Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Bioacessibilidade dos polifenóis do jatobá-do-cerrado
(*Hymenaea Stigonocarpa* Mart.) e seus efeitos em
genes relacionados à absorção de glicose em células
Caco-2**

Cintia Pereira da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Nutrição em Saúde Pública para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Nutrição em Saúde
Pública

Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

São Paulo

2018

**Bioacessibilidade dos polifenóis do jatobá-do-cerrado
(*Hymenaea Stigonocarpa* Mart.) e seus efeitos em
genes relacionados à absorção de glicose em células
Caco-2**

Cintia Pereira da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Nutrição em Saúde Pública para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Nutrição em Saúde
Pública

Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

Versão corrigida

São Paulo

2018

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

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Pereira da Silva, Cintia

Bioacessibilidade dos polifenóis do jatobá-do-cerrado (Hymenaea Stigonocarpa Mart.) e seus efeitos em genes relacionados à absorção de glicose em células Caco-2 / Cintia Pereira da Silva; orientador José Alfredo Gomes Arêas. -- São Paulo, 2018.
108 p.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2018.

1. diabetes mellitus . 2. jatobá-do-cerrado. 3. compostos fenólicos. 4. transporte de glicose. I. Alfredo Gomes Arêas, José , orient. II. Título.

ATA DE DEFESA

Aluno: 6138 - 7071333 - 2 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Cintia Pereira da Silva no Programa: Nutrição em Saúde Pública, do(a) Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Aos 27 dias do mês de março de 2018, no(a) Sala de Web conferência realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Cintia Pereira da Silva, apresentada para a obtenção do título de Doutora intitulada:

"Bioacessibilidade dos polifenóis do jatobá-do-cerrado (*Hymenaea Stigonocarpa* Mart.) e seus efeitos em genes relacionados à absorção de glicose em células Caco-2"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Síglia da CPG	Resultado
Jose Alfredo Gomes Areas	Presidente	FSP - USP	<u>Aprovada</u>
Marcelo Macedo Rogero	Titular	FSP - USP	<u>Aprovado</u>
Geni Rodrigues Sampaio	Titular	Especialista-FSP	<u>Aprovada</u>
Mariana Simões Larráz Ferreira	Titular	UNIRIO - Externo	<u>Aprovada</u>
P/ Daniela Moura de Oliveira Beltrame	Titular	Externo	<u>Aprovada</u>

Resultado Final: aprovada

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Jonathan Jorge Zeferino de Almeida Jonathan J. Z. de Almeida, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 27 dias do mês de março de 2018.

Marcelo Macedo Rogero
Marcelo Macedo Rogero

Geni Rodrigues Sampaio
Geni Rodrigues Sampaio

Mariana Simões Larráz Ferreira
Mariana Simões Larráz Ferreira

Daniela Moura de Oliveira Beltrame
Daniela Moura de Oliveira Beltrame

Jose Alfredo Gomes Areas
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio e
Francisca, e a meus irmãos, Caroline e Samuel
que são o meu porto seguro.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por permitir que eu não perdesse a fé e pudesse concluir esse processo com saúde.

Agradeço imensamente a minha família, em especial a minha mãe Francisca Alves, por sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis e suportar minha ausência em diversos momentos durante a realização deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro ao projeto.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

Ao professor Dr. José Alfredo Gomes Arêas por sua imensa paciência e confiança durante todos esses anos de convivência na Pós-graduação.

À professora Dra. Elizabeth Pinheiro Gomes Arêas por intermediar o processo de concessão da bolsa de estágio-sanduíche.

À professora Dra. Ilja Voets e à Dra. Neus Villanova por me receberem na Universidade Tecnológica de Eindhoven e me mostrarem como o trabalho interdisciplinar pode ser enriquecedor para o entendimento científico.

Ao professor Dr. Marcelo Rogero por ceder as instalações do Laboratório de Genômica Nutricional e Inflamação do Departamento de Nutrição da FSP-USP para o cultivo das células Caco-2.

À professora Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva por viabilizar as análises de expressão gênica no laboratório LIM-18 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Aos membros da banca, em especial a Dra. Daniela Oliveira Beltrame, Dra. Mariana Larraz Ferreira e Dra. Geni Sampaio pelas correções e sugestões do manuscrito durante a pré-banca.

Às funcionárias do Departamento de Nutrição Dra. Rosana Soares, Dra. Geni Sampaio e Dra. Liânia Luzia pelo essencial suporte tanto profissional quanto pessoal em diversos momentos desta jornada.

Ao Dr. José Eduardo Gonçalves e ao MSc. Rafael Paraíso por me apresentarem a técnica de manejo e cultivo de células Caco-2.

Às pesquisadoras Dra. Sônia Tucunduva, Dra. Elizabeth Torres e Dra. Regilda Moreira-Araújo que desde a graduação despertaram em mim o fascínio pela Nutrição.

À Thaise Mendes agradeço as inúmeras conversas e o incondicional apoio que me mantiveram perseverante nos momentos difíceis.

Ao Danilo Olivier, que sempre esteve disponível para me ouvir e me confortar em todos os momentos dessa jornada.

Aos colegas de laboratório/COS Bianka, Amanda, Marcelo, Gustavo, Lucile, Simone, Camila, Glória, Maiara e Marcela pela amizade e companheirismo em todos os momentos desta jornada.

À comunidade nordestina radicada em São Paulo (Manoela Lopes, George Sales, Antônio Júnior, Andréa Fonseca, Susana Lessa e demais) pelo companheirismo nos momentos de tensão e pelos momentos de descontração indispensáveis.

*“Uma vez que você tenha experimentado voar,
você andará pela terra com seus olhos voltados
para o céu, pois lá você esteve e para lá você
desejará voltar.”
(Leonardo da Vinci)*

RESUMO

SILVA, Cintia Pereira da. **Bioacessibilidade dos polifenóis do jatobá-do-cerrado (*Hymenaea Stigonocarpa* Mart.) e seus efeitos em genes relacionados à absorção de glicose em células caco-2.** 2017. Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Introdução: O diabetes *mellitus* (DM) está associado a complicações que comprometem a qualidade de vida e a sobrevida dos indivíduos. Além disso, acarreta elevados custos para o controle metabólico e o tratamento de suas complicações, sendo assim caracterizado como um problema de saúde pública. A regulação da digestão e da absorção intestinal dos carboidratos, com vista a manter a homeostase da glicose plasmática, constituem importantes estratégias de proteção em condições clínicas como o diabetes tipo 2 (DM2), obesidade e síndrome metabólica. Os compostos fenólicos compreendem um grupo complexo de fitoquímicos bioativos presentes nos vegetais. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os compostos fenólicos inibem a atividade de carbohidrases (α -amilase e α -glicosidase) e o transporte intestinal de glicose mediado pelos transportadores SGLT1 e GLUT2. O cerrado brasileiro compreende uma larga biodiversidade, porém, apesar de muitas espécies terem sido identificadas, o seu potencial nutritivo e funcional ainda é pouco conhecido. Dentre estas espécies nativas é destacado o jatobá-do-cerrado. O jatobá-do-cerrado é uma leguminosa nativa brasileira, cuja a polpa farinácea que envolve suas sementes apresenta quantidades significativas de compostos fenólicos, podendo ter um potencial efeito sobre o metabolismo da glicose. **Objetivos:** Verificar os efeitos dos compostos fenólicos da farinha de jatobá-do-cerrado na digestão de carboidratos e na captação de glicose em células intestinais Caco-2. **Metodologia:** Os compostos fenólicos da farinha de jatobá foram obtidos por extração sequencial com as soluções de etanol (60%) e acetona (70%). Em seguida, o extrato foi digerido utilizando enzimas (α -amilase, pepsina e pancreatina) em pH fisiológico. Os compostos fenólicos presentes no extrato antes e após a digestão foram identificados por cromatografia líquida de ultra performance – espectrômetro de massas (UPLC-MS/MS). Foi avaliada a capacidade de inibição dos extratos de jatobá digeridos em relação à atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase. Células intestinais Caco-2 foram incubadas com diferentes concentrações (0,05 mg/mL - 0,1 mg/mL) de extratos de farinha de jatobá digeridos em diferentes tempos (30 min, 2h e 12 h) para a avaliação da captação de glicose

e da expressão gênica dos transportadores de glicose SGLT1 e GLUT2. **Resultados:** 44 compostos fenólicos foram identificados, dentre eles, a principal classe presente são os flavonoides. Compostos como o ácido cafeico, o kaempferol, quercetina-3- rutinosídeo e a quercetrina estavam presentes no extrato antes da digestão. O conteúdo de compostos fenólicos do extrato foi reduzido após a digestão, entretanto o mesmo ainda apresentou compostos de relevância biológica como o ácido p-cumárico, ácido 3-*o*-feruloilquínico, theaflavina, crisina e grandinina que já apresentaram efeito positivo sobre o metabolismo da glicose *in vitro* em outros trabalhos. Os extratos fenólicos de jatobá após a digestão *in vitro* inibiram significativamente a atividade das enzimas α -amilase (76 e 91%) e α -glicosidase (53 e 77%). Os extratos também demonstraram inibir significativamente tanto a captação de glicose independente de sódio quanto a expressão gênica dos transportadores de glicose SGLT1 e GLUT2 de maneira dose-dependente. **Conclusão:** Este é o primeiro trabalho que identificou os compostos fenólicos presentes na farinha de jatobá. A partir do exposto, podemos concluir que a farinha de jatobá apresenta potencial benefício à saúde devido ao seu conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade destes compostos de regular a digestão e a absorção de carboidratos *in vitro*.

Palavras-chave: diabetes mellitus, jatobá-do-cerrado, compostos fenólicos, transporte de glicose.

SILVA, C. P. **Bioaccessibility of polyphenols from jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) and its effects on genes related to glucose uptake in Caco-2 cells.** 2017. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Introduction: Diabetes mellitus (DM) is associated with complications that decrease the quality of life and survival of individuals. In addition, it entails high costs for metabolic control and treatment of its complications, thus being characterized as a public health problem. The regulation of digestion and intestinal absorption of carbohydrates to maintain plasma glucose homeostasis are important strategies for protection in chronic diseases such as type 2 diabetes (DM2), obesity and metabolic syndrome. Phenolic compounds are a complex group of chemical substances present in plants. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that phenolic compounds are able to inhibit the activity of carbohydrases (α -amylase and α -glycosidase) and the intestinal transport of glucose mediated by SGLT1 and GLUT2 transporters. Brazilian Cerrado present a large biodiversity, but although many species have been identified, its nutritional and functional potential is still little known. Among these native species is the jatobá-do-cerrado. Jatobá-do-cerrado is a brazilian native legume, whose farinaceous pulp that surrounds its seeds presents significant amounts of phenolic compounds and may have a potential effect on glucose metabolism. **Objectives:** To verify the effects of phenolic compounds from jatobá-do-cerrado flour in the digestion of carbohydrates and uptake of glucose in Caco-2 intestinal cells. **Methods:** Phenolic compounds of jatobá flour were obtained by sequential extraction with solutions of ethanol (60%) and acetone (70%). The extract was digested using enzymes (α -amylase, pepsin and pancreatin) at physiological pH. The phenolic compounds present in the extract before and after the digestion were identified by liquid chromatography of ultra-performance - mass spectrometer (UPLC-MS / MS). The ability of inhibition of the extracts of jatobá digested in relation to the activity of α -amylase and α -glycosidase enzymes was evaluated. Caco-2 intestinal cells were incubated with different concentrations of jatobá flour extracts (0.1 mg / mL - 0.05 mg / mL) for different time (30 min, 2 h and 12 h) to the evaluation of facilitated uptake (sodium-free buffer) and gene expression of SGLT1 and GLUT2 glucose transporters. **Results:** 44 phenolic compounds have been identified, among them a major class present are flavonoids. Compounds such as caffeic acid, quercetin-3-rutinoside and quercetrine

were present in the extract before *in vitro* digestion. The content of phenolic compounds of the extract after digestion was reduced. However, the extract presents compounds with biological activity such as p-coumaric acid, 3-o-feruloylquinic acid , theaflavin, chrysin and grandinine, which already presented positive effects on glucose metabolism *in vitro* in other studies. Phenolic extracts of jatobá after *in vitro* digestion inhibited the activity of α -amylase (76 and 91%) and α -glycosidase (53 and 77%). The extracts also shown to inhibit both glucose uptake and gene expression of glucose transporters SGLT1 and GLUT2 in a dose-dependent manner. Conclusion: This is the first work that identified the phenolic compounds present in jatobá flour. Thus, we can conclude that the jatobá flour presents potential health benefit by modulate digestion and the absorption of carbohydrates *in vitro*.

Keywords: diabetes mellitus, jatobá-do-cerrado, phenolic compounds, glucose transport.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Outros tipos específicos de diabetes mellitus (DM).

Tabela 2: Principais fontes alimentares de polifenóis.

Tabela 3: Propriedades das células Caco-2.

Tabela 4: Composição química da farinha de jatobá-do-cerrado em base úmida.

Tabela 5: Perfil de aminoácidos do jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stagnocarpa* Mart.) (g.100 g⁻¹), recomendação de aminoácidos essenciais de acordo com a FAO/WHO (1991) e escore de aminoácidos.

Tabela 6: Identificação de compostos fenólicos presentes nos extratos de jatobá por meio de Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) baseado no tempo de retenção e padrão de fragmentação MS/MS.

Tabela 7: Perfil de compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá após a digestão *in vitro* baseado no tempo de retenção e padrão de fragmentação MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Suposta relação entre a hiperglicemia pós-prandial e os fatores de risco para obesidade, diabetes e doença cardiovascular.

Figura 2: Transporte de glicose e frutose para o meio extracelular.

Figura 3: Mecanismos reguladores da captação de glicose no intestino delgado pelos canais de cátion e transportadores.

Figura 4: Diagrama representativo da absorção de glicose no intestino de indivíduos normoglicêmicos e de indivíduos diabéticos.

Figura 5: Algumas estratégias para modulação do metabolismo dos carboidratos.

Figura 6: Estrutura química dos ácidos fenólicos.

Figura 7: (A) Estrutura básica dos flavonoides e (B) Estrutura básica dos flavonoides com grupo carbonila no C-4.

Figura 8: Principais classes de flavonoides.

Figura 9: Estrutura química do resveratrol.

Figura 10: Estrutura química do fenilpropano e a estrutura básica da lignana.

Figura 11: Visão geral da biodisponibilidade dos polifenóis.

Figura 12: Diagrama do crescimento da monocamada de células Caco-2 em suporte de filtro permeável.

Figura 13: Caminhos de transporte através do epitélio intestinal.

Figura 14: Potenciais sítios de ação dos polifenóis no metabolismo da glicose.

Figura 15: Distribuição do bioma Cerrado no Brasil.

Figura 16: Jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stignocarpa* Mart).

Figura 17: Preparo dos extratos de farinha de jatobá.

Figura 18: Fluxograma dos experimentos realizados com o extrato de jatobá antes e após a digestão.

Figura 19: Percentual relativo dos compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá antes da digestão *in vitro*.

Figura 20: Compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá antes da digestão *in vitro* segundo abundância.

Figura 21: Percentual de viabilidade celular das células Caco-2 na presença de diferentes concentrações de extrato de farinha de jatobá digeridos.

Figura 22: Percentual relativo dos compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá digerido que resistiram a digestão e atravessaram a barreira das células Caco-2, concentração 0,05 mg/mL.

Figura 23: Percentual relativo dos compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá digerido que resistiram a digestão e atravessaram a barreira das células Caco-2, concentração 0,075 mg/mL.

Figura 24: Percentual relativo dos compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá digerido que resistiram a digestão e atravessaram a barreira das células Caco-2, concentração 0,1 mg/mL.

Figura 25: Análise dos componentes principais presentes nos extratos de farinha de jatobá antes e após a digestão *in vitro*, segundo o software EZInfo.

Figura 26: Efeito agudo (30 min) do extrato de jatobá na absorção de glicose em células Caco-2.

Figura 27: Efeito do extrato de jatobá na expressão gênica dos transportadores de glicose SGLT1 e GLUT2 após o período de 2 horas de incubação.

Figura 28: Efeito do extrato de jatobá na expressão gênica dos transportadores de glicose SGLT1 e GLUT2 após o período de 12 horas de incubação.

Figura 29: Inibição da atividade da α -glicosidase por extratos de jatobá após digestão *in vitro*.

Figura 30: Inibição da α -amilase pelos extratos de farinha de jatobá após digestão *in vitro* e pela acarbose.

Figura 31: Resumo do mecanismo proposto dos polifenóis do jatobá na homeostase da glicose.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Diabetes <i>mellitus</i> (DM)	17
1.1.1 Classificação etiológica do DM	17
1.1.2 Epidemiologia do DM	20
1.1.3 Complicações no DM	22
1.2. Digestão e Absorção dos carboidratos	24
1.2.1 Transporte intestinal de glicose em pacientes diabéticos	27
1.2.2 Regulação da digestão e absorção da glicose	29
1.3 Compostos fenólicos	32
1.3.1 Fontes alimentares dos compostos fenólicos	36
1.3.2 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos	38
1.3.3 Ensaios <i>in vitro</i> com culturas celulares Caco-2	41
1.3.4 Compostos fenólicos e o metabolismo da glicose	45
1.4 Jatobá do cerrado	47
2. OBJETIVOS	53
2.1 Geral	53
2.2 Específicos	53
3. MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1 Material	54
3.2 Métodos	54
3.2.1 Preparo dos extratos	54
3.2.2 Digestão <i>in vitro</i> dos extratos	55
3.2.3 Quantificação e identificação e dos compostos fenólicos do extrato de jatobá	58
3.2.4 Inibição enzimática de carboidrases	60
3.2.5 Estudo em células Caco-2	61
3.2.5.1 Transporte transepitelial de polifenóis do jatobá em células Caco-2	62
3.2.5.2 Análise da expressão gênica dos transportadores de glicose SGLT1 e GLUT2 em células Caco-2 por qPCR em tempo real	62
3.2.5.3 Captação de glicose	64
3.3 Análises dos dados	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 Quantificação e identificação dos compostos fenólicos presentes no extrato de jatobá antes da digestão <i>in vitro</i>	65

4.2	Quantificação e identificação dos polifenóis presentes no extrato de jatobá após a digestão <i>in vitro</i>	74
4.3	Permeabilidade de polifenóis do jatobá em células Caco-2	77
4.4	Efeito do extrato de jatobá na absorção de glicose via GLUT2.....	86
4.5	Efeito do extrato de jatobá na expressão gênica dos transportadores de glicose SGLT1 e GLUT2.....	87
4.6	Efeito do extrato de jatobá digerido na inibição das carboidrases.....	90
5.	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS.....	95

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes *mellitus* (DM)

1.1.1 CLASSIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DO DM

O Diabetes *mellitus* (DM) não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, a qual é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas. A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA), e recomendada pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Esta classificação é importante para determinar a terapia a qual o paciente será submetido (SBD, 2016; ADA, 2016).

O DM tipo 1 é caracterizado por destruição das células beta que leva a uma deficiência de insulina, sendo subdividido em tipos 1A e 1B. O DM tipo 1A é resultado da destruição imunomediada de células beta pancreáticas com consequente deficiência de insulina. Sua fisiopatologia envolve fatores genéticos (genes do sistema do antígeno leucocitário humano (HLA)) e ambientais (infecções virais, introdução precoce leite bovino, deficiência de vitamina D, etc.). Ao contrário do DM tipo 1A, o DM tipo 1B não apresenta etiologia conhecida e caracteriza-se pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células beta e não associação a haplótipos do sistema HLA. Os indivíduos com esse tipo de DM podem desenvolver cetoacidose e apresentam graus variáveis de deficiência de insulina (SBD, 2016).

O DM2 caracteriza-se por defeitos na ação e secreção da insulina e na regulação da produção hepática de glicose. Diferentemente do DM1 autoimune, não há indicadores específicos para o DM2. Neste caso, a resistência à insulina e o defeito na função das células beta estão presentes precocemente na fase pré-clínica da doença. Estudos sugerem que o DM2 é causado por uma interação de fatores genéticos e ambientais como dietas ricas em gorduras, sedentarismo e envelhecimento. Em geral, os pacientes não dependem de insulina exógena para sobreviver, porém podem necessitar de tratamento com insulina para obter controle metabólico adequado (SBD, 2016).

Outros tipos específicos de DM já foram identificados. São formas menos comuns de DM cuja apresentação clínica é bastante variada e depende da alteração de base. Estão incluídos nessa categoria defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino e outras condições listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Outros tipos específicos de diabetes mellitus (DM)

Defeitos genéticos na função das células beta	MODY 1 (defeitos no gene <i>HNF4A</i>), MODY 2 (defeitos no gene <i>GCK</i>), MODY 3 (defeitos no gene <i>HNF1A</i>), MODY 4 (defeitos no gene <i>IPF1</i>), MODY 5 (defeitos no gene <i>HNF1B</i>) MODY 6 (defeitos no gene <i>NEUROD1</i>), Diabetes neonatal transitório , Diabetes neonatal permanente , DM mitocondrial e outros . <i>*MODY: maturity-onset diabetes of the young.</i>
Defeitos genéticos na ação da insulina	Resistência à insulina do tipo A, Leprechaunismo, Síndrome de Rabson-Mendenhall, DM lipotrófico e outros.
Doenças do pâncreas exócrino	Pancreatite, Pancreatectomia ou trauma, Neoplasia, Fibrose cística, Pancreatopatia fibrocalculosa e outros.
Endocrinopatias	Acromegalia, Síndrome de Cushing, Endocrinopatias, Glucagonoma, Feocromocitoma, Somatostinoma, Aldosteronoma e outros.
Induzidos por medicamentos ou agentes químicos	Determinadas toxinas, Pentamidina, Ácido nicotínico, Glicocorticoides, Hormônio tireoidiano, Diazóxido, Agonistas beta-adrenérgicos, Tiazídicos, Interferona e outros.
Infecções	Rubéola congênita, Citomegalovírus e outros
Formas incomuns de DM autoimune	Síndrome de Stiff-Man, Anticorpos, antirreceptores de insulina e outros.
Outras síndromes genéticas por vezes associadas ao DM	Síndrome de Down, Síndrome de Klinefelter, Síndrome de Turner, Síndrome de Wolfram, Ataxia de Friedreich, Coreia de Huntington, Síndrome de Laurence-Moon-Biedl, Distrofia miotônica, Síndrome de Prader-Willi e outros.

Fonte: SBD, 2016

O DM gestacional refere-se a qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação. Entretanto, aquelas pacientes de alto risco e que na consulta inicial de pré-natal, no primeiro trimestre de gestação, já preenchem os critérios para diabetes fora da gestação, serão classificadas não como diabetes gestacional, mas como DM2. Similar ao DM2, o DM gestacional associa-se tanto à resistência à insulina quanto à diminuição da função das células beta (SBD, 2016).

Recentemente têm chamado a atenção as classes intermediárias no grau de tolerância à glicose, que se referem a estados intermediários entre a homeostase normal da glicose e o DM. A glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída são categorias de risco aumentado para o desenvolvimento do DM, por isso o termo “pré-diabetes” é utilizado para designar essas condições. A categoria “glicemia de jejum alterada” está relacionada às concentrações de glicemia de jejum inferiores ao critério diagnóstico para DM, contudo mais elevadas que o valor de referência normal. A tolerância à glicose diminuída representa uma anormalidade na regulação da glicose no estado pós-sobrecarga, diagnosticada por meio de teste oral de tolerância à glicose (TOTG), o qual inclui a determinação da glicemia de jejum e de 2 h após a sobrecarga com 75 g de glicose (SBD, 2016).

1.1.2 Epidemiologia do DM

Nos últimos anos, o DM, em paralelo com a epidemia da obesidade, tem se tornado um desafio de saúde pública em muitos países. O DM e suas complicações trazem substancial perda econômica para os pacientes e suas famílias e para os sistemas econômicos e de saúde através da perda de trabalho, de salários e dos custos médicos diretos (IDF, 2015; OMS, 2016).

Globalmente, estima-se que 422 milhões de adultos viviam com DM em 2014, em comparação com 108 milhões em 1980. A prevalência mundial de diabetes em adultos acima de 18 anos praticamente dobrou de 4,7% em 1980 para 8,5% em 2014. Em 2015, o DM causou 1,6 milhão de óbitos e a hiperglicemia causou 2,2 milhões de mortes em 2012 (OMS, 2016). Os paradigmas tradicionais de que o DM2 ocorre apenas em adultos e o DM1 ocorre apenas em crianças não são mais precisos, pois ambas as doenças ocorrem em ambas as coortes (ADA, 2016).

Dados do Ministério da Saúde por meio do Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), que monitora a frequência e distribuição de fatores de risco e de proteção para doenças crônicas em todas as capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal, mostraram que nos últimos 10 anos houve um aumento de 61,8% do número de portadores de DM. Estima-se que em 2017, 10,2% da população brasileira sejam portadores de DM, sendo mais prevalente em mulheres (9,9%) (BRASIL, 2017).

O DM1 autoimune representa 5 a 10% dos casos de DM. Os marcadores de autoimunidade são os autoanticorpos anti-ilhota ou antígenos específicos da ilhota e incluem os anticorpos anti-insulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD 65), antitirosina-fosfatases (IA2 e IA2B) e antitransportador de zinco (Znt). De acordo com conhecimento atual, o DM1 não pode ser prevenido, no entanto, esses anticorpos podem ser verificados meses ou anos antes do diagnóstico clínico, ou seja, na fase pré-clínica da doença, e em até 90% dos indivíduos quando se detecta hiperglicemia (SBD, 2016).

O DM gestacional ocorre em 1 a 14% de todas as gestações, dependendo da população estudada, e relaciona-se com aumento de morbidade e mortalidade perinatais. No Brasil, cerca de 7% das gestações são complicadas pela hiperglicemia gestacional. Na maioria dos casos, há reversão para a tolerância normal após a gravidez, porém há risco de 10 a 63% de desenvolvimento de DM2 dentro de 5 a 16 anos após o parto (SBD, 2016).

O DM2 é a forma mais frequente de DM, verificado em 90 a 95% dos casos. Modificações na dieta e no estilo de vida são considerados importantes aspectos na prevenção do DM2. Ensaios clínicos têm demonstrado que intervenções intensivas no estilo de vida podem reduzir em 58% a incidência de DM2 quando comparado com o grupo controle (Knowler et al., 2002).

Estudos observacionais e de intervenção também já demonstraram que o risco de DM2 está associado com o consumo de determinados grupos de alimentos. Em geral, dietas ricas em grãos integrais, frutas, hortaliças, nozes e leguminosas e pobres em açúcares e grãos refinados previnem a ocorrência do DM2 (Zheng et al., 2017).

Exercitar-se regularmente, alimentar-se de maneira saudável (reduzindo açúcares e gorduras saturadas), evitar o fumo e controlar a pressão arterial são consideradas abordagens que contribuem para a boa saúde de todos, independentemente de ter diabetes (OMS,2016).

1.1.3 Complicações no DM

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) os critérios aceitos para o diagnóstico do DM com a utilização da glicemia são:

- glicemia casual ≥ 200 mg/dL, independentemente do horário das refeições aliada a sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal;
- glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL;
- glicemia de 2 h pós-sobrecarga de 75 g de glicose ≥ 200 mg/dL

Muitas vezes, em estágios iniciais do DM2 o quadro de hiperglicemia não é grave o suficiente para que os pacientes apresentem os sintomas clássicos do DM. Entretanto, mesmo não diagnosticados, estes pacientes estão em maior risco de desenvolver complicações macrovasculares e microvasculares (ADA, 2016).

As complicações do DM são tradicionalmente divididas em complicações macrovasculares (por exemplo, doenças cardiovasculares (DCV)) e microvasculares (complicações que afetam os rins, a retina e o sistema nervoso) (Zheng et al., 2017). Estas complicações são bastante comuns no DM2. Em um estudo observacional que incluiu 28 países na Ásia, África, América do Sul e Europa, metade dos pacientes diagnosticados com DM2 apresentavam complicações microvasculares e cerca de 27% apresentavam complicações macrovasculares (Litwak et al., 2013).

A recomendação atual para o controle do DM diz que a hiperglicemia pós-prandial não deve exceder 140 mg. dL^{-1} , 2 horas após a refeição (ADA, 2016). No entanto, muitas vezes esse controle glicêmico é difícil de ser alcançado, aumentando o risco do desenvolvimento de doenças crônicas nestes pacientes. As DCV são a maior causa de mortalidade em pacientes portadores de DM2. Na figura 1 estão demonstrados os fatores de risco hiperglicemia e hiperinsulinemia associados às doenças crônicas: obesidade, DM2 e DCV.

Figura 1: Suposta relação entre a hiperglicemia pós-prandial e os fatores de risco para obesidade, diabetes e doença cardiovascular.

Fonte: Blaak et al. (2012)

A hiperglicemia está envolvida na patogênese cardiovascular no DM ao aumentar a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS), que inativa o óxido nítrico (ON), levando posteriormente à disfunção endotelial. Em paralelo, o aumento da produção de ROS contribui para a DCV ao desencadear a ativação da proteína quinase C (PKC). Atuando como um grupo de enzimas que podem afetar a função de outras proteínas celulares, a PKC demonstrou ter um efeito sobre o crescimento e apoptose das células vasculares, a permeabilidade, a síntese da matriz extracelular e a produção de citocinas. A ativação da PKC resulta em alteração da homeostase vascular e predisposição a complicações vasculares. A PKC, por sua vez, induz a produção de ROS em células vasculares perpetuando o ciclo vicioso (Aryangat e Gerich, 2010; Huang et al, 2017).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado o efeito benéfico do controle glicêmico na redução de complicações micro e macrovasculares em pacientes portadores de DM como foi visto nos trabalhos clássicos: *Diabetes control and complications trial* (DCCT) e o *United Kingdom prospective study* (UKPDS), que mostraram redução significativa das complicações crônicas com o tratamento intensivo (Aryangat e Gerich, 2010).

Por isso, uma abordagem global consistindo em modificações no estilo de vida, diminuição da hiperglicemia e controle dos fatores de risco cardiovascular associados ao diabetes (hiperlipidemia e hiperinsulinemia) são benéficos para o perfil desses pacientes e devem ser avaliados de forma individualizada (Huang et al., 2017).

1.2. Digestão e Absorção dos carboidratos

Os carboidratos complexos que atingem o intestino delgado devem ser hidrolisados previamente em monossacarídeos, tais como glicose ou galactose, pelas enzimas α -amilase e α -glicosidase. O processo de digestão inicia na boca, por meio da ação da amilase salivar, que quebra a molécula de carboidrato em porções menores. Uma vez que este material digerido chega ao intestino, o processo de digestão continua, devido a ação da α -amilase sintetizada pelo pâncreas e excretada no lúmen intestinal. Esta mistura de oligossacarídeos e monossacarídeos passa pela borda em escova do intestino, onde α -glicosidase finaliza o processo de digestão transformando estes metabólitos em glicose (Tundis et al., 2010).

A glicose derivada da dieta é então transferida do lúmen intestinal para a circulação sanguínea através de proteínas transportadoras. Estas proteínas compreendem basicamente dois tipos: os co-transportadores dependentes de sódio (SGLT – *sodium glucose linked transporter*) e os transportadores facilitadores independentes de sódio (GLUT – *glucose transporter*) (Wood e Trayhurn, 2003; Chen et al., 2016). Ambas as famílias apresentam diversos tipos de isoformas, contudo, aqui destacaremos principalmente o papel do SGLT1 e do GLUT2.

O SGLT1 tem uma expressão tecidual limitada e é encontrado principalmente na membrana apical dos enterócitos (células absorptivas) do intestino delgado e nos túbulos reto proximal renal. Já o GLUT2 é expresso primariamente nas células β do pâncreas, no

fígado e nos rins. Além disso, este transportador está expresso na membrana basolateral do intestino delgado e nos túbulos renal proximal (Wood e Trayhurn, 2003).

O caminho clássico de absorção de glicose é através da borda em escova da membrana intestinal, que é predominantemente mediada pelo transportador dependente de sódio, SGLT1. No entanto, a passagem da glicose do enterócito para o meio extracelular é feita por difusão facilitada através do transportador de glicose GLUT2, de acordo com a figura 2. A frutose é absorvida via transportador GLUT5, que está localizado na membrana apical do enterócito. Este processo de transporte não depende do sódio, ou de energia. A frutose sai da membrana basolateral por difusão facilitada que também envolve o transportador GLUT-2 (Kellett e Brot-Laroche, 2005; Araújo e Martel, 2009).

Figura 2: Transporte de glicose e frutose para o meio extracelular.

Fonte: Araújo e Martel, 2009.

É bem conhecido o fato de que a absorção intestinal de glicose é influenciada pela concentração de cálcio intracelular, porém os mecanismos subjacentes ainda não são totalmente compreendidos. Recentemente, foi proposto um novo modelo de regulação da

absorção intestinal de glicose mediado pelo cálcio intracelular (Figura 3). Quando as concentrações de glicose no lúmen são baixas, a entrada da glicose no intestino é mediada principalmente pelo SGLT1, presente na parte apical. No entanto, quando a concentração de glicose no lúmen é muito alta, o GLUT2 presente no lado basolateral é translocado para a parte apical para auxiliar o SGLT1 no processo de absorção de glicose. Esses processos são regulados pelo conteúdo de cálcio intracelular que também pode modular a expressão genica do GLUT2 (Chen et al., 2016)

Figura 3: Mecanismos reguladores da captação de glicose no intestino delgado pelos canais de cátion e transportadores.

Fonte: Chen et al., 2016

Vários pesquisadores têm especulado quais os mecanismos de regulação dos transportadores intestinais de glicose. Diversos fatores podem alterar a expressão gênica dos transportadores de glicose, como ciclo circadiano, ausência de alimentação e conteúdo alimentar. Alguns estudos têm demonstrado que o consumo de sódio, assim como o consumo de carboidratos, também induz mudanças nos transportadores de glicose tanto nos rins quanto no intestino (Sabino-Silva et al., 2010).

Experimentos *in vitro* têm demonstrado que proteínas quinases (PK) podem regular a atividade de proteínas transportadoras de glicose. Foi demonstrado em intestinos de ratos que a ativação de receptores adrenérgicos β induziram a fosforilação de SGLT1 via PK, aumentando o transporte de glicose (Ishikawa et al., 1997). Acredita-se que as proteínas quinases também possam controlar a distribuição de transportadores SGLT1 entre o compartimento intracelular e a membrana plasmática. Porém, essa translocação parece ser independente dos sítios de fosforilação presentes neste transportador (Hirsch et al., 1996).

Entre os fatores de transcrição reportados por participarem na regulação da expressão do SGLT1 destacam-se o HNF (*Hepatocyte Nuclear Factors*) - 1 α e 1 β . Jejum e realimentação, bem como secreção de insulina induzida pela glicose, regulam a transcrição do HNF-1 principalmente no fígado e no intestino. A maioria dos estudos envolveram genes relacionados ao metabolismo da glicose, incluindo o gene SLC5A1 que codifica a proteína SGLT1. No entanto, o papel das proteínas alimentares e dos lipídios, bem como dos hormônios relacionados a secreção de insulina na atividade transcricional do HNF-1, ainda é desconhecido (Sabino-Silva et al., 2010).

O mecanismo que demonstra o efeito da dieta na expressão gênica do SGLT1 foi descrito recentemente e envolve o teor de glicose presente no lúmen intestinal e o sensor de açúcar localizado na membrana luminal do enterócito. Foi demonstrado que a subunidade do receptor de sabor doce T1R3 e a proteína de sabor doce gustaducina, expressas em células enteroendócrinas, está subjacente a detecção de açúcar celular, desencadeando um sinal ligado ao caminho PKA-AMPC, que eventualmente leva ao aumento da expressão do RNAm e da proteína do SGLT1 (Sabino-Silva et al., 2010; Shirazi-Beechey et al., 2011). A partir desses achados conclui-se que o elevado teor de glicose no lúmen intestinal, aumenta a expressão gênica do transportador de glicose dependente de sódio (SGLT1), aumentando assim a absorção intestinal de glicose.

1.2.1 Transporte intestinal de glicose em pacientes diabéticos

Dyer et al. (2002), por meio de biópsia observaram que em pacientes portadores de DM2 tanto a expressão gênica quanto a atividade destes transportadores (SGLT1 e GLUT2) estavam aumentadas no intestino. Na figura 4 está representada a absorção da glicose no intestino, assim como os transportadores que estão envolvidos. De um lado,

podemos observar o intestino de um indivíduo no estado normal, e do outro podemos observar o intestino de indivíduos diabéticos, cuja a atividade dos transportadores pode estar triplicada (GLUT2) ou quadruplicada (SGLT1) (Williamson, 2013).

Figura 4: Diagrama representativo da absorção de glicose no intestino de indivíduos normoglicêmicos e de indivíduos diabéticos.

Fonte: Williamson, 2013.

Experimentos em animais também demonstraram o aumento da expressão de GLUT2 e SGLT2 nos rins de ratos diabéticos. Esse processo ocorre devido a um mecanismo fisiológico que evita a perda de glicose sanguínea. Entretanto, é comum observar complicações microvasculares como as nefropatias devido ao excesso de glicose nos rins. As alterações na expressão dos transportadores de glicose em diabéticos envolvem mecanismos de regulação a nível transcricional. Porém, observou-se que as alterações induzidas pelo diabetes no fator HNF-1 α na atividade e a expressão do SGLT2 nos rins de ratos são revertidas pela redução da glicemia, independentemente da insulinemia, indicando que a glicose é um importante modulador desta atividade transcricional, como descrito para SGLT1 (Freitas et al., 2008).

O aumento da atividade destes transportadores contribuem para o aumento da glicose circulante, ocasionando complicações macro e microvasculares nestes pacientes (Williamson, 2013; Chen et al., 2016). Portanto, compostos que possam alterar a expressão e a atividade destes transportadores podem ser úteis no controle do DM2.

1.2.2 Regulação da digestão e absorção da glicose

De acordo com o estudo prospectivo de coorte, chamado PURE (*The Prospective Urban Rural Epidemiology*), composto por mais de 135.000 indivíduos de 18 países de diferentes estágios de desenvolvimento, o consumo de carboidratos foi associado ao aumento da mortalidade total (Dehghan et al., 2017). Sendo assim, do ponto de vista terapêutico, se os carboidratos são fatores relevantes em relação ao aumento da mortalidade, então não apenas a redução do seu consumo, mas também a inibição da digestão e absorção de glicose podem apresentar papel metabólico importante e assim melhorar a vida da população (Ravichandran, Grandl e Ristow, 2017).

Algumas estratégias já foram testadas experimentalmente e são frequentemente utilizadas para regular o metabolismo dos carboidratos a fim de reduzir a hiperglicemia (Figura 5).

Figura 5: Algumas estratégias para modulação do metabolismo dos carboidratos.

Adaptado de: Ravichandran, Grandl e Ristow, 2017.

Inibidores de α -glicosidase são uma classe de drogas que reduzem a glicemia e que são utilizadas tanto no tratamento quanto na prevenção do DM2. Estes inibidores agem alterando a absorção intestinal de carboidratos através da inibição da conversão dos carboidratos complexos (polissacarídeos) em carboidratos simples (glicose) reduzindo a biodisponibilidade destes compostos e consequentemente diminuindo os níveis de glicose no sangue (DiNicolantonio et al., 2015). A acarbose é o principal inibidor de α -glicosidase utilizado na prática clínica.

O estudo STOP-NIDDM (*Stop – Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus* - Estudo Internacional de eficácia do inibidor de α -glicosidase para prevenir o DM2 em uma população com tolerância a glicose diminuída) avaliou 714 participantes com tolerância a glicose diminuída que consumiram 100 mg de acarbose e 715 participantes que consumiram o placebo. O risco de progressão para DM acima de 3,3 anos foi reduzido em 25% no grupo acarbose. Além disso, a acarbose aumentou a probabilidade de a tolerância a glicose voltar ao normal (Chiasson et al., 2002). Van de Laar et al. (2006) avaliaram estudos realizados com 2.360 participantes que investigaram os efeitos da acarbose no aumento do risco de diabetes. A revisão concluiu que há evidências científicas de que a acarbose pode reduzir a incidência de DM2 em pacientes com tolerância a glicose diminuída. Além disso, é possível que a acarbose possa prevenir eventos cardiovasculares, no entanto este achado precisa ser melhor investigado.

Apesar da acarbose apresentar efeitos benéficos relacionados à redução da hiperglicemia pós-prandial, este fármaco apresenta efeitos colaterais como hipoglicemia em doses mais elevadas, problemas hepáticos, náuseas, vômitos e diarreia (ADA, 2016).

Metformina é um agente anti-hiperglicêmico bastante utilizado em pacientes portadores de DM2 devido ao seu baixo custo, atuando principalmente na redução da produção hepática de glicose. Em alguns casos, a metformina é utilizada em associação a outros medicamentos como os inibidores do cotransportador de glicose dependente de sódio (SGLT2 – *sodium-glucose linked transporter 2*). O inibidor do SGLT2 apresenta alto custo e atua inibindo a reabsorção de glicose nos rins, causando glicosúria. Ambos os medicamentos são bem conhecidos na prática clínica, atuando no controle da hiperglicemia, entretanto, também apresentam efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais, deficiência de vitamina B12, infecções genitourinárias, poliúria, aumento do LDL-colesterol e creatinina entre outros (ADA, 2016). Portanto, ferramentas

que possam reduzir a hiperglicemia de maneira eficaz sem apresentar efeitos colaterais são desejáveis para o tratamento destes pacientes.

A terapia nutricional é uma importante ferramenta para o controle glicêmico da dieta. Powers et al. (2017) demonstrou que a terapia nutricional individualizada mostrou-se efetiva na redução da hemoglobina glicada em indivíduos pré-diabéticos, indicando que intervenções nutricionais são potencialmente eficazes para evitar a progressão do DM2. Ajala et al. (2013) em revisão sistemática que incluiu 20 estudos randomizados controlados concluíram que as dietas com baixo teor de carboidratos (*low carb*), dietas de baixo índice glicêmico, dieta mediterrânea e dieta rica em proteínas são eficazes na melhoria de vários marcadores de risco cardiovascular em diabéticos e devem ser consideradas na estratégia geral do controle desta patologia.

1.3 Compostos fenólicos

Os benefícios relacionados às dietas baseadas em alimentos vegetais englobam uma variedade de mecanismos propostos. Dentre eles, destacamos a presença dos compostos fenólicos em várias plantas que fazem parte da dieta humana como frutas, cereais, café e leguminosas. Estes compostos são conhecidos por prevenir diversas doenças crônicas como as DCV, DM, osteoporose e câncer (Abbas et al., 2017).

Os compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis, compreendem um grupo complexo de metabólitos secundários presentes nas plantas, que geralmente estão envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por agentes patogênicos. Caracterizam-se pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados ao menos a um grupamento – OH e/ou outros substitutos (Manach et al., 2004). De acordo com a estrutura química, podem ser feitas distinções entre os tipos de compostos fenólicos e estes podem ser classificados em: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas (Velderrain-Rodríguez et al., 2014).

Os ácidos fenólicos distinguem-se em duas classes: derivados do ácido benzóico (ácido gálico) e os derivados do ácido cinâmico (ácido cafeico, ácido ferúlico, p-cumárico e sináptico) (Figura 6).

Figura 6: Estrutura química dos ácidos fenólicos.

Os ácidos hidroxibenzoicos são componentes de complexas estruturas como os taninos hidroxilizáveis (galotaninos e elagitaninos). Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comuns que os hidroxibenzoicos e raramente são encontrados na sua forma livre. Por exemplo, o ácido cafeico e o ácido quínico combinados formam o ácido clorogênico que é encontrado em vários tipos de alimentos (Manach et al, 2004; Gharras, 2009).

O ácido cafeico, tanto de forma livre quanto esterificado, é geralmente o mais abundante ácido fenólico e representa entre 75 e 100% do total de ácido hidroxicinâmico da maioria das frutas, principalmente quando estas estão maduras. O ácido ferúlico é mais abundante em cereais. Este ácido é encontrado principalmente em sua forma *trans*, que é esterificada. Vários dímeros do ácido ferúlico também são encontrados em cereais e formam estruturas entre as cadeias de hemicelulose (Manach et al., 2004; Gharras, 2009).

A estrutura dos flavonoides é baseada no núcleo que consiste de dois anéis fenólicos A e B e um anel C (figura 7), que pode ser um pirano heterocíclico, como no caso dos flavanóis (catequinas) e antocianidinas, ou pirona, como nos flavonóis, flavonas, isoflavonas e flavanonas, que possuem um grupo carbonila na posição C-4 do anel C, compreendendo as principais classes dos flavonoides (Huber e Rodriguez-Amaya, 2008).

Figura 7: (A) Estrutura básica dos flavonoides e (B) Estrutura básica dos flavonoides com grupo carbonila no C-4.

Fonte: Huber e Rodriguez-Amaya, 2008

Os flavonoides (exceto as catequinas) são encontrados em plantas principalmente na forma glicosilada, ou seja, ligados a moléculas de açúcares, sendo normalmente *o*-glicosídeos, com a molécula de açúcar ligada ao grupo hidroxila na posição C3 ou C7. As moléculas desprovidas de açúcares são denominadas agliconas (Huber e Rodriguez-Amaya, 2008).

Mais de 4000 flavonoides já foram identificados a partir de fontes de plantas. Na figura 8, podemos observar as principais classes de flavonoides.

Os flavonóis são os mais encontrados nas plantas. Catequinas e epicatequinas são os embaixadores da classe dos flavanóis e não são encontrados na forma glicosilada. As flavonas são os flavonoides menos frequentes e apresentam uma dupla ligação entre o carbono C3 e C2 e geralmente estão presentes na casca e na pele das frutas. As flavononas contém uma molécula de oxigênio no C4 e são caracterizadas pela saturação do anel de 3 carbonos. As isoflavonas possuem arranjo semelhante a estrógenos, com a presença de uma hidroxila (OH) entre C4 e C7 semelhante ao estradiol (Abbas et al., 2017).

Figura 8: Principais classes de flavonoides.

Fonte: Huber e Rodriguez-Amaya, 2008

Antocianinas são corantes hidrofílicos (cor azul ou vermelha de alguns vegetais) encontrados principalmente na forma de antocianidinas, com uma molécula de açúcar no C3 e na posição 5 e 7 do anel A (Abbas, et al., 2017).

Os taninos possuem peso molecular relativamente alto, constituem uma classe de polifenóis e, segundo a estrutura química, são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensáveis. Os taninos condensáveis, denominados proantocianidinas, são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), produtos do metabolismo do fenilpropanol. As proantocianidinas, assim denominadas provavelmente pelo fato de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina, apresentam uma rica diversidade estrutural,

resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e estereoquímica de seus compostos (Ângelo e Jorge, 2007).

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálico e elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxilas do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Os taninos elágicos são muito mais frequentes que os gálicos, e é provável que o sistema bifenílico do ácido hexaidroxidifenílico seja resultante da ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos (Ângelo e Jorge, 2007).

Estilbenos são encontrados apenas em pequenas quantidades na dieta humana. O mais conhecido é o resveratrol, que já foi amplamente estudado devido ao seu efeito anticarcinogênico (Figura 9).

Figura 9: Estrutura química do resveratrol.

Lignanas são formadas por duas unidades de fenilpropano em que dois C6-C3 são unidos pelo seu carbono central (C8), como mostrado na figura 10. São metabolizados pela microflora intestinal em enterodiol e enterolactona (Gharras, 2009).

Figura 10: Estrutura química do fenilpropano e a estrutura básica da lignana.

1.3.1 Fontes alimentares dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão distribuídos em várias plantas que compõem a dieta humana, sendo especialmente abundantes não apenas em frutas, vegetais, grãos integrais e leguminosas, mas também em cacau, chá, café e vinho tinto, conforme tabela 2 (Williamson, 2017).

Tabela 2: Principais fontes alimentares de polifenóis

Classe dos polifenóis	Principais fontes
Lignanas	Azeite de oliva extra virgem, farinha de centeio, linhaça
Estilbenos	Uvas, vinho tinto, nozes
Ácidos fenólicos	Café, romã, batatas
Flavonoides	Chá verde, feijão, soja, cebola, cacau, laranja, cereja

Miranda et al. (2016) estimaram o consumo de compostos fenólicos e os principais contribuintes dietéticos da população geral de São Paulo, utilizando o recordatório alimentar de 24 horas e o banco de dados Phenol-Explorer. Um total de 1.103 indivíduos participaram do estudo, deste 46% homens e 54% mulheres. Os participantes foram divididos segundo a idade em dois grupos: adultos e idosos. O valor médio de ingestão de polifenóis para a população total foi 377,5 mg de polifenóis/dia. O consumo foi significativamente maior em idosos (414,9 mg/dia) em relação aos adultos (370,2 mg/dia).

Ao comparar as classes de polifenóis consumidas, foi observado que os principais alimentos consumidos apresentavam compostos das classes dos ácidos fenólicos (75,5% do total de polifenóis) e flavonoides (14,5% do total de polifenóis). As principais fontes dietéticas para polifenóis totais foram o café (70,5%) e frutas, especialmente frutas cítricas (4,6%) como tangerina e frutas tropicais (3,4%) como o mamão, enquanto que os vegetais representaram uma porcentagem menor da quantidade total de polifenóis na dieta (1,3%) (Miranda et al., 2016).

Apesar de o Brasil apresentar alimentos potenciais fontes de compostos fenólicos, o consumo ainda é inferior em comparação a outros países como a Espanha e a Polônia cuja a ingestão total média de polifenóis é de 820 ± 323 mg/dia e $1756,5 \pm 695,8$ mg/dia (Tresserra-Rimbau et al., 2013; Grosso et al., 2014).

Existem limitações que podem subestimar o consumo de compostos fenólicos pela população brasileira. Embora o Phenol-Explorer seja o banco de dados mais completo atualmente disponível, muitos alimentos regionais consumidos no Brasil ainda não foram caracterizados quanto a composição dos diversos compostos presentes. Portanto, estudos

relacionados ao conteúdo e a biodisponibilidade de compostos fenólicos presentes em plantas nativas do Brasil podem promover o reconhecimento dos alimentos nativos ricos em compostos fenólicos e, assim, aumentar a estimativa de consumo destes compostos pela população.

1.3.2 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos

Do ponto de vista nutricional, o termo biodisponibilidade é definido pela fração disponível do componente ingerido para utilização em funções fisiológicas normais. Além disso, a biodisponibilidade inclui dois termos adicionais: bioacessibilidade e bioatividade (Fernández-García et al., 2009).

Bioacessibilidade tem recebido duas definições alternativas. A primeira é a fração do composto que foi liberada da matriz alimentar no trato gastrointestinal e, portanto, tornou-se disponível para a absorção intestinal. A segunda definição é mais rigorosa e menos amplamente utilizada, que determina bioacessibilidade como a fração do composto que foi liberada da matriz alimentar no trato gastrointestinal e, portanto, torna-se disponível para a absorção intestinal incluindo absorção no epitélio intestinal e por último no pré-sistema intestinal e metabolismo hepático (Cardoso et al., 2015).

O termo bioatividade inclui eventos relacionados a como o composto atingiu a circulação e foi transportado até o tecido alvo, sua interação com biomoléculas nesses tecidos e toda a cascata de efeitos fisiológicos que é gerado (Fernández-García et al., 2009; Cardoso et al., 2015).

Os compostos fenólicos da dieta podem diferir significativamente quanto a biodisponibilidade e às propriedades biológicas, por isso estes aspectos devem ser considerados ao estudar os efeitos destes compostos sobre a saúde. Por isso, nem sempre os mais abundantes em nossa dieta correspondem necessariamente àqueles com melhor biodisponibilidade. A estrutura química dos compostos fenólicos (tamanho molecular, sua estrutura básica, grau de polimerização ou glicosilação, solubilidade e conjugação com outros) determina a sua taxa e extensão de absorção intestinal e a natureza dos metabólitos que irão circular no plasma (Scalbert e Williamson, 2000; Bohn, 2014).

Em geral, a biodisponibilidade dos polifenóis da dieta é relativamente baixa, principalmente devido à sua baixa absorção no trato gastrointestinal após o consumo e

extensa biotransformação no intestino, bem como ampla distribuição sistêmica e depuração rápida do corpo (Velderrain-Rodriguez et al., 2014).

Os ácidos fenólicos e alguns flavonoides (flavonas, catequinas e quercetina) apresentam menor peso molecular, ou e por isso são mais facilmente absorvidos pelo trato gastrointestinal (Martin e Apple, 2010). Por outro lado, polifenóis com maior tamanho molecular, tais como as proantocianidinas, são absorvidos em menor quantidade, pois necessitam de uma hidrólise prévia (Hackman et al., 2008).

Ao iniciar a digestão na boca, os polifenóis sofrem pouca influência das enzimas salivares devido ao pouco tempo de contato. Porém, durante esta primeira fase há redução no tamanho das partículas do alimento, que aumentam a superfície de contato para as outras enzimas das fases gástricas e intestinal (Bohn, 2014).

A maioria dos polifenóis são separados da matriz alimentar durante a fase gástrica da digestão, pois o pH ácido induz a hidrólise e/ou transformação, como a hidrólise de oligômeros de proantocianidinas ou quebra de moléculas de açúcar ligadas a estrutura dos polifenóis (Velderrain-Rodriguez et al., 2014).

As mudanças que ocorrem nestes compostos durante a fase gástrica dependem da interação deles com a matriz dos alimentos e sua estrutura química. Como por exemplo, a digestão *in vitro* diminuiu as concentrações de ácido caféico no suco de abacaxi e de ácido ferúlico em suco de frutas vermelhas, provavelmente devido à baixa estabilidade destes compostos em ambiente básico. No entanto, os flavonoides incluindo os flavonóis glicosídeos e antocianidinas não foram afetados pela digestão gástrica *in vitro* (Friedman e Jürgens, 2000; Bermúdez-Soto et al., 2007; Frontela et al., 2011).

O intestino é o maior sítio de absorção e transformação dos polifenóis. Nesta fase, o pH do meio volta a ser alcalino ($\text{pH} = 7,0$) e por essa razão alguns polifenóis que não sofreram transformação substancial ou perda no estômago podem ser instáveis no meio alcalino do intestino, dependendo novamente da estrutura química (Velderrain-Rodriguez et al., 2014).

Supõe-se que a maioria dos polifenóis, exceto os livres de açúcar (agliconas), precisam ser clivados de sua fração de açúcar por enzimas da borda em escova do intestino, isto é, lactase-florizina-hidrolase (LPH), antes da absorção celular. É estimado que aproximadamente 80% de todos os flavonoides são ingeridos na forma de

glicosídeos, portanto precisam sofrer hidrólise prévia (Day et al., 2000; Pérez-Jimenez et al., 2011). Por essa razão, na maioria das vezes o composto original encontrado na matriz alimentar não é encontrado na sua forma íntegra inicial após a digestão *in vitro*.

Os compostos que sofreram hidrólise pela enzima LPH são absorvidos via difusão passiva. Entretanto, outros compostos que ainda mantêm uma molécula de açúcar em sua estrutura podem ser transportados via transporte ativo através do transportador dependente de sódio (SGLT1). Esta teoria ainda é controversa, além disso, acredita-se a absorção de polifenóis via SGLT1 é baixa. Outro mecanismo de captação de polifenóis inclui o transporte facilitado através dos transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCTs), de acordo com a figura 10 (Bohn, 2014; Velderrain-Rodriguez et al., 2014).

Os compostos fenólicos são metabolizados pelo organismo como não-nutrientes ou xenobióticos. Apesar do fígado ser o responsável pelo processo de detoxificação, no caso dos polifenóis, algumas enzimas de fase II atuam no intestino para que estes compostos sejam rapidamente direcionados para o fígado e rins. Este processo de rápida excreção causa a baixa biodisponibilidade dos polifenóis após o consumo (Velderrain-Rodriguez et al., 2014).

Figura 11: Visão geral da biodisponibilidade dos polifenóis.

Adaptado de Bohn, 2014

1.3.3 Ensaios *in vitro* com culturas celulares Caco-2

No intestino, há uma única camada de células epiteliais que cobre a parede intestinal interna e forma uma barreira limitante da taxa de absorção de drogas dissolvidas. Como consequência, a reconstituição *in vitro* de uma monocamada de células epiteliais humanas diferenciadas permite a predição da absorção oral de drogas em humanos (Artursson et al., 2001).

A linhagem celular epitelial humana Caco-2 tem sido amplamente utilizada como modelo de barreira epitelial intestinal. A linhagem de células Caco-2 é originalmente derivada de um adenocarcinoma de cólon retal e foi obtida por Jorgen Fogh no *Sloan-Kettering Cancer Research Institute* (Fogh et al., 1977). Uma das propriedades mais

vantajosas desta linhagem celular é a sua capacidade de se diferenciar espontaneamente em uma monocamada de células com muitas propriedades típicas de enterócitos absorptivos com camada de borda em escova, como encontrado no intestino delgado (Verhoeckx et al., 2015).

Tabela 3: Propriedades das células Caco-2

Crescimento	Cresce como uma monocamada aderente de células epiteliais
Diferenciação	14 a 21 dias após a confluência sob condições de cultura padrão.
Morfologia celular	Células polarizadas com <i>tight junctions</i> e borda de pincel no lado apical
Parâmetros elétricos	Alta resistência elétrica
Transporte ativo	Aminoácidos, açúcares, vitaminas, hormônios
Transportadores de Membrana de iônico	Na^+/K^+ ATPase, H^+/K^+ ATPase, Na^+/H^+ troca, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporte, canais apical Cl^-
Transportadores de Membrana não iônico	Glicoproteína de permeabilidade (P-gp, Proteína de resistência a múltiplas drogas, proteína de resistência associada ao câncer de pulmão.
Receptores	Vitamina B12, Vitamina D ₃ , EGFR (<i>epidermal growth factor receptor</i>), transportadores de glicose (GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT5, SGLT1).
Produção de citocinas	IL-6, il-8, TNF α , TGF- β 1, TSLP (<i>thymic stromal lymphopoietin</i>), IL-15

Fonte: Verhoeckx et al., 2015

As células Caco-2 são cultivadas em filtros permeáveis (Figura 12) e tornaram-se, portanto, padrão-ouro para a predição *in vitro* da permeabilidade e absorção de fármacos (Hubatsch et al., 2007). O suporte de filtro pode ser feito de policarbonato, poliéster ou polietileno tereftalato. Particularmente, esta última é reivindicada como inerte com baixas propriedades não específicas de ligação às proteínas. Os suportes de filtro podem ser transparentes ou translúcidos (Verhoeckx et al., 2015).

Figura 12: Diagrama do crescimento da monocamada de células Caco-2 em suporte de filtro permeável.

Fonte: Hubatsch et al., 2007

Devido à heterogeneidade celular da linhagem celular o processo de diferenciação ocorre em um mosaico, com algumas áreas expressando células totalmente diferenciadas com microvilosidades depois de 12 a 14 dias, enquanto outras áreas contêm células menos diferenciadas. Em geral, a monocamada de células Caco-2 será homogeneamente diferenciada após 18 a 21 dias. As monocamadas são validadas antes dos estudos de transporte. O protocolo baseado na medida da resistência elétrica transepitelial são cruciais para confirmar a qualidade e a integridade da monocamada de células epiteliais polarizadas (Verhoeckx et al., 2015).

Também é importante que a contaminação da cultura de células seja evitada. Durante um período de cultura de 3 semanas e com antibióticos no meio, uma infecção subclínica não identificável mesmo por microscopia de luz, pode enviesar ou obscurecer os resultados completamente (Verhoeckx et al., 2015).

O transporte de drogas através do epitélio intestinal pode ocorrer por 4 rotas diferentes: o transcelular passivo, paracelular, mediada pelo transportador e por transcitose (Figura 13). A maioria das drogas que são rapidamente absorvidas após a administração oral são transportadas via transporte transcelular passivo. Drogas hidrofílicas e peptídeos geralmente utilizam a via de transporte paracelular. Porém, acredita-se que substâncias muito hidrofílicas possam utilizar também a via transcelular.

Embora, estudos recentes têm demonstrado que as *tight junctions* podem limitar o transporte paracelular destas drogas. Algumas drogas hidrofílicas cujas estruturas químicas imitam as de nutrientes podem ser transportados através do epitélio intestinal por transporte ativo, mediado por transportador. Muitas vezes, o transporte é mediado em parte pelo transportador e em parte por rotas passivas (Artursson et al., 2012).

A baixa capacidade da via da transcitose da mucosa para a lado seroso do epitélio intestinal torna esta rota menos atraente para o transporte de drogas. Por conseguinte, tem sido principalmente considerado como uma via para drogas altamente potentes (como antígenos peptídicos) que são excluídos das outras vias de transporte devido ao seu tamanho molecular (Artursson et al., 2012).

Figura 13: Caminhos de transporte através do epitélio intestinal.

Fonte: Artursson et al., 2012

Os ensaios de cultura de células têm oferecido novas e excitantes possibilidades em muitas áreas da ciência. Se usada adequadamente, a linhagem de células Caco-2 pode fornecer informações sobre a base bioquímica das propriedades de barreira da mucosa intestinal, e podem desvendar informações valiosas sobre a absorção de drogas e componentes da dieta relevantes para a indústria farmacêutica e de alimentos (Verhoeckx et al., 2015).

1.3.4 Compostos fenólicos e o metabolismo da glicose

A bioatividade portanto, é o efeito específico sobre a exposição a uma substância. Isto inclui a absorção e a consequente resposta fisiológica (como antioxidante, anti-inflamatório, anti-hiperglicêmica). Pode ser avaliado *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* (Fernandez-Garcia et al., 2009).

A dieta mediterrânea e seus principais componentes, azeite, nozes e vinho tinto têm sido inversamente associadas à resistência à insulina e ao DM2. Até certo ponto, essas associações podem ser atribuídas à grande quantidade de compostos fenólicos, típicos dos alimentos que compõem esse padrão dietético tradicional. Poucos estudos sugeriram que a predisposição genética poderia modular a relação entre os polifenóis e risco de DM2. Portanto, acredita-se que a ingestão de polifenóis pode ser benéfica tanto para reduzir a resistência à insulina quanto para a redução do risco de desenvolvimento do DM2 (Guasch-Ferré et al., 2017).

Os mecanismos de ação dos polifenóis em relação ao metabolismo da glicose são variados e incluem desde a inibição da digestão e da absorção intestinal de glicose até a melhora da resistência à insulina, conforme a figura 14 (Williamson, 2013; Leo et al., 2015).

Figura 14: Potenciais sítios de ação dos polifenóis no metabolismo da glicose.

Adaptado de Hannieva et al., 2010.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado o efeito protetor do consumo do café contra o risco de desenvolvimento de DM2. Dados de revisões sistemáticas e meta-análises mostram que há redução de 8% no risco de desenvolvimento de DM2 para cada xícara de café consumida por dia independente se o café é descafeinado ou não, atribuindo assim o efeito à presença dos ácidos clorogênicos, e não da cafeína (Ding et al., 2014).

O possível mecanismo anti-hiperglicêmico do ácido clorogênico seria inibir a digestão e a absorção de glicose intestinal, além de melhorar também a captação de glicose no tecido muscular (Hannieva et al., 2010).

Estudos observacionais apoiam fortemente o papel das dietas à base de vegetais e de seus componentes na redução do risco de diabetes tipo 2. Frutas e vegetais específicos, incluindo vegetais de raízes, vegetais de folhas verdes, uvas e maçãs têm sido relacionados a menores taxas de diabetes. As leguminosas também têm demonstrado papel benéfico na melhora da resistência à insulina e na proteção contra a síndrome metabólica (Li et al., 2014; Bahadoram e Mirmiran, 2015; McMacken e Shah, 2017).

O consumo mais elevado de frutas, hortaliças e leguminosas (3 a 4 porções diárias/ 375-500 g) foi associado a um menor risco de mortalidade total e não cardiovascular (Miller et al., 2017). O consumo frequente de leguminosas (4 ou mais vezes comparado com menos que uma por semana) tem sido associado a uma redução de 11% do risco de desenvolvimento de DCV. Ingestão de frutas ou vegetais de folhas verdes também está associada a um risco significativamente reduzido (13%) de DM2 (Bahadoran e Mirmiran, 2015; Li et al., 2014). Portanto, os alimentos vegetais em geral, assim como as leguminosas podem ser uma excelente opção para o tratamento complementar do DM2.

As leguminosas são fontes de compostos fenólicos, principalmente taninos, ácidos fenólicos e flavonoides. De acordo com a literatura, lentilhas (*Lens culinaris*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) apresentam alta capacidade antioxidante e esta atividade está relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos destas matrizes. Dentre os ácidos fenólicos, o ácido ferúlico é o mais abundante nos feijões e em níveis intermediários o ácido p-cumárico e o ácido sináptico. A cor da semente dos feijões é baseada na presença de compostos fenólicos como antocianinas, flavonóis e taninos condensados (Campos-Vega et al., 2010; Ganesan e Xu, 2017).

Experimentos *in vitro* demonstraram que o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) apresenta atividade anti-hiperglicêmica, pois pode inibir α -amilase, α -glicosidase e dipeptidil peptidase – IV (DPP IV) devido ao seu conteúdo de compostos fenólicos como glicosídeos de delfinidina, petunidina e malvidina, antocianinas, catequinas, miricetina, 3 – O – arabinosídeo, epicatequina, ácido vanílico, ácido siringico e ácido O-cumárico (Ganesan e Xu, 2017).

As lentilhas possuem maior conteúdo de fenólicos totais em comparação com leguminosas comuns como ervilha verde, grão-de-bico, feijão caupi e amendoim. Experimentos *in vivo* e *in vitro* mostram o potencial efeito anti-diabético das lentilhas como: inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase, redução do índice glicêmico da dieta prevenindo complicações nos pacientes diabéticos (Ganesan e Xu, 2017).

A capacidade das isoflavonas da soja na inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase também já foi demonstrada. Além disso, o extrato da soja também reduziu a glicose sanguínea de ratos diabéticos, confirmando o potencial anti-hiperglicêmico desta leguminosa (Singhal et al., 2014). Além de reduzir a digestão dos carboidratos, as isoflavonas da soja podem estar envolvidas na redução da glicose-6-fosfatase e da PEPCK no fígado, reduzindo assim a liberação de glicose pelo fígado. Outros pesquisadores também sugeriram que as isoflavonas podem melhorar a secreção de insulina (Hannieva et al., 2010).

1.4 Jatobá do cerrado

O Cerrado é uma região de savana tropical da América do Sul, incluindo grande parte do Brasil Central, parte do nordeste do Paraguai e leste da Bolívia, sendo o segundo bioma brasileiro em extensão (Figura 15). O Cerrado ocupa aproximadamente 24% do território brasileiro, em uma área total estimada de 2.036.448 km². Sua área nuclear abrange o Distrito Federal e dez estados: Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão, Bahia, Piauí, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, somando aproximadamente 1.388 municípios (Brasil, 2014).

A diversidade de ambientes e a heterogeneidade nos atributos ambientais do Cerrado promovem maior riqueza e diversidade biológica. Por esta razão, ele é reconhecido como um importante *hotspot* de biodiversidade (Brasil, 2014).

Apesar disso, este bioma vem experimentando taxas de desmatamento no nível da Amazônia, embora tenha apenas a metade de sua área. A última estimativa do PMDBBS (Programa de Monitoramento do Desmatamento dos Biomas Brasileiros por Satélites) para o desmatamento do Cerrado em 2010 foi de 6.469 km², enquanto na Amazônia Legal o desmatamento no mesmo ano foi de 7.000 km² (Brasil, 2014).

Figura 15: Distribuição do bioma Cerrado no Brasil.

Fonte: Brasil, 2014

Um dos maiores desafios da atualidade é frear o desmatamento de biomas importantes como o Cerrado. Por meio da demonstração da importância que a biodiversidade desempenha tanto no funcionamento dos ecossistemas quanto na alimentação humana será possível o estímulo da perpetuação dessas plantas por meio do manejo sustentável contribuindo para a conservação do bioma. Uma das formas de demonstrar a importância destas plantas é por meio da demonstração do seu valor nutritivo.

Embora muitas espécies nativas do Cerrado tenham sido identificadas, o seu potencial nutritivo ainda é pouco conhecido (Marin et al., 2009). Dentre estas espécies

nativas é destacado o jatobá-do-cerrado, também conhecido como jataí ou jutaí (*Hymenaea stagnocarpa* Mart), pertencente à família Leguminosae e subfamília Caesalpinoideae (Lorenzi et al., 2008).

O jatobá-do-cerrado é uma leguminosa arbórea que apresenta um fruto com comprimento entre 6 e 18 cm e diâmetro de 3 a 6 cm (Lorenzi et al., 2008). Ao contrário das demais leguminosas, a parte comestível do jatobá é a polpa farinácea, de cor creme, que envolve as sementes (Figura 16).

Figura 16: Jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stagnocarpa* Mart).

Sua árvore é uma espécie tropical que mede 4 a 6 m de altura, sendo encontrada mais em terreno seco, muitas vezes de pouca fertilidade. Pode ser encontrado nos estados da Bahia, Pernambuco, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo, Tocantins e Distrito Federal (Vieira et al., 2010; Re flora, 2018).

As leguminosas são fontes de carboidratos complexos, proteínas, fibra alimentar, vitaminas e minerais de grande importância para a alimentação humana (Tharanathan e Mahadevamma, 2003; Trinidad et al., 2010; Bojňanská et al., 2012). A polpa farinácea de jatobá (farinha de jatobá) utilizada para alimentação, ao invés das sementes como é mais comum para as demais leguminosas, apresenta compostos de alto valor biológico (Tabela 4).

A composição química da polpa farinácea do jatobá (farinha de jatobá) destaca-se devido ao seu alto conteúdo de fibra alimentar tanto solúvel quanto insolúvel. Além disso, apresenta alguns minerais como cálcio, magnésio e ainda outros compostos bioativos como os carotenoides e compostos fenólicos (Silva et al., 2001; Marin et al., 2009; Cardoso et al., 2013; Silva et al., 2014; Arakaki et al., 2016).

Tabela 4: Composição química da farinha de jatobá-do-cerrado em base úmida.

Componentes	Farinha de jatobá-do-cerrado
Umidade (%)	13,0 ± 0,0
Cinzas	3,0 ± 0,0
Lipídios	1,3 ± 0,1
Proteínas	7,0 ± 0,2
Fibra Insolúvel	41,6 ± 1,7
Fibra Solúvel	11,5 ± 1,3
Carboidratos disponíveis*	35,6 ± 0,0
Amido total	9,6 ± 0,7
Valor energético (kcal/ 100g)	182

*O teor de carboidratos disponíveis foi determinado pelo cálculo da diferença percentual dos outros constituintes de acordo com a fórmula: [100 g - (g de proteína + g lipídios + g de cinzas + g de fibra alimentar)].

Fonte: Silva et al., 2014

Devido a parte comestível do jatobá ser a farinha e não as sementes como as outras leguminosas, essa matéria-prima (farinha de jatobá) apresenta baixo conteúdo de lipídios e de proteínas (Tabela 4). Além disso, o perfil de aminoácidos também demonstra que a proteína da farinha de jatobá apresenta baixo valor biológico devido à limitação em quatro aminoácidos essenciais (Tabela 5).

Tabela 5: Perfil de aminoácidos do jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stagnocarpa* Mart.) (g.100 g⁻¹), recomendação de aminoácidos essenciais de acordo com a FAO/WHO (1991) e escore de aminoácidos.

Aminoácido	Jatobá-do-cerrado (g.100 ⁻¹ de proteína)	Recomendado FAO/WHO (1991)*	Escore de aminoácidos**
Arginina	6,1	-	-
Cisteína+metionina	1,6	2,5	64,8 ^a
Fenilalanina+tirosina	5,6	6,3	88,8 ^b
Histidina	2,3	1,9	124,2
Isoleucina	2,3	2,8	84,2 ^b
Leucina	4,1	6,6	62,4 ^a
Lisina	5,0	5,8	86,2 ^b
Treonina	1,9	3,4	56,1 ^a
Triptofano	0,59	1,1	53,6 ^a
Valina	4,2	3,5	122
Glicina	3,6	-	-

*Padrão de aminoácidos requerido para crianças de 2 a 5 anos; **escore de aminoácidos = (aminoácido teste x 100) /aminoácido de referência. a – limitante primário; b – limitante secundário

Fonte: Silva et al.,2014

A maioria das espécies do gênero *Hymenaea* são grandes árvores de folhas perenes, e diferentes partes dessa espécie foram usadas por povos indígenas para tratar de várias doenças, incluindo diarreia, disenteria, cólica intestinal, fraqueza pulmonar, asma, anemia, dor de garganta, problemas renais e distúrbios virais (Boniface et al., 2017). Na literatura ainda há poucas pesquisas sobre a atividade biológica do jatobá-do-cerrado, no entanto, recentemente tem sido destacado o papel antioxidante dos compostos fenólicos presentes na polpa farinácea desta matriz.

Orsi et al. (2014) investigou a atividade anti-inflamatória da casca do caule (100, 200 e 400 mg / kg) e da farinha de jatobá (10% e 5% em dieta) em modelo de inflamação intestinal em ratos. A espécie *H. stigonocarpa* apresentou efeitos anti-inflamatórios e pode ser uma fonte potencial para o desenvolvimento de novos fármacos contra a

inflamação intestinal. Orsi et al. (2012) também demonstrou o efeito anti-úlceras tanto do extrato da casca do caule quanto devido a inclusão da farinha de jatobá na dieta de ratos. Ambos os estudos atribuíram o efeito benéfico desta espécie a presença dos compostos fenólicos.

Dados sobre o conteúdo de compostos fenólicos da farinha de jatobá são escassos na literatura. Silva et al. (2014) determinaram o teor de fenólicos totais em diferentes extratos e observaram valores 536,15 mg EAG/100g. Orsi et al., (2012) avaliaram qualitativamente os compostos fenólicos presentes no jatobá e identificaram a presença de flavonoides e taninos condensados.

Recentemente foi investigado o papel da farinha de jatobá na resposta glicêmica de pães. Silva (2013) adicionou farinha de jatobá em pães e obteve produtos de moderado e baixo índice glicêmico, demonstrando o possível efeito do jatobá sobre o metabolismo da glicose. A princípio, o papel benéfico desta matéria-prima (redução do índice glicêmico dos pães) foi atribuído ao conteúdo de fibra alimentar, porém, não sabemos se os compostos fenólicos presentes também contribuíram para tal efeito. Por isso, iniciamos os experimentos para identificar o perfil de compostos fenólicos presentes na farinha de jatobá e se esses compostos bioativos poderiam apresentar algum efeito sobre a digestão e/ou absorção de glicose *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Verificar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos presentes na farinha de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) e seus efeitos na absorção da glicose em culturas de células Caco-2.

2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar e quantificar relativamente os compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) antes e após a digestão *in vitro*.
- Verificar quais compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) após a digestão atravessaram a barreira epitelial das células Caco-2.
- Investigar os efeitos dos extratos de farinha de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) após a digestão sobre a expressão de genes que codificam os transportadores SGLT1 e GLUT 2 em células intestinais Caco-2.
- Determinar a capacidade dos extratos de farinha de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) após a digestão em inibir a atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

A farinha de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) utilizada foi produzida pelo Centro de Produção, Pesquisa e Capacitação do Cerrado – CEPPEC localizado no município de Nioaque/MS (21° 8' 6" S, 55° 49' 48" W).

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de alto grau analítico de pureza. Os padrões de polifenóis e as enzimas α -amilase, α -glicosidase, pepsina, pancreatina e sal biliar foram obtidos da Sigma–Aldrich (Buchs, Switzerland). O meio de cultura Advanced Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), o soro fetal bovino (FBS), a mistura de antibióticos (penicilina-estreptomicina), L-glutamina e a tripsina-edta 0,05% foram adquiridas na Invitrogen Life Sciences (Lubio Science, Bern, Switzerland). As placas transwell e as placas para cultura celular foram adquiridas na Corning Incorporated (NY, USA).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 PREPARO DOS EXTRATOS

O preparo dos extratos de farinha de jatobá foi feito de acordo com a figura 17. Foram pesados 3 g de farinha de jatobá em duplicata e homogeneizados inicialmente com 30 mL de solução de acetona 70% em ultra turrax (14.000 rpm) por 3 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados (18.000g por 15 min) para a coleta do sobrenadante. O procedimento foi repetido por três vezes utilizando 10 mL da solução de acetona 70%, conforme figura 17.

Uma segunda extração utilizando a solução de etanol 60% foi realizada no mesmo precipitado do procedimento anterior. Uma porção de 15 mL de solução de etanol foi adicionada ao precipitado, seguido da homogeneização em turrax e centrifugação (18.000 g por 15 min) para coleta do sobrenadante. Este procedimento foi repetido uma vez.

Figura 17: Preparo dos extratos de farinha de jatobá.

Após a extração, os sobrenadantes foram combinados e o solvente foi evaporado em rotaevaporador a 37°C. Após a evaporação do solvente, o extrato foi ressuspenso em 50 mL de água e armazenado a – 20°C até as análises subsequentes.

3.2.2 DIGESTÃO *in vitro* DOS EXTRATOS

Os extratos foram submetidos a digestão *in vitro*, em condições similares ao organismo humano de acordo com o protocolo estabelecido por Minekus et al. (2014). Previamente, 5 mL do extrato (0,06 g/mL) foi homogeneizado em vortex e ajustado o pH para 7,0. Em seguida foi adicionada a enzima α -amilase (450 U/g de farinha de jatobá). A mistura foi armazenada em temperatura ambiente por 10 min. Antes de iniciar a fase gástrica da digestão o pH da amostra foi ajustado para 2,0 com solução de HCl 1M. A solução de pepsina (3750 U/10 mg de proteína de farinha de jatobá) foi adicionada e a mistura foi purgada com nitrogênio. A amostra então foi incubada a 37 °C por 2 horas em incubadora com agitação contínua. Antes de iniciar a fase intestinal da digestão, as amostras foram resfriadas e o pH foi ajustado para 7,0 com a solução de NaOH 1M. Extrato biliar (45 mg/100 mg de farinha de jatobá) e pancreatina (8 mg/ 100 mg de

farinha de jatobá) foram adicionados. A mistura foi purgada com nitrogênio e em seguida incubada a 37 °C por 2 horas em incubadora com agitação contínua. Ao final da digestão a amostra foi congelada, liofilizada e armazenada a -20 °C até o momento das análises subsequentes.

Para melhor compreensão dos experimentos posteriores segue abaixo o fluxograma das análises realizadas com as respectivas amostras (Figura 18).

Figura 18: Fluxograma dos experimentos realizados com o extrato de jatobá antes e após a digestão.

3.2.3 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO E DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO DE JATOBÁ

O conteúdo de polifenóis totais dos extratos antes e após a digestão foi quantificado de acordo com metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965).

Primeiramente, 120 μ L dos extratos foram pipetados em microplaca de 96 poços, (Greiner Bio-One GmbH). Em seguida, 50 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu foi adicionado. A placa permaneceu em temperatura ambiente (24 °C). Após 3 min, 30 μ L de solução aquosa de NaHCO_3 (200 g/L) foi adicionada e a placa foi incubada a 37 °C por 1 h. A absorbância foi lida a 735 nm (model SpectraMax M5, Molecular Devices Inc). O ácido gálico foi utilizado como padrão (2 – 5 μ g/mL) e os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de farinha de jatobá (mg EAG/g).

A determinação do perfil de compostos fenólicos foi realizada por espectrometria de massas. Inicialmente os extratos liofilizados foram ressuspensos em 500 μ L de fase móvel inicial e filtrados a 0,22 μ m, sendo injetados 3 μ L de amostra no sistema UPLC Acquity (Waters Co., EUA) acoplado ao Xevo G2-S Q-ToF (Waters Co., Inglaterra) equipado com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisadores de massas tipo quadrupolo e tempo de voo (QToF). Para a separação cromatográfica foi utilizada vazão de 0,6 mL/min e fase móvel água ultra-pura contendo 0,3% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio (fase móvel A) e acetonitrila grau LC-MS contendo 0,3% de ácido fórmico (fase móvel B), de acordo com a seguinte programação: 0 min – 97% A; 6,78 min – 50% A; 7,36 min – 15% A; 8,51 min – 15% A; 9,09 min – 97% A, utilizando uma coluna de UPLC HSS T3 C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,8 μ m diâmetro de partícula) (Waters), mantida a 30 °C.

Um mix de 33 padrões analíticos (Sigma Aldrich) sendo eles: ácido vanílico, ácido p-cumárico, catequina, ácido cafeico, ácido elágico, ácido trans-ferúlico, kaempferol, miricetina, pirogalol, flavonona, quercetina, ácido gálico, epicatequina, ácido 4-hidroxibenzil álcool, ácido 4-hidroxibenzaldeído, ácido p-anísico, ácido 4-Hidroxibenzoico, vanilina, ácido 4OH fenilacético, ácido sinapínico, ácido benzoico, quercetina 3-O-glicosídeo, ácido 3,4 diOH fenilacético, epigallocatequina, epigatequina galato, ácido clorogênico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido sirínico, ácido 4-

metoxicinâmico, ácido 2-hidroxicinâmico, ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico, ácido trans-cinâmico, ácido 3-metoxicinâmico, ácido L-(-)-3-fenilacético foi preparado, injetado em triplicata previamente à injeção das amostras, com os mesmos parâmetros descritos para verificar a reprodutibilidade do instrumento e para ser utilizado na confirmação dos compostos encontrados nas amostras.

Os dados foram adquiridos em modo MSI, entre m/z 50 e m/z 1000, no modo negativo. Foram aplicadas as seguintes condições de ionização: voltagem do cone 30 V, voltagem do capilar 3,0 kV; gás de dessolvatação (N_2) 600 L/h a 450 °C; gás do cone 50 L/h e temperatura da fonte a 120 °C. Espectros de MS/MS foram obtidos automaticamente com rampa de energia de colisão de 30 a 55 V, usando argônio como gás de colisão. Todas as aquisições foram realizadas utilizando leucina-encefalina (Leu-Enk, m/z 554,2615, $[M - H]^-$) para a calibração do lock mass.

O software utilizado para aquisição foi o MassLynx 4.1 SCN 9.16 (Waters) e os dados foram analisados pelo software Progenesis QI for metabolomics (Waters, Non-Linear Dynamics) nas seguintes condições: todas as corridas; limites automáticos; dados centroides; resolução de 30.000, ionização no modo negativo; adultos presentes no espectro das corridas.

A identificação dos compostos foi realizada pela comparação com padrões baseada na distribuição de isótopos de massa neutra, no tempo de retenção e com a utilização de fragmentos MS/MS aplicando MetaScope, uma ferramenta de busca totalmente integrada, que permite o carregamento de banco de dados customizados. Foi utilizado o banco de dados de compostos fenólicos “Polyphenols_PubChemID_v.2013.24.11.01” e “KEGG”. As identificações *non-targeted* seguiram os seguintes parâmetros, em ordem decrescente de importância: comparação entre a massa exata experimental e teórica; similaridade isotópica (>80%); limite de erro de massa dos precursores e fragmentos (10 ppm); escore > 30, maior escore de fragmentação, todos parâmetros gerados pelo software utilizado. Além destes parâmetros outros fatores como a comparação com os padrões de compostos injetados, a característica da amostra, tempo de retenção, dados da literatura e característica química da molécula foram utilizados como critérios para determinar as possíveis identificações dos compostos desconhecidos.

Após o processamento de dados no *Progenesis QI for metabolomics*, os mesmos foram exportados para o software EZInfo (Waters, EUA) para análise dos componentes principais (PCA) de cada extrato.

Para verificar a formação de diferentes compostos que não pertenciam ao extrato de farinha de jatobá, foi adicionado em um dos poços de células Caco-2 o tampão de permeação Hanks. Os compostos identificados no controle (tampão de permeação) foram excluídos por serem falso positivos.

3.2.4 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DE CARBOIDRASES

Dois ensaios baseados em métodos colorimétricos-enzimáticos foram utilizados para avaliar a capacidade dos extratos de jatobá após a digestão de inibirem a atividade das enzimas α -glicosidase e α -amilase.

Inibição da α -glicosidase

O teste de inibição da enzima α -glicosidase baseia-se no princípio da interação entre a enzima e o reagente de cor (p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo), a qual resultará num cromóforo medido espectrofotometricamente, de acordo com Yao, Sang, Zhou e Ren (2010). Diferentes concentrações de extrato de jatobá após a digestão *in vitro* (3 e 6 mg/mL) foram testadas. Em uma placa de 96 poços, uma mistura de reagentes contendo 50 μ L de extrato e 100 μ L de α -glicosidase (2 U/mL) dissolvida em 100 mM de tampão fosfato (pH 6.9) foi incubada a 37 °C por 10 min. Em seguida, 50 μ L do reagente p-nitrophenyl- α -D-glicopiranosídeo (5 mM dissolvido em 100 mM de tampão fosfato, pH 6.9) foi adicionado a mistura como substrato da reação e incubado a 37 °C por 5 min. A absorbância foi lida a 405 nm em leitor de microplacas (Multiplate Reader (Multiska thermo scientific, version 1.00.40)).

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da atividade da enzima α -glicosidase e calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{inibição} = [(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle}] \times 100$$

Inibição da α -amilase

A inibição da α -amilase baseia-se no princípio da degradação de um substrato de amido e a posterior reação com o reagente de cor (iodo), a qual revelará a atividade da α -amilase. Este ensaio foi realizado de acordo com Telagari e Hullatti (2015) com algumas modificações. Diferentes concentrações de extrato de jatobá após a digestão *in vitro* (9 e 15 mg/mL) foram testadas. Em microtubos, 20 μ L tampão fosfato (100 mM pH = 6,9), 10 μ L de α -amilase (2 U/mL) e 50 μ L de amostra foram incubadas a 37 °C por 20 min. Em seguida, 20 μ L da solução de amido 1 % (diluída em tampão fosfato 100 mM, pH 6,9) foi adicionado como substrato da reação e incubado a 37 °C por 30 min. Para parar a reação, 100 μ L de reagente DNS foi adicionado, seguido de fervura por 10 min. A absorbância da mistura foi medida a 540 nm utilizando leitor de placas Multiplate Reader (Multiska thermo scientific, version 1.00.40). Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da atividade da enzima α -amilase e calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Inibição (\%)} = [(\text{Abs amostra} - \text{Abs controle})/\text{Abs controle}] \times 100.$$

3.2.5 ESTUDO EM CÉLULAS CACO-2

As células Caco-2 foram cultivadas em meio DMEM com baixa concentração de glicose suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 1 % de solução de aminoácidos não essenciais, glutamina 2 mM e antimicrobianos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 μ g/mL). As células foram mantidas em incubadora sob temperatura de 37 °C, atmosfera constituída de 5 % de CO₂ e 90% de umidade relativa durante todo o experimento.

Teste de citotoxicidade

Antes de iniciar os experimentos, o ensaio de citotoxicidade foi realizado para garantir que as amostras não afetariam a viabilidade celular. As células Caco-2 foram semeadas em placas de cultura de células de 12 poços na densidade de 5×10^4 células/cm² e cultivadas por 21 dias (37°C, 5% de CO₂). As células foram expostas a quantidades crescentes de extrato de jatobá (0,075 - 0,5 mg/mL). Após 12h de incubação, o conteúdo das placas foi transferido para uma microplaca de 96 poços e a viabilidade celular foi determinada pelo kit Cytotox 96® Non-Radioactive. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.5.1 TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE POLIFENÓIS DO JATOBÁ EM CÉLULAS CACO-2

Para o experimento de permeabilidade, as células foram semeadas em placas transwell de doze poços com suporte de policarbonato, 12 mm, 1,12cm² na densidade de 6 x10⁴ células/cm². As células foram mantidas em incubadora (37°C, 5% de CO₂) até a formação da monocamada (21 dias após semeadura).

O experimento de transporte de compostos fenólicos foi realizado durante 2h de acordo com Kosinska-Cagnazzo et al. (2015). As concentrações dos extratos utilizados neste experimento, basearam-se no ensaio de citotoxicidade, que garantiu que estas concentrações eram viáveis para conservação da integridade celular. O extrato de jatobá digerido liofilizado foi ressuspensionado em tampão Hanks para ser adicionados nas células Caco-2. Assim, 500 µL de diferentes concentrações de extrato de jatobá digeridos (0,1 mg/mL, 0,075 mg/mL e 0,05 mg/mL) diluídos em tampão Hanks foram adicionados na parte apical da placa. Na parte basolateral foi adicionado 1,5 mL de tampão Hanks sem amostra. Após 120 min, o conteúdo da parte basolateral foi coletado para posterior identificação dos polifenóis que atravessaram a camada celular.

A integridade da monocamada celular foi monitorada por meio da mensuração da resistência elétrica transeptelial (TER) em equipamento Millicell®. Somente foram consideradas aptas para o experimento os insertos que apresentaram valor de TER acima de 300 Ω.

3.2.5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS TRANSPORTADORES DE GLICOSE SGLT1 E GLUT2 EM CÉLULAS CACO-2 POR qPCR EM TEMPO REAL

Alíquotas das células Caco-2 incubadas com diferentes concentrações de extrato de jatobá nos tempos 2h e 12h foram obtidas para extração do RNA total, utilizando o conjunto de reagentes RNeasy mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) seguindo as indicações do fabricante.

O rendimento do RNA total foi avaliado por espectrofotometria no ultravioleta (UV) utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop® (NanoDrop Technologies INC.,

Wilmington, DE, EUA) e o grau de pureza do RNA determinado pela relação A260 nm/A280 nm. A integridade do RNA foi avaliada utilizando-se o equipamento bioanalyzer® 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O cDNA foi gerado a partir de 1 µg de RNA, utilizando-se 200 ng de iniciadores aleatórios (*randomprimers*) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), DTT 10 mmol/L (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), dNTPs 500 µmol/L (GE Healthcare, AmershamBiosciences do Brasil, São Paulo, SP), 200 U de transcriptase reversa (RT) (SuperScript™ II RT RNase H-) e tampão de RT [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15mM] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). O ensaio de transcrição reversa foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, EUA) com as seguintes etapas: 25 °C por 10 min, 42 °C por 50 min e 70 °C por 15 min. O cDNA obtido foi armazenado a – 20 °C até a realização do PCR.

A expressão do RNAm dos genes dos transportadores de glicose SGLT1 e GLUT2 foi realizada por reação de transcrição reversa seguida de amplificação por PCR em tempo real, por procedimento previamente descrito por GENVIGIR et al. (2011) e normalizados com o gene UBC (Ubiquitina C).

A medida quantitativa da expressão do RNAm dos genes estudados foi realizada por PCR em tempo real utilizando o sistema de amplificação TaqMan® *RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando-se o equipamento ABIPrism 7500 FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa. Com a finalidade de escolher o gene endógeno mais adequado para o modelo, vários genes foram testados e analisados no programa GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Os iniciadores e as sondas marcadas com fluoróforo foram fornecidos em solução 20 vezes concentrada pelo serviço “*Assay by design*” e/ou “*Assay on demand*” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os ensaios HS01573790 (SGLT1) e HS01096908 (GLUT2) foram utilizados nesse estudo.

As análises de quantificação relativa da expressão de RNAm dos genes estudados foram realizadas utilizando o método do ΔC_t , com base na fórmula $2^{-\Delta C_t}$. Previamente, foram calculadas as eficiências de todos os ensaios, sendo considerados adequados valores entre 90 e 110% (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Com a finalidade de monitorar a precisão dos resultados das reações de amplificação realizadas por RT-PCR, as amostras foram analisadas em sextuplicata. Foram feitos controles dos reagentes em cada conjunto de reações para avaliar possíveis contaminações.

3.2.5.3 CAPTAÇÃO DE GLICOSE

Neste estudo, foi avaliado o efeito dos extratos de jatobá na inibição do transporte de glicose não dependente de sódio (GLUT2) de acordo com Manzano e Williamson (2010).

Os extratos de jatobá digeridos e liofilizados em diferentes concentrações (0,1 mg/mL, 0,075 mg/mL e 0,05 mg/mL) foram ressuspensos em tampão HEPES (20 mM de sais de HEPES; 4,7 mM de KCl; 1,2mM de MgSO₄; 1,8 mM de CaCl₂) com pH ajustado para 7,4. 500 µL de tampão HEPES com e sem extrato de jatobá contendo [3H]-D-glucose foi adicionado na parte apical para iniciar a captação. 1,5 mL de tampão HEPES sem glicose e sem extrato foi colocado na parte basolateral. Após 30 min, o conteúdo basolateral das células foi coletado para posterior quantificação da glicose. Os experimentos foram realizados utilizando tampões livres de sódio. A quantificação da glicose foi feita utilizando o kit Glicose Liquiform – Labtest.

3.3 ANÁLISES DOS DADOS

Após a coleta, os dados foram tabulados e tratados estatisticamente. Os resultados estão expressos na forma de média e desvio-padrão das repetições. Para comparação das médias de 2 amostras foi empregado o teste-t. Para comparação das médias de 3 ou mais amostras foi empregado o teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. As médias foram consideradas diferentes ao nível de 5 % de significância. Os gráficos gerados foram elaborados no Microsoft Office-Excel 2016 e o pacote estatístico utilizado foi o SPSS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NO EXTRATO DE JATOBÁ ANTES DA DIGESTÃO *IN VITRO*

Neste estudo, os compostos fenólicos foram extraídos por meio de extração sequencial utilizando etanol e acetona. O conteúdo de compostos fenólicos totais obtidos da farinha de jatobá foi de $1753 \pm 0,85$ mg de EAG/100g. Silva et al. (2014) e Arakaki et al. (2016) compararam a eficiência de diferentes solventes (água, etanol, metanol e acetona) na extração de compostos fenólicos da farinha de jatobá e observaram que o extrato de acetona foi mais eficiente na extração dos compostos (536,15 mg EAG/ 100g; 786,18 mg EAG/ 100g).

Neste estudo, verificamos que o uso combinado de etanol e acetona foi mais eficiente na extração de compostos fenólicos desta matriz alimentar, visto que o conteúdo de compostos fenólicos totais obtidos foi superior aos relatados na literatura, que utilizaram estes solventes de modo separado para extração dos compostos. Segundo Azmir et al. (2013) a eficiência do método convencional de extração depende principalmente da escolha dos solventes e esta deve estar de acordo com a polaridade do composto de interesse.

O conteúdo de compostos fenólicos da farinha de jatobá é superior à de outros alimentos como: morango (268 mg/100g), chocolate ao leite (854 mg/100g), maçã (205 mg/100g), café filtrado (267 mg/100g), chá verde (62 mg/100g), chá mate (155 mg/200 mL), chá de camomila (11 mg/200 mL) (Pérez-Jimenez et al., 2010; Baeza et al., 2017). Portanto, o seu consumo deve ser incentivado, visto que, é potencial fonte de polifenóis, sendo assim, pode contribuir para o aumento do consumo destes compostos pela população brasileira.

Esta é a primeira vez que a farinha de jatobá é caracterizada quando ao seu perfil de compostos fenólicos (Tabela 6). Apesar de a parte comestível do jatobá não seja a semente, ao comparar o perfil de compostos de fenólicos da farinha de jatobá com o perfil das sementes de outras leguminosas podemos observar semelhanças como a presença de compostos da classe dos ácidos fenólicos como o ácido gálico, caféico e o p-cumárico, e

flavonoides como kaempferol e quercetina-3-rutinosídeo, que também são comuns em sementes de leguminosas como ervilhas e feijões (Amarowicz e Pegg, 2008).

Tabela 6: Identificação de compostos fenólicos presentes nos extratos de jatobá por meio de Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) baseado no tempo de retenção e padrão de fragmentação MS/MS.

Composto	Massa do precursor	Fragmentos (m/z)	Erro de massa
Ácido salicílico	C ₇ H ₆ O ₃	nd	-4,91
Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	121.0289 (100); 135.0445 (22.46)	-3,95
Ácido 4-hidroxifenilglicólico	C ₈ H ₈ O ₄	nd	-4,43
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	nd	-3,55
Ácido gentísico I	C ₇ H ₆ O ₄	nd	-4,67
Ácido gentísico II	C ₇ H ₆ O ₄	nd	-4,13
Ácido p-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	145.0288 (100)	-4,36
Ácido 3-O-Feruloilquínico	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	59.0129 (16.28); 71.0131 (66.56); 73.0287 (3.62); 83.0133 (4.36); 85.0289 (26.98); 87.0445 (0.41); 89.0239 (51.89); 101.0240 (100); 113.0241 (68.43); 119.0345 (18.32); 127.0396 (1.12); 131.0347 (8.14); 143.0346 (11.31); 148.0375 (0.37); 161.0450 (14.58); 191.0557 (29.75)	4,07
Fraxidina	C ₁₀ H ₈ O ₅	nd	-4,05

Continua

Tabela 6: Identificação de compostos fenólicos presentes nos extratos de jatobá por meio de Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) baseado no tempo de retenção e padrão de fragmentação MS/MS.

(Continuação)

Composto	Massa do precursor	Fragmentos (m/z)	Erro de massa
Álcool sinapílico	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	nd	-3,71
Leptodactillo	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	nd	-3,32
4-Metoxibenzaldeído	C ₈ H ₈ O ₂	121.0289 (100)	-4,89
Difilina	C ₂₁ H ₁₆ O ₇	59.0129 (16.28); 71.0131 (66.56); 83.0133 (4.36); 85.0289 (26.98); 87.0445 (0.41); 95.0133 (9.22)	1,60
Simplexósido I	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₁	nd	-9,73
Simplexósido II	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₁	97.0289 (56.31); 129.0190 (53.14)	-6,45
Simplexósido III	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₂	59.0127 (0.87); 83.0132 (3); 87.0445 (100); 95.0132 (1); 99.0081 (1); 129.0551 (7)	-5,50
Arbutina I	C ₁₂ H ₁₆ O ₇	nd	-2,75
Arbutina II	C ₁₂ H ₁₆ O ₇	nd	-2,59

Continua

Tabela 6: Identificação de compostos fenólicos presentes nos extratos de jatobá por meio de Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) baseado no tempo de retenção e padrão de fragmentação MS/MS.

(Continuação)

Composto	Massa do precursor	Fragmentos (m/z)	Erro de massa
Astilbina	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	83.0132 (9.92); 107.0135 (16.27); 151.0030 (100); 152.0100 (25.48)	-2,95
Taxifolin 3 – raminosídeo	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	107.0132 (10.22); 123.0445 (5.26); 125.0237 (25.61); 151.0030 (44.25); 152.0099 (15.72); 285.0398 (13.22)	-1,98
Silimarina	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	121.0289 (100); 135.0445 (22.46)	-6,25
Leucocianidina	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	nd	5,43
Quercetrina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	271.0242 (81.38); 300.0267 (100)	-1,69
Miricitrina	C ₉ H ₁₅ NO ₃	nd	-3,12
Artemisinina	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	nd	-2,71
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	133.0289 (45.9)	-2,87
Quercetina 3-rutinosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	103.0396 (17.33); 301.0344 (100)	-1,62
Elemicina	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	nd	-3,12

Continua

Tabela 6: Identificação de compostos fenólicos presentes nos extratos de jatobá por meio de Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) baseado no tempo de retenção e padrão de fragmentação MS/MS.

			Continuação
Composto	Massa do precursor	Fragmentos (m/z)	Erro de massa
Hesperetina 7-O-glicosideo I	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₁	93.0340 (35.38); 119.0496 (13.7); 134.0604 (44.33); 173.0449 (24.17); 179.0555 (89.44)	-6,97
Hesperetina 7-O-glicosideo II	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₂	71.0131 (17.25); 73.0287 (14.11); 81.0338 (1.34); 83.0132 (6.65); 85.0288 (39.23); 97.0289 (3.5); 99.0446 (15.72); 101.0238 (25.73); 103.0395 (38.32); 109.0288 (4.38); 113.0239 (26.72); 115.0758 (15); 119.0343 (5.77); 141.0188 (2); 143.0344 (5.94); 145.0500 (3.37); 161.0448 (6.77)	-5,95
Prunina	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	73.0287 (46.62); 115.0396 (14.31); 147.0444 (61.09); 164.0709 (100)	-6,59
Silandrina I	C ₂₅ H ₂₂ O ₉	93.0340 (35.38); 119.0496 (13.7); 125.0238 (52.44); 341.1083 (100)	1,13
Siladrina II	C ₂₅ H ₂₂ O ₉	71.0131 (17.25); 73.0287 (14.11); 81.0338 (1.34); 83.0132 (6.65); 85.0288 (39.23); 97.0289 (3.50); 99.0446 (15.72); 109.0288 (4.38); 323.0975 (3.62); 341.1082 (7)	1,20

Continua

Tabela 6: Identificação de compostos fenólicos presentes nos extratos de jatobá por meio de Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) baseado no tempo de retenção e padrão de fragmentação MS/MS.

Composto	Massa do precursor	Fragmentos (m/z)	Erro de massa
Neoesperidina	$C_{28}H_{34}O_{15}$	75.0080 (19.97); 117.0189 (2.14); 135.0295 (53.38); 247.0274 (7.22)	8,87
Narirutina	$C_{27}H_{32}O_{14}$	116.0498 (82.08)	0,64
Dalpanina	$C_{26}H_{30}O_{12}$	59.0129 (16); 71.0131 (67); 73.0287 (4); 83.0133 (4); 85.0289 (27); 87.0445 (0.41); 89.0239 (52); 101.0240 (100); 113.0241 (68); 119.0345 (18); 127.0396 (1); 131.0347 10579.5330 (8); 134.0717 (0.40); 143.0346 (11.31); 161.0450 (15)	9,66
7-Metiljuglona	$C_{11}H_8O_3$	115.0203 (100)	8,20
Ácido pirogálico I	$C_6H_6O_3$	nd	97,94
Ácido pirogálico II	$C_6H_6O_3$	95.0134 (31.37); 125.0238 (100)	94,03
Ácido pirogálico III	$C_6H_6O_3$	nd	95,7

A maioria dos compostos identificados no extrato de farinha jatobá não digerido (Figura 19) apresentam relevância biológica ao modular o metabolismo dos carboidratos, dos lipídios, atenuando a hiperglicemia, a dislipidemia e a resistência à insulina além de aliviar o estresse oxidativo, os caminhos de sinalização celular sensíveis ao estresse metabólico e os processos inflamatórios (Lin et al., 2016).

Figura 19: Percentual relativo dos compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá antes da digestão *in vitro*.

Ao verificar a proporção de compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá antes da digestão observamos que a maior parte dos compostos são da classe dos flavonóides, seguido das lignanas, ácidos fenólicos e taninos (Figura 20).

Figura 20: Compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá antes da digestão *in vitro* segundo abundância.

4.2 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS PRESENTES NO EXTRATO DE JATOBÁ APÓS A DIGESTÃO *IN VITRO*

Os resultados demonstraram que o conteúdo de compostos fenólicos totais diminuiu após a digestão. Os valores variaram de $1753 \pm 0,85$ mg de EAG/100g de farinha antes da digestão para $1021 \pm 0,12$ mg de EAG/100g após a digestão enzimática. Outros pesquisadores já relataram evento semelhante ao que ocorreu com o extrato de farinha de jatobá. Tavares et al. (2012) e Bouayed et al. (2012) observaram tanto a mudança no perfil quanto a redução no conteúdo de polifenóis de amoras silvestres e maçãs após a digestão *in vitro*.

Na tabela 7, estão apresentados os compostos fenólicos bioacessíveis, ou seja, que resistiram a digestão *in vitro*. Nota-se que a maioria dos compostos identificados no extrato de jatobá antes da digestão, não foram observados no extrato após a digestão *in*

vitro corroborando com os resultados obtidos a partir do conteúdo de fenólicos totais. A provável razão para a redução do conteúdo de polifenóis após a digestão *in vitro* é que durante a passagem dos compostos do estômago para o intestino (mudança da fase gástrica para a intestinal) há uma mudança de pH de ácido para alcalino. Dependendo da estrutura química do composto, estes podem torna-se instáveis em meio alcalino (Velderrain-Rodriguez et al., 2014).

Tabela 7: Perfil de compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá após a digestão *in vitro* baseado no tempo de retenção e padrão de fragmentação MS/MS.

Composto	Extrato não digerido	Extrato digerido
Ácido salicílico	X	X
Ácido cafeico	X	-
Ácido 4-hidroxifenilglicólico	X	-
Ácido gálico	X	-
Ácido gentísico	X	-
Ácido p-cumárico	X	X
Ácido 3-O-Feruloilquinico	X	X
Fraxidina	X	-
Álcool sinapílico	X	-
Leptodactillo	X	-
4-Metoxibenzaldeído	X	-
Difilina	X	X
Simplexósido I	X	-
Simplexósido II	X	-
Simplexósido III	X	-
Arbutina I	X	-
Arbutina II	X	-
Astilbina	X	-
Taxifolin 3 – raminosídeo	X	-
Silimarina	X	-
Leucocianidina	X	-
Quercetrina	X	-
Miricitrina	X	-
Artemisinina	X	-
Kaempferol	X	-
Quercetina 3-rutinosídeo	X	-
Elemicina	X	X
Hesperetina 7-O-glicosídeo I	X	-
Hesperetina 7-O-glicosídeo II	X	-
Prunina	X	-
Silandrina I	X	-
Siladrina II	X	-
Neoesperidina	X	-
Narirutina	X	-
Dalpanina	X	-
7-Metiljuglona	X	X
Ácido pirogálico I	X	-
Ácido pirogálico II	X	-
Ácido pirogálico III	X	-

Os compostos que foram identificados após a digestão *in vitro* pertencem a diferentes classes de compostos fenólicos: ácidos fenólicos (ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico), ácido p-cumárico, ácido 3-*o*-feruloilquínico), lignanas (difilina) e flavonoides (elimicina) e 7 – Metiljuglona (Naftoquinonas) indicando a boa diversidade de compostos que esta matriz apresenta e o seu potencial para enriquecer a alimentação da população brasileira.

A presença desses compostos fenólicos (ácido salicílico, ácido p-cumárico, ácido 3-*o*-feruloilquínico, difilina, elimicina, 7 – Metiljuglona, teaflavina, crisina, isoxanthohumol e grandinina) no extrato de jatobá após a digestão indica que o consumo desta matriz alimentar pode beneficiar o organismo, visto que os compostos bioativos foram desligados da matriz alimentar, resistiram ao processo digestivo e assim estão aptos a serem absorvidos (Cilla et al., 2018).

Abbas et al. (2017) em estudo de revisão afirma que o consumo de alimentos que apresentem compostos fenólicos em sua composição está relacionado com a prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e diabetes. Experimentos *in vitro* demonstraram a capacidade anti-tumoral do isoxanthohumol (Krajnović et al., 2016). Ácidos clorogênicos também são conhecidos devido a sua capacidade antioxidante, antimicrobiana, antibacteriana, antiviral e anti-inflamatória (Doklí et al., 2013). Experimentos *in vitro* revelaram que o ácido p-cumárico, crisina e a grandinina apresentam atividade anti-hiperglicêmica (Lukačínová et al., 2008; Moharram et al., 2003; Welsch et al., 1989). Por isso, o consumo de alimentos que apresentem estes compostos em sua composição, como a farinha de jatobá, pode estar relacionado com a prevenção de algumas doenças metabólicas.

4.3 PERMEABILIDADE DE POLIFENÓIS DO JATOBÁ EM CÉLULAS CACO-2

Antes de iniciarmos os estudos de bioacessibilidade dos compostos fenólicos da farinha de jatobá, foi realizado o teste de citotoxicidade com diferentes concentrações do extrato de farinha de jatobá digeridos para verificação da viabilidade celular das células Caco-2.

De acordo com a figura 21 podemos observar que na concentração abaixo de 0,2 mg/mL obteve-se mais de 80% de células viáveis. Por isso, decidimos utilizar concentrações a partir de 0,1 mg/mL para avaliação da permeabilidade de compostos fenólicos e expressão gênica de transportadores de glicose.

Figura 21: Percentual de viabilidade celular das células Caco-2 na presença de diferentes concentrações de extrato de farinha de jatobá digeridos. Valores expressos em média e desvio-padrão. * $p < 0,05$ letras diferentes indicam amostras diferentes entre si (ANOVA seguido de teste Tukey).

Para avaliação da permeabilidade dos compostos fenólicos presentes no extrato digerido de farinha de jatobá foi utilizada três concentrações de extrato (0,1 mg/mL, 0,075 mg/mL e 0,05 mg/mL). Este estudo indica quais compostos fenólicos atravessaram a barreira das células Caco-2 e que provavelmente podem apresentar bioatividade em tecidos alvos (Figura 22,23 e 24).

Dentre os ácidos fenólicos presentes no extrato digerido, apenas o ácido p-cumárico não foi observado na parte basolateral das células em todas as concentrações. Em geral, os ácidos hidroxicinâmicos livres apresentam excelente biodisponibilidade, aparecendo

na circulação sanguínea até 30 min após o consumo, sendo absorvidos por transporte ativo mediado por transportadores de ácidos monocarboxílicos – MCT (Oliveira e Bastos, 2011). A hipótese deste estudo é que o ácido p-cumárico presente no conteúdo apical concentração 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL tenha sofrido o processo de biotransformação durante a incubação e por isso não foi identificado no lado basolateral das células Caco-2.

Figura 22: Percentual relativo dos compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá digerido que resistiram a digestão e atravessaram a barreira das células Caco-2, concentração 0,05 mg/mL.

Figura 23: Percentual relativo dos compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá digerido que resistiram a digestão e atravessaram a barreira das células Caco-2, concentração 0,075 mg/mL.

Figura 24: Percentual relativo dos compostos fenólicos presentes no extrato de farinha de jatobá digerido que resistiram a digestão e atravessaram a barreira das células Caco-2, concentração 0,1 mg/mL.

Um fator de destaque relacionado a bioacessibilidade dos polifenóis da farinha de jatobá é que a teaflavina (flavonóide) e a grandinina (tanino) foram identificadas apenas na parte basolateral das células, demonstrando que estes compostos não eram nativos da matriz alimentar, mas foram gerados por meio da interação de metabólitos provenientes do processo digestivo e as células Caco-2. Isso é comum quando se trata da bioacessibilidade destes compostos, visto que, o processo digestivo altera a estrutura da maioria dos compostos fenólicos. Durante esse processo, muitos compostos sofrem hidrólise, no entanto, seus metabólitos podem ser rearranjados e formarem novos compostos. Portanto, a análise da biodisponibilidade dos compostos fenólicos deve incluir não somente compostos nativos, mas também seus metabólitos (Carbonell-Capella et al., 2014).

Além disso, ao comparar o perfil dos compostos fenólicos presentes na parte basolateral das células Caco-2 também foi observada diferença entre as concentrações, assim como ocorreu na parte apical. Os compostos teaflavina e grandinina foram identificadas na parte basolateral apenas das concentrações 0,1 e 0,075 mg/mL.

Pacheco-Ordaz et al. (2018) avaliaram a permeabilidade de compostos fenólicos livres e ligados presentes em mangas após hidrólise ácida e alcalina utilizando células Caco-2. Assim como em nosso trabalho compostos como taninos e glicosídeos não foram absorvidos, o que indica que eles podem atingir o cólon e possivelmente modificar as populações de bactérias presentes nesta parte do trato gastrointestinal. Borrás-Linares et al. (2015) examinaram a permeabilidade dos compostos fenólicos presentes em extrato de *Hibiscus sabdariffa* utilizando células Caco-2 e também observaram que apenas alguns compostos conseguiram atravessar este modelo de membrana intestinal. Neste caso, os autores atribuíram tal comportamento a complexidade da composição do extrato, que poderia saturar os transportadores específicos que atravessariam estes compostos através da monocamada celular.

Foi realizada uma análise dos componentes principais dos extratos analisados por meio do software EZInfo, tanto do extrato puro (não digerido) quanto dos extratos digeridos da parte apical e da parte basolateral das células Caco-2 (Figura 25). A partir dos dados obtidos, observa-se que o extrato não digerido (C), diferencia-se dos extratos digeridos (A e B), confirmando que o extrato após a digestão *in vitro* apresenta

composição distinta em relação ao conteúdo de compostos fenólicos. O conteúdo apical e basolateral também são diferentes entre si, como também já foi observado anteriormente através das análises do perfil relativo de compostos fenólicos presentes.

Ambos os compartimentos celulares continham tampão de permeação Hanks para que a célula se mantivesse estável durante o experimento, por isso a letra D (Figura 21), encontra-se entre as duas amostras apical e basolateral confirmando a semelhança em relação a esse conteúdo.

Figura 25: Análise dos componentes principais presentes nos extratos de farinha de jatobá antes e após a digestão *in vitro*, segundo o software EZInfo.

4.4 EFEITO DO EXTRATO DE JATOBÁ NA ABSORÇÃO DE GLICOSE VIA GLUT2.

Após identificar quais compostos fenólicos estavam presentes no extrato de farinha de jatobá após a digestão *in vitro*, investigamos se este extrato alteraria a absorção de glicose. Neste experimento, testamos a capacidade dos extratos em inibir a captação de glicose em células Caco-2 em ambiente livre de sódio (Figura 26).

De acordo com os resultados, apenas o extrato com a concentração de 0,1 mg/mL de extrato reduziu significativamente a absorção de glicose em células Caco-2. Como o ambiente em questão estava livre de sódio, possivelmente a glicose foi captada via transporte facilitado, ou seja, por meio do GLUT2. Este resultado mostra que existe a possibilidade de que compostos fenólicos presentes em matrizes alimentares possam atuar reduzindo a captação intestinal de glicose (Alzaid et al., 2013; Johnston et al., 2005).

Figura 26: Efeito agudo (30 min) do extrato de jatobá na absorção de glicose em células Caco-2. Os valores apresentados são médias de ensaios realizados em duplicata. As barras representam o desvio padrão. * $p < 0,05$ letras diferentes indicam amostras diferentes entre si (ANOVA seguido de teste Tukey).

Outros pesquisadores já observaram efeitos semelhantes de extratos de compostos fenólicos (morango, maçã e berries) na captação de glicose em células Caco-2 (Manzano e Williamson, 2010; Alzaid et al. (2013). Entretanto, a maioria dos trabalhos publicados até o momento, avaliaram os extratos de polifenóis *in natura*. Dessa forma, não consideraram as particularidades de cada matéria-prima em relação a bioacessibilidade e biodisponibilidade destes compostos. Neste estudo, demonstramos que o extrato de farinha de jatobá reduziu a captação de glicose intestinal em células Caco-2 *in vitro*. Dessa forma, abrimos o espaço para investigações futuras relacionadas ao potencial papel anti-hiperglicêmico e benefício à saúde desta matriz alimentar.

4.5 EFEITO DO EXTRATO DE JATOBÁ NA EXPRESSÃO GÊNICA DOS TRANSPORTADORES DE GLICOSE SGLT1 E GLUT2

Neste ensaio, foi investigado se o extrato de jatobá digerido alteraria a expressão gênica do RNAm do SGLT1 e do GLUT2 após incubação por 2h e 12h. Na figura 27, podemos observar que a incubação das células com o extrato de jatobá durante 2 horas reduziu significativamente a expressão gênica de ambos os transportadores na dose 0,1 mg/mL.

Figura 27: Efeito do extrato de jatobá na expressão gênica dos transportadores de glicose SGLT1 e GLUT2 após o período de 2 horas de incubação. Os resultados foram normalizados para o gene endógeno UBC. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n=6). * $p < 0,05$ diferentes em comparação ao controle (ANOVA seguido de teste Tukey).

A figura 28 mostra o efeito do extrato de jatobá na expressão gênica dos transportadores de glicose SGLT1 e GLUT2 após o período de 12 horas de incubação. Neste caso, o extrato reduziu significativamente a expressão genica de ambos os transportadores e seu efeito foi dose-dependente.

Figura 28: Efeito do extrato de jatobá na expressão gênica dos transportadores de glicose SGLT1 e GLUT2 após o período de 12 horas de incubação. Os resultados foram normalizados para o gene endógeno UBC. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (n=6). *p<0,05 diferentes em comparação ao controle (ANOVA seguido de teste Tukey).

Outras pesquisas já evidenciaram que os polifenóis podem interagir com transportadores de glicose de várias formas (Bahadoran et al., 2013; Kim et al., 2016). Polifenóis do chá verde, do morango e de maçãs já demonstraram serem eficazes na inibição da absorção de glicose por células intestinais *in vitro* via redução da expressão gênica de SGLT1 e GLUT2 (Kobayashi et al., 2000; Manzano e Williamson, 2010).

É a primeira vez que esta matriz alimentar é testada quanto este possível efeito biológico, por isso, mais análises são necessárias para confirmar se a redução da

expressão gênica dos transportadores também está relacionada com a redução da atividade destes transportadores.

Este efeito anti-hiperglicêmico pode ser atribuído aos compostos fenólicos identificados no compartimento basolateral das células Caco-2 como a a crisina e a grandinina, que já apresentaram efeito na redução da glicose sanguínea de animais diabéticos (Lukačínová et al.,2008; Moharram et al.,2003). Porém, são necessários mais ensaios para investigar se este efeito é individual de cada composto ou é um efeito sinérgico entre todos os compostos presentes no extrato, inclusive os que não apresentam efeito anti-hiperglicêmico direto.

4.6 EFEITO DO EXTRATO DE JATOBÁ DIGERIDO NA INIBIÇÃO DAS CARBOIDRASES.

A inibição da ação das enzimas responsáveis pela digestão dos carboidratos reduz a resposta glicêmica da dieta, por isso, verificamos se o extrato de farinha de jatobá digerido apresentava este efeito.

A interação dos compostos fenólicos dos extratos da farinha de jatobá submetidos à digestão *in vitro* com a α -glicosidase está apresentada na Figura 29. Os valores da porcentagem de inibição variaram de 53 (61 $\mu\text{g GAE.mL}^{-1}$) a 77% (31 $\mu\text{g GAE.mL}^{-1}$). Ambas as doses testadas foram capazes de inibir mais de 50% da atividade da α - glicosidase, mas este resultado não é dependente da dose (Figura 25). A eficiência da inibição e o padrão de compostos fenólicos sobre a atividade da α -glucosidase dependem do mecanismo, afinidades de ligação e do local de ação destes compostos (Boath, Stewart, McDougall, 2012), consequentemente, outros estudos são necessários para avaliar a cinética da inibição da α -glucosidase pelos extratos de farinha de jatobá.

Figura 29: Inibição da atividade da α -glicosidase por extratos de jatobá após digestão *in vitro*. Os valores apresentados são médias de ensaios realizados em triplicata. As barras representam o desvio padrão. Letras diferentes significam que as concentrações são diferentes entre si de acordo com o teste-t ($p < 0,05$).

Como mostrado na Figura 30, os extratos de farinha de jatobá após a digestão *in vitro* exibiram alta atividade inibitória contra α -amilase. O valor do IC₅₀ do extrato de jatobá para a atividade inibitória da α -amilase foi de 56 $\mu\text{g GAE.mL}^{-1}$ e o valor de IC₅₀ da acarbose foi de 465 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando o potencial desses compostos como o inibidor da α -amilase.

Figura 30: Inibição da α -amilase pelos extratos de farinha de jatobá após digestão *in vitro* e pela acarbose. Os valores são médias de testes realizados em triplicata. As barras representam o desvio padrão.

Neste estudo, a capacidade anti-hiperglicêmica do extrato de jatobá foi demonstrada pela inibição da α -amilase e α -glicosidase. Da mesma forma, extratos de outras leguminosas também são capazes de inibir a atividade destas carboidrases. No estudo de Ademiluyi e Oboh (2013) o extrato de soja apresentou $\text{IC}_{50} = 526,32 \mu\text{g/mL}$ para α -amilase e $\text{IC}_{50} = 526,32 \mu\text{g/mL}$ para α -glicosidase, e Mojica et al. (2015) relataram que os extratos de feijão inibiram 74,2% da atividade da α -amilase e 82,5% da atividade da α -glicosidase. Outras fontes de polifenóis demonstraram efeitos potenciais à saúde, como o pistache, que inibiu 98% ($610 \mu\text{g GAE / mL}$) da atividade da α -amilase e 90% ($76 \mu\text{g GAE / mL}$) da atividade da α -glucosidase (Lalegani et al., 2018). No entanto, é importante notar que os extratos analisados por outros autores não foram submetidos à digestão prévia, indicando que os resultados podem variar após o processo de hidrólise enzimática. Assim, nosso estudo indica que compostos fenólicos de jatobá são bioacessíveis e podem ajudar a prevenir doenças crônicas não transmissíveis, como o diabetes.

Atualmente, o inibidor padrão utilizado para reduzir a hiperglicemia pós-prandial é a acarbose. No entanto, este medicamento tem certos efeitos adversos, como diarreia e náuseas (Sales et al., 2012). Portanto, os inibidores naturais, como o extrato de jatobá, podem ser uma boa estratégia para o controle glicêmico de portadores de DM2.

Em suma, os mecanismos propostos neste trabalho indicam o possível papel dos compostos fenólicos presentes na farinha de jatobá na redução da digestão e absorção de carboidratos (Figura 31). Entretanto, destacamos a necessidade de mais estudos a respeito da dose de segurança e possíveis efeitos colaterais relacionados ao uso deste extrato para a população.

Figura 31: Resumo do mecanismo proposto dos polifenóis do jatobá na homeostase da glicose.

5. CONCLUSÃO

Mais de 40 compostos fenólicos das classes dos flavonóides, lignanas, ácidos fenólicos e taninos foram identificados no extrato de farinha de jatobá não digerido. Após a digestão *in vitro* houve uma redução do conteúdo de compostos fenólicos presentes no extrato. Entretanto, a maioria dos compostos fenólicos foram identificados na parte basolateral das células Caco-2, confirmando a sua bioacessibilidade. Portanto, o consumo de farinha de jatobá, como fonte de compostos fenólicos, deve ser estimulado.

Todos os extratos digeridos testados (0,1 mg/mL; 0,075 mg/mL; 0,05 mg/mL) foram capazes de reduzir a expressão gênica dos transportadores de glicose SGLT1 e GLUT2 em células Caco-2 após 12h de exposição, demonstrando a capacidade desta matriz em modular a absorção intestinal de glicose. Além disso, o extrato digerido também inibiu a atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase.

A partir do exposto concluímos que esta matriz apresenta potencial benefício a saúde, devido a sua capacidade de regulação da digestão e absorção de carboidratos *in vitro*, por meio do modelo de células Caco-2, porém esta atividade biológica precisa ser melhor investigada em estudos futuros com humanos.

A farinha de jatobá apresenta alto conteúdo de fibra alimentar, que reconhecidamente pode auxiliar no controle glicêmico. Aliado aos achados deste estudo, no qual revelou o potencial papel benéfico dos compostos fenólicos desta matriz, sugere-se estudos futuros para verificar se estes compostos bioativos (fibras e compostos fenólicos) atuam de maneira sinérgica no controle da glicemia.

REFERÊNCIAS

1. ABBAS, Munawar et al. Natural polyphenols: An overview. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 8, p. 1689-1699, 2017.
2. ADEMILUYI, Adedayo O.; OBOH, Ganiyu. Soybean phenolic-rich extracts inhibit key-enzymes linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting enzyme) in vitro. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 3, p. 305-309, 2013.
3. AJALA, Olubukola; ENGLISH, Patrick; PINKNEY, Jonathan. Systematic review and meta-analysis of different dietary approaches to the management of type 2 diabetes. **The American journal of clinical nutrition**, v. 97, n. 3, p. 505-516, 2013.
4. ALZAID, F., CHEUNG, H. M., PREEDY, V. R., & SHARP, P. A. (2013). Regulation of Glucose Transporter Expression in Human Intestinal Caco-2 Cells following Exposure to an Anthocyanin-Rich Berry Extract. **PloS one**, 8(11), e78932.
5. AMAROWICZ, Ryszard; PEGG, Ronald B. Legumes as a source of natural antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 10, p. 865-878, 2008.
6. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes. Sec. 2. In Standards of Medical Care in Diabetes - 2016. **Diabetes Care** 2016;39(Suppl. 1): S13–S22
7. ÂNGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos- uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.
8. ARAKAKI, Daniela Granja et al. In vitro and in vivo antioxidant activity of the pulp of Jatobá-do-cerrado. **Food Science and Technology** (Campinas), v. 36, n. 1, p. 166-170, 2016.

9. ARAÚJO, João R.; MARTEL, Fátima. Regulação da Absorção Intestinal de Glicose: Uma Breve Revisão. **Arquivos de medicina**, v. 23, n. 2, p. 35-43, 2009.
10. ARTURSSON, Per; PALM, Katrin; LUTHMAN, Kristina. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 280-289, 2012.
11. ARTURSSON, Per; PALM, Katrin; LUTHMAN, Kristina. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport1. **Advanced drug delivery reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 27-43, 2001.
12. ARYANGAT, Ajikumar V.; GERICH, John E. Type 2 diabetes: postprandial hyperglycemia and increased cardiovascular risk. **Vascular health and risk management**, v. 6, p. 145, 2010.
13. AZMIR, Jannatul et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.
14. BAEZA, Gema et al. Polyphenol content, in vitro bioaccessibility and antioxidant capacity of widely consumed beverages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2017.
15. BAHADORAN, Zahra; MIRMIRAN, Parvin. Potential properties of legumes as important functional foods for management of type 2 diabetes. A short review. **Int. J. Nutr. Food Sci**, v. 4, p. 6-9, 2015.
16. BAHADORAN, Zahra; MIRMIRAN, Parvin; AZIZI, Fereidoun. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, n. 1, p. 43, 2013.
17. BERMÚDEZ-SOTO, M.-J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.-A.; GARCÍA-CONESA, M.-T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. **Food chemistry**, v. 102, n. 3, p. 865-874, 2007.

18. BLAAK, E. E. et al. Impact of postprandial glycaemia on health and prevention of disease. **Obesity reviews**, v. 13, n. 10, p. 923-984, 2012.
19. BOATH, Ashley S.; STEWART, Derek; MCDUGALL, Gordon J. Berry components inhibit α -glucosidase in vitro: Synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 929-936, 2012.
20. BOHN, Torsten. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. **Nutrition reviews**, v. 72, n. 7, p. 429-452, 2014.
21. BOJŇANSKÁ, T.; FRANČÁKOVÁ, H.; LÍŠKOVÁ, M.; TOKÁR, M. Legumes—the alternative raw materials for bread production. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**. v.1, p. 876-886, 2012.
22. BONIFACE, Pone Kamdem; FERREIRA, Sabrina Baptista; KAISER, Carlos Roland. Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2017.
23. BORRÁS-LINARES, Isabel et al. Permeability study of polyphenols derived from a phenolic-enriched *Hibiscus sabdariffa* extract by UHPLC-ESI-UHR-Qq-TOF-MS. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 8, p. 18396-18411, 2015.
24. BOUAYED, Jaouad et al. Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1466-1472, 2012.
25. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Cerrado – Plano de Ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no Cerrado: 2ª fase (2014-2015) / Ministério do Meio Ambiente, Organizador. Brasília: MMA, 2014. 132 p.
26. BRAZIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. SECRETARIA DE GESTÃO ESTRATÉGICA E PARTICIPATIVA; Vigitel Brasil 2017: vigilância de fatores e risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Ministério da Saúde, 2017.

27. CAMPOS-VEGA, Rocio; LOARCA-PIÑA, Guadalupe; OOMAH, B. Dave. Minor components of pulses and their potential impact on human health. **Food research international**, v. 43, n. 2, p. 461-482, 2010.
28. CARBONELL-CAPELLA, Juana M. et al. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 155-171, 2014.
29. CARDOSO, Carlos et al. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk–benefit evaluation of food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 5-23, 2015.
30. CARDOSO, L. D. M. et al. 'Jatoba do cerrado' (Hymenaeastigonocarpa): chemical composition, carotenoids and vitamins in an exotic fruit from the Brazilian Savannah. **Fruits**, v. 68, n. 2, p. 95-107, Mar-Apr 2013. ISSN 0248-1294. Available at: <<Go to ISI>://WOS:000317708200004 >.
31. CHEN, Lihong; TUO, Biguang; DONG, Hui. Regulation of intestinal glucose absorption by ion channels and transporters. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 43, 2016.
32. CHIASSON, Jean-Louis et al. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. **The Lancet**, v. 359, n. 9323, p. 2072-2077, 2002.
33. CILLA, Antonio et al. Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds—A review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.68, p.3-15, 2018.
34. DAY, Andrea J. et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. **FEBS letters**, v. 468, n. 2-3, p. 166-170, 2000.

35. DEHGHAN, Mahshid et al. Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2050-2062, 2017.
36. DING, Ming et al. Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review and a dose-response meta-analysis. **Diabetes care**, v. 37, n. 2, p. 569-586, 2014.
37. DINICOLANTONIO, James J.; BHUTANI, Jaikrit; O'KEEFE, James H. Acarbose: safe and effective for lowering postprandial hyperglycaemia and improving cardiovascular outcomes. **Open heart**, v. 2, n. 1, p. e000327, 2015.
38. DOKLI, Irena; NAVARINI, Luciano; HAMERŠAK, Zdenko. Syntheses of 3-, 4-, and 5-O-feruloylquinic acids. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 24, n. 13-14, p. 785-790, 2013.
39. DYER, J. et al. Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 282, n. 2, p. G241-G248, 2002.
40. EL GHARRAS, Hasna. Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. **International journal of food science & technology**, v. 44, n. 12, p. 2512-2518, 2009.
41. FERNÁNDEZ-GARCÍA, Elisabet; CARVAJAL-LÉRIDA, Irene; PÉREZ-GÁLVEZ, Antonio. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, n. 11, p. 751-760, 2009.
42. Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 22 Mai. 2018
43. FOGH, Jørgen; WRIGHT, William C.; LOVELESS, James D. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 58, n. 2, p. 209-214, 1977.
44. FREITAS, H. S. et al. Na⁺-glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: involvement

- of hepatocyte nuclear factor-1 α expression and activity. **Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 717-724, 2008.
45. FREITAS, H. S. et al. Na⁺-glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: involvement of hepatocyte nuclear factor-1 α expression and activity. **Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 717-724, 2007.
 46. FRIEDMAN, Mendel; JÜRGENS, Hella S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2101-2110, 2000.
 47. FRONTELA, Carmen et al. Stability of Pycnogenol® as an ingredient in fruit juices subjected to in vitro gastrointestinal digestion. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 2, p. 286-292, 2011.
 48. GANESAN, Kumar; XU, Baojun. Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, p. 2331, 2017.
 49. GENVIGIR, F. D. V.; RODRIGUES, A. C.; CERDA, A.; ARAZI, S. S.; WILLRICH, M. A.; OLIVEIRA, R.; HIRATA, M. H.; DOREA, E. L.; BERNIK, M. M.; CURI, R.; HIRATA, R. D. Effects of lipid-lowering drugs on reverse cholesterol transport gene expressions in peripheral blood mononuclear and HepG2 cells. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 9, p. 1235-46, 2010.
 50. GROSSO, Giuseppe et al. Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study. **Nutrition**, v. 30, n. 11, p. 1398-1403, 2014.
 51. GUASCH-FERRÉ, Marta et al. Dietary Polyphenols, Mediterranean Diet, Prediabetes, and Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
 52. HACKMAN, Robert M. et al. Flavanols: digestion, absorption and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 195, 2008.

53. HANHINEVA, K., TÖRRÖNEN, R., BONDIA-PONS, I., PEKKINEN, J., KOLEHMAINEN, M., MYKKÄNEN, H., & POUTANEN, K. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, 11(4), 1365-1402.
54. HIRSCH, Jochen R.; LOO, Donald DF; WRIGHT, Ernest M. Regulation of Na⁺/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 25, p. 14740-14746, 1996.
55. HUANG, Dou et al. Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
56. HUBATSCH, Ina; RAGNARSSON, Eva GE; ARTURSSON, Per. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nature protocols**, v. 2, n. 9, p. 2111, 2007.
57. HUBER, Lísia Senger; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.
58. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, **IDF Diabetes Atlas**, International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 7 ed., 2015.
59. ISHIKAWA, Yasuko; EGUCHI, Takafumi; ISHIDA, Hajime. Mechanism of β -adrenergic agonist-induced transmural transport of glucose in rat small intestine: Regulation of phosphorylation of SGLT1 controls the function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1357, n. 3, p. 306-318, 1997.
60. JOHNSTON, Kelly et al. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. **FEBS letters**, v. 579, n. 7, p. 1653-1657, 2005.
61. KELLETT, George L.; BROT-LAROCHE, Edith. Apical GLUT2 a major pathway of intestinal sugar absorption. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 3056-3062, 2005.
62. KIM, Yoona; KEOGH, Jennifer B.; CLIFTON, Peter M. Polyphenols and glycemic control. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 17, 2016.

63. KNOWLER, William C. et al. DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH GROUP. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **New England journal of medicine**, v. 346, n. 6, p. 393-403, 2002.
64. KOBAYASHI, Yoko et al. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5618-5623, 2000.
65. KOSIŃSKA-CAGNAZZO, Agnieszka et al. Identification of bioaccessible and uptaken phenolic compounds from strawberry fruits in in vitro digestion/Caco-2 absorption model. **Food chemistry**, v. 170, p. 288-294, 2015.
66. KRAJNOVIĆ, Tamara et al. Versatile antitumor potential of isoxanthohumol: enhancement of paclitaxel activity in vivo. **Pharmacological research**, v. 105, p. 62-73, 2016.
67. LALEGANI, Sajjad et al. Inhibitory activity of phenolic-rich pistachio green hull extract-enriched pasta on key type 2 diabetes relevant enzymes and glycemic index. **Food Research International**, v. 105, p. 94-101, 2018.
68. LEO, Chen-Huei; WOODMAN, Owen L. Flavonols in the prevention of diabetes-induced vascular dysfunction. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 532, 2015.
69. LI, Min et al. Fruit and vegetable intake and risk of type 2 diabetes mellitus: meta-analysis of prospective cohort studies. **BMJ open**, v. 4, n. 11, p. e005497, 2014.
70. LIN, Derong et al. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1374, 2016.
71. LITWAK, Leon et al. Prevalence of diabetes complications in people with type 2 diabetes mellitus and its association with baseline characteristics in the multinational A 1 chieve study. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 5, n. 1, p. 57, 2013.

72. LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtimequantitative PCR and the 2⁻(-Delta DeltaC(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8,2001.
73. LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, vol.1, 5ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2008. 384 p.
74. LUKAČÍNOVÁ, A. et al. Preventive effects of flavonoids on alloxan-induced diabetes mellitus in rats. **Acta Veterinaria Brno**, v. 77, n. 2, p. 175-182, 2008.
75. MANACH, Claudine et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.
76. MANZANO, Susana; WILLIAMSON, Gary. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. **Molecular nutrition&foodresearch**, v. 54, n. 12, p. 1773-1780, 2010.
77. MARIN, A.M.F.; SIQUEIRA, E.M.A.; ARRUDA, S.F. Minerals, phytic acid and tannin contents of 18 fruits from the Brazilian savanna. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, n.60, s.7, p. 177-187, 2009.
78. MARTIN, Keith R. et al. Polyphenols as dietary supplements: a double-edged sword. **Nutrition and Dietary Supplements**, v. 2, p. 1-12, 2010.
79. MCMACKEN, Michelle; SHAH, Sapana. A plant-based diet for the prevention and treatment of type 2 diabetes. **Journal of geriatric cardiology: JGC**, v. 14, n. 5, p. 342, 2017.
80. MILLER, Victoria et al. Fruit, vegetable, and legume intake, and cardiovascular disease and deaths in 18 countries (PURE): a prospective cohort study. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2037-2049, 2017.
81. MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

82. MIRANDA, A. M. et al. Dietary intake and food contributors of polyphenols in adults and elderly adults of Sao Paulo: a population-based study. **British Journal of Nutrition**, v. 115, n. 6, p. 1061-1070, 2016.
83. MOHARRAM, F. A. et al. Polyphenols of *Melaleuca quinquenervia* leaves—pharmacological studies of grandinin. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 7, p. 767-773, 2003.
84. MOJICA, Luis et al. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. **Food research international**, v. 69, p. 38-48, 2015.
85. OLIVEIRA, Daniela Moura de; BASTOS, Deborah M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.
86. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Global report on diabetes. OMS, 2016.
87. ORSI, P. R. et al. *Hymenaeastigonocarpa* Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 81-90, 2012.
88. ORSI, Patrícia Rodrigues; SEITO, Leonardo Noboru; DI STASI, Luiz Claudio. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 380-385, 2014.
89. PACHECO-ORDAZ, Ramón et al. Intestinal Permeability and Cellular Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Mango (*Mangifera indica* cv. Ataulfo) Peels. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 514, 2018.
90. PÉREZ-JIMÉNEZ, J. et al. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. **European journal of clinical nutrition**, v. 64, p. S112-S120, 2010.

91. POWERS, Margaret A. et al. Diabetes self-management education and support in type 2 diabetes: a joint position statement of the American Diabetes Association, the American Association of Diabetes Educators, and the Academy of Nutrition and Dietetics. **The Diabetes Educator**, v. 43, n. 1, p. 40-53, 2017.
92. RAVICHANDRAN, Meenakshi; GRANDL, Gerald; RISTOW, Michael. Dietary Carbohydrates Impair Healthspan and Promote Mortality. **Cell Metabolism**, v. 26, n. 4, p. 585-587, 2017.
93. SABINO-SILVA, R. et al. The Na⁺/glucose cotransporters: from genes to therapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 11, p. 1019-1026, 2010.
94. SALES, Paloma Michelle et al. α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 141-183, 2012.
95. SCALBERT, Augustin; WILLIAMSON, Gary. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2073S-2085S, 2000.
96. SHIRAZI-BEECHEY, S. P. et al. Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport. **Proceedings of the nutrition society**, v. 70, n. 2, p. 185-193, 2011.
97. SILVA, C. P. et al. Chemical composition and antioxidant activity of jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n. 3, p. 597-603, 2014.
98. SILVA, C.P. **Efeito da adição de farinha de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) na resposta glicêmica de pães**. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública.
99. SILVA, M.R.; SILVA, M.S.; MARTINS, K.A; BORGES, S. Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.2, p.176-182. 2001.

100. SINGHAL, Poonam; KAUSHIK, Geetanjali; MATHUR, Pulkit. Antidiabetic potential of commonly consumed legumes: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 5, p. 655-672, 2014.
101. SINGLETON, Vernon L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
102. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016) / Adolfo Milech...[et. al.]; organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio - São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.
103. TAVARES, Lucélia et al. Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. **Food chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1443-1452, 2012.
104. TELAGARI, Madhusudhan; HULLATTI, Kirankumar. In-vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of *Adiantum caudatum* Linn. and *Celosia argentea* Linn. extracts and fractions. **Indian journal of pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 425, 2015.
105. THARANATHAN, R. N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes—a boon to human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**. v.14, n. 12, p. 507-518, 2003.
106. TRESSERRA-RIMBAU, Anna et al. Inverse association between habitual polyphenol intake and incidence of cardiovascular events in the PREDIMED study. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 24, n. 6, p. 639-647, 2014.
107. TRINIDAD, TRINIDAD P.; AIDA C. MALLILLIN; ANACLETA S. LOYOLA; ROSARIO S. SAGUM; ROSARIO R. ENCABO. The potential health benefits of legumes as a good source of dietary fibre. **British Journal of Nutrition**, v.103, n. 4, p.569-574, 2010.

108. TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F. Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 10, n. 4, p. 315-331, 2010.
109. VAN DE LAAR, Floris A. et al. Alpha-glucosidase inhibitors for people with impaired glucose tolerance or impaired fasting blood glucose. **The Cochrane Library**, 2006.
110. VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 2002 2002. ISSN 1474-760X.
111. VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R. et al. Phenolic compounds: their journey after intake. **Food & function**, v. 5, n. 2, p. 189-197, 2014.
112. VERHOECKX, Kitty et al. (Ed.). **The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models**. Springer, 2015.
113. VIEIRA, R.F. et al. **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Embrapa informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.
114. WELSCH, Cathy A.; LACHANCE, Paul A.; WASSERMAN, Bruce P. Dietary phenolic compounds: inhibition of Na⁺-dependent D-glucose uptake in rat intestinal brush border membrane vesicles. **The Journal of nutrition**, v. 119, n. 11, p. 1698-1704, 1989.
115. WILLIAMSON, G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 1, p. 48-57, 2013.
116. WILLIAMSON, G. The role of polyphenols in modern nutrition. **Nutrition Bulletin**, v. 42, n. 3, p. 226-235, 2017.
117. WOOD, I. Stuart; TRAYHURN, Paul. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **British Journal of Nutrition**, v. 89, n. 1, p. 3-9, 2003.

118. YAO, Yang et al. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity of colored grains in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 770-774, 2010.
119. ZHENG, Yan; LEY, Sylvia H.; HU, Frank B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**, 2017.