

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURIAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS

Camila Sant'Anna Monteiro

**EFEITO DA MICRONIZAÇÃO SOBRE A BIOTRANSFORMAÇÃO DO
BAGAÇO DE OLIVA EM MODELO ESTÁTICO DE FERMENTAÇÃO
COLÔNICA**

Santa Maria, RS
2022

Camila Sant'Anna Monteiro

**EFEITO DA MICRONIZAÇÃO SOBRE A BIOTRANSFORMAÇÃO DO BAGAÇO
DE OLIVA EM MODELO ESTÁTICO DE FERMENTAÇÃO COLÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientador^a: Dr^a. Tatiana Emanuelli
Coorientador^a: Dr^a. Sabrina Somacal
Coorientador: Dr. Cristiano Augusto Ballus

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Monteiro, Camila Sant'Anna
Efeito da micronização sobre a biotransformação do
bagaço de oliva em modelo estático de fermentação colônica
/ Camila Sant'Anna Monteiro.- 2022.
66 p.; 30 cm

Orientadora: Tatiana Emanuelli
Coorientadores: Sabrina Somacal, Cristiano Augusto
Ballus
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2022

1. Resíduo da oliva 2. Olivicultura 3. Compostos
fenólicos 4. Microbiota intestinal I. Emanuelli, Tatiana
II. Somacal, Sabrina III. Ballus, Cristiano Augusto IV.
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, CAMILA SANT'ANNA MONTEIRO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Camila Sant'Anna Monteiro

**EFEITO DA MICRONIZAÇÃO SOBRE A BIOTRANSFORMAÇÃO DO BAGAÇO
DE OLIVA EM MODELO ESTÁTICO DE FERMENTAÇÃO COLÔNICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestra em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

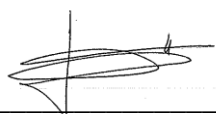
Aprovado em 14 de fevereiro de 2022:



Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Ana Teresa Serra, Dra. (iBET)



Jesús Lozano-Sánchez, Dr. (UGR)

Santa Maria, RS
2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família e amigos, que sempre acreditaram em mim!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo apoio e incentivo nesta jornada. Meus pais José Eraldo e Ana Maria (*in memoriam*) e meu irmão Raul, estiveram comigo no pensamento e coração. Ao meu noivo Ricardo, que esteve sempre ao meu lado apoiando e incentivando. Não mediu esforços quando precisei de ajuda nos experimentos, nos finais de semana e feriados. Muito obrigada por tudo! Agradeço minha sogra, Elisa, pelos cuidados e apoio nos últimos anos em Santa Maria. Obrigada, obrigada, muito obrigada!

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Tatiana Emanuelli, por todos aprendizados e dedicação com a pesquisa. És um exemplo de pessoa e professora, te admiro muito! À minha coorientadora, Dra. Sabrina Somacal, pela amizade, por todos os conhecimentos e por tanta dedicação para ensinar.

As gurias do NIDAL do grupo de pesquisa em Compostos Bioativos, Camila Araujo, Dariane Trivisiol, Franciele Smaniotto, Julia Baranzelli, Luana Dluzniewski, Paula Bortolazzo e Sabrina Somacal. Por todo apoio e parceria durante os experimentos. Vocês são demais!

Sou grata a minha equipe da “Olive Plus”, Julia Baranzelli, Rogério Assis Brasil, Cassandra de Deus e Thaianes Marques. Desde a criação da startup, vocês me incentivaram muito e trouxeram um outro olhar sobre a pesquisa. O mercado das olivas no Brasil precisa ser mais bem explorado, e nós vamos juntos!

Gratidão pelas queridas colegas da pós-graduação que tive o prazer de conviver no presencial e no virtual, Lídia, Cecília, Cassandra, Fabiane, Pamela e Alice, pela companhia, brincadeiras e mensagens que fez os dias ficarem mais leves.

Agradeço ao Prof. Dr. Cristiano Augusto Ballus e a Carla Farias, por todos ensinamentos e contribuições nas análises dos compostos fenólicos deste trabalho. Aos professores (as) Dr. Jesus Lozano Sánchez, Dr^a. Teresa Serra e Dr^a. Paula Augusti, por aceitarem contribuir nesta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, pela atenção e apoio que recebi durante todo o curso. Aos servidores e professores que tive o prazer em conhecer e aprender. À Universidade Federal de Santa Maria, por me acolher e ter sido minha segunda casa durante esses três de pós-graduação. Agradeço a CAPES pela bolsa de estudos e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

EFEITO DA MICRONIZAÇÃO SOBRE A BIOTRANSFORMAÇÃO DO BAGAÇO DE OLIVA EM MODELO ESTÁTICO DE FERMENTAÇÃO COLÔNICA

AUTORA: Camila Sant'Anna Monteiro

ORIENTADORA: Dr^a Tatiana Emanuelli

COORIENTADORES: Dr^a. Sabrina Somacal e Dr. Cristiano Augusto Ballus

A olivicultura, nos últimos anos, apresentou crescimento significativo no Brasil, com destaque para o estado do Rio Grande do Sul, o qual apresenta condições climáticas favoráveis para esta cultura e que proporcionou um aumento do número de olivais e do volume de azeite produzido. Da fabricação do azeite de oliva é gerado o bagaço de oliva, resíduo sólido que requer tratamento prévio para adequado descarte. O bagaço de oliva é rico em polifenóis e fibra alimentar, mas devido ao seu elevado teor de lignina é pouco acessível para digestão e metabolização. Uma alternativa para modificar a matriz fibrosa e aumentar a sua funcionalidade é a utilização de métodos físicos como a micronização. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da micronização sobre a biotransformação do bagaço de oliva utilizando um modelo de fermentação colônica com fezes humanas *in vitro*, investigando o impacto deste processo sobre as características nutricionais do resíduo. Após a simulação *in vitro* da digestão e fermentação, a biotransformação dos compostos fenólicos durante a fermentação foi avaliada por HPLC-MS-MS. O bagaço de oliva bruto, ou seja, não fracionado (NF) foi submetido ao fracionamento granulométrico (F2NM) e apresentou tamanho de partícula de $143.0 \pm 5.3 \mu\text{m}$. Já o bagaço de oliva fracionado e micronizado (F2MTL) apresentou tamanho de partícula de $22.4 \pm 0.9 \mu\text{m}$, permitindo uma padronização do tamanho das partículas no bagaço de oliva. Durante a fermentação foi observado a redução no pH em 8h para F2MTL, em 24 h e 48 h para F2NM e F2MTL e comparado ao controle sem amostra. No tempo inicial da fermentação (0h), a fração F2MTL apresentou a maior concentração de compostos fenólicos totais dentre as amostras analisadas. A micronização favoreceu a liberação de hidroxitirosol em F2MTL comparado com o F2NM em 2h e 8h ($p < 0,05$). Tirosol aumentou apenas para F2MTL em 2h. A quantidade de oleuropeína foi significativa para F2MTL em 0h e foi completamente degradada até 2 h e a oleuropeína aglicona em F2NM e F2MTL aumentou a liberação em até 2h de fermentação. O fracionamento granulométrico associado à micronização, favoreceu a liberação dos compostos fenólicos ligados à matriz produzindo maior quantidade de compostos fenólicos durante a fermentação quando comparado ao bagaço de oliva não micronizado. Ensaios *in vivo* são necessários para confirmar a biodisponibilidade dos compostos fenólicos e o efeito sobre a microbiota intestinal para, assim, confirmar os efeitos benéficos do bagaço de oliva micronizado na saúde humana.

Palavras-chave: Resíduo da oliva; Olivicultura; Compostos fenólicos; Microbiota Intestinal;

ABSTRACT

EFFECT OF MICRONIZATION ON THE BIOTRANSFORMATION OF OLIVE POMACE IN STATIC MODEL OF COLONIC FERMENTATION

AUTHOR: Camila Sant'Anna Monteiro

ADVISOR: Dr^a Tatiana Emanuelli

CO-ADVISORS: Dr^a. Sabrina Somacal and Dr. Cristiano Augusto Ballus

Olive cultivation, in recent years, has shown significant growth in Brazil, especially in the state of Rio Grande do Sul, which has favorable climatic conditions for this culture and which has increased the number of olive groves and the volume of oil produced. From the manufacture of olive oil, olive pomace is generated, a solid residue that requires previous treatment for proper disposal. Olive pomace is rich in polyphenols and dietary fiber, but due to its high lignin content, it is not easily accessible for digestion and metabolism. An alternative to modify the fibrous matrix and increase its functionality is the use of physical methods such as micronization. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of micronization on the biotransformation of olive pomace using an *in vitro* colonic fermentation model with human feces, investigating the impact of this process on the nutritional characteristics of the residue. After *in vitro* digestion and fermentation simulation, the biotransformation of phenolic compounds during fermentation was evaluated by HPLC-MS-MS. The crude olive pomace, that is, unfractionated (NF) was submitted to granulometric fractionation (F2NM) and presented a particle size of $143.0 \pm 5.3 \mu\text{m}$. The fractionated and micronized olive pomace (F2MTL) presented a particle size of $22.4 \pm 0.9 \mu\text{m}$, allowing standardization of the particle size in the olive pomace. During fermentation, a reduction in pH was observed in 8h for F2MTL, in 24h for F2NM and F2MTL and 48h compared to control without sample. At the initial fermentation time (0h), the F2MTL fraction presented the highest concentration of total phenolic compounds among the analyzed samples. Micronization favored the release of hydroxytyrosol in F2MTL compared to F2NM at 2h and 8h ($p < 0.05$). Tyrosol only increased to F2MTL in 2h. The amount of oleuropein was significant for F2MTL at 0h and was completely degraded up to 2h and the oleuropein aglycone in F2NM and F2MTL increased the release up to 2h of fermentation. The granulometric fractionation associated with micronization favored the release of phenolic compounds bound to the matrix, producing a greater amount of phenolic compounds during fermentation in relation to non-micronized olive pomace. *In vivo* assays are needed to confirm the bioavailability of phenolic compounds and the effect on the gut microbiota to further corroborate the beneficial effects of micronized olive pomace on human health.

Keywords: Olive residue; Olive cultivation; Phenolic compounds; Intestinal microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frutos da oliveira prontos para a colheita para extração do azeite de oliva...18	18
Figura 2 – Métodos de extração do azeite de oliva.....20	20
Figura 3 – Equipamento de moagem com bolas.....25	25
Figura 4 – Classes de compostos fenólicos encontradas em bagaço de oliva.....27	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NF – Bagaço de oliva não fracionado e micronizado

F2NM – Bagaço de oliva fracionado e não micronizado

F2MTL – Bagaço de oliva fracionado e micronizado

B.S – Base seca

KG – Kilograma

MG – Miligrama

TGI – Trato gastrointestinal

IG – Intestino grosso

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	OLIVICULTURA.....	15
2.2	EXTRAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM.....	17
2.3	BAGAÇO DE OLIVA.....	20
2.4	MICRONIZAÇÃO	22
2.5	COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DE OLIVA E PROPRIEDADES NUTRACÊUTICAS	24
2.6	SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL E FERMENTAÇÃO COLÔNICA <i>IN VITRO</i>	27
3	OBJETIVO.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	DESENVOLVIMENTO	32
4.1	MANUSCRITO	32
5	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	ANEXO.....	56
	ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	56
	ANEXO B – QUESTIONÁRIO ONLINE PARA SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS.....	58
	ANEXO C – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA- UFSM.....	61

1 INTRODUÇÃO

A olivicultura é uma atividade agrícola tradicionalmente de países europeus como a Espanha, a Itália e a Grécia. A Espanha é o maior produtor mundial com ampla vantagem em relação à Itália e à Grécia, segundo e terceiro maiores produtores, respectivamente (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2020). No Brasil a produção é crescente, com ênfase nas regiões Sul e Sudeste, devido ao clima mais propício para desenvolvimento da olivicultura (COUTINHO et al., 2015). Entretanto, por ocorrer ainda em pequena escala e por se tratar de uma cultura em desenvolvimento, as atividades são limitadas apenas ao plantio, colheita e processamento, sem tratamento dos resíduos da extração do azeite de oliva, que atualmente são majoritariamente depositados no solo, seja diretamente ou após processo de compostagem.

A extração do azeite de oliva extravirgem pode ser realizada pelo método contínuo ou pelo sistema de prensas. A extração pelo método contínuo utiliza moagem e centrifugação para separar o óleo do fruto, e o sistema de prensas realiza a prensagem do fruto para liberação do mosto oleoso e por decantação obtém-se o azeite. No Brasil, devido à introdução recente da olivicultura, os sistemas de extração de azeite são majoritariamente do tipo contínuo de duas fases, o sistema mais moderno. Ambos métodos de extração geram resíduo, porém o sistema de 2 fases é mais aceito, pois resulta na produção de apenas um tipo de resíduo, o bagaço de oliva (AIRES, 2007).

O bagaço de oliva, consiste de fragmentos de polpa, casca e caroço com alto teor de umidade e elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), necessitando de tratamento prévio para descarte no meio ambiente (DERMECHE et al., 2013; BRITO, 2016; ROSELLÓ-SOTO et al., 2015). Além disso, o bagaço da oliva contém grande quantidade de compostos fenólicos, que apresentam potencial nutracêutico, sendo o hidroxitirosol, o pinoresinol e a luteolina os principais compostos encontrados (SPERONI et al., 2019). Além dos compostos fenólicos livres, os compostos fenólicos também podem estar ligados covalentemente a outros constituintes da matriz alimentícia, como polissacarídeos estruturais, da fração fibra alimentar. Esta fração de compostos fenólicos ligados não é usualmente avaliada nos estudos de composição de alimentos. No bagaço de oliva, podem ser encontrados compostos lignocelulósicos provenientes do caroço, como a hemicelulose (21,45–27,64%), a celulose (29,79–34,35%) e a lignina (20,63–25,11%), pertencentes a fração insolúvel da fibra (GHANBARI et al., 2012; GIUNTINI; MENEZES, 2011; NACZK; SHAHIDI, 2004).

Apesar de ser rico em compostos fenólicos livres e ligados (MALAPERT et al., 2018), o bagaço de oliva é rico em fibra insolúvel, especialmente lignina (SPERONI et al., 2020), o que limita o aproveitamento desse resíduo na nutrição humana e animal ou a incorporação em outros produtos. Uma alternativa para modificar a matriz fibrosa e aumentar a sua funcionalidade é a utilização de métodos físicos como a micronização (SPERONI et al., 2020).

A micronização é um método de moagem ultrafina que resulta em tamanho da partícula inferior a 100 μm , apresentando melhoria das propriedades superficiais, tais como aumento da dispersibilidade e solubilidade (CHEN et al., 2018). O mesmo autor ainda relata que a redução do tamanho de partícula melhora a dispersibilidade dos alimentos, e a solubilidade dos componentes nutritivos melhorando assim a sua absorção (CHEN et al., 2018; SHU et al., 2019). Nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que a micronização de curto tempo em bagaço de oliva é eficiente para aumentar a capacidade antioxidante em diferentes ensaios (SPERONI et al., 2019). Este processo de moagem ultrafina possibilitou a redução do tamanho das partículas para aproximadamente 30,2-31,1 μm e modificou a estrutura da amostra, principalmente a fibra alimentar, liberando ou expondo os compostos fenólicos ligados na matriz fibrosa, aumentando o teor de fibras solúveis e diminuindo o teor de lignina (SPERONI et al., 2020). Além disso, o bagaço de oliva após micronização submetido a digestão gastrointestinal *in vitro* aumentou a liberação de compostos fenólicos nas fases salivar e gástrica da digestão, refletindo um aumento na capacidade antioxidante.

Para exercer os efeitos benéficos à saúde, os compostos bioativos precisam atingir o tecido alvo em concentrações biologicamente ativas (GIL-SÁNCHEZ et al., 2018). Os compostos fenólicos, por exemplo, quando ingeridos são absorvidos na proporção de apenas 5-10% no intestino delgado, enquanto o restante atinge o intestino grosso (IG) onde poderá ser metabolizado pela microbiota intestinal (CLIFFORD, 2004; GIL-SÁNCHEZ et al., 2018). Alguns estudos relatam que os compostos fenólicos após serem metabolizados pela microbiota intestinal proporcionam o crescimento e atividade microbiana promovendo um efeito prebiótico (MOSELE; MACIÀ; MOTILVA, 2015). Além disso, os produtos formados a partir da biotransformação dos compostos fenólicos geralmente apresentam menor peso molecular, resultando em maior disponibilidade para absorção e em alguns casos, maior atividade biológica (DANNESKIOLD-SAMSØE et al., 2019).

Assim, qualquer proposta de aproveitamento de subprodutos agroindustriais na nutrição humana ou animal, deveria contemplar a avaliação prévia da transformação deste

ingrediente durante o processo digestivo. No caso do bagaço de oliva, estudos a respeito da sua transformação durante a digestão fornecerão valiosas informações sobre o seu potencial prebiótico e bioativo, a partir da avaliação das transformações sofridas pela fibra alimentar e compostos fenólicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OLIVICULTURA

A oliveira (*Olea europaea* L.), é uma árvore frutífera da família botânica *Oleaceae* conhecida mundialmente por propriedades benéficas a saúde e desde a antiguidade o azeite proveniente dos seus frutos, a oliva, é utilizado para fins terapêuticos e alimentares. Devido ao potencial benéfico a saúde e apreciação pela culinária, ocorreu uma crescente demanda por azeite de oliva nos últimos anos, e com isso, o cultivo se disseminou por diferentes países no mundo (LANZA; NINFALI, 2020; COUTINHO et al., 2015).

Grande parte do cultivo de oliveiras no mundo encontra-se na União Europeia (UE), destacando-se como os maiores produtores de oliveiras a Espanha, Itália, Grécia e Portugal, que também são os maiores consumidores mundiais de azeite de oliva. Nos anos de 2017/2018 a UE teve uma produção de azeite de oliva de 2.188.300 toneladas, e cerca de 489.500 toneladas de azeite de oliva foram exportados, principalmente para Estados Unidos, Brasil, Japão e Canadá, sendo 76.500 toneladas apenas para o Brasil (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2020).

Na América, a olivicultura foi introduzida primeiramente no México, Estados Unidos e Peru, dissipando-se posteriormente para o Chile, Brasil e Argentina. No Brasil, a cultura de oliveira foi introduzida há algumas décadas nos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina, devido as características climáticas favoráveis desses estados para o desenvolvimento da cultura (COUTINHO et al., 2015). As oliveiras são normalmente cultivadas em regiões de clima mediterrâneo, caracterizada por elevadas temperaturas (até 35 °C) e baixo índice pluviométrico no verão, necessitando de baixas temperaturas no período de floração para ocorrência de produções satisfatórias (COUTINHO et al., 2015).

A olivicultura no estado do Rio Grande do Sul tem apresentado grande potencial de expansão conforme relatado por Alba et al. (2014), uma vez que encontrou nesse estado condições propícias para o cultivo e sendo mapeados cerca de 6,8 mil hectares de terras com aptidão para este cultivo. Em 2005 foram implantados os primeiros pomares na cidade de Caçapava do Sul (30° 30' 44" S; 53° 29' 29" O). Com o objetivo de apoiar os produtores no desenvolvimento e processamento, a Secretaria da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul criou a Câmara Setorial das Oliveiras em 2012, e o Programa Estadual de Desenvolvimento da Olivicultura (Pró-Oliva) em 2015, que impulsionaram o crescimento

da olivicultura no estado nos últimos anos. Desde a implantação das oliveiras no estado, a área plantada aumentou de 80 ha para 6.200 ha em 2021, com 15 indústrias e 46 marcas ativas no mercado – sendo que a grande maioria dessas indústrias atuam em todas as fases da produção do azeite de oliva atuando desde os cultivos, beneficiamento das azeitonas e embalagem do azeite de oliva extravirgem. Em 2021 o Rio Grande do Sul teve uma produção de 202 mil litros de azeite de oliva extravirgem, a maior produção registrada até o momento, isso que apenas 35% dos olivais cultivados atingiram a idade produtiva (4 anos) no momento. Adicionalmente, vários olivais foram recentemente implantados, evidenciando um grande potencial de crescimento da produção de azeite nos próximos anos (SECRETARIA DA AGRICULTURA PECUÁRIA E DESENVOLVIMENTO RURAL, 2021).

Figura 1 – Frutos da oliveira prontos para a colheita para extração do azeite de oliva.



Fonte: Próprio autor.

O mercado da oliva concentra-se basicamente em dois produtos: o azeite de oliva e a azeitona de mesa, contudo, Guilherme (2012) relata que apenas 4% da produção são destinados para as azeitonas de mesa e 96% das olivas produzidas são destinadas para a extração do azeite no mundo. Segundo a Secretaria da Agricultura, Pecuária e

Desenvolvimento Rural (2021), no Rio Grande do Sul as cultivares mais promissoras são Arbequina, Koroneiki, Arbosana e Picual para a produção de azeite, e Manzanilla e Cordovil de Sêrpa para a produção de azeitona de mesa (TERAMOTO; BERTONCINI; PANTANO, 2010). As diferentes cultivares caracterizam o azeite produzido, principalmente pelo conteúdo de compostos fenólicos como a oleuropeína, que influencia diretamente nas características sensoriais e na estabilidade lipídica, inibindo as reações de oxidação (PEDAN et al., 2019).

A azeitona é um fruto pequeno que mede 1-4 cm de comprimento e 0,6-2 cm de diâmetro (Figura 1), constituída de pericarpo, mesocarpo e endocarpo e onde a pele e a polpa representam cerca de 65 a 83% do peso total do fruto, e o caroço cerca de 13 a 30%. A azeitona contém até 50% de água, 1,6% de proteínas, 22% de lipídeos, 19% de carboidratos, 5,8% de celulose e 1,5% de minerais. Outros constituintes importantes são pectinas, ácidos orgânicos, pigmentos e compostos fenólicos que contribuem para o sabor forte e amargo sendo o principal a oleuropeína (RAMALHEIRO, 2009; JÚLIO, 2015).

2.2 EXTRAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM

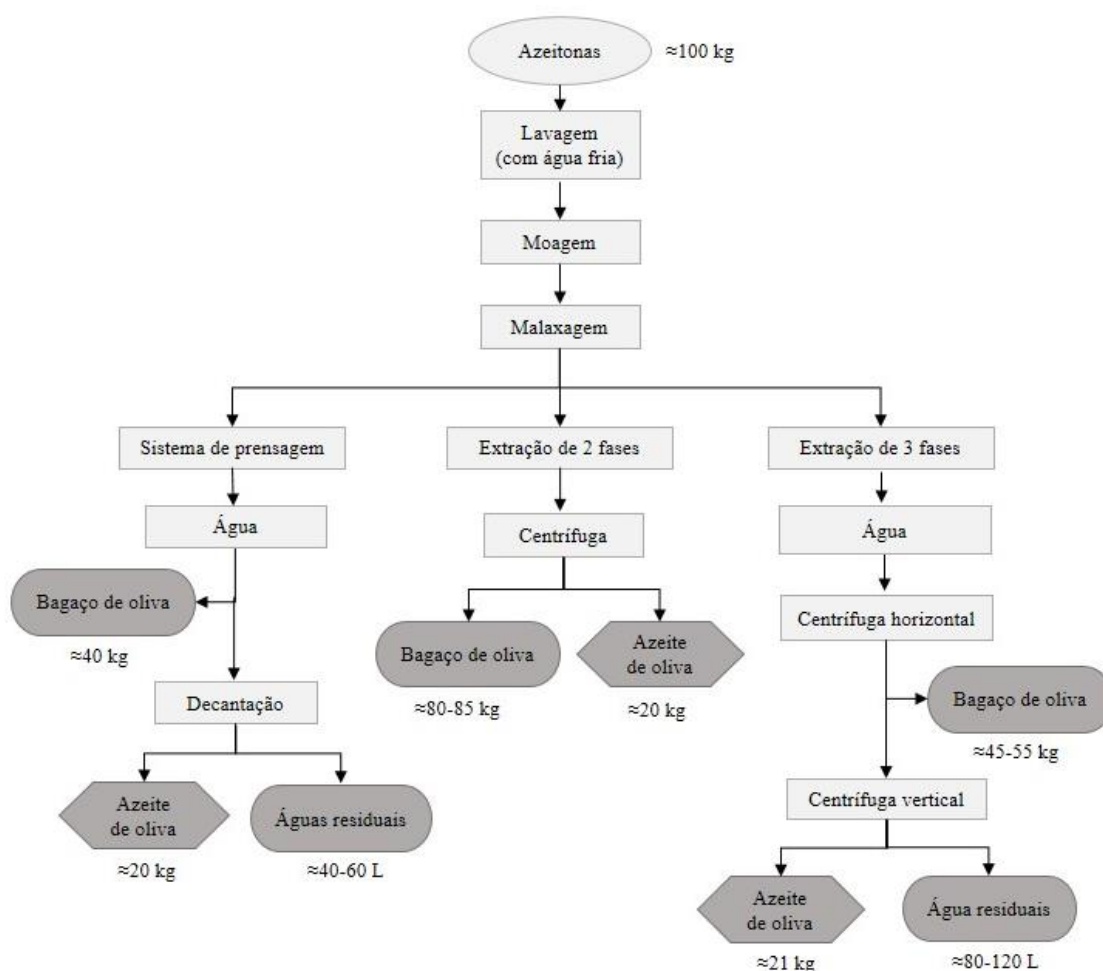
Após a colheita da azeitona, o fruto deve ser imediatamente submetido a extração do azeite, para evitar e/ou reduzir alterações indesejáveis ao produto. Após colhidas, as azeitonas são preparadas para o processo de extração, sendo necessária remoção das matérias estranhas (ramos, pedras e folhas) e lavagem para remoção de terra. Independente do processo de extração a ser utilizado, previamente o fruto passa por um processo de trituração, onde é reduzido a uma pasta, através de moenda e batedura (malaxagem), provocando a ruptura das paredes celulares e das membranas dos vacúolos nos quais estão armazenadas as gotículas de óleo e permitindo a libertação do azeite que se encontra na polpa (mesocarpo) da azeitona (AIRES, 2007).

Segundo Dermeche et al. (2013) a extração do azeite pode ser feita por meio de três sistemas: o sistema clássico de prensagem, o sistema de extração contínuo de três fases e o sistema de extração contínuo de duas fases, como demonstrado na Figura 2.

O sistema de prensas, baseia-se na pressão exercida por uma prensa hidráulica sobre o fruto, que libera o mosto oleoso composto por azeite e água, que por decantação se separam pela diferença de densidades (DUARTE, 2011). Esse processo de extração é o mais antigo e atualmente está em desuso, devido ao alto custo de mão de obra, demora no

processamento e maior probabilidade de oxidação do azeite. Assim, poucos lagares ainda adotam o sistema de prensas, que está sendo substituído em muitos países pelos sistemas de extração contínua (DERMECHE et al., 2013).

Figura 2. Métodos de extração do azeite de oliva.



Adaptado de: Dermeche et al. (2013).

O sistema de extração contínua do azeite de oliva ocorre por ação da força centrífuga, que acentua a diferença entre os pesos específicos dos líquidos imiscíveis e do material sólido obtido após a moenda e batidura. Este processo é realizado em uma centrífuga horizontal de alta velocidade. No sistema de extração contínua de 3 fases é adicionado água morna durante a moagem, para reduzir a viscosidade da massa e facilitar a separação entre a fase sólida e a líquida durante a centrifugação - no entanto a adição de

água pode favorecer a lixiviação de compostos fenólicos. A designação de 3 fases dá-se pelas frações resultantes do processo: azeite, bagaço e água-residual. (AIRES, 2007; MORAL; MÉNDEZ, 2006). A extração a partir 100 kg de azeitonas geram 45-55 kg de bagaço de oliva com 45-55% de umidade e em média 80-120 L de água residual (LOZANO-SÁNCHEZ et al., 2017; DERMECHE et al., 2013).

Já para o sistema de extração contínua de 2 fases, mais moderno, desenvolveu-se um sistema a fim de reduzir a quantidade de água residual, originando apenas duas frações: azeite e bagaço. Esse sistema tem como vantagem maior estabilidade lipídica, teor de compostos fenólicos e antioxidante e melhores características sensoriais do azeite devido a redução da lixiviação desses compostos pela água adicionada, além do menor consumo de água e energia em comparação com o sistema de três fases. Entretanto, resulta em maior quantidade de bagaço de oliva (80-85 kg de bagaço de oliva em 100 kg de azeitonas), teor de umidade (80%) e açúcares em comparação aos demais métodos (AIRES, 2007; LOZANO-SÁNCHEZ et al., 2017; NIAOUNAKIS; HALVADAKIS, 2006).

A diferença entre o método de extração contínua de 3 fases para o de 2 fases ocorre na separação sólido-líquido, que é realizada sem adição de água evitando-se, assim, a produção de água residual, sendo que os efluentes líquidos resultantes são apenas as água de lavagem da azeitona e da constituição do fruto (AIRES, 2007).

A composição química do azeite de oliva pode variar dependendo do método de extração utilizado e a variedade da oliveira. Analogamente, podemos deduzir variações correspondentes também na composição do bagaço de oliva em função destes fatores. Segundo Servili et al. (2011), o processo de extração pode afetar principalmente a liberação de compostos fenólicos para o azeite, ocasionando a redução da qualidade, tornando o produto mais instável do ponto de vista da oxidação lipídica. Deste modo, o azeite de oliva obtido pelo sistema de extração contínua de 2 fases, é a forma mais viável de obtenção, pois gera menor quantidade de resíduo e tem maior teor de antioxidantes, proporcionando maior estabilidade no produto final (AIRES, 2007).

A produção de resíduos é grande para qualquer lugar de processamento azeite de oliva, no entanto, na União Europeia o tratamento dos resíduos de bagaço de oliva é destinado para geração de energia elétrica, por meio da incineração. No Brasil, o processamento deste produto ainda é crescente e localizado em regiões específicas do país, e devido ao bagaço gerado no sistema de 2 fases apresentar maior dificuldade de tratamento (armazenagem, transporte, secagem), justifica pesquisas relacionadas ao seu aproveitamento.

2.3 BAGAÇO DE OLIVA

O bagaço de oliva é o principal resíduo da extração do azeite de oliva e consiste de um lodo espesso que contém pedaços de caroço, polpa e água provenientes do fruto e, também, do processo de lavagem. A composição química varia de acordo com a espécie da azeitona, condições de cultura, origem do fruto e método empregado para a extração do azeite. Bagaços obtidos pelo sistema bifásico de extração apresentam de 65-75% de umidade, conteúdo mais elevado em comparação aos outros sistemas: 22-25% no sistema de prensas e 45-55% em sistemas trifásicos (LOZANO-SÁNCHEZ et al., 2017). Contudo, o sistema bifásico é considerado o mais ecológico, pois elimina a produção de águas residuais, mas resulta na produção de bagaços com maior umidade, o que aumenta a dificuldade para um descarte adequado, apresentando, portanto, um maior potencial poluente.

Após a extração do azeite de oliva, o bagaço permanece com cerca de 8,9 g/100 g b.s. de óleo residual de grande interesse nutricional, e segundo Pasten et al. (2019), oito ácidos graxos foram detectados, onde o ácido oleico foi o mais abundante (63,9% do total de ácidos graxos), seguido pelos ácidos linoleico (14,5%), palmítico (13,6%) e palmitoléico (4,1%). Apresenta também de 8,9 g/100 g b.s. de proteínas, 5,0 g/100 g b.s. de cinzas (em maior quantidade o potássio, cálcio e sódio), 63,0 g/100 g b.s. de fibra alimentar total (fibra insolúvel 62,3 g/100 g b.s. e fibra solúvel 0,69 g/100 g b.s.), compostos fenólicos, açúcares e ácidos orgânicos (PASTEN et al., 2019).

A azeitona contém elevadas quantidades de polifenóis de interesse para a saúde, dos quais cerca de 98% desses compostos permanecem no resíduo após a extração do azeite de oliva, devido a polaridade destes compostos e também por se apresentarem majoritariamente na forma livre (70-80%) (RODIS; KARATHANOS; MANTZAVINO, 2002). Os compostos fenólicos como os hidroxitirosol, tirosol, ácidos fenólicos (p-cumárico, cafeico, ferúlico), oleuropeína e luteolina são os principais polifenóis presentes no bagaço de oliva (ALU'DATT et al., 2010; MALAPERT et al., 2018). Speroni et al. (2019) observaram elevada capacidade antioxidante em bagaço de oliva submetido a fracionamento granulométrico, identificando como compostos fenólicos majoritários o hidroxitirosol (208-290 mg/kg b.s), o pinoresinol (14-32 mg/kg b.s) e a luteolina (24-50 mg/kg b.s).

Além dos compostos fenólicos, a fração fibrosa do resíduo também é relevante. O bagaço de oliva é composto majoritariamente por fibras insolúveis, como demonstrado por

Speroni et al. 2020, em que foram quantificados 78,7 g de fibra alimentar total/100 g b.s., das quais 70,7 g/100 g b. s. correspondem a fração insolúvel e 5,4 g/100 g b. s. são de fibra alimentar solúvel. A fração insolúvel da fibra alimentar presente no bagaço de oliva é proveniente do caroço da azeitona, sendo composta por hemicelulose (17,9 g/100 g b.s.), celulose (1,2 g/100 g b.s.) e lignina (45,4 g/100 g b.s.) (SPERONI et al., 2020). O interesse na ingestão de fibra alimentar é conhecido pela regulação do trânsito intestinal, mas também, por estar relacionada a diferentes efeitos fisiológicos no organismo humano, destacando-se a influência na microbiota intestinal, na melhora da resposta imunológica, e na redução da prevalência de obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 (MÜLLER; CANFORA; BLAAK, 2018; WONG; JENKINS, 2007).

Apesar da composição rica em compostos bioativos, como fibra alimentar e compostos fenólicos, o aproveitamento do bagaço de oliva na alimentação humana na forma de enriquecimento de produtos alimentícios é limitado pelo seu elevado conteúdo de fibra insolúvel, em especial a lignina (SPERONI et al., 2020). Mesmo que o bagaço de oliva seja composto na sua maioria por fibras insolúveis, a presença de polímeros lignocelulósicos apresentam grande rigidez, insolubilidade e impedem a absorção pelo trato gastrointestinal (TGI) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2019). A lignina é a única fibra estrutural não polissacarídea, composta de polímeros de fenilpropano com elevada massa molecular, localizadas geralmente na parede celular, e pela complexidade da sua estrutura tem baixa digestibilidade (BERNAUD; RODRIGUES, 2013).

O resíduo de bagaço de oliva tem grande potencial poluidor decorrente dos compostos bioativos presentes. Segundo Roselló-soto et al. (2015), o bagaço tem elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), matéria orgânica e acidez, que necessitam de tratamento antes do descarte. No Brasil, a geração de resíduo de bagaço de oliva preocupa principalmente pela falta de alternativas para o descarte ou aplicação adequada, decorrente dos elevados teores de água, e desta forma, é destinado para compostagem com posterior aplicação no solo ou para extração de óleo do bagaço de oliva.

Estratégias para agregar valor a um subproduto com consequente redução no impacto ambiental do resíduo vem sendo amplamente investigadas, como revisado por Galanakis (2018), sendo a fortificação de produtos à base de carne com extrato natural de polifenóis de bagaço de oliva e águas residuais, como forma de aumentar o prazo de validade dos produtos à base de carne, um exemplo. Dessa forma estudos relacionados a transformação do bagaço visando o aproveitamento na nutrição humana são de grande relevância (DERMECHE et al., 2013). Como o bagaço de oliva é rico tanto em fibras

insolúveis (lignina, celulose e hemicelulose) (SPERONI et al., 2020) como em compostos fenólicos livres e ligados (ALU'DATT et al., 2010) uma alternativa para modificar a matriz fibrosa e aumentar a sua funcionalidade é a utilização de métodos físicos como a micronização. Conforme Speroni et al. (2020), o fracionamento granulométrico seguido de micronização em bagaço de oliva foi capaz de modificar a fração fibra alimentar, reduzindo principalmente a lignina. Neste estudo, foi otimizada a condição de moagem de 300 rpm por 5 h e obtiveram a menor relação fibra alimentar insolúvel/solúvel (FI/FS), que resultou aumento na fibra solúvel de 5,4 g/100 g b. s. para 11,0 g/100 g b. s. após a micronização e diminuiu a quantidade de lignina de 45,4 g/100 g b.s. para 22,7 g/100 g b. s. (SPERONI et al., 2020). A moagem com bolas proporcionou o rearranjo da fibra alimentar no bagaço de oliva, degradando celulose, hemicelulose e lignina com consequente aumento na solubilidade.

2.4 MICRONIZAÇÃO

A micronização é um processo que reduz o tamanho da partícula de um material para grandezas micro e nano, sendo denominado o material que contém tamanho de partícula de 1 nm a 100 µm de “micronizado” (ZHAO et al., 2009). Existem diferentes tipos de equipamentos utilizados para a redução do tamanho de partículas tais como a moagem de bolas, moagem a jato, moinho coloidal e o uso de alta pressão (CHEN et al., 2018).

O moinho de bolas é um dos tipos de moagem mais comumente usados para micronização (Figura 3). Consiste de um processo mecânico de rotação de um recipiente contendo bolas, promovendo a sucessiva colisão entre as esferas e nas paredes do recipiente, gerando a moagem do materiais através do atrito, originando tamanho de partícula que pode ser até mesmo inferior a 20 µm (CHEN et al., 2018; ZHANG et al., 2014). Existem diversos fatores que afetam as características dos produtos moídos neste equipamento, tais como a quantidade de bolas, o tamanho das bolas, a velocidade de moagem, o estado de moagem (seco/úmido) e o tempo de moagem (ZHAO et al., 2009). Algumas vantagens deste método de moagem devem ser destacadas como a possibilidade de moagem com materiais secos e úmidos, ótimas condições de operação com mínimo contato, possibilidade de operação intermitente e contínua e principalmente pela baixa ou quase nula geração de resíduos (CHEN et al., 2018).

Figura 3 – Equipamento de moagem com bolas.



Fonte: Autoria própria.

Esses processos de redução de partícula são de grande interesse principalmente para o desenvolvimento de produtos alimentícios e fármacos, aumentando sua dispersibilidade nos alimentos, e a solubilidade dos componentes nutritivos, levando a uma melhor absorção no organismo (SHU et al., 2019; ZHAO et al., 2009). Shu et al. (2019), investigaram o efeito do tamanho da partícula após moagem com bolas na bioacessibilidade de polifenóis em chá verde, comprovando melhora na sua atividade antioxidante e bioacessibilidade após a redução do tamanho de partícula. Conforme descrito por Chen et al. (2018), a taxa de liberação de compostos ativos dos pós são proporcionais a sua área superficial, ou seja, quanto menor a partícula da amostra mais rápido o ingrediente ativo é liberado. Outro estudo também avaliou que a moagem com bolas alterou as propriedades físico-químicas do amido de milho, aumentando significativamente a solubilidade em água fria dos amidos processados (HE et al., 2014).

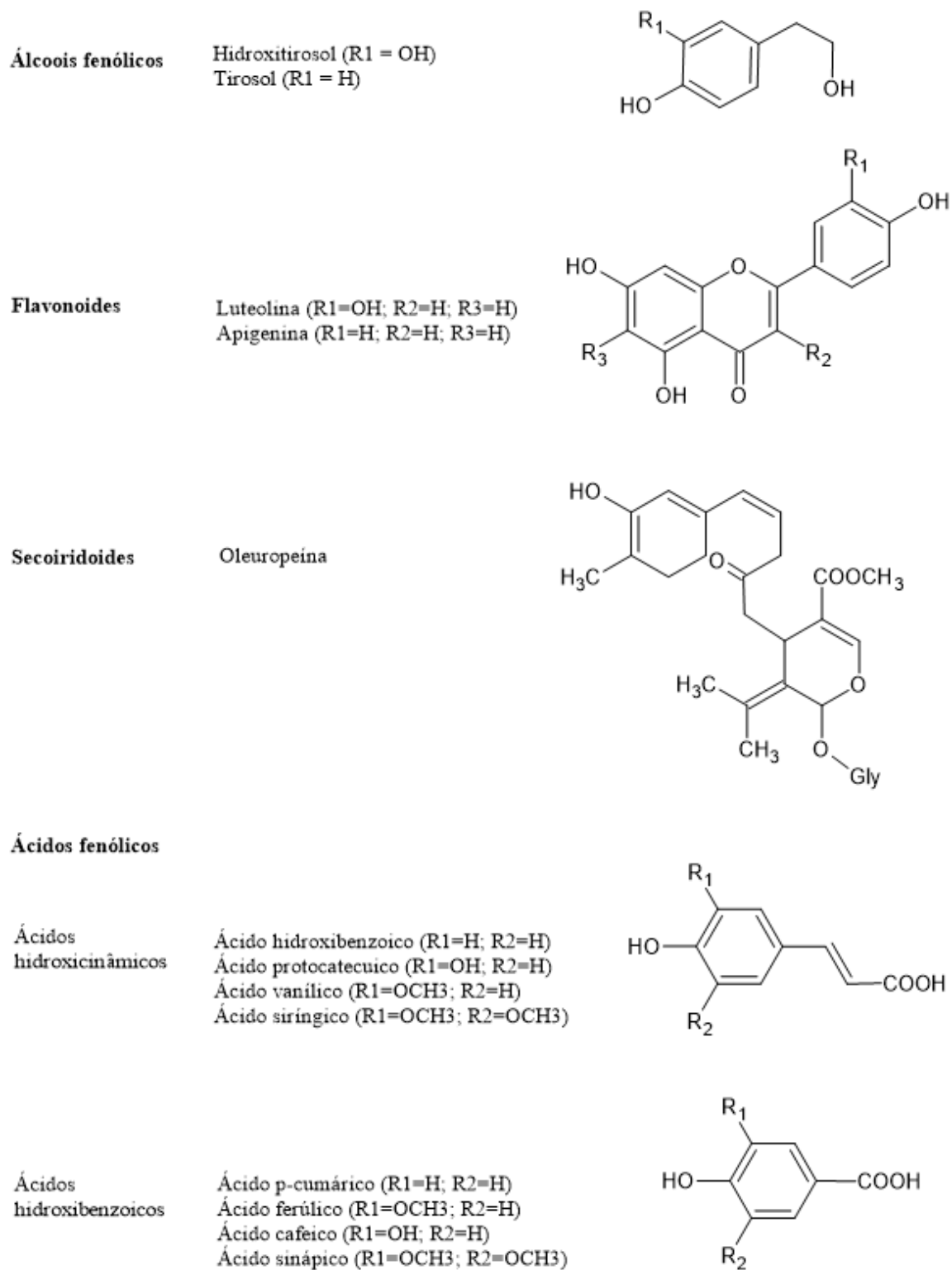
Speroni et al. (2019) avaliando um processo rápido de micronização do bagaço de oliva granulometricamente fracionado (500 rpm por 16 min e 24,8 min) observaram que o tamanho da partícula reduziu para aproximadamente 30 μm , com isso favoreceu a extração de polifenóis extraíveis e aumentou a capacidade antioxidante do bagaço. A micronização

também promoveu modificações significativas na fração fibra alimentar do bagaço de oliva, que consistiram na redução na fibra alimentar insolúvel, com destaque para a mudança na composição desta última com redução do teor de lignina. O processo longo de micronização (300 rpm por 5 h), por outro lado resultou em menor tamanho de partícula de aproximadamente 17 μm com aumento no conteúdo de fibra alimentar solúvel, e redução ainda mais marcante do teor de lignina (SPERONI et al., 2020), comparado com o tempo curto de micronização. Entretanto, o bagaço micronizado por tempo longo sofreu redução no conteúdo de compostos fenólicos, possivelmente devido à degradação térmica dos compostos (SPERONI et al., 2020). Apesar da redução no conteúdo, os pós de bagaço de oliva micronizados pelo processo longo, apresentaram maior bioacessibilidade dos compostos fenólicos em ensaio de digestão simulada até a etapa do intestino delgado, resultando em conteúdo de compostos fenólicos na fração bioacessível superior ou similar ao bagaço não micronizado (SPERONI et al., 2021).

2.5 COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DE OLIVA E PROPRIEDADES NUTRACÊUTICAS

O bagaço de oliva é uma fonte rica em compostos bioativos, sendo que a maior parte destes compostos permanece no resíduo após a extração do azeite (98%) e por se apresentarem majoritariamente na forma livre (70-80%). Foram identificados compostos pertencentes as diferentes classes de polifenóis como demonstrado Malapert et al. (2018), 35 metabólitos das classes secoiridoides, álcoois fenólicos, ácidos fenólicos e flavonoides, das quais os compostos que obtiveram maior quantificação foram hidroxitirosol e seus derivados hidroxitirosol-glicosídeo e tirosol, seguido de ácido cafeico e ácido p-cumárico. Outros compostos característicos da oliva são secoiridoides como a oleuropeína e seus derivados, ligstrosídeo e seus derivados, flavonas como a luteolina e apigenina, o ácidos hidroxicinânicos como os ácidos protocatecuico, vanílico, siríngico e hidroxibenzóico e ácidos hidroxibenzóicos como os ácidos p-cumárico, ferúlico, cafeico e sinápico (FERNÁNDEZ-POYATOS; RUIZ-MEDINA; LLORENT-MARTÍNEZ, 2019; LOZANO-SÁNCHEZ et al., 2014). A figura 4 apresenta a estrutura química dos principais compostos fenólicos presentes no bagaço de oliva.

Figura 4 – Classes de compostos fenólicos encontradas em bagaço de oliva.



Fonte: Autoria própria.

Segundo Saura-calixto (2012), os polifenóis podem ser classificados com base na sua solubilidade em solventes orgânicos e sua bioacessibilidade, em dois grupos: polifenóis extraíveis (solúveis) e polifenóis não extraíveis (insolúveis). Os polifenóis extraíveis ou também conhecido como livres, compreendem compostos com baixo peso molecular, que são solúveis em solventes orgânicos (metanol, acetona, etanol e acetato de etila). Estes compostos têm estruturas químicas variáveis e incluem os flavonóides, derivados do ácido benzóico e hidroxicinâmico, estilbenos, proantocianidinas extraíveis (EPA), taninos hidrolisáveis e outros. Os polifenóis não extraíveis ou também denominados de polifenóis ligados, são compostos de alto peso molecular e normalmente ligados a macromoléculas da parede celular (proteínas, polissacarídeos) ou aprisionados no núcleo da matriz alimentar que permanecem no resíduo de extrações orgânicas aquosas (SAURA-CALIXTO, 2012). No bagaço de oliva, os polifenóis ligados estão presentes em grandes quantidades, geralmente em polímeros lignocelulósicos associados a parede celular da planta, como a lignina e taninos hidrolisáveis e condensados. A lignina consiste de polímeros fenilpropanóides, altamente condensados e muito resistentes à degradação, são compostos de unidades p-hidroxifenila, guaiacila e siringila com proporções variáveis conforme a origem (KOMURA, 2015; SILVA, 2019).

Os compostos fenólicos apresentam propriedade antioxidante, devido ao fato de serem capazes de neutralizar espécies reativas (ER) como as espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN) ou de enxofre (ERS). Estes compostos agem de forma direta na inibição de reações de oxidação através da doação de elétrons e/ou hidrogênios, gerando espécies mais estáveis, e também por meio da ação antioxidante indireta, que ocorre através da modulação de vias relacionadas as defesas antioxidantes endógenas (WANG; HE; CHEN, 2014; SHAHIDI; ZHONG, 2015). Com isso, impedem que moléculas importantes, como DNA, proteínas e lipídios de membrana, sejam oxidadas, proporcionando benefícios a saúde na prevenção de doenças cardiovasculares e diabetes (WANG; HE; CHEN, 2014; SHAHIDI; ZHONG, 2015; HALLIWELL, 2015).

Devido ao fato de que os compostos fenólicos, em sua maioria, possuem pequena taxa de absorção, o efeito antioxidante direto desses compostos fica restrito ao local de sua absorção, ou seja, o TGI, onde a concentração é relativamente elevada e condizente com a necessária para exercer a atividade antioxidante (GIL-SÁNCHEZ et al., 2018). Devido a essa baixa biodisponibilidade dos compostos fenólicos, após a absorção desses compostos, concentrações relativamente baixas são encontradas no plasma e nos tecidos, não sendo compatíveis com uma possível ação antioxidante direta nesses locais. Assim o efeito

biológico sistêmico observado para os compostos fenólicos está principalmente relacionado a capacidade de modular a expressão de enzimas antioxidantes e proteínas envolvidas na resposta inflamatória, melhorando o balanço redox celular e dessa forma prevenindo a modificação oxidativa de estruturas celulares importantes (AUGUSTI et al., 2021).

Os compostos fenólicos são um dos grupos de compostos bioativos mais abundantes na dieta humana, e por isso no TGI é possível sim atingir concentrações compatíveis com as necessárias para um efeito antioxidante direto. Dessa forma, esse efeito antioxidante direto poderia estar envolvido na prevenção ou redução do risco de doenças gastrointestinais associadas ao estresse oxidativo, tais como, a úlcera gástrica e doenças inflamatórias intestinais. Por estas razões, é de extrema importância o estudo da transformação dos compostos fenólicos ao longo do processo de digestão e avaliação das propriedades biológicas dos compostos gerados durante a sua transformação.

2.6 SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL E FERMENTAÇÃO COLÔNICA *IN VITRO*

Modelos para estudo da digestão *in vivo* são importantes para elucidar informações sobre a biodisponibilidade de diferentes nutrientes e fitoquímicos bioativos presentes nos alimentos, entretanto, apresentam limitações pelo elevado custo e por razões éticas (BRODKORB et al., 2019). Com isso, os métodos de digestão *in vitro* são utilizados há décadas para simular a digestão de alimentos e fármacos, devido ao menor tempo de trabalho empregado nesse método, sua simplicidade, facilidade de aplicação e baixo custo (SENGUL; SUREK; NILUFER-ERDIL, 2014).

Os métodos que simulam a digestão gastrointestinal são importantes e úteis para estimar eventos pré-absortivos, como para mensurar a bioacessibilidade de diferentes nutrientes bioativos, podendo ser facilmente aplicáveis (BRODKORB et al., 2019). Os métodos de digestão dividem-se em métodos dinâmico e estático, que visam simular as condições fisiológicas do TGI superior, nomeado em fases oral, gástrica e intestinal. Os modelos dinâmicos são adequados para simular a digestão de alimentos e fármacos com diferentes finalidades, entretanto, são modelos complexos, de alto custo de aplicação e não estando disponíveis para muitos pesquisadores atualmente (BRODKORB et al., 2019), sobretudo no Brasil.

Uma alternativa ao modelo dinâmico é a utilização de modelos estáticos, e devido à sua simplicidade têm sido amplamente utilizados por muitos pesquisadores em alimentos, ração animal e produtos farmacêuticos (MINEKUS et al., 2014). As amostras de alimentos são submetidas à digestão em condições que mimetizam de forma sequencial as etapas oral, gástrica e intestinal com quantidades de eletrólitos, enzimas, sais biliares, diluição, pH e tempo de digestão todas baseadas na fisiologia do TGI humano (BRODKORB et al., 2019).

A maior parte dos estudos de digestão disponíveis até o presente momento estão relacionados a bioacessibilidade de compostos bioativos, pois a quantidade total dessas substâncias no alimento não reflete a porção absorvida e metabolizada pelo corpo. A “bioacessibilidade” é definida como a quantidade de um composto liberado de sua matriz no trato digestivo, que está disponível para absorção na corrente sanguínea, diretamente influenciada pela forma (livre ou ligada) que se encontra no alimento (GIL-SÁNCHEZ et al., 2018). E a “biodisponibilidade” expressa a fração do composto ingerido ou nutriente que atinge a circulação sistêmica e se torna disponível para ser utilizado (GIL-SÁNCHEZ et al., 2018).

Dentre os compostos fenólicos, os compostos livres são os que apresentam a maior bioacessibilidade, estando geralmente disponíveis para absorção no estômago e no intestino delgado, porém a biodisponibilidade é baixa, apenas 5% a 10% são absorvidos e após atingir a corrente circulatória podem ser exercer efeitos sistêmicos e ser metabolizados (CLIFFORD, 2004). Os compostos fenólicos ligados não são bioacessíveis até o intestino delgado, mas ao atingir o cólon podem liberar metabólitos de menor peso molecular pela ação da microbiota intestinal, possibilitando sua absorção (SAURA-CALIXTO, 2012; GIL-SÁNCHEZ et al., 2018).

A bioacessibilidade dos compostos fenólicos da azeitona é elevada (> 50%) para os compostos majoritários presentes na fruta e pertencentes às classe dos álcoois fenólicos como hidroxitirosol, tirosol e hidroxitirosol glicosídeo, porém os ácidos fenólicos apresentam baixa bioacessibilidade (< 25%), o que estaria relacionado a pequena estabilidade desses compostos frente as condições gastrointestinais (RIBEIRO et al., 2020). Fernández-poyatos; Ruiz-medina; Llorent-martínez (2019), destacam que o teor de compostos fenólicos totais em azeitonas de mesa diminuíram cerca de 50% após as condições gastrointestinais. Em outro estudo, a bioacessibilidade dos fenólicos de azeite de oliva extravirgem de 5 variedades de azeitonas foi avaliada, onde constataram que os ácidos fenólicos e secoiridoides tinham menor bioacessibilidade durante o processo de

digestão (10-25%) e os álcoois fenólicos, principalmente o hidroxitirosol, tiveram maior bioacessibilidade no azeite de oliva (> 60%) (ROCCHETTI et al., 2020).

Em outro estudo, avaliando a bioacessibilidade *in vitro*, (SPERONI et al., 2021) constatou que, a micronização em bagaço de oliva aumentou a bioacessibilidade nas fases oral e gástrica de alguns compostos fenólicos, como o hidroxitirosol, a oleuropeína, a decarboximetil oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EDA), a luteolina e a apigenina. A capacidade antioxidante após a digestão na fase intestinal foi maior na fração não absorvível que na fração disponível para absorção, proporcionando efeitos benéficos no cólon. Segundo Speroni et al. (2019), o bagaço de oliva contém elevadas quantidades de compostos fenólicos e fibra alimentar, sendo grande parte dos compostos fenólicos ligados a fibra alimentar. O conteúdo de taninos hidrolisáveis e condensados do bagaço de oliva é cerca de 6 vezes superior ao conteúdo de compostos fenólicos livres (extraíveis) (SPERONI et al., 2019). Os polifenóis ligados a matriz do alimento podem ser distribuídos pelo TGI gradativamente, resistem as condições ácido-básicas do estômago e intestino e permanecem em quantidades significativas na fração não absorvível, ficando disponíveis para metabolização no cólon (RIBEIRO et al., 2020; GIL-SÁNCHEZ et al., 2018)

Apesar dos compostos fenólicos extraíveis serem mais prontamente solubilizados, e portanto, apresentarem maior bioacessibilidade ao longo do TGI, a fração remanescente no intestino delgado após a absorção chegará ao cólon no intestino grosso (IG) (MOSELE; MACIÀ; MOTILVA, 2015). Assim no IG, tanto a fração bioacessível remanescente, quanto a fração não bioacessível (compostos fenólicos associados a matriz) estarão disponíveis para modulação da microbiota e/ou para metabolização pela microbiota intestinal, com produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que promovem tanto efeito local na melhora da barreira intestinal como efeito sistêmico na redução do processo inflamatório e também produção de metabólitos fenólicos de menor peso molecular e na maioria dos casos com maior bioatividade (MÜLLER; CANFORA; BLAAK, 2018; MOSELE; MACIÀ; MOTILVA, 2015).

A etapa de digestão no IG, também denominada de fermentação colônica, pode ser mimetizada *in vitro* através de incubações anaeróbicas, onde compostos fenólicos e fibras da amostra representam o substrato microbiano e culturas de bactérias, humanas ou fezes de animais, o inóculo microbiano (MOSELE; MACIÀ; MOTILVA, 2015). Entretanto, a metabolização dos nutrientes depende da constituição da flora intestinal que pode variar de indivíduo para indivíduo e depende de hábitos alimentares (TAPPENDEN; DEUTSCH, 2007). Para contornar esta variabilidade individual, usualmente os estudos

utilizam um *pool* com os inóculos microbianos de 3 a 6 voluntários para diminuir a variabilidade das diferentes microbiotas. Os estudos geralmente realizam fermentações por 24 a 48 horas, conduzidas em frascos independentes para cada tempo de análise, para possibilitar a amostragem ao longo do tempo afim de avaliar a quantidade metabólitos gerados e para elucidar vias metabólicas que assemelham-se com as condições *in vivo* (MOSELE; MACIÀ; MOTILVA, 2015).

Com base no exposto no estudo de Speroni et al. (2021) a micronização reduz o teor de lignina e aumenta o teor de fibra alimentar solúvel e a bioacessibilidade no intestino delgado da maioria dos compostos fenólicos do bagaço de oliva fracionado granulometricamente, além de aumentar sua capacidade antioxidante na fase gástrica da digestão. Esses resultados indicam que a micronização é um processo promissor para melhorar as propriedades nutricionais do bagaço de oliva viabilizando seu aproveitamento na nutrição humana ou animal. Entretanto, não existem estudos que avaliem o impacto da micronização sobre a fermentação colônica de resíduos agroindustriais e de bagaço de oliva, ou o comportamento do bagaço de oliva durante a fermentação colônica.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do fracionamento granulométrico e micronização do bagaço de oliva sobre a biotransformação de compostos fenólicos pela microbiota intestinal humana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar se o fracionamento do bagaço de oliva modifica o processo de biotransformação de compostos fenólicos durante a simulação estática da fermentação colônica *in vitro*.
- Investigar se a micronização do bagaço de oliva modifica o processo de biotransformação dos compostos fenólicos durante a simulação estática da fermentação colônica *in vitro*.
- Investigar se há interação entre os processos de fracionamento e micronização do bagaço de oliva afetando a biotransformação dos compostos fenólicos durante a simulação estática da fermentação colônica *in vitro*.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 MANUSCRITO:

Effect of micronization on olive pomace biotransformation in the static model of *in vitro* colonic fermentation

Artigo a ser submetido ao periódico Food Chemistry (Qualis A1)

EFFECT OF MICRONIZATION ON OLIVE POMACE BIOTRANSFORMATION IN THE STATIC MODEL OF *IN VITRO* COLONIC FERMENTATION

Camila Sant'Anna Monteiro¹

Franciele Aline Smaniotto¹

Paula Colpo Bortolazzo²

Camila Araujo Amorim Bonini²

Luana Tamires Dluzniewski²

Dariane Trivisiol da Silva³

Sabrina Somacal⁴

Julia Baranzelli⁵

Cristiano Augusto Ballus⁶

Tatiana Emanuelli⁶

Abstract

Olive pomace, residue from the extraction of olive oil, is rich in polyphenols and dietary fiber, but due to its high insoluble fiber (lignin) content, it is not easily accessible for digestion and metabolism. Physical methods such as micronization are an alternative to modify the fibrous matrix and also improve the solubility of phenolic compounds. In this way, the effect of particle size reduction (granule fractionation and micronization) in olive pomace on the biotransformation of phenolic compounds by the intestinal microbiota *in vitro* was investigated. Digestion and fermentation were simulated, and the metabolism of phenolic compounds during fermentation was evaluated by HPLC-MS-MS. Before fermentation, F2MTL had a higher concentration of total phenolic compounds than F2NM and NF. Micronization favored the release of hydroxytyrosol in F2MTL compared to F2NM at 2h and 8h ($p < 0.05$). Tyrosol only increased to F2MTL in 2h. The amount of oleuropein was significant for F2MTL at 0h and was completely degraded up to 2h and the oleuropein aglycone in F2NM and F2MTL increased the release up to 2h of fermentation. The granulometric fractionation associated with micronization favored the release of

¹Master's Student in Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria (UFSM)

²Graduation student, Integrated Center for the Development of Laboratory Analysis, Department of Food Science and Technology, UFSM

³PhD student in Pharmacology, UFSM

⁴Postdoctoral fellow in Food Science and Technology, UFSM

⁵Doctoral Student in Food Science and Technology, UFSM

⁶Professor at the Department of Food Science and Technology, UFSM

phenolic compounds bound to the matrix, producing a greater amount of phenolic compounds during fermentation.

Keywords: phenolic compounds, *in vitro* digestion, gut phenolic metabolites, superfine grinding;

1. Introduction

The extraction of olive oil generates olive pomace (OP) that contains olive pulp, peel and stones and amounts to 80% of the processed fruits. Due to its chemical characteristics and the great volume produced, OP stands out for its potential to pollute the environment. OP is rich in vitamins, residual lipids from extraction, and dietary fiber, but the high content of insoluble fiber such as lignin prevents its direct use in food (DERMECHE et al., 2013; SPERONI et al., 2019). Additionally, this residue contains significant amounts of phenolic compounds, about 95-96% of the phenolic compounds present in the olive remain in the residue after the extraction of olive oil (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2020). Generally, the residue is destined for energy production or as a soil fertilizer, however, studies show that OP can be an interesting source of bioactive compounds for food application (ROCCHETTI et al., 2020).

Micronization is a physical method that modifies the structure of the fibrous matrix and has been shown to increase OP functionality (SPERONI et al., 2020). This ultrafine milling method reduces particle size to less than 100 μm and improves food dispersibility, and the solubility of nutritive components which would likely improve their intestinal absorption (CHEN et al., 2018; SHU et al., 2019). We have recently demonstrated that short-time micronization (less than 30 min) of OP is efficient to increase the extractability of phenolic compounds and antioxidant capacity (SPERONI et al., 2019). In addition, long-time micronization of OP (5 h) has been shown to be efficient for reducing lignin content and increasing soluble fiber content (SPERONI et al., 2020). Long-time micronization of OP has been also shown to increase the release of phenolic compounds in the salivary and gastric phases during simulated static digestion, reflecting increased antioxidant capacity (SPERONI et al., 2021). Moreover, long-time micronization of OP has been shown to increase the intestinal bioaccessibility of hydroxytyrosol, decarboxymethyl oleuropein aglycone (3,4-DHPEA-EDA), oleuropein, luteolin, and apigenin in static digestion model

Phenolic compounds of OP are mostly composed by phenolic alcohols (hydroxytyrosol and tyrosol), secoiridoids (oleuropein and its derivatives), flavonoids (luteolin), and phenolic acids (caffeic acid and p-coumaric acid) (MALAPERT et al., 2018). These compounds have been described to reduce the risk of cardiovascular diseases and some types of cancer, by exerting an antioxidant effect, neutralizing reactive species and oxidation reactions (CONTERNO et al., 2019; SERRELI; DEIANA, 2018).

However, a small fraction of phenolic compounds is absorbed intact up to the small intestine and can exert their systemic effects in the native form (AUGUSTI et al., 2021). According to Rocchetti et al., (2020), the bioaccessibility of phenolic acids and secoiridoids in olive oil was low during digestion (10-25%), whereas phenolic alcohols, mainly hydroxytyrosol, was the only one that showed higher bioaccessibility (> 60%). Compounds with a complex structure resist to the acidic conditions of the stomach and remain in significant amounts in the non-absorbable fraction in the small intestine (MOSELE; MACIÀ; MOTILVA, 2015). After reaching the colon, they become available for metabolism by intestinal microbiota (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2020; GIL-SÁNCHEZ et al., 2018). The products formed during the biotransformation of phenolic compounds have low molecular weight, resulting in greater availability for absorption and in some cases greater biological activity than their parent compounds (DANNESKIOLD-SAMSØE et al., 2019). In addition, phenolic compounds that reach the large intestine are able to reshape the intestinal microbiota exerting a prebiotic-like effect (AUGUSTI et al., 2021; RIBEIRO et al., 2021).

Studies on the biotransformation of OP during colonic fermentation can provide information about the microbial-derived phenolic metabolites that are likely implicated in the bioactive properties of dietary phenolic compounds. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of granulometric fractionation followed by micronization of OP on the biotransformation of phenolic compounds in a static model of colonic fermentation with human feces.

2. Materials and methods

2.1. Olive pomace

The olive pomace from *Olea europaea* cv. 'Arbequina' was collected immediately after oil extraction by the two-phase continuous extraction method, in an extra virgin olive oil industry located in the city of Formigueiro, RS, Brazil (29° 59' 01" S; 53° 21' 50 " W).

The crude sample of olive pomace without physical modification was identified as non-fractionated (NF).

2.2. Granulometric fractionation and micronization of olive pomace

NF was subjected to granulometric fractionation with a 2 mm sieve as described by Speroni et al. (2019), and the fraction with particle size < 2 mm was identified as F2NM. This fraction was centrifuged (1774 x g/10 min), lyophilized (TERRONI, model LS 3000, Brazil), crushed in a knife mill (Marconi ®, model MA 630, Brazil) and degreased with n-hexane, according to Goulart et al. (2013).

Thereafter, F2NM was micronized in a planetary ball mill (Retsch Co. Germany, model PM100), using a 250 mL container with six stainless steel balls (30 mm diameter each). The milling time was optimized by Speroni et al. (2020), with 15 g of sample ground at 300 r min⁻¹ for 5 hours, with a 2 min pause every 10 min of grinding. After micronization the sample was identified as F2MTL.

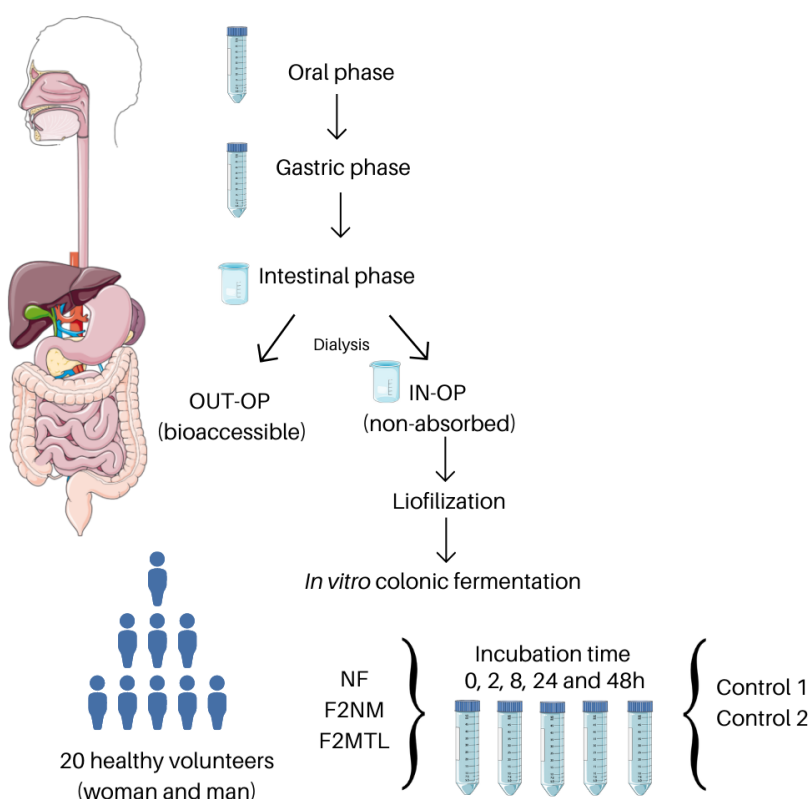
2.3. Particle size analysis

Particle size was assessed in Beckman Coulter's Laser Diffraction Particle Size Analyzer equipment, model LS 13320. Triplicate samples were added to the equipment until optimal obscuration was achieved in the software. Thereafter, the powders were dispersed in an aqueous medium and submitted to an ultrasound treatment for 1 min inside the equipment before analysis.

2.4. *In vitro* simulation of gastrointestinal digestion

Samples of NF, F2NM and F2MTL were submitted to a simulated gastrointestinal digestion based on the standardized INFOGEST 2.0 *in vitro* digestion method (BRODKORB et al., 2019). The samples are subjected to digestion under conditions that sequentially mimic the oral, gastric and intestinal stages (Fig. 1) with amounts of electrolytes, enzymes, bile, dilution, pH and digestion time all based on the physiology of the gastrointestinal tract. The conditions were based on the study of (BRODKORB et al., 2019), with small modification.

Figure 1 – Scheme of *in vitro* gastrointestinal digestion (oral, gastric and intestinal phase) of OP samples, followed by *in vitro* colonic fermentation with fresh human feces.



OP: olive pomace samples; IN-OP: fraction that remains inside the dialysis tube and corresponds to the digesta that will reach the colon; OUT-OP: fraction that crosses the dialysis membrane and represents the bioaccessible fraction; Control 1= IN-OP sample incubated with buffer solution, without feces; Control 2= fermentation with feces but without IN-OP;

For the oral phase, 4 g of each sample were incubated (without amylase) with salivary fluid pH 7.0 at 37 °C for 2 min on a rotary shaker (AGROT-BI, Satra). Subsequently, for the gastric phase, the pH was corrected to 3, by adding gastric fluid and pepsin (2,000 U/mL; P7000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in a final volume of 20 mL, with incubation at 37 °C in the rotary shaker for 2 h. In the intestinal phase, the pH was adjusted to 7, intestinal fluid, bile salts with sodium deoxycholate and sodium cholate (10 mM; C6750; C1254 Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and pancreatin (100 U/mL; P7545, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) were added in a final volume of 40 mL. This solution was transferred to a dialysis membrane (12,400 Da; D0530, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) that was placed in beaker containing 200 mL of phosphate buffer (24.9 mM, pH 7,4) and intestinal incubation was performed for 2 h at 37 °C with sporadic shaking. The membrane was previously activated as described by Dutra

et al., (2017). The fraction that remained inside the dialysis membrane after intestinal digestion (IN-OP) represents the fraction that is not available for absorption, and will reach the colon, whereas the fraction that was able to cross the dialysis membrane (OUT-OP) represents the bioaccessible fraction of OP. The OUT-OP fraction was used for another study and the IN-OP fraction was lyophilized and used for colonic fermentation with human feces.

2.5 Static model of colonic fermentation *in vitro*

The protocol was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (CAAE 20528819.4.0000.5346). Twenty healthy volunteers (18-55 years, 2 males, 16 females) were included as fecal donors in this study. Exclusion criteria were chronic, infectious, or gastrointestinal diseases or those who had received antibiotic treatment in the last 6 months. Twenty stool samples were collected from 18 donors and used to perform five independent fermentation assays, with each assay was performed with a pool of feces from four donors. Feces were used within 2 hours after defecation and kept at room temperature under anaerobic conditions (CO₂) until the time of the experiment.

Colonic fermentation was mimicked according to Mosele et al., (2015). After collection of feces, a pool of feces from 4 donors was made and homogenized in phosphate carbonate buffer pH 6.5 at a ratio of 0.5:10 m/v (RIBEIRO et al., 2021). The fecal suspension was filtered through sterile gauze under anaerobic conditions (N₂) and then used for the fermentation of the samples. The faecal inoculum buffer was purged with N₂ for 30 s in each fermentation tube to remove O₂.

Samples (0.25 g IN-OP) were incubated at 37 °C for 0, 2, 8, 24 or 48 h. Separate flasks were used for each fermentation time and the pH was determined at the end of each incubation times. In parallel with the samples, two control fermentation runs were carried out. Control 1 was the IN-OP sample incubated with buffer solution, in the absence of feces and was used to evaluate the chemical degradation of phenolic compounds, independent of the microbiota. Control 2 was the buffer solution containing feces but without the inclusion of IN-OP and was used to account for the phenolic compounds that were already found in the feces. After the end of fermentation, samples were centrifuged at 1,400 x g for 10 min and the supernatant was immediately frozen under liquid N₂ and stored at -20 °C.

2.6 pH analysis

The pH value was determined immediately after finishing colonic fermentation assays, using a PHOX P1000 digital potentiometer (PHOX Equipamentos Científicos, Colombo, Paraná, Brazil).

2.7 Extraction of phenolic compounds from colonic fermentation assay

Aliquots of supernatant samples obtained after fermentation (6 mL) were extracted using an acidified acetone solution (0.35% formic acid, v/v; 7 mL). After vortex mixing for 1 min, samples were centrifuged at $1,100 \times g$ for 10 min to collect the supernatant. The organic solvent was removed in a rotary evaporator (38 ± 2 °C) and the extract was filtered with 0.22 μm PTFE filter.

2.8 Identification and quantification of phenolic compounds by UHPLC-MS-MS

Phenolic compounds were identified and quantified using a triple-quadrupole Shimadzu UHPLC Mass Spectrometer (LCMS-8045; Japan) equipped with a binary pump, degasser, communication module, oven column and automatic injector. Samples were injected (10 μL) onto a Zorbax RRHD Eclipse C18 (XDB) analytical column (4.6 mm x 150 mm, 1.8 μm particle size) at 35 °C. The mobile phase was HPLC grade water (Millipore Direct-Q 3 UV; Merck, Germany) with 0.5% acetic acid glacial (eluent A) and acetonitrile (eluent B) at 0.2 mL min⁻¹. Chromatographic separation was carried out in a reverse-phase mode according to the following multistep elution gradient: 0% B from 0 to 7 min; 10% B from 7 to 11 min; 14% B from 11 to 17 min; 18% B from 17 to 20 min; 20% B from 20 to 21 min; 27% B from 21 to 22 min; 29% B from 22 to 23 min; 30% B from 23 to 33 min; 36% B from 33 to 40 min. Phenolic compounds were monitored in the Multiple Reaction Monitoring (MRM) spectrum mode, MRM conditions were as described by Pletsch (2021). The equipment was operated with an Electrospray Ionization Source (ESI) under the following conditions: interface temperature at 350 °C, heating gas flow at 6 L min, nebulizing gas flow at 2 L min⁻¹, drying gas flow at 4 L min⁻¹, interface voltage at -3.5 V. Analytical curves were constructed using commercial standards of protocatechuic acid, 3-hydroxytyrosol, 4-hydroxybenzoic acid, tyrosol, caffeic acid, vanillic acid, homovanillic

acid, p-coumaric acid, oleuropein, luteolin, and apigenin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

2.9 Statistical analysis

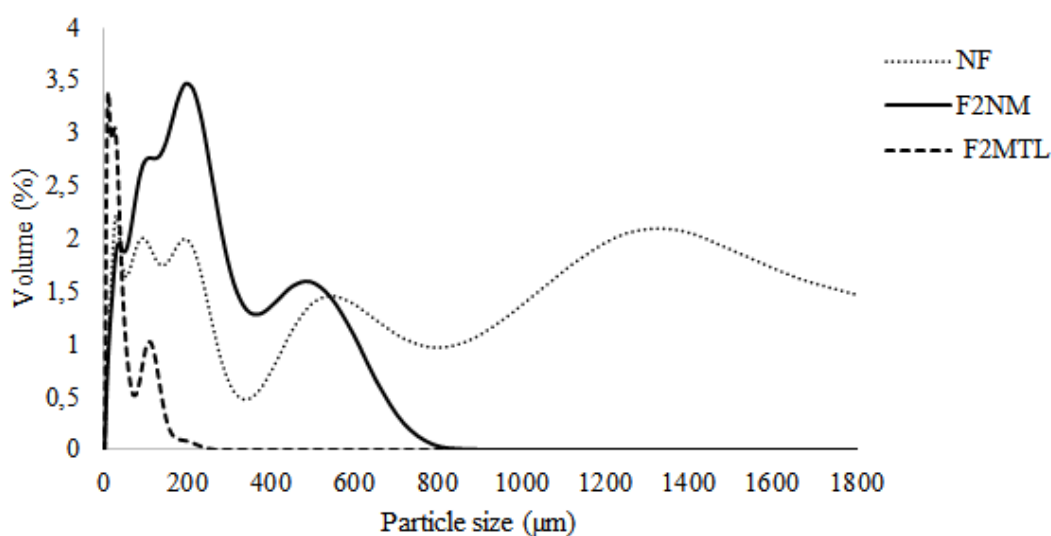
All statistical evaluations were performed using GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The data were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.).

3. Results and discussion

3.1 Particle size

The average particle size of OP decreased after granulometric fractionation (F2NM) and micronization (F2MTL), as shown in Fig. 2. Powdered samples obtained from OP without physical modification (NF) had a wide distribution range for the particle size, reaching up to 1800 μm , with an average size of $320.8 \pm 195.0 \mu\text{m}$ (mean \pm SD), mainly due to the presence of larger particles of stones and pulp that are difficult to grind in conventional knife milling devices.

Figure 2 – Particle size distribution of OP samples.



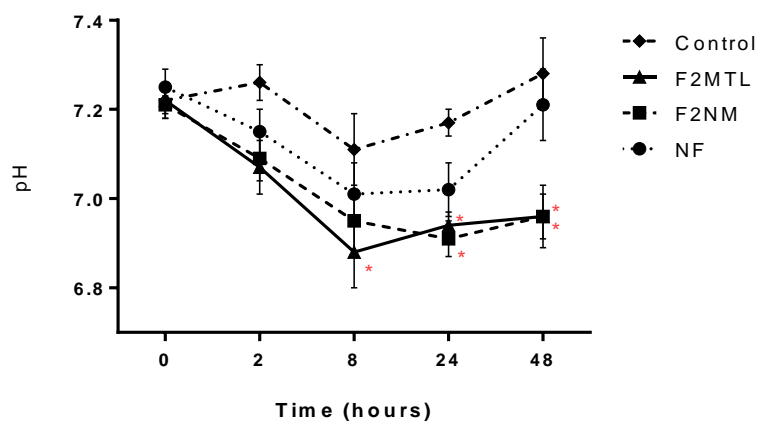
NF= non-fractionated OP; F2NM= granulometrically fractionated OP; F2MTL= granulometrically fractionated and micronized OP. Results were obtained in triplicate.

The particle size of powdered OP samples was reduced by granulometric fractionation using a 2 mm sieve (F2NM) (mean \pm SD: $143.0 \pm 5.3 \mu\text{m}$) and even more reduced when samples were subsequently micronized (F2MTL) (mean \pm SD: $22.4 \pm 0.9 \mu\text{m}$). As previously demonstrated by our research group, long-time (5 h) micronization standardizes the particle size as indicated by the great decrease in the SD of particle size values (SPERONI et al., 2020).

3.2 pH and fermentation parameters

The evaluation of pH during fermentation was used as an indicator of the viability of the intestinal microbiota of the fecal inoculum. F2MTL samples had a decrease in pH values during fermentation (pH 7.22 at 0 h vs. pH 6.95 at 48 h), with a significant difference from the Control 2 (fermentation of feces without OP) at 8 h, 24 h, and 48 h. The pH of F2NM was also reduced during fermentation (pH 7.21 at 0 h vs. pH 6.96 at 48 h) and significantly lower than Control 2 at 24 h and 48 h ($p < 0.05$).

Figure 3 – Changes in pH values during the colonic fermentation of IN-OP samples.



IN-OP: olive pomace fraction that was not bioaccessible after gastrointestinal digestion. Control 2= fermentation with feces but without IN-OP; NF= IN-OP from non-fractionated OP; F2NM= IN-OP from granulometrically fractionated OP; F2MTL= IN-OP from granulometrically fractionated and micronized OP. Data are presented as mean \pm SEM (n = 5). *Different from Control 2 at the same time point ($p < 0.05$).

The reduction in pH is expected by the increase in the rate of intestinal fermentation (TEJADA-ORTIGOZA et al., 2022). pH can demonstrate fecal microbiota viability, with colonic fermentation of dietary fiber and other undigestible compounds producing short chain fatty acids that can acidify the colonic pH and favor intestinal homeostasis (WANG et al., 2019).

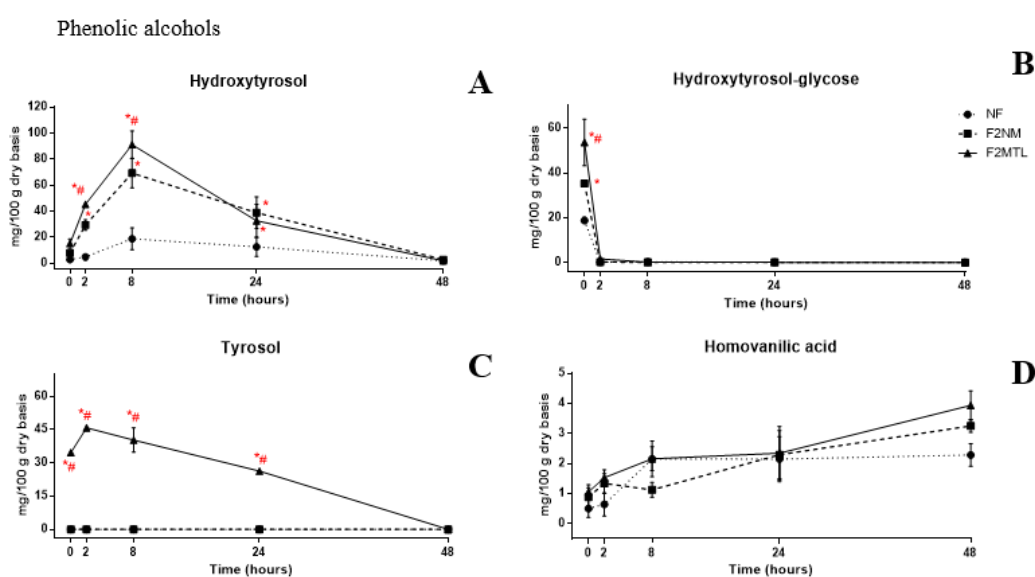
3.3 Transformation of phenolic compounds during colonic fermentation

The main compounds present in OP were evaluated by MRM and quantified using authentic reference standards. The concentration of phenolic compounds in OP samples during fermentation was corrected to eliminate the interference of phenolic compounds already present in the feces (Control 2). The sum of phenolic compounds was high in the start of colonic fermentation assay (time 0), especially in F2MTL (146.7 mg/100 g d.b.) compared to NF and F2NM (31.14 and 85.49 mg/100 g d.b.). The fractionation of OP followed by micronization resulted in lower particle size that likely facilitated the release of phenolic compounds bound to the matrix yielding greater amount of phenolic compounds during the colonic fermentation of F2MTL than in F2NM and NF.

Hydroxytyrosol is the main phenolic alcohol found in OP (RIBEIRO et al., 2020). During *in vitro* digestion, hydroxytyrosol had high bioaccessibility in the salivary, gastric and intestinal phases, and it is still present in the insoluble fraction that reaches the colon (SPERONI et al., 2021). Granulometric fractionation of OP followed by micronization significantly increased the amount of hydroxytyrosol released during *in vitro* gastrointestinal digestion (SPERONI et al., 2021). At the start of fermentation (0 h) the concentration of hydroxytyrosol (mg/100 g of sample d.b.) was higher in F2MTL (15.2 ± 2.0) and F2NM (8.1 ± 0.9) than in NF (3.0 ± 0.2) (Fig. 4A). The concentration of hydroxytyrosol released during colonic fermentation increased for all OP samples during the first hours, reached a peak at 8 h, and thereafter decreased from 24 h onwards ($p < 0.05$). F2NM and F2MTL released higher hydroxytyrosol levels than NF after 2 (4.8x and 7.9x, respectively), 8 (2.6x and 3.8x, respectively) and 24 h (2x and 1.6x, respectively) of fermentation ($p < 0.05$; Fig. 4A). Additionally, hydroxytyrosol levels released by F2MTL were higher than F2NM at 2 and 8 h of fermentation ($p < 0.05$; Fig. 4A). At 48 h of fermentation, small amounts of hydroxytyrosol were found regardless of the sample, demonstrating the complete metabolism of the compound and in agreement with a recent study on OP fermentation (RIBEIRO et al. 2021).

Hydroxytyrosol-glycoside represents ~46% of the phenolic compounds found in OP-IN. At the start of fermentation (0 h) there was a significant difference in hydroxytyrosol levels among samples: F2MTL > F2NM > NF ($p < 0.05$; Fig. 4B). This data corroborates the effectiveness of micronization to improve the release of phenolic alcohols and is in agreement with our previous study on the gastrointestinal digestion of OP up to the small intestinal phase (SPERONI et al., 2021). However, hydroxytyrosol-glycoside was detected at trace levels after 2 h of fermentation. The parallel increase in the levels of hydroxytyrosol indicates a rapid and extensive metabolism of hydroxytyrosol glycoside by fecal microbiota that removes the sugar moiety favoring the increase of aglycone levels (Fig. 4A).

Figure 4 – Changes in phenolic alcohols during the colonic fermentation of IN-OP samples.

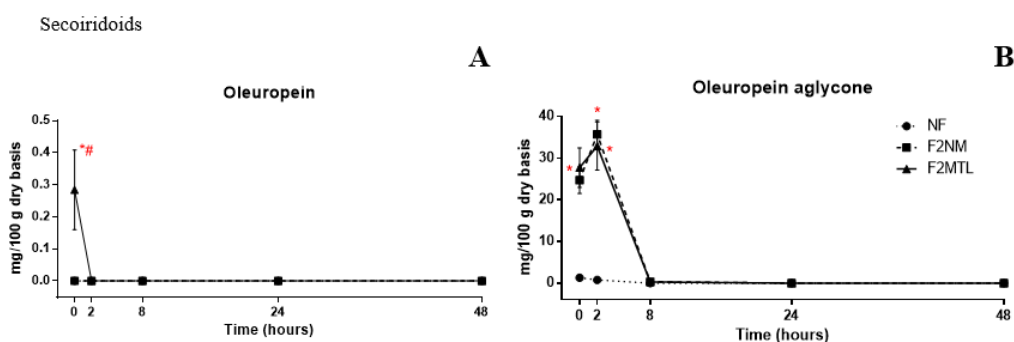


IN-OP: olive pomace fraction that was not bioaccessible after gastrointestinal digestion. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 5$). *Different from NF at the same time point ($p < 0.05$). #Different from F2NM at the same time point ($p < 0.05$). NF= IN-OP from non-fractionated OP; F2NM= IN-OP from granulometrically fractionated OP; F2MTL= IN-OP from granulometrically fractionated and micronized OP.

The most remarkable effect of OP fractionation followed by micronization (F2MTL) was the significant increase in the release of tyrosol during colonic fermentation compared to NF and F2NM, in which the presence of this compound was not detected ($p <$

0.05; Fig 4C). The increase in tyrosol levels of F2MTL from 0 to 2 h is likely related to the metabolism of hydroxytyrosol by intestinal microbiota (Fig. 4). Although F2MTL keep much higher levels of tyrosol than NF and F2NM up to 24 h ($p < 0.05$), a progressive decrease was observed from 2 h onwards and culminates with the disappearance of tyrosol at 48 h (Fig. 4C). The main metabolites generated from the biotransformation of phenolic alcohols, such as hydroxytyrosol and tyrosol, by the intestinal microbiota are homovanillic acid, phenylacetic acid and its derivatives, and vanillyl alcohol (RIBEIRO et al., 2021; LÓPEZ DE LAS HAZAS et al., 2016). Only homovanillic acid was monitored in the present study. Their levels progressively increased during the colonic fermentation of OP samples (Fig. 4D), which is in agreement with the study by Ribeiro et al., (2021), but no difference was observed among samples. The presence of this compound was also reported by Conterno et al., (2019), who quantified homovanillic acid in the plasma of volunteers after feeding with cookies made from olive pomace.

Figure 5 – Changes in secoiridoids during the colonic fermentation of IN-OP samples.

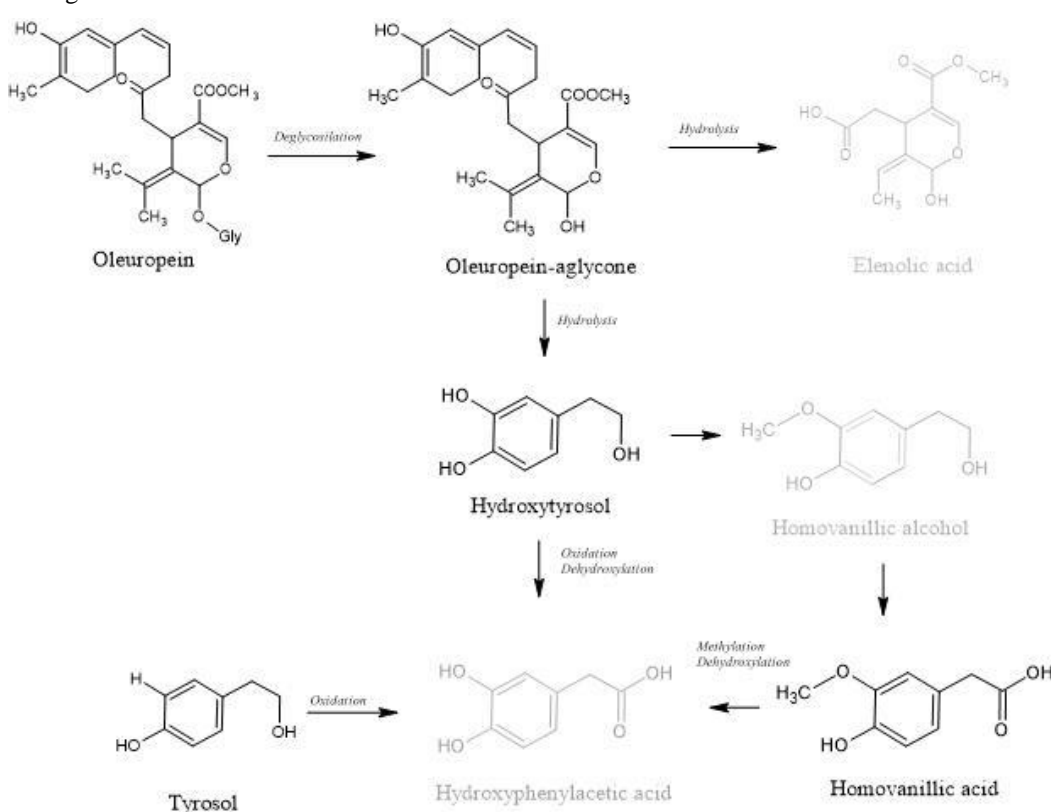


IN-OP: olive pomace fraction that was not bioaccessible after gastrointestinal digestion. Data are presented as mean \pm SEM (n = 5). *Different from NF at the same time point ($p < 0.05$). #Different from F2NM at the same time point ($p < 0.05$). NF= IN-OP from non-fractionated OP; F2NM= IN-OP from granulometrically fractionated OP; F2MTL= IN-OP from granulometrically fractionated and micronized OP.

Oleuropein is the main phenolic glycoside found in olive fruits but it is extensively degraded during olive oil extraction generating phenolic alcohols that are the major phenolics in OP (PEDAN et al., 2019). Thus, small amounts of secoiridoids, such as oleuropein and its derivatives, have been reported in OP (LÓPEZ DE LAS HAZAS et al., 2016), and in the present study only trace amounts of these compounds were detected in

NF samples at the start of fermentation (Fig. 5). Micronized OP has been shown to have a greater release of oleuropein during the salivary and gastric phases of digestion, but oleuropein was still found in the fraction that was not accessible for intestinal absorption, which is the one that will be available for biotransformation by the intestinal microbiota after reaching the colon (SPERONI et al., 2021). In the present investigation, oleuropein was found only at the initial fermentation time (0 h) in F2MTL and it was completely degraded up to 2 h ($p < 0.05$; Fig. 5A). The degradation of oleuropein favors the increase of oleuropein aglycone, as can be seen in Fig. 5B. Granulometric fractionation associated or not to micronization (F2MTL and F2NM), were effective to increase the release of oleuropein aglycone in the start of fermentation (up to 2 h) compared to NF ($p < 0.05$), which released only trace amounts of this compound (Fig. 5B).

Figure 8 – Proposed biotransformation pathways for secoiridoids and phenolic alcohols from olive pomace during colonic fermentation.

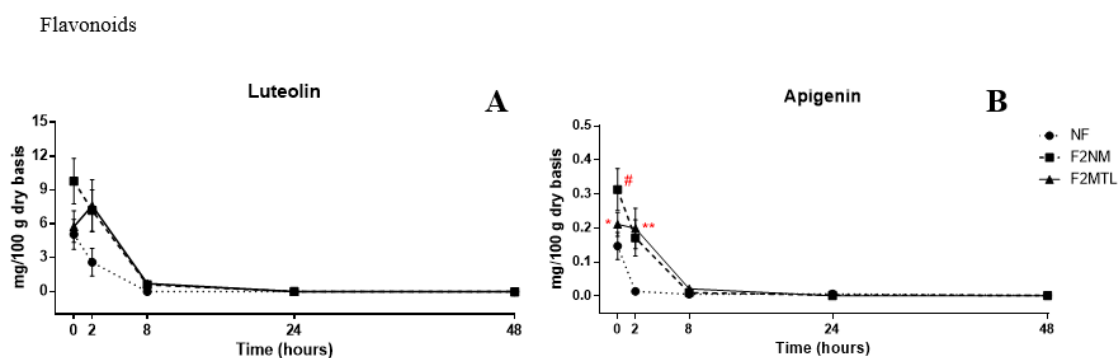


After 2 h of fermentation, oleuropein aglycone was rapidly degraded in F2NM and F2MTL samples. After 8h of fermentation oleuropein aglycone was not detected, as

observed by Mosele et al., (2014), with detection of elenolic acid and oleuropein aglycone in low amounts in the initial times decreasing to trace levels at 12 h of fermentation.

Luteolin and apigenin are the main flavonoids in olive pomace. They show good stability during simulated *in vitro* digestion, which results in a quite high proportion of the intake dose reaching the colon (43.1% for luteolin and 85.2% for apigenin in F2NM) (SPERONI et al., 2021). Luteolin concentration was high in the OP samples at the initial fermentation time (Fig. 6A), but it was rapidly reduced up to 8 h, when it was found at trace levels. No difference was observed in luteolin levels among OP samples. Apigenin had a similar time-course behavior compared to luteolin by F2MTL and F2NM released higher apigenin amount than NF up to 2 h of fermentation ($p < 0.05$, Fig. 6B). The rapid degradation of these flavonoids is likely related to their deglycosylation by microbial action (MOSELE; MACIÀ; MOTILVA, 2015).

Figure 6 – Changes in flavonoids during the colonic fermentation of IN-OP samples.

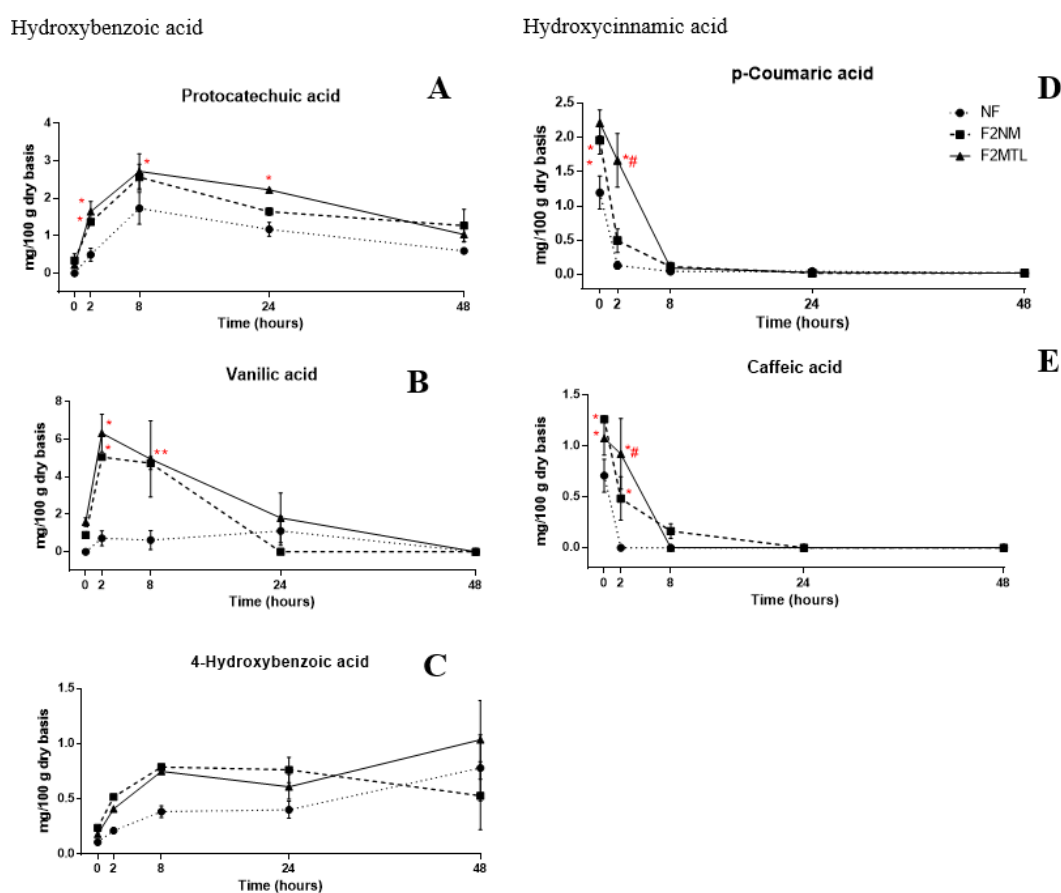


IN-OP: olive pomace fraction that was not bioaccessible after gastrointestinal digestion. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 5$). *Different from NF at the same time point ($p < 0.05$). #Different from F2NM at the same time point ($p < 0.05$). NF= IN-OP from non-fractionated OP; F2NM= IN-OP from granulometrically fractionated OP; F2MTL= IN-OP from granulometrically fractionated and micronized OP.

Among the phenolic acids found in OP-IN, the derivatives of hydroxybenzoic acids showed an increase up to 8 h of fermentation for protocatechuic, vanillic and 4-hydroxybenzoic acids (Fig. 6A, B, C). Thereafter, the levels of protocatechuic and vanillic acid were decreased, whereas 4-hydroxybenzoic acid remained in a plateau up to 48 h of fermentation (Fig. 6). F2NM (at 2 h) F2MTL (at 2, 8 and 24 h) had higher protocatechuic acid levels than NF during fermentation ($p < 0.05$; Fig 6A). F2NM and F2MTL also had

higher levels of vanillic acid than NF during fermentation (at 2 and 8 h, $p < 0.05$; Fig. 6B). The levels of 4-hydroxybenzoic acid did not differ among OP samples during fermentation (Fig. 6C). These metabolites are described by Mosele; Macià; Motilva, (2015), as end products of flavonoid fermentation, related to luteolin and apigenin degradation (Fig 6). Fractionation and micronization increased the release these phenolic acids which will favor their absorption. The particle size reduction likely favored microbial metabolic activity in the OP matrix.

Figure 7 – Changes in hydroxybenzoic acid- and hydroxycinnamic acid-derivatives during the colonic fermentation of IN-OP samples.



IN-OP: olive pomace fraction that was not bioaccessible after gastrointestinal digestion. Data are presented as mean \pm SEM (n = 5). *Different from NF at the same time point ($p < 0.05$). #Different from F2NM at the same time point ($p < 0.05$). NF= IN-OP from non-fractionated OP; F2NM= IN-OP from granulometrically fractionated OP; F2MTL= IN-OP from granulometrically fractionated and micronized OP.

Hydroxycinnamic acid derivatives, such as p-coumaric and caffeic acid, had their levels decreased during fermentation being found at trace levels from 8 h onwards. At 0 h, p-coumaric and caffeic acid levels were higher for F2MTL and F2NM than NF, whereas at 2 h of fermentation levels were higher for F2MTL than for F2NM and NF ($p < 0.05$; Fig. 6D).

4. Conclusions

The reduction in particle size with micronization was shown to increase the amount of phenolic compounds in OP-IN. The increase in surface area in F2MTL facilitated the biotransformation of phenolic alcohols, mainly hydroxytyrosol, and secoiridoids, such as oleuropein. Hydroxytyrosol (8h) and tyrosol (2h) were the compounds that reached the highest concentration and highest stability during simulated colonic fermentation. Oleuropein was a key compound in the metabolism by the fecal microbiota, with complete degradation within 2 h of fermentation. The main metabolites formed were homovanillic acid and hydroxybenzoic acids, such as vanillic, protocatechuic and hydroxybenzoic acid. The results show that granulometric fractionation and micronization in OP can increase the concentration of hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein during fermentation in relation to non-micronized OP. *In vivo* assays are needed to confirm the bioavailability of phenolic compounds and the effect on the gut microbiota to further corroborate the beneficial effects of micronized OP on human health.

Acknowledgments

This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) [grant numbers 435932/2018-7; 303654/2017-1; 422700/2021-5], CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) [Finance code 001] and Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul [grant number DCIT 41/2017]. We thank to Olivais da Fonte Company (Formigueiro, RS, Brazil) for the kind donation of olive pomace.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

References

- AUGUSTI, Paula Rossini et al. Bioactivity, bioavailability, and gut microbiota transformations of dietary phenolic compounds: implications for COVID-19. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 97, p. 108787, 2021.
- BRODKORB, André. et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.
- CHEN, Tong; BHANDARI, Bhesh; YANG, Zaixing. Micronization and nanosizing of particles for an enhanced quality of food: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 6, p. 993-1001, 2018.
- CONTERNO, Lorenza et al. Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects. **European Journal of Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 63–81, 2019.
- DANNESKIOLD-SAMSØE, Niels Banhos et al. Interplay between food and gut microbiota in health and disease. **Food Research International**, v. 115, p. 23-31, 2019.
- DERMECHE, Samia et al. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 10, p. 1532–1552, 2013.
- DUTRA, Rodrigo Luiz Targino et al. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 100, p. 650–657, 2017.
- GIL-SÁNCHEZ, Irene et al. Dynamic gastrointestinal digestion of grape pomace extracts: Bioaccessible phenolic metabolites and impact on human gut microbiota. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, p. 41–52, 2018.
- GOULART, Fernanda Rodrigues et al. Atividade de enzimas digestivas e parâmetros de crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com farelo de linhaça *in natura* e demucilada **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3069–3080, 2013.
- LÓPEZ DE LAS HAZAS, María-Carmem. et al. Differential absorption and metabolism of hydroxytyrosol and its precursors oleuropein and secoiridoids. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 52–63, 2016.
- MALAPERT, Aurélia et al. direct and rapid profiling of biophenols in olive pomace by UHPLC-DAD-MS. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 4, p. 1001–1010, 2018.
- MOSELE, Juana I. et al. Faecal microbial metabolism of olive oil phenolic compounds : *In vitro* and *in vivo* approaches. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 9, p. 1809–1819, 2014.
- MOSELE, Juana I. et al. Application of *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 529–540, 2015.
- MOSELE, Juana. I.; MACIÀ, Alba; MOTILVA, Maria-José. Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: A review. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 17429–17468, 2015.

PEDAN, Vasilisa et al. Characterization of phenolic compounds and their contribution to sensory properties of olive oil. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2041, 28 maio 2019.

PLETSCH, Lidia Betina Hendges. **Avaliação do perfil lipídico e caracterização de compostos fenólicos de diferentes cultivares de noz-pecã [*Carya illinoensis* (wangenh) k. koch]**. 2021. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2021.

RIBEIRO, Tânia Bragança et al. Simulated digestion of an olive pomace water-soluble ingredient: Relationship between the bioaccessibility of compounds and their potential health benefits. **Food and Function**, v. 11, n. 3, p. 2238–2254, 2020.

RIBEIRO, Tânia Bragança et al. Prebiotic effects of olive pomace powders in the gut: *In vitro* evaluation of the inhibition of adhesion of pathogens, prebiotic and antioxidant effects. **Food Hydrocolloids**, v. 112, n. April 2020, 2021.

ROCCHETTI, Gabriele et al. Metabolomic study to evaluate the transformations of extra-virgin olive oil's antioxidant phytochemicals during *in vitro* gastrointestinal digestion. **Antioxidants**, v. 9, n. 4, p. 1–15, 2020.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, Paloma et al. Structure–biological activity relationships of extra-virgin olive oil phenolic compounds: Health properties and bioavailability. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 1–17, 2020.

SERRELI, Gabriele; DEIANA, Monica. Biological relevance of extra virgin olive oil polyphenols metabolites. **Antioxidants**, v. 7, n. 12, p. 11–13, 2018.

SHU, Yang et al. Effect of particle size on the bioaccessibility of polyphenols and polysaccharides in green tea powder and its antioxidant activity after simulated human digestion. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 3, p. 1127–1133, 2019.

SPERONI, Caroline Sefrin et al. Micronization and granulometric fractionation improve polyphenol content and antioxidant capacity of olive pomace. **Industrial Crops and Products**, v. 137, p. 347–355, 2019.

SPERONI, Caroline Sefrin et al. Granulometric fractionation and micronization: A process for increasing soluble dietary fiber content and improving technological and functional properties of olive pomace. **LWT - Food Science and Technology**, v. 130, p. 109526, 2020.

SPERONI, Caroline Sefrin et al. Micronization increases the bioaccessibility of polyphenols from granulometrically separated olive pomace fractions. **Food Chemistry**, v. 344, p. 128689, 2021.

TEJADA-ORTIGOZA, Viridiana et al. Extrusion effect on *in vitro* fecal fermentation of fruit peels used as dietary fiber sources. **LWT - Food Science and Technology**, v. 153, p. 112569, 2022.

WANG, Miaomiao et al. *In vitro* colonic fermentation of dietary fibers: Fermentation rate, short-chain fatty acid production and changes in microbiota. **Trends in Food Science and Technology**, v. 88, p. 1–9, 2019.

5 CONCLUSÃO

A aplicação de métodos de redução de partícula no bagaço de oliva, como o fracionamento granulométrico e a micronização, são alternativas simples e de baixo custo que podem melhorar a composição nutricional e fitoquímica desse resíduo. Com o fracionamento granulométrico foi possível remover a fração mais grosseira do bagaço de oliva, como os caroços e a casca, e o posterior uso do processo de micronização permitiu a redução homogênea do tamanho de partícula. A micronização em tempos prolongados possibilita o rearranjo da fibra alimentar, reduzindo a quantidade de lignina e aumentando a solubilidade de compostos fenólicos. A digestão *in vitro*, seguida de fermentação colônica do bagaço de oliva *in vitro*, mostra o efeito que a associação dos métodos de redução de partícula tem na liberação de alguns dos compostos fenólicos. O aumento da área superficial em bagaço de oliva após o fracionamento granulométrico e a micronização facilitou a biotransformação de álcoois fenólicos, especialmente hidroxitirosois, e secoiridóides, como a oleuropeína. E possibilitou a biotransformação de álcoois fenólicos e flavonoides em metabólitos como ácido homovanílico e os ácidos hidroxibenzoicos, como o ácido vanílico, protocatecuico e hidroxibenzoico. Desta forma, o fracionamento granulométrico e a micronização demonstraram ser ferramentas úteis para o reaproveitamento do bagaço de oliva como ingrediente para a alimentação humana e animal.

REFERÊNCIAS

- AIRES, Cristina Maria Gomes Leite Sempiterno. **Contribuição para o estudo da aplicação de subprodutos da indústria de extração de azeite em solos agrícolas**. 2007. Tese (Engenharia Agronomica) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2007.
- ALBA, José Maria Filippini *et al.* **Zoneamento edafoclimático da olivicultura para o rio grande do sul**. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013.
- ALU'DATT, Muhammad *et al.* Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. **Food Chemistry**, v. 123, n. 1, p. 117–122, 2010.
- AUGUSTI, Paula Rossini *et al.* Bioactivity, bioavailability, and gut microbiota transformations of dietary phenolic compounds: implications for COVID-19. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 97, p. 108787, 2021.
- BERNAUD, Fernanda Sarmiento Rolla; RODRIGUES, Ticiania C. Fibra alimentar - Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 57, p. 397-405, 2013.
- BRITO, Romilson Fernando. **Valorização integrada de resíduos e subprodutos da extração do azeite: extração e caracterização de compostos bioativos do bagaço de azeitona**. 2016. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Universidade de Algarve, Faro, 2016.
- BRODKORB, André. *et al.* INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.
- CHEN, Tong; BHANDARI, Bhesh; YANG, Zaixing. Micronization and nanosizing of particles for an enhanced quality of food: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 6, p. 993-1001, 2018.
- CLIFFORD, Michel N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. **Planta Medica**, v. 70, n. 12, p. 1103–1114, 2004.
- COUTINHO, Enilton Fick. *et al.* **Oliveira – Aspectos técnicos e cultivo no sul do Brasil**. Brasília, Embrapa, 2015, 181 p.
- DAMODARAN, Srinivasan.; PARKIN, Kirk. L.; FENNEMA, Owen. R. **Química de alimentos de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.
- DANNESKIOLD-SAMSØE, Niels Banhos *et al.* Interplay between food and gut microbiota in health and disease. **Food Research International**, v. 115, p. 23-31, 2019.
- DERMECHE, Samia *et al.* Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 10, p. 1532–1552, 2013.
- DUARTE, Cláudia Sofia Caeiro. **Extração e encapsulamento de compostos bioativos do bagaço de azeitona**. 2011. Dissertação (Mestre em Engenharia Alimentar) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.
- FERNÁNDEZ-POYATOS, Maria del Pilar; RUIZ-MEDINA, Antonio; LLORENT-MARTÍNEZ, Eulogio. Phytochemical profile, mineral content, and antioxidant activity of *Olea europaea* L. cv. Cornezuelo table olives. Influence of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 297, p. 124933, 2019.

- GALANAKIS, Charis. M. Phenols recovered from olive mill wastewater as additives in meat products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 79, p. 98–105, 2018.
- GHANBARI, Rahelex *et al.* Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) - A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 1291–1340, 2012.
- GIL-SÁNCHEZ, Irene *et al.* Dynamic gastrointestinal digestion of grape pomace extracts: Bioaccessible phenolic metabolites and impact on human gut microbiota. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, p. 41–52, 2018.
- GIUNTINI, Elina Bistriche; MENEZES, Elizabete Wenzel de. Fibra Alimentar. **International Life Sciences Institute do Brasil**, v. 18, p. 1–26, 2011.
- GUILHERME, Vanessa da Rocha Soares. **Biodegradação anaeróbia do bagaço de azeitona**. 2012. Dissertação (Mestre em Química Industrial) - Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2012.
- HALLIWELL, B. **Antioxidant and anti-inflammatory components of foods**. ILSI Europe, 2015.
- HE, Shenghua *et al.* Effect of ball-milling on the physicochemical properties of maize starch. **Biotechnology Reports**, v. 3, p. 54–59, 2014.
- OIC. International Olive Council. **World olive oil figures**. Disponível em: <<https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures>>. Acesso em: junho de 2021.
- JÚLIO, Luciana Resende Cardoso. **Tratamento, caracterização química e estudo *in vivo* do bagaço de azeitona resultante da extração do azeite de oliva**. 2015. Tese (Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- KOMURA, Rodrigo Kenji. **Investigação dos métodos de separação, uso e aplicação da lignina proveniente da biomassa lignocelulósica**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2015.
- LANZA, Barbara; NINFALI, Paolino. Antioxidants in extra virgin olive oil and table olives: Connections between agriculture and processing for health choices. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, 2020.
- LOZANO-SÁNCHEZ, Jesus *et al.* Recovering bioactive compounds from olive oil filter cake by advanced extraction techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 16270–16283, 2014.
- LOZANO-SÁNCHEZ, Jesus *et al.* Extraction, Isolation and Utilisation of Bioactive Compounds from Waste Generated by the Olive Oil Industry. In: VUONG, Quan V. **Utilisation of bioactive compounds from agricultural and food waste**: CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 230–251, 2017.
- MALAPERT, Aurélia *et al.* Direct and rapid profiling of biophenols in olive pomace by UHPLC-DAD-MS. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 4, p. 1001–1010, 2018.
- MINEKUS, Mans *et al.* A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.
- MORAL, Pedro Sánchez; MÉNDEZ, Maria Victoria Ruiz. Production of pomace olive oil. **Grasas y aceites**, v. 57, n. 1, p. 47–55, 2006.

MOSELE, Juana I.; MACIÀ, Alba; MOTILVA, Maria-José. Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: A review. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 17429–17468, 2015.

MÜLLER, Mattea; CANFORA, Emanuel E.; BLAAK, Ellen E. Gastrointestinal transit time, glucose homeostasis and metabolic health: Modulation by dietary fibers. **Nutrients**, v. 10, n. 3, 2018.

NACZK, Marian; SHAHIDI, Fereidoon. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 2004.

NIAOUNAKIS, Michael; HALVADAKIS, Constantinos. **Olive processing waste management: Literature review and patent survey**. 2 ed., v. 5. Elsevier: 2006.

PASTEN, Alexis *et al.* Influence of drying on the recoverable high-value products from olive (cv. Arbequina) waste cake. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 6, p. 1627–1638, 2019.

PEDAN, Vasilisa *et al.* Characterization of phenolic compounds and their contribution to sensory properties of olive oil. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2041, 2019.

RAMALHEIRO, João Pedro da Silva Canas. **Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades**. 2009. Dissertação (Engenharia Alimentar - Qualidade e Segurança Alimentar) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

RIBEIRO, Tânia Bragança *et al.* Simulated digestion of an olive pomace water-soluble ingredient: Relationship between the bioaccessibility of compounds and their potential health benefits. **Food and Function**, v. 11, n. 3, p. 2238–2254, 2020.

ROCCHETTI, Gabriele *et al.* Metabolomic study to evaluate the transformations of extra-virgin olive oil's antioxidant phytochemicals during *in vitro* gastrointestinal digestion. **Antioxidants**, v. 9, n. 4, p. 1–15, 2020.

RODIS, Panayotis; KARATHANOS, Vaios; MANTZAVINO, Antonia. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 596–601, 2002.

ROSELLÓ-SOTO, Elena *et al.* Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. **Trends in Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 296–310, 2015.

SAURA-CALIXTO, Fulgencio. Concept and health-related properties of nonextractable polyphenols: The missing dietary polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 45, p. 11195–11200, 2012.

SECRETARIA DA AGRICULTURA PECUÁRIA E DESENVOLVIMENTO RURAL. **Pró-oliva**. Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/pro-oliva>>. Acesso em: janeiro de 2022.

SENGUL, Hafizenur; SUREK, Ece.; NILUFER-ERDIL, Dilara. Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an *in vitro* gastrointestinal digestion model. **Food Research International**, v. 62, p. 1069–1079, 2014.

SERVILI, Maurizio *et al.* Innovation in extraction technology for improved virgin olive oil quality and by-product valorisation. **Acta Horticulturae**, v. 888, p. 303–315, 2011.

SHAHIDI, Fereidoon; ZHONG, Ying. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757–781, 2015.

SHU, Yang *et al.* Effect of particle size on the bioaccessibility of polyphenols and polysaccharides in green tea powder and its antioxidant activity after simulated human digestion. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 3, p. 1127–1133, 2019.

SILVA, Luana Costa da Silva. **Composição químico-bromatológica do bagaço de azeitona conservado através de silagem**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

SPERONI, Caroline Sefrin *et al.* Micronization and granulometric fractionation improve polyphenol content and antioxidant capacity of olive pomace. **Industrial Crops and Products**, v. 137, p. 347–355, 2019.

SPERONI, Caroline Sefrin *et al.* Granulometric fractionation and micronization: A process for increasing soluble dietary fiber content and improving technological and functional properties of olive pomace. **LWT - Food Science and Technology**, v. 130, p. 109526, 2020.

SPERONI, Caroline Sefrin *et al.* Micronization increases the bioaccessibility of polyphenols from granulometrically separated olive pomace fractions. **Food Chemistry**, v. 344, p. 128689, 2021.

TAPPENDEN, Kelly; DEUTSCH, Andrew. The Physiological Relevance of the Intestinal Microbiota - Contributions to Human Health. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 679S-683S, 2007.

TERAMOTO, Juliano Rolim Salomé; BERTONCINI, Edna Ivani; PANTANO, Angélica Praela. **Histórico da introdução da cultura da oliveira no brasil**. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/HistoricoOliveira/index.htm>. Acesso em: Março 2021.

WANG, Tao; HE, Fuli; CHEN, Guibing. Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. **Journal of Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 101–111, 2014.

WONG, Julia; JENKINS, David. Carbohydrate Digestibility and Metabolic Effects. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2539S-2546S, 2007.

ZHANG, Min *et al.* Effects of superfine grinding on physicochemical and antioxidant properties of *Lycium barbarum* polysaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 594–601, 2014.

ZHAO, Xiao-Yan *et al.* Application of superfine pulverization technology in Biomaterial Industry. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 3, p. 337–343, 2009.

ANEXO

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: **Efeito da micronização sobre a biotransformação do bagaço de oliva em modelo estático de fermentação colônica.**

Pesquisador responsável: Dra. Tatiana Emanuelli
Instituição/Departamento: Universidade Federal de Santa Maria/Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos
Telefone para contato: (55) 3220 8547 ou (55) 9696 1480
Pesquisadores participantes: Tatiana Emanuelli e Camila Monteiro
Endereço eletrônico: camilamonteiro@gmail.com; tatiana.emanuelli@ufsm.br

Eu, Tatiana Emanuelli, responsável pela pesquisa **“Efeito da micronização sobre a biotransformação do bagaço de oliva em modelo estático de fermentação colônica,** convido-vos a participar como voluntário deste nosso estudo.

Esta pesquisa pretende avaliar se a moagem ultrafina aumenta a liberação de compostos bioativos do bagaço de oliva durante a digestão. Acreditamos que ela seja importante para desenvolver um processo de aproveitamento do bagaço gerado durante a produção de azeite de oliva, possibilitando seu uso para enriquecer alimentos para pessoas e animais. Para a realização da pesquisa serão coletadas amostras de fezes de pessoas saudáveis que serão utilizadas para simular o processo de digestão humana em laboratório, onde será avaliada a transformação dos compostos fenólicos do bagaço de oliva. O comportamento do bagaço que sofreu moagem ultrafina será comparado ao que não sofreu este processo. Para participar da pesquisa, você não necessitará sair de sua casa. Você deverá responder a um questionário sobre hábitos alimentares e informações sobre seu estado de saúde e posteriormente, em data previamente agendada, deverá realizar a coleta de uma amostra das suas fezes em frasco coletor e, logo após a coleta, entregar a amostra para o pesquisador responsável. Você receberá um recipiente apropriado para a coleta das fezes e o transporte do material coletado até o laboratório será fornecido pelo pesquisador responsável. O material coletado será retirado pelo pesquisador responsável na casa do voluntário, sem gerar risco de deslocamento e seguindo os protocolos de segurança para o Covid-19.

A coleta de fezes é um procedimento que não causará riscos para você. Você poderá se sentir constrangido durante a coleta das fezes, podendo desistir de participar do estudo neste momento, ou em qualquer outro momento.

Não há benefício direto para você decorrente da participação no projeto. Trata-se

de estudo experimental simulando a digestão do bagaço de oliva. Caso os resultados do projeto indiquem a possibilidade de aproveitamento do bagaço de oliva para fins nutricionais, a sua participação terá contribuído para desenvolver um processo de aproveitamento deste resíduo agroindustrial, reduzindo seu impacto ambiental.

Durante todo o período da pesquisa você terá a possibilidade de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento. Para isso, entre em contato com algum dos pesquisadores ou com o Comitê de Ética em Pesquisa.

Você tem garantida a possibilidade de não aceitar participar ou de retirar sua permissão a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo pela sua decisão. As informações desta pesquisa serão confidenciais e poderão ser divulgadas, apenas, em eventos ou publicações, sem a identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação.

Fica garantida indenização em casos de danos comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa. Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe do estudo, o Comitê de Ética independente terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo. O material coletado e os seus dados serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão guardados com o pesquisador pelo período de cinco anos, após o qual serão destruídos. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Autorização

Eu, _____, após a leitura ou a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, estou suficientemente informado, ficando claro para que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade. Diante do exposto e de espontânea vontade, expresso minha concordância em participar deste estudo e assino este termo em duas vias, uma das quais foi-me entregue.

Assinatura do voluntário

Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM - Cidade Universitária - Bairro Camobi, Av. Roraima, nº 1000 - CEP: 97.105.900 Santa Maria – RS. Telefone: (55) 3220-9362 – Fax: (55) 3220-9362. E-mail: cep.ufsm@gmail.com. Web: www.ufsm.br/cep

ANEXO B – QUESTIONÁRIO ONLINE PARA SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Voluntário para experimento da fermentação colônica *in vitro*

Esta pesquisa busca voluntários saudáveis que possam doar amostras de fezes que serão utilizadas para simular o processo de digestão humana do bagaço de oliva em laboratório, onde será avaliada a fermentação colônica da fibra alimentar e a transformação dos compostos fenólicos. Os resultados dos questionários não serão divulgados e são apenas para conhecimento e triagem dos voluntários deste estudo e a identidade de cada voluntário será mantida em sigilo. Sua participação neste estudo é muito importante. Responda com atenção aos questionamentos e quaisquer dúvidas entre em contato com os pesquisadores responsáveis.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do estudo para leitura: <https://drive.google.com/file/d/10dPOz9thKofhDXiCv49DxdVVku5QE4Ku/view?usp=sharing>

Dados do voluntário:

E-mail *:

Nome completo *:

Data de nascimento *:

Endereço (Rua, nº, bairro e complemento) *:

Hábitos de vida e saúde do voluntário

Peso e altura corporal *

Sua resposta

Temperatura corporal *

Sua resposta

Você apresentou sintomas do novo corona vírus nos últimos 14 dias? *

Sim

Não

Pratica atividade física? *

1 vez por semana

2 vezes por semana

3 vezes por semana

Todos os dias

Não pratico atividades físicas

Qual seu consumo de bebidas alcoólicas? *

- 1 a 2 vezes por semana
- 3 a 4 vezes por semana
- 5 vezes por semana
- Todos os dias
- Não bebo

Você é fumante? *

- Sim
- Não

Qual seu consumo de frutas e vegetais? *

- 1 a 2 vezes por semana
- 3 a 4 vezes por semana
- 5 vezes por semana ou mais
- Todos os dias
- Não como frutas e vegetais

Você tem dificuldades de ir ao banheiro (evacuação)? *

- Sim
- Não

Qual a frequência de evacuação? *

- 1 a 2 vezes por semana
- 3 a 4 vezes por semana
- 5 vezes por semana ou mais
- Todos os dias

Teve alguma doença inflamatória, viral ou bacteriana nos últimos meses? *

- Sim
- Não

Fez uso de antibióticos nos últimos 6 meses? *

- Sim
- Não

Teve distúrbios intestinais nos últimos 3 meses, como diarreia? *

- Sim
- Não

Usa algum tipo de medicamento ou suplemento alimentar, como polivitamínicos, whey protein ou fibras? Se sim, qual? *

Sua resposta

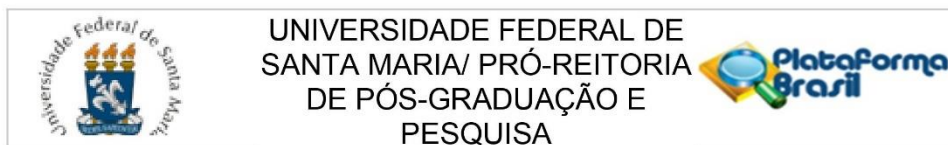
Você tem alguma doença intestinal diagnosticada? Se sim, qual? *

Sua resposta

Faz uso de algum medicamento? Se sim, qual? *

Sua resposta

ANEXO C – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-UFSM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da micronização sobre a biotransformação do bagaço de oliva em modelo estático de fermentação colônica

Pesquisador: Tatiana Emanuelli

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 20528819.4.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

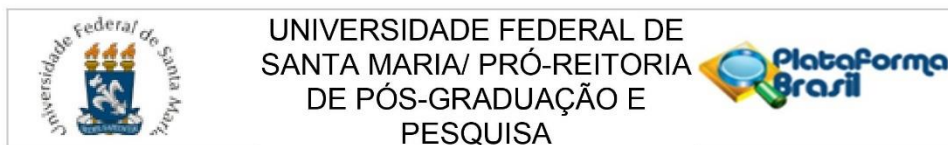
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.630.505

Apresentação do Projeto:

Este projeto visa avaliar os efeitos da micronização sobre a biotransformação do bagaço de oliva em modelo de fermentação colônica utilizando fezes humanas in vitro, a fim de avaliar o impacto deste processo sobre as características nutricionais do resíduo. O bagaço de oliva bruto será separado em peneira de 2 mm e uma das frações resultantes (F1 ou F2) será escolhida para micronização durante um tempo curto (FMC, 500 rpm/20 min) ou longo (FML, 300 rpm/5 h), processos que aumentam respectivamente o conteúdo de compostos fenólicos livres ou a fibra alimentar solúvel da fração. FMC, FML e a amostra não micronizada serão analisadas quanto a composição físico-química (umidade, cinzas, proteína bruta, gordura, fibra alimentar total, solúvel e insolúvel, fibra em detergente ácido, celulose, lignina). O teor de compostos fenólicos solúveis totais, taninos hidrolisáveis e taninos condensados, também serão quantificados. Além disso, será avaliada a capacidade antioxidante das amostras. As amostras FMC, FML e não micronizada serão submetidos a uma simulação da digestão gastrointestinal (boca, estômago e duodeno) in vitro e a fração não absorvível resultante será utilizada para o ensaio de fermentação colônica. A simulação da fermentação colônica será realizada em modelo estático, através da incubação com fezes humanas em anaerobiose. Paralelamente às amostras de bagaço de oliva digerido serão fermentadas amostras controle contendo apenas fezes humanas sem bagaço de oliva (controle 1) ou contendo apenas bagaço de oliva sem fezes (controle 2) e ainda uma condição padrão de

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.630.505

referência para fibra alimentar (inulina). Serão monitoradas a produção de gases durante a fermentação, utilizando o sistema ANKON, e também serão coletadas amostras do meio em diferentes tempos para avaliar a produção de ácidos graxos de cadeia curta (CG-FID), fibra alimentar, e o perfil compostos fenólicos (HPLC-DAD-MS-MS). Através deste estudo, espera-se identificar a influência do processo de micronização sobre as propriedades nutricionais do bagaço de oliva, agregando valor a este subproduto agroindustrial.

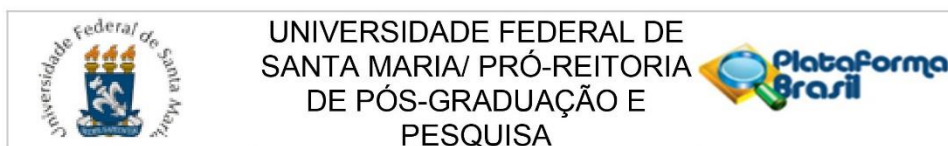
Os critérios de inclusão dos participantes na pesquisa são: 20 voluntários de ambos os sexos, com idade entre 18-55 anos e índice de massa corporal (IMC) inferior a 30,0. Os voluntários saudáveis serão recrutados entre servidores e alunos da UFSM nas dependências do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos. Os voluntários receberão informações a respeito dos objetivos e riscos da pesquisa e poderão aderir livremente à pesquisa por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Além disso, os voluntários que aderirem à pesquisa serão orientados a evitar o consumo de qualquer bebida alcoólica e comidas ricas em compostos fenólicos nas 48 h que antecedem a coleta de fezes. Apenas fezes sólidas serão utilizadas no estudo.

Como critério de exclusão da pesquisa tem-se: os voluntários que fizeram uso de qualquer antibiótico nos 6 meses anteriores a pesquisa, tabagistas, etilistas, portadores de doenças intestinais crônicas ou agudas (diarreia), portadores de doenças infecto contagiosas e diabéticos. Fezes amolecidas ou diarreicas não serão utilizadas no estudo.

O tamanho da amostra (número de doadores) para os ensaios com fezes humanas foi escolhido através de um teste de poder estatístico (poder estatístico 0,80, alfa = 0,05) para um arranjo experimental que avaliará in vitro a fermentação de 3 amostras (fração não micronizada, FMC e FML). Para detectar diferença de 30% no comportamento das amostras será necessário conduzir 5 repetições da fermentação para cada amostra (n=5), considerando um desvio padrão equivalente a 25% das médias de compostos fenólicos (Quatrin, 2019). Considerando que cada fermentação será conduzida com um pool de fezes de 4 doadores, estimamos um número de 20 voluntários doadores de fezes. O número de 4 doadores para compor um pool de fezes para cada ensaio foi escolhido conforme QUATRIN (2019) e tem por finalidade garantir um de fezes mais representativo da população e reduzir a variabilidade dos resultados de fermentação.

Os resultados serão submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para a verificação da normalidade dos dados. Os dados serão submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de teste post-hoc de

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.630.505

Tukey para comparação das médias. Os dados que não obedecerem aos pressupostos da ANOVA serão analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido por teste de comparação múltipla não-paramétrico quando necessário.

Objetivo da Pesquisa:

O Objetivo principal da pesquisa é o de avaliar os efeitos da micronização sobre a biotransformação do bagaço de oliva em modelo de fermentação colônica utilizando fezes humanas in vitro, a fim avaliar o impacto deste processo sobre as características nutricionais do bagaço. Já como objetivos secundários, tem-se: estudar o efeito da micronização sobre o potencial prebiótico do bagaço de oliva avaliado através da biotransformação da fibra alimentar e produção de gases e ácidos graxos de cadeia curta durante a simulação da fermentação colônica; e investigar o efeito da micronização sobre a biotransformação de compostos fenólicos durante a simulação da fermentação colônica.

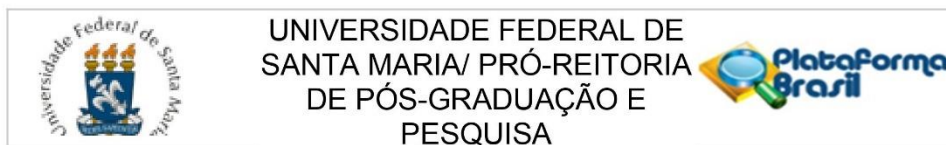
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores, a coleta de fezes é um procedimento que não causa riscos para o voluntário e será feita pelo próprio voluntário. O voluntário pode sentir-se constrangido ao responder ao questionário ou durante a coleta das fezes ou também no transporte das mesmas. Nesse caso, ele poderá abandonar este estudo sem prejuízo algum. Já como benefícios da pesquisa, no caso dos resultados do projeto indicarem a possibilidade de aproveitamento do bagaço de oliva para fins nutricionais, o projeto terá contribuído para desenvolver um processo de aproveitamento deste resíduo agroindustrial, reduzindo seu impacto ambiental.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A olivicultura no Brasil apresentou crescimento significativo nos últimos anos e no Rio Grande do Sul, as condições climáticas favoráveis para desenvolvimento desta cultura proporcionaram aumento dos olivais e do volume de azeite produzido. Com a fabricação do azeite de oliva é gerado elevadas quantidades de resíduo sólido, o bagaço de oliva, que apresenta fragmentos de polpa, casca e caroço. Com alto teor de umidade e elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) o bagaço requer tratamento prévio para descarte no meio ambiente. Entretanto, este resíduo é rico em componentes com propriedades funcionais como polifenóis e fibra alimentar, mas se apresentam de forma pouco acessível para digestão e metabolização devido ao elevado conteúdo

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.630.505

de lignina. Sendo assim, a pesquisa proposta apresenta grande relevância científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos devidamente apresentados.

Recomendações:

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. ACOMPANHE AS ORIENTAÇÕES DISPONÍVEIS, EVITE PENDÊNCIAS E AGILIZE A TRAMITAÇÃO DO SEU PROJETO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

.

Considerações Finais a critério do CEP:

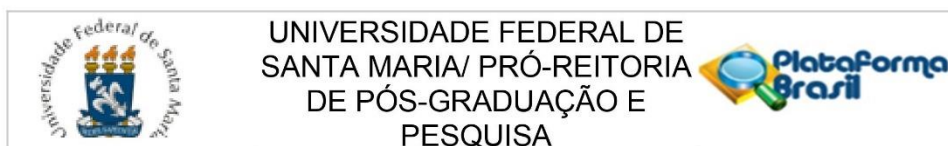
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1430794.pdf	10/09/2019 12:35:18		Aceito
Outros	Registro_do_projeto_SIE.pdf	10/09/2019 12:33:29	Tatiana Emanuelli	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_integra_para_Plataforma_Brasil.pdf	10/09/2019 12:32:26	Tatiana Emanuelli	Aceito
Outros	termosDeConcessao.pdf	10/09/2019 12:30:48	Tatiana Emanuelli	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_institucionalAssinada.pdf	10/09/2019 12:29:00	Tatiana Emanuelli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermodeConfidencialidade.pdf	10/09/2019 12:27:51	Tatiana Emanuelli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_para_plataforma_Brasil.pdf	10/09/2019 12:27:24	Tatiana Emanuelli	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_Plataforma_Brasil_assinada.pdf	10/09/2019 12:26:43	Tatiana Emanuelli	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.630.505

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTA MARIA, 09 de Outubro de 2019

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com