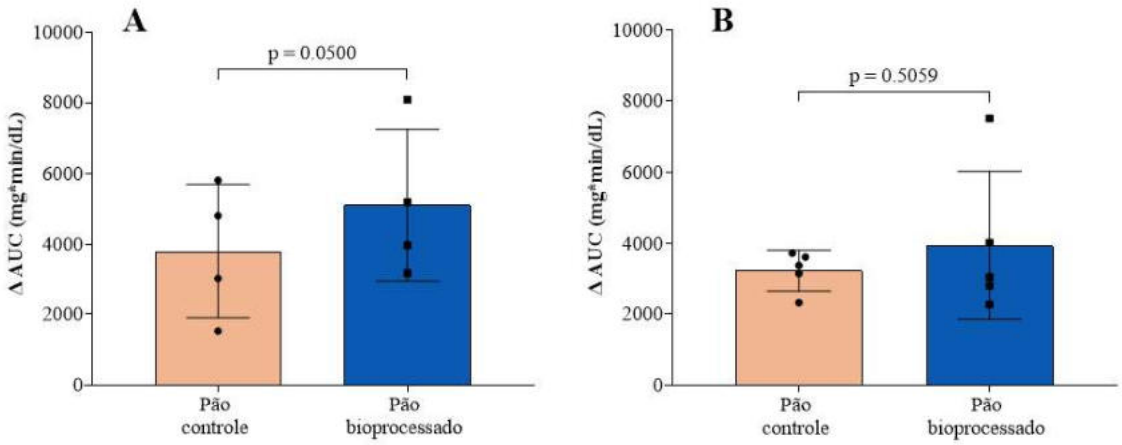
carboidratos e a absorção de glicose, principalmente por meio da inibição de enzimas digestivas do amido (Zhang *et al*., 2021). Essa modulação pode contribuir para a liberação controlada de glicose no sangue, associada a uma diminuição do índice glicêmico. Além disso, estratégias de processamento, como o uso de altas temperaturas e a autoclavação, já foram previamente relatadas como favoráveis ao controle glicêmico (Sarkar et al., 2021).

Figura 17. Área sob a curva (AUC) (mg*min/dL) do delta da resposta glicêmica, expressa como média ± desvio padrão. Teste *t* pareado, $p < 0,05$.



Quando analisados separadamente, observou-se que os participantes com obesidade apresentaram uma resposta glicêmica maior após o consumo de pão bioprocessado (**Figura 18A**) em comparação ao pão controle (**Figura 18B**). Esse aumento pode estar relacionado à produção de monossacarídeos e oligossacarídeos livres durante o bioprocessamento, em decorrência da hidrólise enzimática, o que pode resultar em uma maior disponibilidade de açúcares de rápida absorção, elevando a resposta glicêmica, conforme já mencionado previamente (Zhang et al., 2021). Assim, embora o bioprocessamento apresente potencial para modular positivamente a resposta glicêmica, seus efeitos podem variar de acordo com características individuais e com as modificações bioquímicas induzidas no alimento.

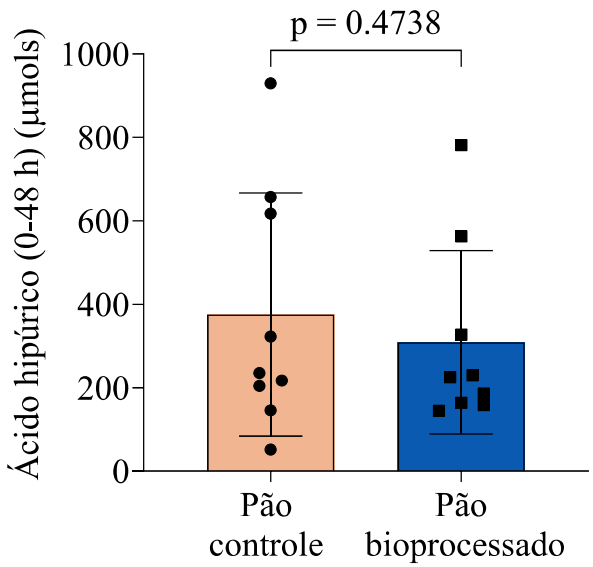
Figura 18. Área abaixo da curva (AUC) (mg*min/dL) do delta da curva glicêmica dos participantes com obesidade (**A**) e eutróficos (**B**). Resultados expressos como média ± desvio padrão. Teste *t* pareado; $p < 0,05$.



6.3.3 Excreção de metabólitos urinários

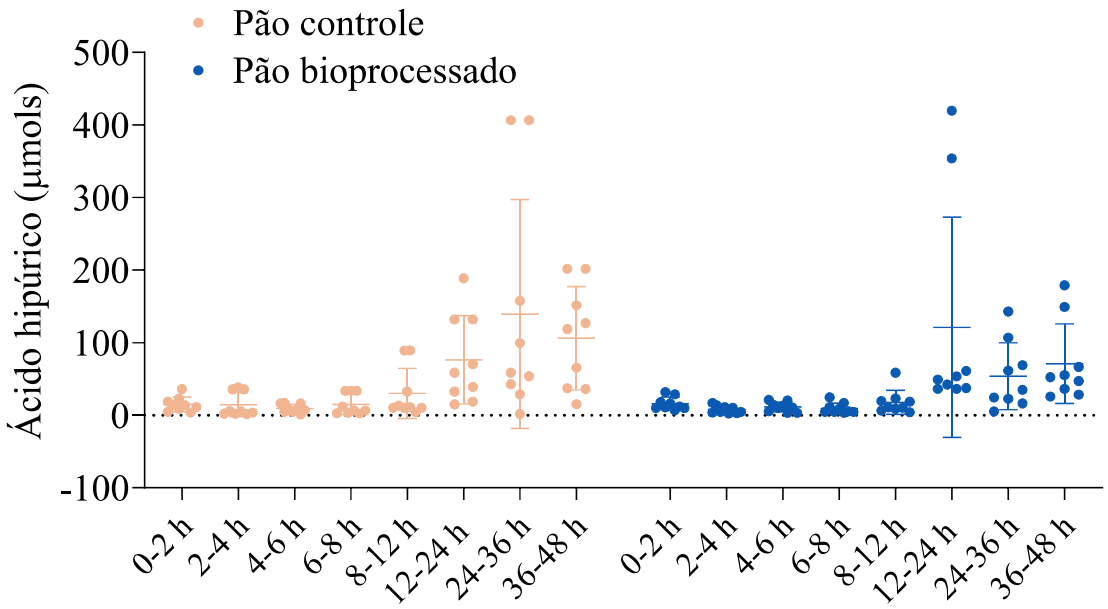
Apenas dois metabólitos (ácido hipúrico e ácido ferúlico) foram identificados na urina dos participantes do estudo. O ácido hipúrico foi o metabólito urinário mais abundante, correspondendo a 99% do total após o consumo do pão controle e 95% do total após o consumo do pão bioprocessado, com uma excreção média de 342 µmol ao longo das 48 horas de coleta. Não foram observadas diferenças na excreção desse composto após o consumo do pão controle e do pão bioprocessado (**Figura 19**). O ácido hipúrico pode derivar tanto da exposição ao tolueno quanto da ingestão dietética de polifenóis (como catequinas e ácido clorogênico), ácido benzóico (presente em laticínios e usado como aditivo em alimentos para conservação) e proteínas (como a fenilalanina) (Siqueira et al., 2002; Ticinese et al., 2023). Considerando que, durante o estudo clínico, os participantes seguiram uma dieta pobre em compostos fenólicos, podemos inferir que o ácido hipúrico detectado resulta predominantemente do consumo dos pães e dos alimentos consumidos e permitidos na dieta, como leite e derivados e alimentos fonte de proteínas, como carnes e derivados.

Figura 19. Excreção total de ácido hipúrico ao longo de 48 horas após o consumo do pão controle e do pão bioprocessado. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Teste t pareado, $p < 0,05$.



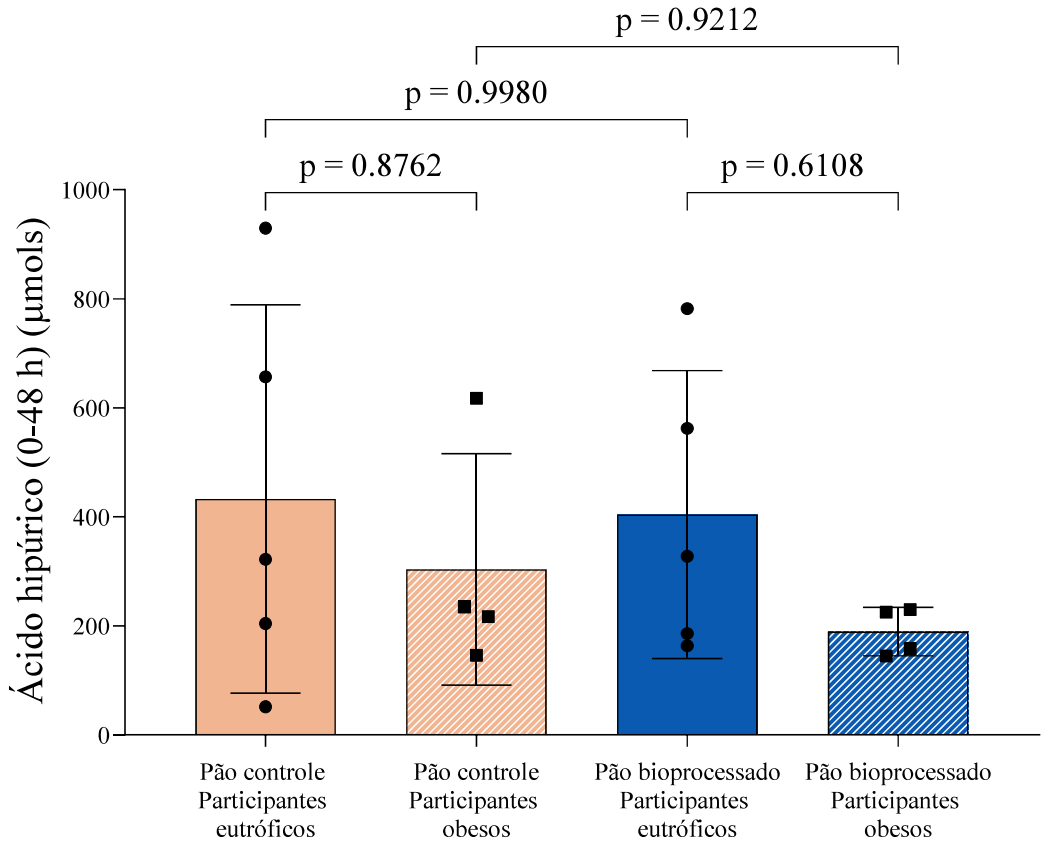
Ao analisar a excreção de ácido hipúrico ao longo das 48 horas do estudo clínico, observa-se que a excreção apresentou um perfil semelhante entre as duas intervenções (consumo de pão controle e de pão bioprocessado) (**Figura 20**). Essa baixa variabilidade interindividual é particularmente evidente nas primeiras oito horas do estudo, período no qual a alimentação foi rigorosamente controlada. A uniformidade dos dados nesse intervalo reforça a adequação das condições experimentais e assegura o controle das variáveis dietéticas durante a fase inicial da coleta de urina. Esses achados reforçam a robustez do estudo clínico e conferem maior confiabilidade às análises realizadas e às conclusões obtidas, fornecendo uma base sólida para a comparação entre os pães avaliados. Após esse período, pequenas variações entre os participantes foram observadas, o que era esperado diante da maior autonomia alimentar permitida.

Figura 20. Excreção de ácido hipúrico ao longo das 48 horas após o consumo do pão controle e do pão bioprocessado. Resultados expressos como média ± desvio padrão.



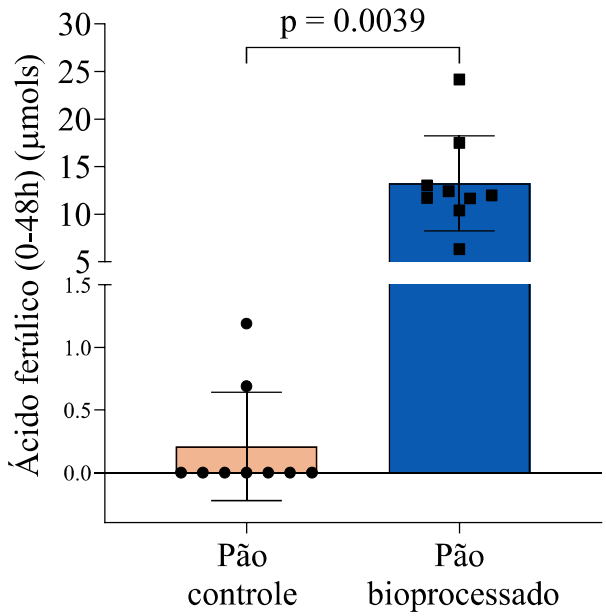
Não foram observadas diferenças significativas na excreção urinária de ácido hipúrico entre participantes eutróficos e com obesidade, tampouco entre as diferentes intervenções realizadas (**Figura 21**). Segundo Ticinesi et al. (2023), os níveis plasmáticos e urinários de ácido hipúrico são influenciados por múltiplos processos fisiopatológicos, incluindo envelhecimento, condições relacionadas à idade, dieta, composição da microbiota intestinal e função renal. Calvani et al. (2010), ao aplicar uma abordagem metabolômica em amostras urinárias, identificaram o ácido hipúrico como um dos metabólitos derivados da microbiota colônica envolvidos na discriminação entre indivíduos eutróficos e com obesidade mórbida, sendo que o fenótipo metabólico urinário das pessoas com obesidade apresentou uma concentração aproximadamente duas vezes menor desse metabólito. A ausência de diferença observada no presente estudo pode estar relacionada ao número reduzido de participantes e ao fato de os indivíduos com obesidade avaliados não apresentarem obesidade mórbida, o que pode ter limitado a expressão metabólica característica descrita na literatura.

Figura 21. Excreção total de ácido hipúrico ao longo de 48 horas após o consumo do pão controle e do pão bioprocessado, agrupado entre os participantes eutróficos e com obesidade. Resultados expressos como média ± desvio padrão. (One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).



Após o consumo do pão controle, apenas 2 dos 9 voluntários excretaram o ácido ferúlico, com uma média de 0,94 µmol (**Figura 22**). Em contraste, todos os participantes excretaram o ácido ferúlico após o consumo do pão bioprocessado, com uma média 14 vezes maior (13,2 µmol). Esses resultados indicam que o bioprocessamento foi eficaz em aumentar a biodisponibilidade do ácido ferúlico, demonstrando o potencial dessa técnica para melhorar sua liberação e absorção.

Figura 22. Excreção total de ácido ferúlico ao longo de 48 horas após o consumo do pão controle e do pão bioprocessado. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$.

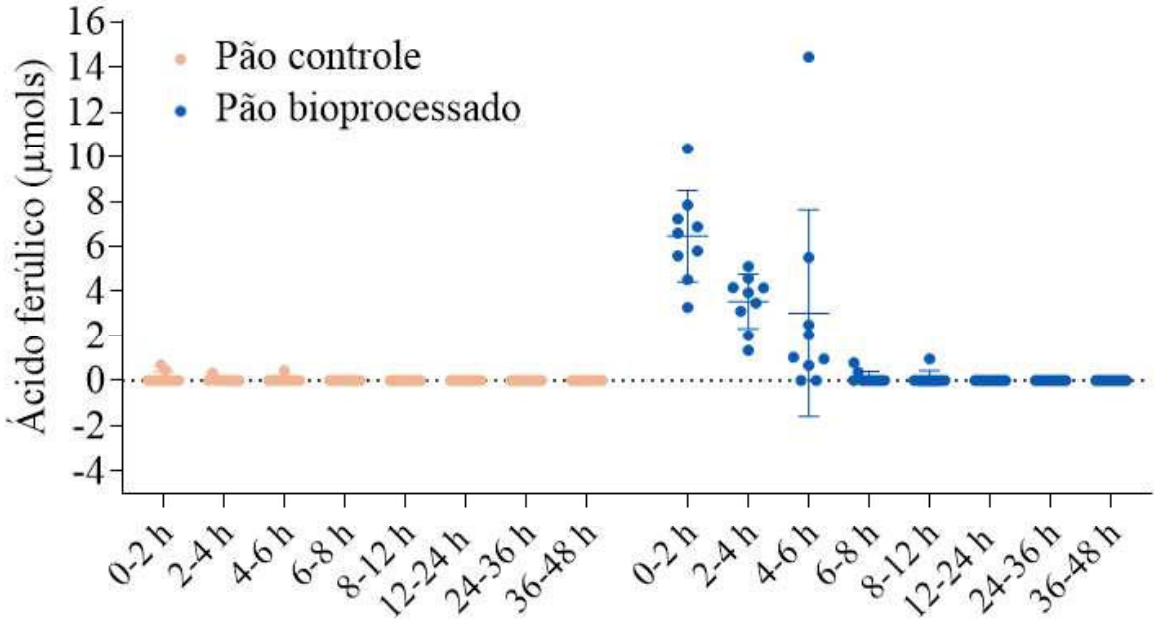


Apesar de Anson *et al*. (2011) terem relatado uma excreção urinária de ácido ferúlico maior (110 µmol em 24 h) após o consumo de pão de trigo bioprocessado, o aumento observado em relação ao pão controle foi de apenas 2 vezes. Em contraste, no presente estudo, a excreção urinária de ácido ferúlico foi 14 vezes maior após o consumo do pão bioprocessado em comparação ao pão controle. Contudo, ao interpretar esses dados, é necessário considerar as diferenças metodológicas entre os estudos. A dose de pão administrada por Anson et al. (2011) foi três vezes maior que a utilizada no presente trabalho, além de haver diferenças significativas na formulação dos pães, o que impactou diretamente na quantidade de compostos fenólicos ofertados aos voluntários. Enquanto Anson et al. (2011) utilizaram pão preparado com farinha integral, que continha 230 mg de ácido ferúlico na dose controle, o presente estudo utilizou pão à base de farinha refinada, resultando em uma dose substancialmente menor, de apenas 34 mg de ácido ferúlico. Essas diferenças na matriz alimentar e na dosagem devem ser levadas em consideração ao comparar os resultados entre os estudos.

A excreção urinária de ácido ferúlico ocorreu predominantemente nas primeiras quatro horas após o consumo dos pães, com aproximadamente 75% do total excretado nesse intervalo, sugerindo que sua absorção pode ter início no intestino delgado. Entre 4 e 12 h, foram eliminados os 25% restantes, e não foi detectada excreção entre 12 e 48 h (**Figura 23**). Resultados semelhantes foram observados por Lappi et al. (2013), que relataram 60% da

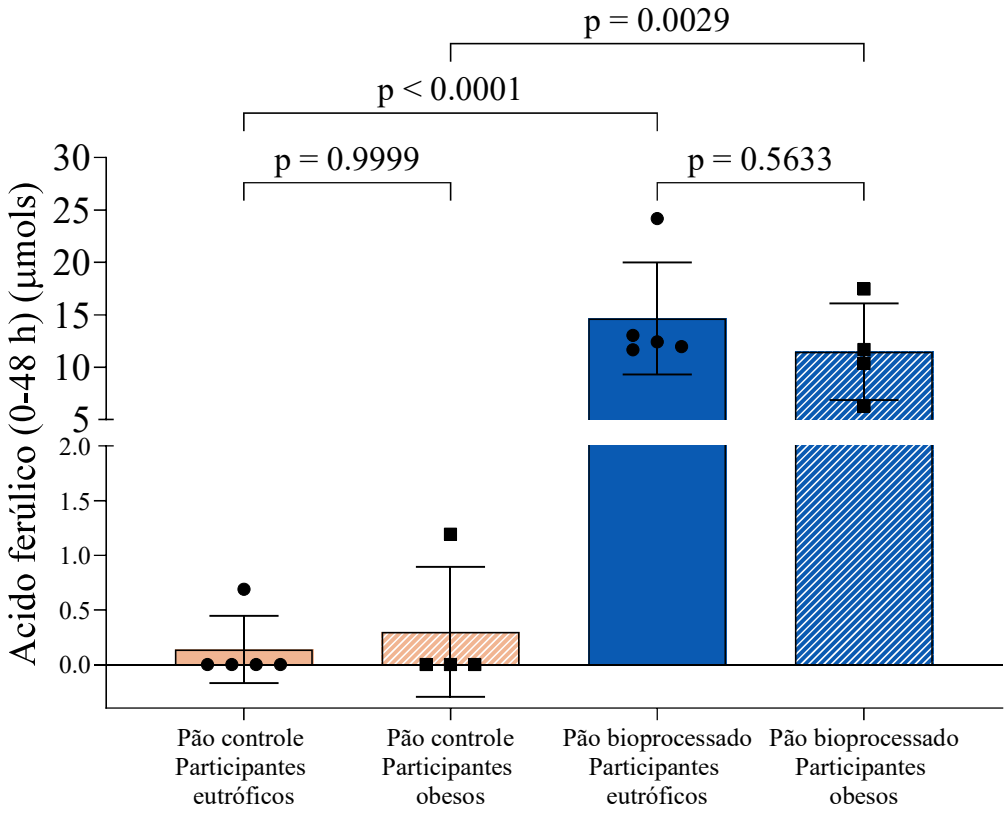
excreção de ácido ferúlico nas primeiras 4 h, 29% entre 4 e 12 h, e 11% entre 12 e 24 h, após o consumo de pão elaborado com farinha de trigo refinada e fortificado com farelo de centeio bioprocessado. De modo complementar, Bresciani et al. (2016) apontaram que a excreção nas primeiras três horas após o consumo sugere uma absorção rápida no intestino delgado, seguida de conjugação hepática ou intestinal. Excreções entre 3 e 6 h após o consumo sugerem a liberação de compostos fenólicos ligados à fibra pela microbiota colônica. Por outro lado, excreções mais tardias parecem estar associadas à metabolização colônica e formação de metabólitos específicos. Anson et al. (2011) detectaram em momentos tardios após a ingestão (6-24 h) o aumento dos metabólitos ácido 3-hidroxifenilpropiônico e ácido fenilpropiônico, que tiveram sua origem colônica como metabólitos do ácido ferúlico confirmada pelo tempo de aparecimento no plasma e pela sua estrutura química. Bresciani et al. (2016) detectou a excreção urinária em até 48 h após a ingestão de pão de metabólitos de ácido ferúlico (ácido ferúlico-4'-*O*-sulfato, ácido di-hidroferúlico-4'-*O*-sulfato e ácido dihidroferúlico-*O*-glucuronídeo), sulfato de ácido dihidrocaféico e outros metabólitos de baixo peso molecular, como o ácido vanílico-4-*O*-sulfato e o sulfato do ácido hidroxibenzóico.

Figura 23. Excreção total de ácido ferúlico ao longo de 48 horas após o consumo do pão controle e do pão bioprocessado, agrupado entre os participantes eutróficos e com obesidade. Resultados expressos como média ± desvio padrão. (One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).



Não foram observadas diferenças significativas na excreção total de ácido ferúlico entre voluntários eutróficos e com obesidade (**Figura 24**). Considerando as diferenças conhecidas na composição da microbiota intestinal entre esses grupos, seria plausível esperar variações na metabolização de compostos fenólicos. No entanto, os dados obtidos referem-se a metabólitos de excreção precoce, livres ou liberados após a hidrólise enzimática com β-glucuronidase/sulfatase de *Helix pomatia*, que converte as formas conjugadas com ácido glucurônico e sulfato em ácido ferúlico livre. Dessa forma, eventuais diferenças relacionadas à produção de metabólitos colônicos, característicos da excreção tardia, não puderam ser detectadas neste estudo.

Figura 24. Excreção total de ácido ferúlico ao longo 48 horas após o consumo do pão controle e do pão bioprocessado, agrupado entre os participantes eutróficos e com obesidade. Resultados expressos como média ± desvio padrão. (One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).



Esses resultados, embora reforcem o efeito do bioprocessamento sobre a biodisponibilidade de ácido ferúlico, também evidenciam limitações importantes relacionadas ao escopo analítico utilizado. A ausência de identificação dos metabólitos colônicos impede uma avaliação mais abrangente do impacto da microbiota intestinal na metabolização dos compostos fenólicos, especialmente em indivíduos com perfis metabólicos distintos, como

eutróficos e indivíduos com obesidade. Estudos futuros utilizando abordagens metabolômicas direcionadas ou não-direcionadas, integradas à análise da microbiota fecal poderão contribuir para uma compreensão mais completa das vias metabólicas envolvidas e do papel do bioprocessamento na modulação da interação entre dieta, microbiota e metabolismo de compostos fenólicos.

6.4 CONCLUSÃO

O bioprocessamento utilizado demonstrou ser eficiente para a liberação de ácido ferúlico no pão. Observou-se que o bioprocessamento enzimático impactou a resposta glicêmica apenas em indivíduos com obesidade, enquanto a excreção urinária de ácido hipúrico não foi influenciada pelo tipo de pão consumido nem pela composição corporal dos participantes. A excreção urinária de ácido ferúlico foi 14 vezes maior após o consumo dos pães bioprocessados em comparação ao controle. Contudo, o índice de massa corporal não teve efeito sobre a sua excreção. Ressalta-se que limitações analíticas impediram a detecção de outros metabólitos, especialmente os de origem colônica, os quais poderiam apresentar maior sensibilidade às diferenças individuais na composição corporal e na microbiota colônica dos participantes.

7 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos nos três capítulos desta tese reforçam o efeito positivo do bioprocessamento enzimático na liberação de compostos fenólicos da matriz alimentar. O bioprocessamento de pães utilizando coprodutos agroindustriais fermentados demonstrou ser uma estratégia viável, eficaz e sustentável, promovendo o aproveitamento e a valorização desses materiais. No entanto, dificuldades relacionadas à reprodutibilidade dos resultados, após uma interrupção prolongada nas atividades experimentais, inviabilizaram a aplicação contínua dessas enzimas produzidas localmente, comprometendo a proposta inicial.

Como alternativa, a utilização da enzima comercial Pentopan® se mostrou eficaz na liberação de ácido ferúlico a partir do farelo de trigo, especialmente quando combinada com a autoclavagem, estratégia que potencializou a liberação do composto. A incorporação do farelo bioprocessado na formulação do pão se revelou como uma alternativa promissora para a obtenção de produtos com alto teor de ácido ferúlico solúvel.

O estudo clínico indicou que o bioprocessamento enzimático influenciou a resposta glicêmica exclusivamente em indivíduos com obesidade e afetou significativamente a excreção urinária de ácido ferúlico. O índice de massa corporal, por sua vez, não alterou o perfil de excreção dos metabólitos analisados. A ausência de diferenças mais expressivas entre os grupos de eutróficos e de indivíduos com obesidade pode ser atribuída a limitações do método analítico utilizado, que não permitiu a detecção de metabólitos de excreção tardia, especialmente aqueles resultantes da metabolização colônica, que potencialmente sofreriam maior influência da composição corporal.

Com o objetivo de aprofundar esses achados, as amostras de urina coletadas no estudo clínico foram enviadas a um laboratório parceiro no exterior para análise metabolômica do perfil urinário, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial. Atualmente, os dados encontram-se em fase de processamento. Espera-se que essa abordagem permita identificar um espectro mais amplo de metabólitos, incluindo aqueles de excreção tardia associados à ação da microbiota intestinal, possibilitando uma avaliação mais precisa da influência da composição corporal no metabolismo de compostos fenólicos. Além disso, a análise da microbiota fecal a partir das amostras de fezes coletadas dos participantes no estudo clínico permitirá a caracterização do perfil da microbiota colônica e sua associação com os resultados metabólicos observados.

8 REFERÊNCIAS

AACC. *Approved Methods of Analysis*. 11th ed. Baking Quality, AACC Method 10-05.01, Guidelines for Measurement of Volume by Rapeseed Displacement.

AATIF, M. Current understanding of polyphenols to enhance bioavailability for better therapies. *Biomedicines*, v. 11, n. 7, p. 2078, 2023.

ABDEL-AAL, E.-S. M.; RABALSKI, I. Changes in phenolic acids and antioxidant properties during baking of bread and muffin made from blends of hairless canary seed, wheat, and corn. *Antioxidants*, v. 11, n. 6, p. 1059, 2022.

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

ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 21, p. 6182–6187, 2002.

ALMEIDA, S. S. et al. Bioaccessibility and gut metabolism of phenolic compounds of breads added with green coffee infusion and enzymatically bioprocessed. *Food Chemistry*, v. 333, p. 127473, 2020.

AMORIM, G. M. et al. Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 11, p. 34–41, 2017.

ANGELINO, D. et al. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: A review. *Food and Function*, v. 8, n. 7, p. 2368–2393, 2017.

ANGIOLONI, A.; COLLAR, C. Polyphenol composition and in vitro antiradical activity of single and multigrain breads. *Journal of Cereal Science*, v. 53, n. 1, p. 90–96, 2011.

ANSON, N. M. et al. Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 14, p. 6148–6155, 2009.

ANSON, N. M. et al. Bioprocessing of wheat bran in whole wheat bread increases the bioavailability of phenolic acids in men and exerts anti-inflammatory effects ex vivo. *The Journal of Nutrition*, v. 141, n. 1, p. 137–143, 2011.

ANTOINE, C. et al. Wheat bran tissue fractionation using biochemical markers. *Journal of Cereal Science*, v. 39, n. 3, p. 387–393, 2004.

ARAÚJO, F. F. de et al. Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, v. 338, p. 127535, 2021.

ATWELL, W. A. *Wheat flour*. St. Paul: American Association of Cereal Chemists International, 2001. p. 1–14.

AUNE, D. et al. Whole grain and refined grain consumption and the risk of type 2 diabetes: A systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Epidemiology*, v. 28, p. 845–858, 2013.

AYDIN, E.; GOCMEN, D. The influences of drying method and metabisulfite pre-treatment on the color, functional properties and phenolic acids contents and bioaccessibility of pumpkin flour. *LWT - Food Science and Technology*, v. 60, n. 1, p. 385–392, 2015.

BARBA, F. J. et al. Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. *Trends in Food Science & Technology*, v. 67, p. 195–206, 2017.

BAUTISTA-EXPÓSITO, S. et al. Enzyme selection and hydrolysis under optimal conditions improved phenolic acid solubility, and antioxidant and anti-inflammatory activities of wheat bran. *Antioxidants*, v. 13, n. 10, p. 984, 2020.

BENTO-SILVA, A. et al. Factors affecting intake, metabolism and health benefits of phenolic acids: do we understand individual variability? *European Journal of Nutrition*, 2019.

BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; VERMA, P. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 6, p. 40, 2019.

BHATIA, L. et al. Food wastes phenolic compounds (PCs): Overview of contemporary greener extraction technologies, industrial potential, and its integration into circular bioeconomy. *Energy, Ecology and Environment*, 2024.

BONDIA-PONS, I. et al. Phenolic compounds in rye and their bioavailability and health effects. *Journal of Cereal Science*, v. 49, n. 3, p. 323–336, 2009.

BOTELLA, C. et al. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 42, n. 1, p. 98–101, 2007.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.

BRAY, G. A.; KIM, K. K.; WILDING, J. P. Obesity: A chronic relapsing progressive disease process. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 19, n. 1, p. 5–9, 2017.

BRESCIANI, L. et al. Bioavailability and metabolism of phenolic compounds from wholegrain wheat and aleurone-rich wheat bread. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 60, n. 11, p. 2343–2354, 2016.

BRYNGELSSON, S.; DIMBERG, L. H.; KAMAL-ELDIN, A. Effects of commercial processing on levels of antioxidants in oats (*Avena sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 7, p. 1890–1896, 2002.

BUTT, M. et al. Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technology and Biotechnology*, v. 46, n. 1, p. 22–31, 2008.

CĂLINOIU, L. F.; VODNAR, D. C. Thermal processing for the release of phenolic compounds from wheat and oat bran. *Biomolecules*, v. 10, n. 1, p. 21, 2019.

CALVANI, R. et al. Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype. *International Journal of Obesity*, v. 34, n. 6, p. 1095–1098, 2010.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Multivariate optimization and supplementation strategies for the simultaneous production of amylases, cellulases, xylanases, and proteases by *Aspergillus awamori* under solid-state fermentation conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 175, n. 3, p. 1588–1602, 2014.

CHAN, E. W. C. et al. Resveratrol and pterostilbene: A comparative overview of their chemistry, biosynthesis, plant sources, and pharmacological properties. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 9, n. 7, p. 124–129, 2019.

CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. *Journal of Functional Foods*, v. 4, n. 2, p. 226–237, 2012.

CHEN, Y. et al. The intestinal delivery systems of ferulic acid: Absorption, metabolism, influencing factors, and potential applications. *Food Frontiers*, v. 5, n. 4, p. 1126–1144, 2024.

CHENG, H. et al. Interactions between gut microbiota and polyphenols: A mechanistic and metabolomic review. *Phytomedicine*, v. 119, p. 154979, 2023.

CHEYNIER, V. et al. Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, v. 12, n. 2, p. 219–238, 2012.

CLIFFORD, M. N. Diet-derived phenolic compounds in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Medica*, v. 70, n.12, p. 1103-1114, 2004.

CODA, R. et al. Effect of bioprocessing and particle size on the nutritional properties of wheat bran fractions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 25, p. 19–27, 2014.

COSTA MAIA, I. et al. Effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from brewer's spent grain revealed by UPLC-MSE. *LWT*, v. 133, p. 110136, 2020.

COSTA, R. et al. Enzymes produced by solid state fermentation of agro-industrial by-products release ferulic acid in bioprocessed whole-wheat breads. *Food Research International*, v. 140, p. 109843, 2021.

DAHIYA, S. et al. Microbial xylanases in bread making. *Encyclopedia of Food Chemistry*, v. 23, n. 4, p. 140–149, 2018.

DELCOUR, J. A.; HOSENEY, R. C. *Principles of cereal science and technology*. 3rd ed. St. Paul: AACC International, 2010. p. 1–22.

DHULL, S. B. et al. Solid-state fermentation of lentil (*Lens culinaris* L.) with *Aspergillus awamori*: Effect on phenolic compounds, mineral content, and their bioavailability. *Legume Science*, v. 37, p. 1–12, 2020.

DI GIOIA, D. et al. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid. *Journal of Biotechnology*, v. 156, n. 4, p. 309–316, 2011.

DILOKPIMOL, A. et al. Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, n. 2, p. 305–312, 2016.

DOMÍNGUEZ-AVILA, J. A. et al. Use of nonthermal technologies in the production of functional beverages from vegetable ingredients to preserve heat-labile phytochemicals. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 42, n. 2, e13506, 2017.

DONA, A. M. Enhancing antioxidant activity and extractability of bioactive compounds of wheat bran using thermal treatments. 2011. Master's thesis (Department of Food Science) — University of Manitoba, Winnipeg, Canada, 2011

DZIKI, D.; RÓŻYŁO, R.; GAWLIK-DZIKI, U.; ŚWIECA, M. Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. *Trends in Food Science and Technology*, v. 40, p. 48–61, 2014.

FARDET, A. New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre? *Nutrition Research Reviews*, v. 23, p. 65–134, 2010.

GOESAERT, H. et al. Wheat flour constituents: How they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, v. 16, n. 12, p. 12–30, 2005.

GRAÇAS-COSTA, E.; DE SOUZA, P. M. Introduction to cereals. In: SHAH, M. A.; VALIYAPEEDIYEKKAL SUNOOJ, K.; MIR, S. A. (eds.) *Cereal-Based Food Products*. Cham: Springer, 2023.

HAN, H.; DYE, L.; MACKIE, A. The impact of processing on the release and antioxidant capacity of ferulic acid from wheat: A systematic review. *Food Research International*, v. 164, p. 112371, 2023.

HEMERY, Y. M. et al. Milling of wheat bran and its impact on the bioaccessibility of phenolic acids in bread. *Food Chemistry*, v. 119, n. 3, p. 1245–1252, 2010.

HILHORST, R. et al. Effects of xylanase and peroxidase on soluble and insoluble arabinoxylans in wheat bread dough. *Journal of Food Science*, v. 67, n. 2, p. 497–506, 2002.

HITHAMANI, G.; SRINIVASAN, H. Bioaccessibility of polyphenols from wheat (*Triticum aestivum*), sorghum (*Sorghum bicolor*), green gram (*Vigna radiata*), and chickpea (*Cicer arietinum*) as influenced by domestic food processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 46, 2014.

HU, Y. et al. Intake of whole grain foods and risk of type 2 diabetes: results from three prospective cohort studies. *BMJ*, v. 370, 2020.

IKRAM, S. et al. Composition and nutrient value proposition of brewers spent grain. *Journal of Food Science*, v. 82, n. 10, p. 2232–2242, 2017.

INADA, K. O. P. et al. Metabolism of ellagitannins from jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) in normoweight, overweight and obese Brazilians: Unexpected laxative effects influence urolithins urinary excretion and metabotype distribution. *Journal of Functional Foods*, v. 57, p. 299–308, 2019.

JAKOBEK, L.; MATIĆ, P. Non-covalent dietary fiber–polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology*, v. 83, p. 235–247, 2018.

JUHNEVICA-RADENKOVA, K. et al. Highly-efficient release of ferulic acid from agro-industrial by-products via enzymatic hydrolysis with cellulose-degrading enzymes: Part I — The superiority of hydrolytic enzymes versus conventional hydrolysis. *Foods*, v. 10, n. 4, p. 782, 2021.

KHALID, A.; HAMEED, A.; TAHIR, M. F. Wheat quality: A review on chemical composition, nutritional attributes, grain anatomy, types, classification, and function of seed storage proteins in bread making quality. *Frontiers in Nutrition*, v. 10, art. 1053196, 2023.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 345–351, 2002.

KOISTINEN, V. M. et al. Effect of bioprocessing on the in vitro colonic microbial metabolism of phenolic acids from rye bran fortified breads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, n. 9, p. 1854–1864, 2017.

KORNBRUST, B. A.; FORMAN, T.; MATVEEVA, I. Applications of enzymes in breadmaking. In: *Breadmaking: Improving quality*, 2nd ed. Woodhead Publishing Limited, 2012.

KROON, P. A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plants and food: Current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 79, n. 3, p. 355–361, 1999.

LADDOMADA, B.; CARETTO, S.; MITA, G. Wheat bran phenolic acids: bioavailability and stability in whole wheat-based foods. *Molecules*, v. 20, p. 15666–15685, 2015.

LAPPI, J. et al. Intake of whole-grain and fiber-rich rye bread versus refined wheat bread does not differentiate intestinal microbiota composition in Finnish adults with metabolic syndrome. *The Journal of Nutrition*, v. 143, p. 648–655, 2013.

LECUMBERRI, E. et al. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, v. 104, n. 3, p. 948–954, 2007.

LI, Y.; LI, M.; WANG, L.; LI, Z. Effect of particle size on the release behavior and functional properties of wheat bran phenolic compounds during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, v. 367, 2022.

LONG, L. et al. Thermotolerant hemicellulolytic and cellulolytic enzymes from *Eupenicillium parvum* 4-14 display high efficiency upon release of ferulic acid from wheat bran. *Journal of Applied Microbiology*, v. 121, n. 2, p. 422–434, 2016.

LÓPEZ-YERENA, A. et al. Metabolomics technologies for the identification and quantification of dietary phenolic compound metabolites: An overview. *Antioxidants*, v. 10, n. 6, p. 846, 2021.

LUCA, S. V. et al. Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 60, p. 626–659, 2020.

LYNCH, K. M.; STEFFEN, E. J.; ARENDT, E. K. Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 122, n. 4, p. 553–568, 2016.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 79, p. 727–747, 2004.

MANDAK, E.; NYSTRÖM, L. Influence of baking and in vitro digestion on steryl ferulates from wheat. *Journal of Cereal Science*, v. 57, n. 3, p. 356–361, 2013.

MATEO ANSON, N. et al. Bioprocessing of wheat bran in whole wheat bread increases the bioavailability of phenolic acids in men and exerts antiinflammatory effects ex vivo. *The Journal of Nutrition*, v. 141, n. 1, p. 137–143, 2011.

MATSUSHITA, K. et al. The bread making qualities of bread dough supplemented with whole wheat flour and treated with enzymes. *Food Science and Technology Research*, v. 23, n. 3, p. 403–410, 2017.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico: obesidade e excesso de peso no Brasil — análise dos dados de 2023. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, 2024. v. 55, n. 07.

MÖRKL, S. et al. Gut microbiota and body composition in anorexia nervosa inpatients in comparison to athletes, overweight, obese, and normal weight controls. *International Journal of Eating Disorders*, v. 50, n. 12, p. 1421–1431, 2017.

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

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 1523–1542, 2006.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION (NCD-RISC). Worldwide trends in underweight and obesity from 1990 to 2022: a pooled analysis of 3663 population-representative studies with 222 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*, v. 403, n. 10431, p. 1027–1050, 2024.

NEETA, K.; ABHAY, S.; MALA, R. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 23, n. 4, p. 411–456, 1999.

OECD/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. OECD-FAO agricultural outlook 2023–2032. Paris: OECD Publishing, 2023.

OUTEIRIÑO, D. et al. A novel approach to the biorefinery of brewery spent grain. *Process Biochemistry*, v. 85, p. 135–142, 2019.

PANAGIOTOU, G.; GRANOUILLET, P.; OLSSON, L. Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 72, n. 6, p. 1117–1124, 2006.

PASMANS, A. R. et al. The role of polyphenols in the modulation of postprandial glucose metabolism: a review of the literature. *Obesity Reviews*, v. 23, n. 9, e13486, 2022.

PRINSEN, P.; GUTIÉRREZ, A.; FAULDS, C. B.; DEL RÍO, J. C. Comprehensive study of valuable lipophilic phytochemicals in wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 7, p. 1664–1673, 2014.

RAGAEE, S.; SEETHARAMAN, K.; ABDEL-AAL, E. S. M. The impact of milling and thermal processing on phenolic compounds in cereal grains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 54, n. 7, p. 837–849, 2014.

RAGHAVENDRA, S. N. et al. Lipid encapsulated phenolic compounds by fluidization. *Journal of Food Science and Technology*, v. 43, n. 4, p. 365–368, 2006.

REBOREDO-RODRÍGUEZ, P. et al. Phenolic compounds isolated from olive oil as nutraceutical tools for the prevention and management of cancer and cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 8, 2018.

REDAN, B. W.; BUHMAN, K. K.; NOVOTNY, J. A.; FERRUZZI, M. G. Altered nutrient and phytochemical bioavailability in disease states: a review. *Advances in Nutrition*, v. 7, n. 4, p. 735–746, 2016.

REMELY, M.; TESAR, I.; HIPPE, B.; GNAUER, S.; RUST, P.; HASLBERGER, A. G. Gut microbiota composition correlates with changes in body fat content due to weight loss. *Beneficial Microbes*, v. 6, n. 4, p. 431–439, 2015.

REUNGOAT, V.; ALLAIS, F.; DUCATEL, H.; IOANNOU, I. Extraction and purification processes of sinapic acid derivatives from rapeseed and mustard seed by-products. *Separation & Purification Reviews*, v. 51, n. 4, p. 521–544, 2021.

RIBAS-AGUSTÍ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R.; ELEZ-MARTÍNEZ, P. Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 58, n. 15, p. 2531–2548, 2018.

ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 4, p. 1215–1221, 2011.

ROCHETTI, G. et al. Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 21, n. 2, p. 811–842, 2022.

ROSA, N. N.; BARRON, C.; GAIANI, C.; DUFOUR, C.; MICARD, V. Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. *Food Chemistry*, v. 141, n. 1, p. 823–830, 2013.

ROSALES, E.; PAZOS, M.; ÁNGELES SANROMÁN, M. Solid-state fermentation for food applications. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, p. 319–355, 2018.

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.

SALAR, R. K.; PUREWAL, S. S.; BHATTI, M. S. Optimization of extraction conditions and enhancement of phenolic content and antioxidant activity of pearl millet fermented with *Aspergillus awamori* MTCC-548. *Resource-Efficient Technologies*, v. 2, n. 3, p. 148–157, 2016.

SALAR, R. K.; PUREWAL, S. S.; SANDHU, K. S. Fermented pearl millet (*Pennisetum glaucum*) with in vitro DNA damage protection activity, bioactive compounds and antioxidant potential. *Food Research International*, v. 100, p. 204–210, 2017.

SARKAR, D.; CHRISTOPHER, A.; SHETTY, K. Phenolic bioactives from plant-based foods for glycemic control. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, 727503, 2022.

SEGANFREDO, F. B. et al. Weight-loss interventions and gut microbiota changes in overweight and obese patients: a systematic review. *Obesity Reviews*, v. 18, n. 8, p. 832–851, 2017.

SENSOY, İ.; ROSEN, R. T.; HO, C.-T.; KARWE, M. V. Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*, v. 99, n. 2, p. 388–393, 2006.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods. *Trends in Food Science & Technology*, v. 20, n. 9, p. 376–387, 2009.

SHAHIDI, F.; DANIELSKI, R.; IKEDA, C. Phenolic compounds in cereal grains and effects of processing on their composition and bioactivities: a review. *Journal of Food Bioactives*, v. 15, p. 39–50, 2021.

SHAHIDI, F.; PENG, H. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*, v. 4, p. 11–68, 2018.

SHAHIDI, F.; VARATHARAJAN, V.; OH, W. Y.; PENG, H. Phenolic compounds in agri-food by-products, their bioavailability and health effects. *Journal of Food Bioactives*, v. 5, n. 1, p. 57–119, 2019.

SHAHIDI, F.; YEO, J. Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 6, p. 1573, 2018.

SILVA, A.; SILVA, V.; IGREJAS, G.; VALENTÃO, P. Phenolic compounds classification and their distribution in winemaking by-products. *European Food Research and Technology*, v. 249, p. 207–239, 2023.

SILVA, E. O.; BATISTA, R. Ferulic acid and naturally occurring compounds bearing a feruloyl moiety: a review on their structures, occurrence, and potential health benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 16, n. 4, p. 580-616, 2017.

SILVA, F. O. et al. Fermentation of soybean meal improves isoflavone metabolism after soy biscuit consumption by adults. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 100, n. 7, p. 2991–2998, 2020.

SIQUEIRA, M. E. P. B.; PAIVA, M. J. N. Hippuric acid in urine: reference values. *Revista de Saúde Pública*, v. 36, n. 6, p. 723-727, 2002.

SOUZA, P. M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 2, p. 337–346, 2015.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, v. 30, n. 18, p. 3268–3295, 2007.

SUNGURTAS, J.; SWANSTON, J. S.; DAVIES, H. V.; MCDOUGALL, G. J. Xylan-degrading enzymes and arabinoxylan solubilisation in barley cultivars of differing malting quality. *Journal of Cereal Science*, v. 39, n. 2, p. 273–281, 2004.

TABKA, M. G. et al. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 4, p. 897–902, 2006.

TANG, G. et al. Meta-analysis of the association between whole grain intake and coronary heart disease risk. *American Journal of Cardiology*, v. 115, p. 625–629, 2015.

TANG, G.; WANG, D.; LONG, J.; YANG, F.; SI, L. Meta-analysis of the association between whole grain intake and coronary heart disease risk. *American Journal of Cardiology*, v. 115, p. 625–629, 2015.

TARASCOU, I. et al. The hidden face of food phenolic composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 501, n. 1, p. 16–22, 2010.

TEBBEN, L.; SHEN, Y.; LI, Y. Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: a review of their effects on dough properties and bread quality. *Trends in Food Science and Technology*, v. 81, p. 10–24, 2018.

TICINESI, A. et al. Disentangling the complexity of nutrition, frailty and gut microbial pathways during aging: a focus on hippuric acid. *Nutrients*, v. 15, n. 5, art. 1138, 2023.

TURNER, A. L. et al. Increased bioavailability of phenolic acids and enhanced vascular function following intake of feruloyl esterase-processed high fibre bread: a randomized, controlled, single blind, crossover human intervention trial. *Clinical Nutrition*, v. 40, n. 3, 2021.

VAN CRAEYVELD, E.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Reduction of wheat and rye bran particle size: impact on dietary fiber extractability, antioxidant capacity, and enzymatic hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 7, p. 2900–2908, 2009.

VÁSQUEZ, Z. S. et al. Biotechnological approaches for cocoa waste management: a review. *Waste Management*, v. 90, p. 72–83, 2019.

VUOLO, M.; LIMA, V.; MARÓSTICA JR., M. Phenolic compounds: structure, classification, and antioxidant power. In: *Bioactive Compounds*, p. 33–50. Elsevier, 2019.

WANG, M.; VAN VLIET, T.; HAMER, R. J. Evidence that pentosans and xylanase affect the re-agglomeration of the gluten network. *Journal of Cereal Science*, v. 39, n. 3, p. 341–349, 2004.

WANG, T.; HE, F.; CHEN, G. Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: a concise review. *Journal of Functional Foods*, v. 7, p. 101-111, 2014.

WATERS, D. M. et al. Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment. *European Food Research and Technology*, v. 235, n. 5, p. 767–778, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. 2024. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight. Acessado em Fevereiro de 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation (WHO Technical Report Series, No. 894). Geneva: WHO, 2000. Disponível em: https://apps.who.int/iris/handle/10665/42330. Acessado em Fevereiro de 2025.

WU, H. et al. High efficiency co-production of ferulic acid and xylooligosaccharides from wheat bran by recombinant xylanase and feruloyl esterase. *Biochemical Engineering Journal*, v. 120, p. 41–48, 2017.

WU, H. et al. Whole grain intake and mortality: two large prospective studies in U.S. men and women. *JAMA Internal Medicine*, v. 175, p. 373–384, 2015.

WU, N.-N. et al. Free and bound phenolic profiles of the bran from different rice varieties and their antioxidant activity and inhibitory effects on α-amylose and α-glucosidase. *Journal of Cereal Science*, v. 82, p. 206–212, 2018.

YIN, Z. et al. Comparison of releasing bound phenolic acids from wheat bran by fermentation of three Aspergillus species. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 53, n. 5, p. 1120–1130, 2018.

YU, L.; BETA, T. Identification and antioxidant properties of phenolic compounds during production of bread from purple wheat grains. *Molecules*, v. 20, n. 9, p. 15525–15549, 2015.

ZADEIKE, D. et al. Comparative study of ciabatta crust crispness through acoustic and mechanical methods: effects of wheat malt and protease on dough rheology and crust crispness retention during storage. *LWT - Food Science and Technology*, v. 89, p. 110–116, 2018.

ZHANG, K. et al. Oat-based foods: chemical constituents, glycemic index, and the effect of processing. *Foods*, v. 10, n. 6, p. 1304, 2021.

ZHANG, M. et al. Antioxidant properties of tartary buckwheat extracts as affected by different thermal processing methods. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, n. 1, p. 181–185, 2010.

ZHOU, K.; LAUX, J. J.; YU, L. M. Comparison of Swiss red wheat grain and aleurone antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 5, p. 1118–1123, 2004.

9 ANEXOS

Anexo 1 - Certificado de análise Pentopan

Certificate of Analysis

novozymes
Rethink Tomorrow

Date
Jul 28, 2022
Purchase order item/date

Delivery
70200514
Sales order
2101640

Sold to
UFRJ - Laboratório COPPECombL

Material:	**Pentopan 100 BG**		
Batch:	**CN100987**	Quantity:	**100 G**
Production date:	**Mar 11, 2022**		
		Best before:	**Mar 10, 2024**

Characteristic	Unit	Value
Fungal xylanase unit FXU	/g	2979,7
Total viable count	/g	< 100
Coliform bacteria	/g	< 10
E.coli		Not Detected, 25 g
Salmonella		Not Detected, 25 g

The product is standardized by documented addition in a process controlled by Novozymes ISO 9001 quality system

The product complies with current FAO/WHO JECFA and FCC recommended purity specifications for food grade enzymes.

This is a computer generated document and no signature is required.

Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética

UFRJ - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO / HUCFF-UFRJ

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Efeito do bioprocessamento enzimático de pães integrais sobre o metabolismo de seus compostos fenólicos em indivíduos eutróficos e obesos.

Pesquisador: Daniel Perrone Moreira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 47789021.6.0000.5257

Instituição Proponente: INSTITUTO DE QUIMICA

Patrocinador Principal: INSTITUTO DE QUIMICA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.751.781

Apresentação do Projeto:
Emenda E1 recebida em 10/10/2022

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2031972_E1.pdf" de 10/10/2022.

Compostos fenólicos podem estar presentes nos alimentos na forma insolúvel (ligados à matriz) ou na forma solúvel (livre ou conjugado). Nos grãos e cereais, os compostos fenólicos se encontram majoritariamente na forma insolúvel, covalentemente ligados aos componentes estruturais da parede celular e consequentemente menos bioacessíveis e biodisponíveis. Estratégias como adição de ingredientes naturalmente ricos em compostos fenólicos solúveis e a aplicação de técnicas de bioprocessamento enzimático tem potencial para aumentar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de compostos fenólicos em pão. Dessa forma, a presente pesquisa tem como objetivo avaliar o efeito do bioprocessamento enzimático sobre o metabolismo de compostos fenólicos de pão integral em adultos eutróficos (n=20) e obesos graus I e II (n=20).

Os participantes serão submetidos a dois diferentes testes (consumo de pão integral e consumo de pão integral bioprocessado) com um período de intervalo de 2 semanas entre cada intervenção. O estudo consistirá no consumo agudo de pão integral após jejum noturno de 8 horas. No dia anterior ao estudo, será coletada a urina basal, que corresponderá à urina total da noite anterior até imediatamente antes da ingestão do pão. Após a ingestão do mesmo, amostras de urina serão coletadas nos intervalos de 0-4; 4-8; 8-12; 12-24; 24-36 e 36-48 horas. O volume total de urina em cada intervalo de coleta será aferido e alíquotas serão armazenadas a -80 °C para posterior análise dos metabólitos excretados. O nível de glicose no sangue dos participantes da pesquisa será medido com auxílio de um sistema portátil de monitorização da glicose no tempo zero (imediatamente antes do consumo de pão) e após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos do consumo do alimento. Amostras de fezes serão solicitadas durante o estudo para análise do perfil da microbiota intestinal.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar o efeito do bioprocessamento enzimático de pão integral sobre o metabolismo dos compostos fenólicos em indivíduos eutróficos e obesos.

Objetivo Secundário: Avaliar a relação entre o metabolismo dos compostos fenólicos e o perfil da microbiota colônica dos indivíduos eutróficos e obesos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: O participante passará por períodos de restrição alimentar, o que poderá acarretar dores de cabeça, tonturas, hipoglicemia e outros. Nesse caso, o participante poderá não dar continuidade a pesquisa. Forneceremos uma refeição completa e todo suporte médico sem despesas para o participante. A participação no estudo tem como risco possível a reação alérgica aos ingredientes do pão. Para prevenir esse caso, não haverá a participação de pessoas com relato de qualquer tipo de alergia alimentar. Além disso, para evitar riscos de infecção ou intoxicação, os pães serão produzidos seguindo as boas práticas de higiene e segurança. O procedimento de coleta de amostras de urina e fezes não deverá acarretar desconforto ou danos a sua saúde. No entanto, para evitar o risco de aquisição ou transmissão de doenças, recomendamos a lavagem

das mãos com água e sabão antes e após a coleta. Para diminuir riscos de contaminação a glicemia capilar será realizada com material descartável e após a higienização do local da punção.

BENEFÍCIOS: Não há benefício direto para o participante. Como benefícios indiretos da pesquisa temos a complementação de informações para a comunidade científica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Trata-se da Emenda E1 enviada ao Comitê de Ética com a seguinte justificativa:

A principal alteração na emenda enviada ao comitê de Ética consiste em mudanças na forma de bioprocessamento do pão que será oferecido aos participantes do estudo. No projeto inicialmente aprovado pelo Comitê de Ética os pães seriam bioprocessados enzimaticamente a partir da adição dos coprodutos da indústria de alimentos farelo de trigo e resíduo de malte cervejeiro fermentados pelo microrganismo Aspergillus awamori. Porém atrasos e intercorrências no projeto decorrentes da interrupção nas atividades impostas pela pandemia de COVID-19 fizeram com que a produção das enzimas por fermentação em estado sólido ficasse inviável. Como forma de viabilizar o projeto foi estabelecido contato com a empresa privada Novozymes® que doou amostra do preparado enzimático Pentopan® 500 BG que possui atividade declarada de xilanase (endo-1,4-) e de feruloil esterase e que é comercializado para uso em processos industriais na fabricação de alimentos e possui certificado de segurança, conformidade e especificações de pureza para enzimas de qualidade alimentar fornecidos pela empresa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Não foram identificados óbices éticos nesta emenda.

Diante do exposto, o CEP/HUCFF/FM/UFRJ, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº.466 de 2012 e na Norma Operacional CNS nº. 001 de 2013, item 2.2.e, se manifesta por aprovar esta emenda.

UFRJ - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO / HUCFF-UFRJ

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP/HUCFF/FM/UFRJ relatórios parciais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Considerações Finais a critério do CEP:

1.De acordo com o item X.1.3.b, da Resolução CNS n. 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais - a contar da data de aprovação do protocolo - que permitam ao Cep acompanhar o desenvolvimento dos projetos. Esses relatórios devem ser assinados pelo pesquisador responsável e conter as informações detalhadas - naqueles itens aplicáveis - nos moldes do relatório final contido no endereço: http://conselho.saude.gov.br/comites-de-etica-em-pesquisa-conep?view=default(clicar na aba Documentos Orientadores), bem como deve haver menção ao período a que se referem. As informações contidas no relatório devem ater-se ao período correspondente e não a todo o período da pesquisa até aquele momento. Para cada relatório, deve haver uma notificação separada. A submissão deve ser como Notificação (consultar pág. 69 no arquivo intitulado "1 - Manual Pesquisador - Versão 3.2.39 disponível no endereço http://plataformabrasil.saude.gov.br/login.jsf.Anexar em arquivo com recurso "copiar e colar"

2. Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas de forma clara e sucinta, identificando-se, por cor, negrito ou sublinhado, a parte do documento a ser modificada, isto é, além de apresentar o resumo das alterações, juntamente com a justificativa, é necessário destacá-las no decorrer do texto (item 2.2.1.H.1, da Norma Operacional CNS nº 001 de 2013).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2031972_E1.pdf	10/10/2022 11:21:20		Aceito
Outros	CartaEmenda.pdf	10/10/2022 11:19:31	Suellen Silva de Almeida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_Emenda.pdf	10/10/2022 11:16:48	Suellen Silva de Almeida	Aceito

UFRJ - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO / HUCFF-UFRJ

Continuação do Parecer: 5.751.701

Outros	CartaResposta.docx	29/09/2021 22:45:45	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Outros	PlanoAcompanhamento.docx	29/09/2021 22:44:26	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Outros	Analise_Interina.pdf	29/09/2021 22:37:07	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	29/09/2021 22:27:03	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Cronograma	Cronograma_Projeto_de_Pesquisa.docx	29/09/2021 22:26:10	Daniel Perrone Moreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_com_alteracoes.pdf	29/09/2021 22:21:18	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Outros	Tarefas_Delegadas.pdf	29/09/2021 22:20:59	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Outros	Nomeacao_Claudio_Mota_DOU.pdf	29/09/2021 22:20:20	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Outros	Lista_CV_Lattes.pdf	29/09/2021 22:18:27	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Outros	Encaminhamento_eventos_adversos.pdf	29/09/2021 22:18:00	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Outros	Comite_de_Monitoramento.pdf	29/09/2021 22:17:26	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Outros	Anuencia_Brigada_de_Emergencia.pdf	29/09/2021 22:16:01	Daniel Perrone Moreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	29/09/2021 22:12:58	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.docx	17/05/2021 08:07:24	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Outros	Lista_CV_Lattes.docx	13/05/2021 18:09:49	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Outros	Concordancia_LABAFS.pdf	13/05/2021 18:08:48	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Outros	Questionario_projeto_de_pesquisa.docx	13/05/2021 18:07:36	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Outros	Divulgacao_e_recrutamento_dos_participantes.docx	13/05/2021 18:06:46	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisadores.pdf	13/05/2021 18:06:04	Daniel Perrone Moreira	Aceito

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E, sala 35
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO / HUCFF-UFRJ

Outros	Declaracao_InicioProjeto.pdf	13/05/2021 16:05:33	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Outros	Carta_de_Apresentacao.pdf	13/05/2021 16:04:24	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Declaração de concordância	Concordancia_LBNA.pdf	13/05/2021 17:53:28	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Infraestrutura_CT.pdf	13/05/2021 17:49:17	Daniel Perrone Moreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	13/05/2021 17:48:45	Daniel Perrone Moreira	Aceito
Orçamento	Orcamento_detalhado.docx	13/05/2021 17:48:20	Daniel Perrone Moreira	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIO DE JANEIRO, 10 de Novembro de 2022

Assinado por:
Monique Loureiro
(Coordenador(a))

Anexo 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza - CCMN

Instituto de Química – IQ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Nome:_____ Contato: _____

Trabalho de pesquisa: Efeito do bioprocessamento enzimático de pães integrais sobre o metabolismo de seus compostos fenólicos em indivíduos eutróficos e obesos

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é estudar a maneira como a adição de um material contendo enzimas vai modificar a forma como compostos bioativos presentes em pães (compostos fenólicos) são metabolizados (absorção e excreção) no corpo de seres humanos. Este estudo está sendo realizado pela nutricionista e doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos Suellen Silva de Almeida, sob orientação dos professores Dr. Daniel Perrone Moreira, Dr.ª Mariana Costa Monteiro da Fonseca e Dr.ª Nathália Moura Nunes. Sua participação consistirá em consumir pão integral. Participando desse estudo, dois dias antes e durante a coleta de urina você será orientado a:

- Beber 2 litros de água por dia;

- Anotar todas as bebidas e alimentos consumidos;

- Não consumir frutas, hortaliças, cereais integrais, oleaginosas, cacau, chás, café, vinho e cerveja.

O estudo será dividido em 2 etapas com intervalo de duas semanas entre as etapas. Em cada uma das etapas, após jejum noturno de 8 horas, será oferecida 100 g de pão integral. Amostras de urina antes da ingestão e nos períodos de 0 a 2 h, 2 a 4 h, 4 a 6 h, 6 a 8 h, 8 a 12 h, 12 a 24 h, 24 a 36 h e 36 a 48 h após a ingestão do pão serão coletadas. O nível de glicose no sangue será medido com medidor de glicose a partir de amostra de sangue capilar obtida através da punção dos dedos das mãos no tempo zero (imediatamente antes do consumo de pão) e após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da ingestão de pão. Será solicitada uma amostra de fezes durante o período de duração do estudo.

Considera-se que toda pesquisa com seres humanos envolve risco. No caso deste estudo, acreditamos que o principal risco à saúde seja um possível caso de reação alérgica aos ingredientes do

pão. Para prevenir esse caso, não haverá a participação de pessoas com relato de qualquer tipo de alergia alimentar. Além disso, para evitar riscos de infecção ou intoxicação, os pães serão produzidos seguindo as boas práticas de higiene e segurança. O procedimento de coleta de amostras de urina não deverá acarretar desconforto ou danos a sua saúde. No entanto, para evitar o risco de aquisição ou transmissão de doenças, recomendamos a lavagem das mãos com água e sabão antes e após a coleta da urina. Para diminuir riscos de contaminação a glicemia capilar será realizada com material descartável e após a higienização do local da punção. Todos os dados fornecidos por você são considerados confidenciais, sendo garantido o sigilo das informações e sua privacidade. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a sua identificação. Para prevenir o risco de quebra do sigilo das informações, somente nós, os pesquisadores envolvidos no estudo, saberemos das informações relacionadas aos participantes, bem como tomaremos todas os cuidados necessários para evitar que isso aconteça.

Esclarecemos, ainda, que não há benefício direto para você, mas que sua participação contribui para complementar as informações na comunidade científica. Você será reembolsado de despesas relacionadas à pesquisa, tais como alimentação e transporte necessários para sua participação no estudo. A sua participação na pesquisa não é obrigatória e sua recusa não acarretará nenhum prejuízo. Além disso, você poderá se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem qualquer tipo de aborrecimento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo ou punição, sem necessidade de justificativa.

Caso você venha a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você terá direito à indenização por parte do pesquisador, do patrocinador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa. Cabe enfatizar que a questão da indenização não é prerrogativa da Resolução CNS N° 466 de 2012, estando originalmente prevista no Código Civil (Lei 10.406 de 2002), sobretudo nos artigos 927 a 954, dos Capítulos I (Da Obrigação de Indenizar) e II (Da I (Da Obrigação de Indenizar), Título IX (Da Responsabilidade Civil).

Em caso de dúvidas ou questionamentos, você pode se manifestar agora ou em qualquer momento do estudo para explicações adicionais. Você terá acesso direto com os responsáveis pela pesquisa das seguintes formas:

• Prof. Daniel Perrone: e-mail: danielperrone@iq.ufrj.br. Endereço: Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Centro de Tecnologia, bloco A, sala 528A. Cidade Universitária. Rio de Janeiro. Telefone de contato: 3938-8213.

• Profª. Mariana Monteiro: e-mail: mariana@nutricao.ufrj.br. Endereço: Av. Carlos Chagas Filho, 373, Centro de Ciências da Saúde, bloco J, segundo andar, sala 16. Cidade Universitária. Rio de Janeiro. Telefone de contato: 3938-6449.

• Profª. Nathália Moura Nunes: e-mail: moura.nunes.n@gmail.com. Endereço: R. São Francisco Xavier, 524, Pavilhão João Lyra Filho,12º andar, Bloco D. Maracanã. Rio de Janeiro. Telefone de contato: 23340722.

• Suellen Silva de Almeida: e-mail: suellensilvadealmeida@yahoo.com.br. Endereço: Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Centro de Tecnologia, bloco A, sala 528A. Cidade Universitária. Rio de Janeiro. Telefone de contato: 99720-7885.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ. O CEP é um órgão institucional que tem por objetivo proteger o bem-estar dos participantes de um estudo clínico por meio da avaliação dos projetos de pesquisa que envolvam a participação de seres humanos. O CEP está localizado na Rua Professor Rodolpho Paulo Rocco, nº 255, 7º andar, Ala E. Cidade Universitária/Ilha do Fundão. Rio de Janeiro. Telefone (21) 3938-2480, atendimento de segunda a sexta-feira, das 8 às 16 horas ou através do email: cep@hucff.ufrj.br.

Li e concordo em participar da pesquisa. Eu receberei uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além

disso, estou ciente de que eu e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Data: ____/____/20__

_____ _____

Nome do participante da Pesquisa Assinatura do participante da Pesquisa

Anexo 4 – Ilustração da divulgação do estudo clínico

Anexo 5 – Questionário aplicado aos participantes do estudo clínico

QUESTIONÁRIO PARA INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES NA PESQUISA

Projeto: "Efeito do bioprocessamento enzimático de pães integrais sobre o metabolismo de seus compostos fenólicos em indivíduos eutróficos e obesos"

Data da coleta de dados ___/____/____

- Dados pessoais

Nome: _____

Código:_____

Sexo: ( ) masculino ( ) feminino.

Data de nascimento: ___/___/____ Idade: _____

Telefone residencial: _____

Celular:_____

Email: _____

- Dados antropométricos

Peso: _____ kg Estatura: _____ m IMC:_____ (kg/m²)

Classificação segundo IMC (OMS,1998): _____

- Dados sobre saúde

1 – Fumante? ( ) sim ( ) não ( ) parou. Quanto tempo?____

2 – Consumo de bebidas alcoólicas: ( ) sim ( ) não ( ) parou. Quanto tempo? ____

3 – Prática algum exercício físico: ( ) sim ( ) não ( ) parou. Quanto tempo? ____

Tempo de exercício: ( ) menor que 30 min. ( ) maior que 30 min.

Frequência: _____ vezes na semana

Tipo de exercício: ( ) caminhada ( ) natação ( ) ciclismo ( ) musculação
( ) dança ( ) luta ( ) corrida

( ) Outras: _____

4 – Você está grávida ou amamentando?
( ) sim ( ) não

5 – Utiliza ou utilizou suplementos dietéticos nos últimos três meses? Quais?

_____
_____

6 – Utiliza ou utilizou alguma suplementação de probióticos ou produtos com sua adição? Quais?

_____
_____

7 – Utiliza ou utilizou algum medicamento de uso contínuo nos últimos três meses? Quais?_____
_____
_____
_____

8 – Tem ou teve alguma doença do sistema digestório (esofagite, gastrite, doença celíaca e etc.)? Quais?

_____
_____

9 – Tem ou teve alguma doença inflamatória intestinal (retocolite ulcerativa ou Doença de Crohn)?

_____
_____

10 – Tem ou teve alguma alergia alimentar?

---

11 – Você possui alergia a trigo ou glúten?

_____
_____

12 – Tem alguma das seguintes doenças?

( ) Diabetes

( ) Doenças cardiovasculares (hipertensão arterial, arritmia, infarto de miocárdio)

( ) Doença renal

( ) Câncer

( ) Fenilcetonúria

13 – Tem ou teve alguma outra doença? Quais?

_____
_____
_____

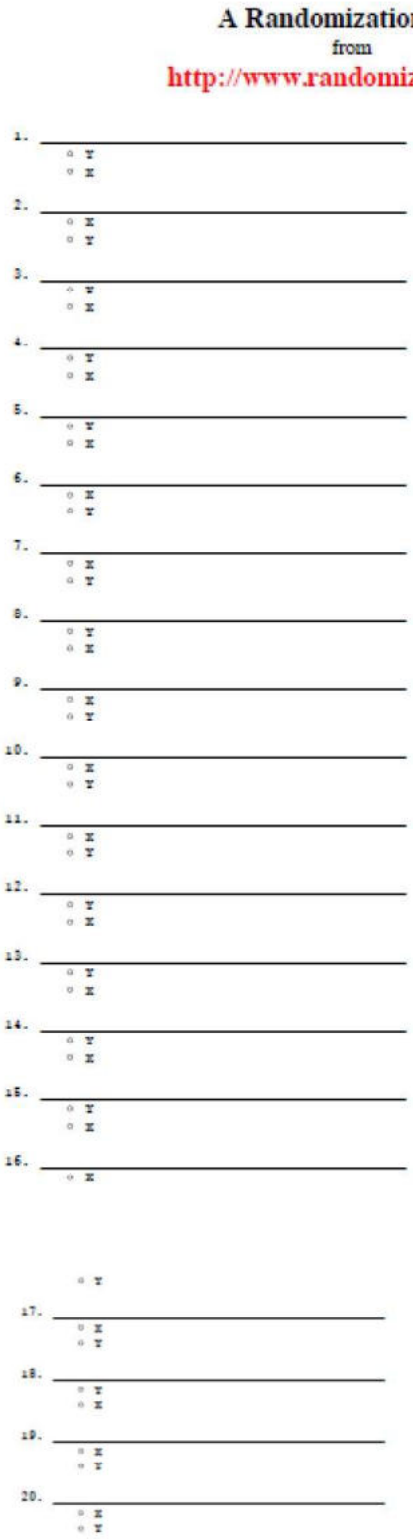
15 – Está participando ou participou de algum estudo clinico nos últimos 15 dias? Se sim, explique brevemente o que você tem/tinha que fazer no estudo. Ingeriu algum

medicamento ou alimento? Coletou amostras de saliva, urina, sangue ou fezes?

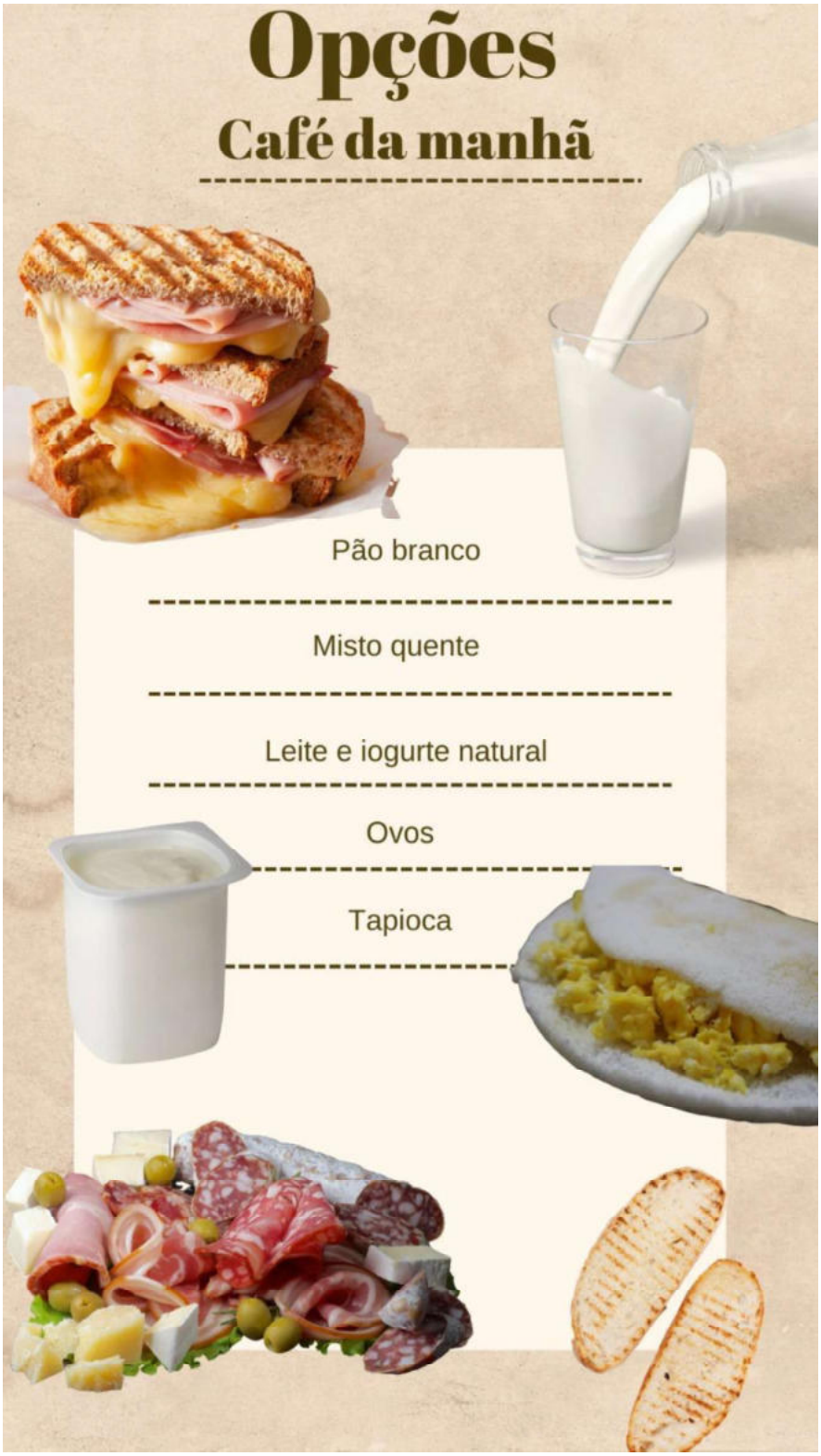
_____

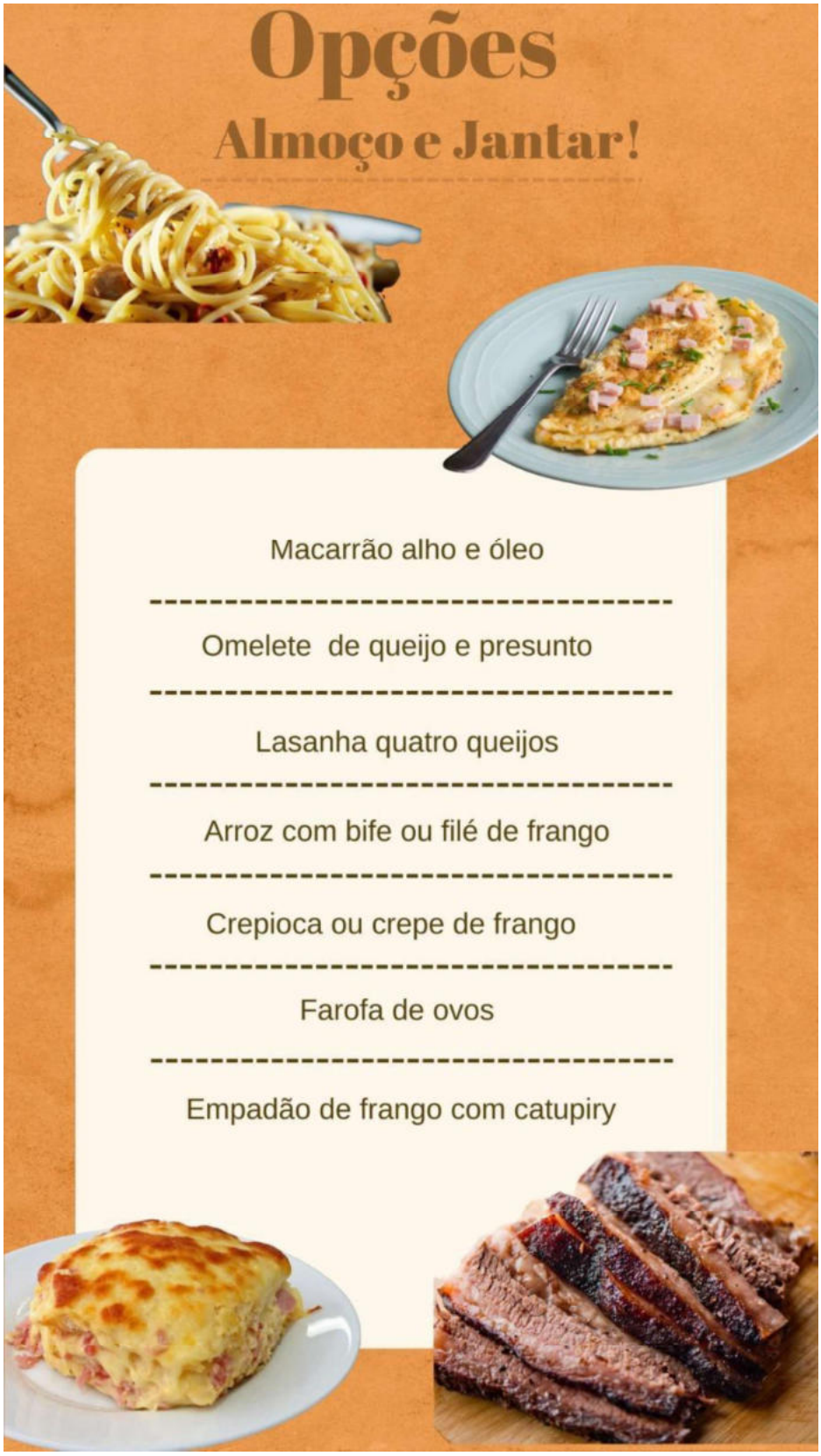
_____

Anexo 6 – Esquema de randomização do estudo clínico



Anexo 7 – Imagens com instruções sobre a alimentação ao longo do estudo clínico


Opções
Café da manhã
Pão branco
Misto quente
Leite e iogurte natural
Ovos
Tapioca


Opções
Almoço e Jantar!
Macarrão alho e óleo
Omelete de queijo e presunto
Lasanha quatro queijos
Arroz com bife ou filé de frango
Crepioca ou crepe de frango
Farofa de ovos
Empadão de frango com catupiry

Opções

Guloseimas!

Hambúrguer

Cachorro quente sem molho

Bolinha de queijo

Pudim de leite condensado

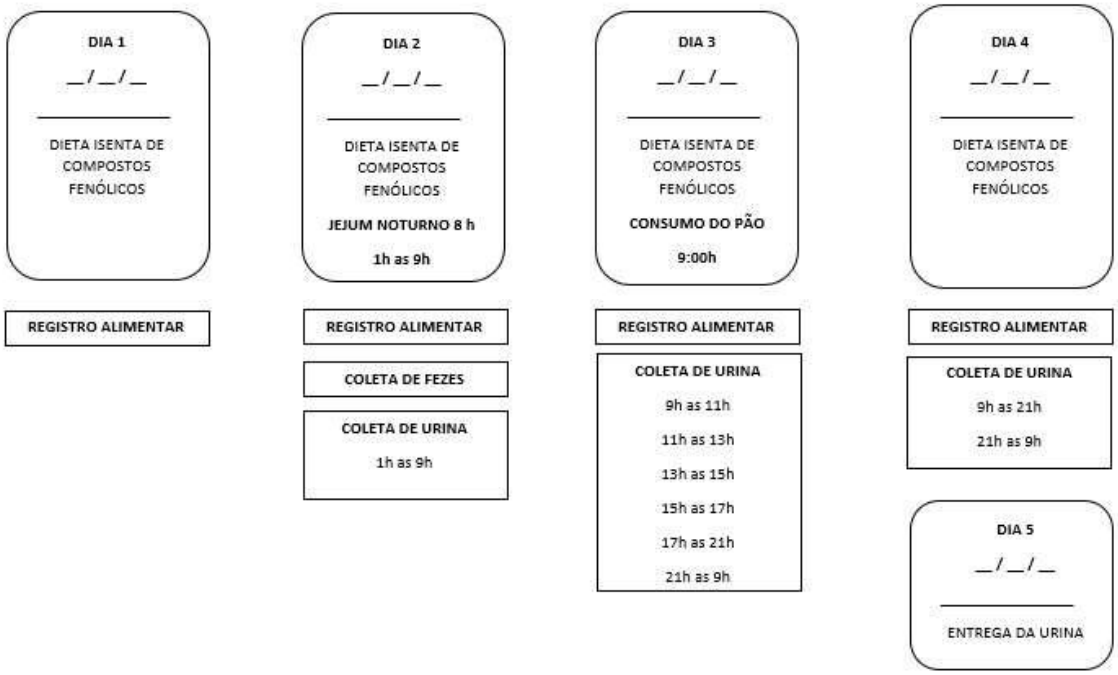
Sorvete de creme

Bolo simples

Empadinha de queijo

Anexo 8 – Instruções enviadas aos participantes sobre o estudo clínico

ESQUEMA DO ESTUDO



DIETA ISENTA DE FENÓLICOS

ALIMENTOS PROIBIDOS:

- Frutas frescas ou secas
- Açaí
- Verduras (ex.: alface, agrião, couve, brócolis, couve-flor)
- Legumes (ex.: abóbora, berinjela, chuchu, pimentão)
- Raízes e tubercúlos (Ex.: batata, batata-doce, aipim)
- Cereais integrais (ex.: pão integral, arroz integral, macarrão integral, farinhas integrais)
- Leguminosas (ex.: feijões, lentilha, ervilha, grão de bico, soja)
- Oleaginosas (ex.: amendoim, nozes, castanhas, avelã)
- Bebidas alcoólicas (ex.: vinho, cerveja, destilados)
- Chás (ex.: preto, verde. mate, erva-doce)
- Cacau (chocolate, achocolatado)
- Café
- Produtos contendo algum dos alimentos proibidos:
  - Sucos e bebidas com frutas e hortaliças, como sucos, chás e refrigerantes com frutas
  - Doce de frutas em calda e geleia
  - Pão com frutas cristalizadas
  - Bebidas lácteas com frutas
  - Bebidas à base de café. como cappuccino

ALIMENTOS PERMITIDOS:

- Carnes bovina e suína, frango, ovos, peixes, frutos do mar e embutidos (salsicha, linguiça, presunto).

Obs.: Em preparações que não contenham produtos da lista de proibidos

- Arroz branco
- Pão branco
- Macarrão branco. Obs.: Sem molho de tomate
- Macarrão instantâneo
- Tapioca
- Farofa
- Leites e derivados (queijo, requeijão, iogurte)
- Maionese
- Doces: leite condensado, doce de leite, gelatina, sorvete de creme
- Refresco de pozinho. Ex.: Tang

REGISTRO ALIMENTAR

- Anotar tudo que consumir nos 4 dias de estudo

COLETA DE FEZES

- Coleta no frasco universal fornecido pelo pesquisador.
- Armazenar em congelador imediatamente após a coleta
- Não coletar fezes que entraram em contato com a água do vaso sanitário ou com urina

COLETA DE URINA

- Coletar toda a urina pelo tempo que foi orientado pelo pesquisador nos potes entregues ao longo da pesquisa.
- Não trocar as tampas dos potes
- Caso você esqueça e urine no vaso sanitário avisar ao pesquisador para interrupção do estudo
- Cada intervalo de coleta de urina deve ser realizado no pote correspondente
- Armazenar os potes com urina na geladeira

OPÇÕES DE REFEIÇÕES COM ALIMENTOS PERMITIDOS:

CAFÉ DA MANHÃ / LANCHE:

PÃO COM MANTEIGA E LEITE

IOGURTE NATURAL

MISTO QUENTE

CACHORRO-QUENTE SEM MOLHO

PÃO DE QUEIJO

BOLO SIMPLES

ALMOÇO / JANTAR:

ARROZ BRANCO COM FILÉ DE FRANGO / CARNE / PEIXE

MACARRÃO COM MOLHO BRANCO OU ALHO E ÓLEO OU MOLHO DE QUEIJO

OMELETE DE QUEIJO E PRESUNTO

EMPADÃO DE QUEIJO OU FRANGO

FRANGO COM REQUEIJÃO

SOBREMESA: DOCE DE LEITE / PUDIM DE LEITE CONDENSADO / GELATINA COM CREME DE LEITE

OBSERVAÇÕES

QUALQUER DÚVIDA ENTRAR EM CONTATO A QUALQUER MOMENTO POR TELEFONE OU WHATSAPP COM SUELLEN NO TELEFONE (21) 997207885