UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Compostos bioativos fenólicos de frutos nativos da família Myrtaceae:
Avaliação da bioacessibilidade e do potencial funcional relacionado às doenças
cardiovasculares

Gabriela de Lima Santiago

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Compostos bioativos fenólicos de frutos nativos da família Myrtaceae:
Avaliação da bioacessibilidade e do potencial funcional relacionado às doenças
cardiovasculares

Gabriela de Lima Santiago

Versão original

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S235c Santiago, Gabriela de Lima
Compostos bioativos fenólicos de frutos nativos da família Myrtaceae: Avaliação da bioacessibilidade e do potencial funcional relacionado às doenças cardiovasculares / Gabriela de Lima Santiago. - São Paulo, 2018.
85 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Genovese, Maria Ines

1. Compostos fenólicos. 2. Cambuci (Campomanesia phaea O. Berg.). 3. Jabuticaba (Myrciaria jaboticaba O. Berg.). 4. Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA). 5. Agregação plaquetária. I. T. II. Genovese, Maria Ines , orientador.

GABRIELA DE LIMA SANTIAGO

**Compostos bioativos fenólicos de frutos nativos da família Myrtaceae:
Avaliação da bioacessibilidade e do potencial funcional relacionado às
doenças cardiovasculares**

Comissão Julgadora da
Dissertação para a obtenção de título de Mestre

Prof. Dr. Maria Inés Genovese
Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018

*Este trabalho é dedicado à minha amada mãe
Roseli Pimenta de Lima.*

AGRADECIMENTOS

Talvez não existam palavras suficientes que me permitam expressar, de forma justa, toda gratidão que sinto pelas pessoas que estiveram presentes durante o caminho que percorri para chegar ao final desta trajetória. Indigna eu seria se atribuisse o alcance dos meus objetivos ao acaso dos acontecimentos ou exclusivamente ao meu próprio mérito.

De maneira especial, agradeço a Deus por todos os benefícios concedidos e aos bons espíritos que foram os executores das vontades de Deus durante esta caminhada.

Minha eterna gratidão a minha querida mãe Roseli Pimenta de Lima, meu maior exemplo de força e determinação, por nunca medir esforços para apoiar minhas escolhas e por sempre me suportar nos momentos que precisei. À senhora, devo tudo o que sou hoje. Sou grata aos meus amados irmãos Juliano, Ana Elisa e João Paulo, pelas palavras de carinho e estímulo que sempre alimentaram minha vontade de ser melhor a cada dia.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos: Lucas, Matô, Pedro, Rafinha e Capitalista, que foram minha família em São Paulo. Obrigada pela amizade, convivência, paciência e todas as trocas de experiências. Também agradeço a minha parceira Shai, por ter chegado em minha vida e ter me presenteado com momentos repletos de diversão, carinho e compreensão.

Agradeço minha orientadora Maria Inés Genovese pela confiança em minha capacidade profissional e por sempre compreender as minhas limitações. A conclusão deste trabalho não teria sido possível sem os seus ensinamentos, conselhos, dedicação e incentivo. Obrigada por contribuir para o meu crescimento científico e intelectual e por me mostrar diariamente que “grandes batalhas só são dadas a grandes guerreiros”.

Meus sinceros agradecimentos a todos os colegas com os quais eu tive o prazer de dividir os meus dias no Laboratório de Análise de Alimentos, que me acolheram e sempre estiveram dispostos a me ensinar. Às alunas de iniciação científica: Denise, Heloísa, Júlia, Larissa e Rebeca. Aos amigos Carlos, Helena, Taty e, especialmente, aos parceiros Elias, Márcio, Renata e Rosa, que me ampararam em todos os momentos necessários. Obrigada pelas infinitas discussões acerca do meu trabalho, por todas as conversas, gargalhadas, conselhos e palavras de carinho e incentivo. Com vocês aprendi que desistir nunca deve ser uma opção.

Sem a contribuição de profissionais de outras instituições, muito deste trabalho não teria se realizado. Sou grata à professora Adriana Carmona por disponibilizar o Laboratório

de Enzimologia da Universidade Federal de São Paulo e a professora Patrícia Bersanetti por compartilhar seu tempo e seus conhecimentos durante todo o ensaio da ECA. Agradeço, em nome da Dr^a Vanessa Silva, todos os funcionários do Laboratório de Hemostasia do Instituto do Coração, os quais não mediram esforços para me auxiliar no ensaio de agregação plaquetária.

À querida Flávia Ong, pela paciência e atenção dispensadas durante a eutanásia dos animais utilizados neste trabalho.

Ao professor Felipe Rebello, pelas sugestões relacionadas a análise estatística dos dados obtidos.

A todos os professores que contribuíram para o meu crescimento científico e intelectual, e aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

À professora Maria Aderuza Horst, por ter aberto as portas iniciais desta jornada, possibilitando o início da realização deste objetivo profissional.

Finalmente, agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro ao laboratório, bem como à FAPESP.

Meus sinceros agradecimentos.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”.

Cora Coralina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Principais classes dos Compostos Bioativos Fenólicos.

Figura 2 - Frutos nativos da família Myrtaceae: [A] Cagaita, [B] Cambuci, [C] Camu-camu, [D] Jabuticaba. (Fonte: Imagens retiradas do diretório Google Imagens).

Figura 3 - Alterações nos sistemas renina-angiotensina e calicreína-cinina que contribuem para o aumento da pressão sanguínea (Adaptado de Su, 2014).

Figura 4. Representação esquemática da formação do trombo como consequência da ruptura da placa de ateroma (Adaptado de Vilahur e Badimón (2013).

Figura 5 – Efeito inibitório dos extratos brutos de frutos nativos e frutas tradicionais sobre as enzimas α -amilase [A], α -glicosidase [B], lipase [C] e ECA [D]. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Letras minúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$). b.s.: amostra em base seca; BN: banana; CB: cambuci; CG: cagaita; CC: camu-camu; JB: jabuticaba LA: laranja; MÇ: maçã; MM: mamão; MG: manga.

Figura 6 – Cromatogramas e espectros UV de ácido elágico livre [1], derivados de ácido elágico [2], derivados de quercetina [3] e ácido elágico total [4] dos extratos obtidos a partir da polpa de cambuci antes e depois da digestão *in vitro*. A: fração Metanol:Amônia-270 nm (PA); B: fração Metanol -270 nm (PA); C: fração Metanol-270 nm (C18); ad: antes da digestão; dd: depois da digestão. Nos espectros UV, linhas azuis são as bandas de absorção dos extratos e linhas vermelhas são as bandas de absorção dos padrões.

Figura 7 – Cromatogramas e espectros UV de ácido elágico livre [1], derivados de ácido elágico [2], derivados de quercetina [3], ácido elágico total [4] e derivados de cianidina [5] dos extratos obtidos a partir da polpa de jabuticaba antes e depois da digestão *in vitro*. A: fração Metanol:Amônia-270 nm (PA); B: fração Metanol -270 nm (PA); C: fração Metanol-525 nm (PA); D: fração Metanol-270 nm (C18); ad: antes da digestão; dd: depois da digestão. Nos espectros UV, linhas azuis são as bandas de absorção dos extratos e linhas vermelhas são as bandas de absorção dos padrões.

Figura 8 – Efeito inibitório dos extratos enriquecidos em CBF, provenientes de polpas comerciais de cambuci [A] e jabuticaba [B], antes e depois da digestão *in vitro*, sobre a atividade da ECA. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Letras minúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significativas entre os IC50 dos extratos de cambuci [A] ou jabuticaba [B], antes e depois da digestão *in vitro* ($p \leq 0,05$). EAG: equivalente de ácido gálico; PA: poliamida; C18: octadecilsilano.

Figura 9 - Curvas de dose-resposta obtidas para os extratos provenientes da polpa de cambuci [A] e jabuticaba [B], antes e depois da digestão, sobre a atividade da ECA *in vitro*. ○ Antes da digestão; ● Depois da digestão; PA: poliamida; C18: octadecilsilano; EAG: Equivalente de ácido gálico.

Figura 10 - Curvas de dose-resposta obtidas para os extratos provenientes da polpa de cambuci [A] e jabuticaba [B], antes e depois da digestão, sobre a agregação plaquetária induzida por ADP *in vitro*. ○ Antes da digestão; ● Depois da digestão; PA: poliamida; C18: octadecilsilano; EAG: equivalente de ácido gálico.

Figura 11 - Efeito inibitório dos extratos enriquecidos em CBF, provenientes de polpas comerciais de cambuci [A] e jabuticaba [B], antes e depois da digestão *in vitro*, sobre a atividade da ECA. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Letras minúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significativas entre os IC50 dos extratos de cambuci [A] ou jabuticaba [B], antes e depois da digestão *in vitro* ($p \leq 0,05$). EAG: equivalente de ácido gálico; PA: poliamida; C18: octadecilsilano.

Figura 12 – Aprovação concedida pelo CEUA para a realização do ensaio com animais.

Figura 13 – Primeira aprovação concedida pelo CEUA para a realização de alterações no ensaio com animais.

Figura 14 – Segunda aprovação concedida pelo CEUA para a realização de alterações no ensaio com animais.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo de fenólicos totais e umidade de polpas comerciais de frutos nativos e das partes comestíveis de frutas tradicionais. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). b.s.: amostra em base seca.

Tabela 2 - Valores de IC50 expressos em massa de base seca da amostra (mg b.s./mL reação) e em conteúdo de fenólicos totais (μ g EAG/ mL reação). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). b.s.: amostra em base seca; EAG: equivalentes de ácido gálico. BN: banana; CB: cambuci; CG: cagaita; CC: camu-camu; JB: jabuticaba LA: laranja; MÇ: maçã; MM: mamão; MG: manga.

Tabela 3 - Bioacessibilidade dos CBF da polpa de cambuci, obtidos a partir da extração em fase sólida em resinas de C18 (octadecilsilano) e PA (poliamida). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$); EFS: Extração em fase sólida; EAG: equivalente de ácido gálico; b.s.: amostra em base seca; PB2: procianidina B2; C3R: cianidina-3-rutinosídeo; DMAC: método 4-dimetilaminocinamaldeído. *Calculado por diferença: ácido elágico total-ácido elágico livre.

Tabela 4 - Bioacessibilidade dos CBF da polpa de jabuticaba, obtidos a partir da extração em fase sólida em resinas de C18 (octadecilsilano) e PA (poliamida). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$); EFS: extração em fase sólida; EAG: equivalente de ácido gálico; b.s.: amostra em base seca; PB2: procianidina B2; C3R: cianidina-3-rutinosídeo; DMAC: método 4-dimetilaminocinamaldeído. *Calculado por diferença: ácido elágico total-ácido elágico livre.

Tabela 5 - Coeficiente de correlação de Pearson entre os compostos fenólicos identificados nos frutos estudados e os IC50 obtidos para a ECA. *p-valor estatisticamente significativo ($p < 0,001$). IC50: μ g EAG/mL reação; ECA: enzima conversora de angiotensina; FT: fenólicos totais; AEL: ácido elágico livre; DAE: derivados de ácido elágico; DQ: derivados de quercetina; DC: derivados de cianidina; ET: elagitaninos; PAC: proantocianidinas pelo método 4-dimetilaminocinamaldeído.

Tabela 6 – Capacidade inibitória dos CBF presentes nas polpas de cambuci e jabuticaba, antes e depois da digestão *in vitro*, sobre a atividade da ECA. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas entre os IC50 dos extratos de cambuci ou jabuticaba, antes e depois da digestão *in vitro* ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas entre os extratos de cambuci e jabuticaba, antes ou depois da digestão *in vitro*. b.s.: amostra em base seca.

Tabela 7 – Capacidade inibitória dos CBF presentes nas polpas de cambuci e jabuticaba, antes e depois da digestão *in vitro*, sobre a agregação plaquetária induzida por ADP Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas entre os IC50 dos extratos de cambuci ou jabuticaba, antes e depois da digestão *in vitro* ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas entre os extratos de cambuci e jabuticaba, antes ou depois da digestão *in vitro*. b.s.: amostra em base seca.

Tabela 8 - Valores de λ e respectivas funções utilizadas para transformar as respostas obtidas nas análises cujos dados não apresentaram distribuição normal. PA: poliamida; C18: octadecilsilano.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%: porcentagem	JB: jabuticaba
<: menor	C18: octadecilsilano
>: maior	PA: poliamida
≤: menor igual	b.s: base seca
®: marca registrada	et al.: e colaboradores
μg: micrograma	DAD: Detector de Arranjo de Diodo
μl: microlitro	DMAC: 4-dimetilaminocinamaldeído
μm: micrômetro	EPB: Equivalente de procianidina B2
μM: micromolar	C3R: cianidina-3-rutinosídeo
mg: miligrama	AEL: ácido elágico livre
ml: mililitro	DAE: derivados de ácido elágico
mM: milimolar	DQ: derivados de quercetina
g: grama	DC: derivados de cianidina
L: litro	ET: elagitanino
g: gravitacional	PAC: proantocianidina
M: molar	EAG: equivalente de ácido gálico
N: normal	CBF: compostos bioativos fenólicos
nm: nanômetro	DCM: doenças cardiometabólicas
m/v: massa por volume	DCV: doenças cardiovasculares
v/v: volume por volume	DB2: <i>diabetes mellitus</i> tipo 2
v/v/v: volume por volume por volume	PRP: plasma rico em plaquetas
°C: grau Celsius	ADP: adenosina difosfato
pH: potencial hidrogeniônico	DNA: ácido desoxirribonucleico
U: unidade	HDL: lipoproteína de alta densidade
UAF: unidade arbitrária de fluorescência	LDL: lipoproteína de baixa densidade
UV: ultravioleta	VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade
α: alfa	AGL: ácido graxo livre
β: beta	ERO: espécie reativa de oxigênio
λ: lâmbda	ECA: enzima conversora de angiotensina I
λ ex: comprimento de onda - excitação	GP: glicoproteico

λ em: comprimento de onda - emissão

min: minuto

rpm: rotação por minuto

nº: número

BN: banana

MÇ: maçã

MG: manga

MM: mamão

LA: laranja

CB: cambuci

CC: camu-camu

CG: cagaita

JB: jabuticaba

ad: antes da digestão

dd: depois da digestão

TA2: tromboxano A2

FT: fator tissular

FVII: fator de coagulação VII

TGI: trato gastrointestinal

ad: antes da digestão

dd: depois da digestão

DNS: 3,5-ácido dinitrosalicílico

DMSO: dimetilsufóxido

EEFS: extração em fase sólida

IC50: metade da concentração inibitória máxima

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 COMPOSTOS BIOATIVOS FENÓLICOS.....	16
1.2 FRUTOS NATIVOS BRASILEIROS DA FAMÍLIA MYRTACEAE.....	18
1.3 DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	21
1.4 ENZIMAS DIGESTIVAS E ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I..	24
1.5 AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	26
1.6 BIOACESSIBILIDADE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS FENÓLICOS.....	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
2.3 AMOSTRA.....	32
3.2 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE.....	32
3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROMETANÓLICOS (EXTRATO BRUTO).....	32
3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.....	33
3.5 <i>SCREENING</i> – DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DOS EXTRATOS BRUTOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	33
3.5.1 α-amilase pancreática.....	33
3.5.2 α-glicosidase.....	34
3.5.3 Lipase pancreática.....	34
3.5.4 Enzima Conversora de Angiotensina I.....	35
3.6 BIOACESSIBILIDADE – SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL.....	36
3.7 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS: EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	36
3.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	37
3.9 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO TOTAL.....	37
3.10 DETERMINAÇÃO DE PROANTOCIANIDINAS PELO MÉTODO 4-	

	DIMETILAMINOCINAMALDEÍDO (DMAC).....	38
3.11	DETERMINAÇÃO DE PROANTOCIANIDINAS PELO MÉTODO BUTANOL-HCL.....	38
3.12	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DOS EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ADP.....	39
3.13	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1	<i>SCREENING</i> – EFEITO <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS BRUTOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	41
4.2	BIOACESSIBILIDADE – EFEITO DA DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE OS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS POLPAS COMERCIAIS DE CÂMBUCI E JABUTICABA.....	48
4.3	EFEITO <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE A ATIVIDADE DA ECA.....	54
4.4	EFEITO <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ADP.....	61
5.	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICES.....	82
	ANEXOS.....	83

RESUMO

SANTIAGO, G. L. **Compostos bioativos fenólicos de frutos nativos da família Myrtaceae: Avaliação da bioacessibilidade e do potencial funcional relacionado às doenças cardiovasculares.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

As doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis pela maioria das mortes ocorridas em todo o mundo. Os riscos para o desenvolvimento destas patologias podem ser amenizados, em parte, por meio de uma dieta rica em alimentos de origem vegetal. Neste sentido, os frutos nativos brasileiros, como os pertencentes à família Myrtaceae, podem contribuir para melhorar a qualidade da alimentação, pois apresentam altos teores de compostos bioativos, entre eles, os fenólicos (CBF). Pouco se sabe sobre os efeitos dos polifenóis destes frutos para redução do risco de desenvolvimento das DCV. Sendo assim, este trabalho buscou avaliar a bioacessibilidade dos CBF presentes em polpas de cambuci e jabuticaba e seus efeitos *in vitro* sobre mecanismos de ação relacionados às DCV. Para tanto, extratos ricos em polifenóis foram obtidos a partir de extrações em fase sólida (C18 e PA) das polpas de ambos os frutos, submetidas ou não à simulação da digestão gastrointestinal. Estes extratos tiveram seus efeitos inibitórios sobre a atividade da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) e a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato avaliados *in vitro*. De acordo com os resultados obtidos, a digestão *in vitro* foi capaz de liberar os CBF da matriz alimentar. Tal bioacessibilidade parece ter sido importante apenas para a inibição da agregação plaquetária, uma vez que a capacidade inibitória destes compostos sobre a atividade da ECA não melhorou depois da digestão *in vitro*. Quanto aos resultados obtidos pelos extratos provenientes das colunas PA e C18, observa-se que as maiores concentrações de taninos nestes últimos não foram suficientes para melhorar a capacidade antiagregante, mas foram importantes para aumentar a inibição da atividade da ECA. Comparando-se as respostas apresentadas pelos dois frutos, os CBF presentes no cambuci exibiram, predominantemente, potenciais anti-hipertensivo e antiagregante maiores do que os da jabuticaba. Neste contexto, o consumo de cambuci e jabuticaba, bem como a utilização de seus polifenóis purificados, podem ser adjuvantes para a redução dos riscos relacionados ao desenvolvimento das DCV.

Palavras-chave: Cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg.), jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* O. Berg.), compostos fenólicos, enzima conversora de angiotensina I, agregação plaquetária.

ABSTRACT

SANTIAGO, G. L. **Bioactive phenolic compounds of native fruits from Myrtaceae family: Evaluation of bioaccessibility and functional potential related to cardiovascular diseases.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death worldwide. The risk of development of these disorders can be reduced, partially, by a vegetal-based diet. In this way, the Brazilian native fruits from Myrtaceae family may contribute to improve the diet quality, once they have high quantity of bioactive compounds, such as the phenolic (PC). The knowledge about the cardioprotective effects of consuming these fruit polyphenols is limited, so this study aimed to evaluate the bioaccessibility of the cambuci and jaboticaba PC and their *in vitro* potential on CVD-related mechanisms. First, gastrointestinal digestion simulation of each fruit pulp was done, and then the polyphenols rich extracts were obtained by solid phase extractions, before and after the pulps digestion. The polyphenols rich extracts had their phenolic concentrations determined and were used to evaluate the capacity of PC in inhibit the Angiotensin Converting Enzyme (ACE) activity and the platelet aggregation induced by ADP. The results were expressed as IC₅₀, considering the total phenolic content per milliliter of reaction. According to the results, the *in vitro* digestion process was able to release the polyphenols from the food matrix. Therefore, the bioaccessibility had no significant effect on ACE activity, but decreased the IC₅₀ values of platelet aggregation. In relation to the extracts from PA and C18 columns, the higher tannin concentration. In comparison to the IC₅₀ values presented by PA extracts, the higher concentrations of tannins in the last one were not enough to improve the antiaggregant effect, but were important to increase the inhibition of ACE activity. Cambuci polyphenols presented higher antihypertensive and antiaggregant potentials than the jaboticaba compounds. In this respect, the ingestion of cambuci and jaboticaba and the use of their purified polyphenols can be of particular importance in reducing the risk for the CVD development.

Keywords: Cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg.), jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* O. Berg.), phenolic compounds, angiotensin converting enzyme, platelet aggregation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 COMPOSTOS BIOATIVOS FENÓLICOS

Os compostos bioativos fenólicos (CBF), conhecidos como polifenóis ou compostos fenólicos, são produtos do metabolismo secundário de plantas, cuja síntese foi viabilizada no decorrer do processo evolutivo. A produção destes compostos possibilitou a adaptação das plantas frente às constantes mudanças sofridas pelo meio ambiente, tais como a incidência de raios ultravioleta e a ação de pragas e patógenos (CHEYNIER et al., 2013). Além disso, os CBF contribuem para o sabor, cor, odor e estabilidade oxidativa do vegetal (PANDEY; RIZVI, 2009).

Estes compostos apresentam, em sua estrutura química, no mínimo um anel aromático ligado a um ou mais grupamentos hidroxílicos e podem ser encontrados em sua forma livre ou associados a açúcares e ácidos orgânicos. Com base no número e disposição de seus átomos de carbono, os CBF podem ser divididos em flavonoides e não-flavonoides (DEL RIO et al., 2013) (**Figura 1**).

Os flavonoides, constituídos por dois anéis aromáticos conectados por um anel heterocíclico (C6-C3-C6), são o grupo de polifenóis mais abundante no reino vegetal e se encontram, na maioria das vezes, na forma glicosilada. Este grupo é dividido em subclasses, por exemplo, antocianinas, flavanonas, isoflavonas, flavonas, flavonóis e flavanóis, sendo que esta última pode apresentar desde simples monômeros até proantocianidinas poliméricas, conhecidas como taninos condensados. Estes compostos podem se apresentar como polímeros de até 50 unidades, sendo que as proantocianidinas mais abundantes nas plantas são constituídas exclusivamente de unidades de (epi)catequinas, denominadas procianidinas (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Os compostos não flavonoides de maior importância para a dieta humana são os ácidos fenólicos. Este grupo é subdividido em ácidos hidroxicinâmicos (C6-C3), dentre os quais estão os ácidos cumárico, caféico e cinâmico, e em ácidos hidroxibenzoicos (C6-C1), como os ácidos vanílico, salicílico, elágico e gálico (BRAVO, 1998). Alguns ácidos fenólicos são precursores da biossíntese dos taninos hidrolisáveis. Geralmente este processo ocorre a partir da esterificação dos grupamentos hidroxílicos de um poliol pelo ácido gálico, formando os galotaninos, ou pelo ácido hexahidroxidifênico, que por sua vez originam os elagitatinos, estes últimos formam o maior grupo de taninos conhecidos. A hidrólise dos elagitatinos libera ácido difênico, que se rearranja espontaneamente para ácido elágico (KHANBABAEI; REE, 2001).

Figura 1 – Principais classes dos Compostos Bioativos Fenólicos

Uma dieta rica em frutas e hortaliças apresenta baixa densidade calórica, fornece grande variedade de nutrientes essenciais ao organismo e é fonte exclusiva de fitoquímicos, como os polifenóis. Os fitoquímicos são considerados constituintes extra nutricionais, uma vez que não são necessários para a manutenção da vida, mas proporcionam benefícios para a saúde. Logo, podem contribuir para a redução do risco de doenças cardiometabólicas (DCM) (MANACH et al., 2016).

Estudos epidemiológicos associados a meta-análises têm demonstrado relação positiva entre a saúde humana e o consumo, por longo prazo, de dietas ricas em polifenóis (VAUZOUR et al., 2010; DEL RIO, et al., 2013). Por muito tempo, o principal mecanismo de ação relacionado aos benefícios dos CBF à saúde humana esteve associado à sua estrutura química, responsável pelo sequestro de radicais livres e consequente proteção celular contra danos oxidativos. Porém, em uma visão emergente, os polifenóis e seus metabólitos não agem como meros doadores de hidrogênio ou elétrons, mas exercem interações diretas com receptores celulares ou enzimas envolvidas em vias de sinalização. Portanto, podem regular fatores de transcrição e metilação do DNA, induzir autofagia de material intracelular desnecessário, estimular a fosforilação oxidativa e modular o estado redox da célula, contribuindo para sua sobrevivência ou, se necessário, sua apoptose (TSAO, 2010; KIM et al., 2014).

1.2 FRUTOS NATIVOS BRASILEIROS DA FAMÍLIA MYRTACEAE

O Brasil detém a maior biodiversidade do mundo graças aos seus biomas de características distintas, os quais correspondem a aproximadamente 20% do número total das espécies terrestres (MAM, 2016). Além disso, é o terceiro maior produtor de frutas do mundo e o oitavo maior produtor de frutas tropicais, dentre as quais se enquadram as nativas (FAO, 2018). Entre as plantas nativas de alguns destes biomas destaca-se a família Myrtaceae, peculiar da flora brasileira e de especial ocorrência na Mata Atlântica. Está classificada entre as dez famílias mais diversas de angiospermas recorrentes no Brasil e apresenta 928 espécies catalogadas, sendo responsável pelo segundo maior percentual de espécies endêmicas (76,2%) no território nacional (INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2010).

As mirtáceas brasileiras geralmente não produzem madeiras valiosas, contudo há numerosas espécies frutíferas encontradas desde o Amazonas até a região Sul do Brasil. Seus frutos como cagaita, cambuci, camu-camu e jabuticaba (**Figura 2**) podem ser consumidos *in natura* ou processados na forma de polpas, sorvetes, doces, geleias e licores, o que demonstra o grande potencial econômico apresentado pelas espécies desta família (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006).

Figura 2 - Frutos nativos da família Myrtaceae: [A] Cagaita, [B] Cambuci, [C] Camu-camu, [D] Jabuticaba (Imagens retiradas do diretório Google Imagens).

Entre as mirtáceas inerentes ao bioma Cerrado, considerado a savana mais rica do mundo, encontra-se a cagaita (*Eugenia dysenterica* DC). A cagaiteira frutifica em meados de setembro e outubro, seus frutos apresentam cor amarelo-pálida e têm de dois a três centímetros de diâmetro. Sua polpa é conhecida por suas propriedades laxativas, é fonte de vitamina C e possui quantidades de β -caroteno e folato que suprem suas recomendações diárias (MEC, 2008; CARDOSO et al., 2011). Além disso, apresenta quantidade significativa de polifenóis, como os derivados de quercetina e de campferol, ácido elágico, elagitaninos e proantocianidinas, associados à redução do risco de obesidade e suas complicações metabólicas (GENOVESE et al., 2008; DONADO-PESTANA; BELCHIOR; GENOVESE, 2015). Outra espécie desta família é a *Myrciaria dubia* Mc. Vaugh, popularmente conhecida como camu-camu, encontrada na Amazônia, maior bioma brasileiro. Este fruto apresenta cerca de dois centímetros e meio de diâmetro, é uma baga globosa cuja cor varia de verde a vermelho de acordo com seu grau de maturação. Sua polpa é macia e succulenta, porém apresenta elevada acidez em função do alto teor de vitamina C (2 g por 100 g de fruto), maior que o encontrado em frutas consideradas ricas neste nutriente (CHIRINOS et al., 2010). Ademais, o camu-camu é fonte de CBF como derivados de cianidina, quercetina, miricetina e campferol, ácido gálico e elagitaninos. Estes

compostos, presentes em extratos brutos de camu-camu, contribuíram para melhorar o perfil lipídico e reduzir o estresse oxidativo em ratos diabéticos (AKTER et al, 2012; GONÇALVES et al., 2014).

A jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* O. Berg.) e o cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg.) são duas espécies da família Myrtaceae com predominância na Mata Atlântica, bioma que se estende por 17 estados do território brasileiro. A frutificação das jabuticabeiras ocorre geralmente entre os meses de agosto e novembro, sendo que dentre os frutos nativos abordados neste trabalho, a jabuticaba é o mais apropriado para consumo *in natura*, pois apresenta sabor doce e ligeiramente ácido. Além disso, pode ser consumida em sua forma processada e utilizada na produção de cosméticos, o que contribui para seu alto potencial de comercialização. É considerada fonte de β -caroteno, potássio e ferro. Seu teor de CBF também é significativo, uma vez que apresenta concentrações elevadas de ácido elágico, elagitaninos, proantocianidinas e derivados de cianidina, estes últimos, responsáveis pela cor roxo-escuro da casca do fruto (ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2011; INADA et al., 2015). O consumo diário de jabuticaba liofilizada, por ratos diabéticos, reduziu os níveis plasmáticos de triacilgliceróis e colesterol e aumentou a atividade de enzimas que desempenham funções antioxidantes (ALEZANDRO; GRANATO; GENOVESE, 2013). Já em ratos submetidos à dieta hiperlipídica, a ingestão da casca desta fruta reduziu a insulina sérica e aumentou os níveis de HDL-colesterol (LENQUISTE et al., 2012).

O cambuci é o fruto do cambucizeiro, apresenta forma romboide, coloração verde e é extremamente aromático e suculento. Contém razoáveis concentrações de vitamina C, minerais e fibras alimentares, porém apresenta limitações ao consumo *in natura* devido ao baixo teor de açúcar, elevada acidez e adstringência (VALLILO et al., 2005; SANCHES AZEVEDO et al., 2017). Por outro lado, o consumo desta fruta pode contribuir para a ingestão de compostos fenólicos, como os derivados de quercetina, ácido elágico, elagitaninos e proantocianidinas. Extratos de cambuci ricos em polifenóis foram responsáveis por garantir a homeostase da glicose em camundongos alimentados com dieta hipercalórica. Além disso, reduziram a expressão de citocinas pró-inflamatórias e elevaram os níveis de HDL-colesterol (DONADO-PESTANA et al., 2015). Ainda, um recente estudo realizado com 23 voluntários saudáveis demonstrou que o consumo de sucos clarificados de cagaita, cambuci, camu-camu e jabuticaba contribuiu para reduzir as concentrações séricas de glicose (BALISTEIRO et al., 2017).

Um trabalho de revisão realizado por Donado-Pestana et al. (2018), demonstrou que os compostos fenólicos presentes em cagaita, cambuci, camu-camu e jabuticaba estão diretamente relacionados a efeitos positivos, *in vitro* e *in vivo*, contra a obesidade e suas complicações. Estes

efeitos são atribuídos ao perfil e à quantidade de fenólicos totais presentes nos frutos nativos da família das mirtáceas. Este conteúdo é superior às concentrações encontradas em frutas tradicionais como banana, laranja, maçã, mamão e manga (PATTHAMAKANOKPORN et al, 2008; ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012; CHEN et al., 2014), sendo estas cinco frutas as mais consumidas pela população brasileira, segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (2010). Considerando estas informações, os frutos nativos, ainda subexplorados, têm despertado o interesse da agroindústria. Logo, a exploração comercial destas espécies é favorecida, tornando-as possíveis fontes de renda para povos locais e de consumo acessível para uma grande parte da população, contribuindo para a promoção da saúde e redução do risco de DCM (RUFINO et al., 2010).

1.3 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A obesidade e a síndrome metabólica são fatores de risco para o desenvolvimento de DCM. Estas doenças, representadas principalmente pelas doenças cardiovasculares (DCV) e pelo *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), constituem um importante problema para a saúde pública (MANACH et al., 2016). As DCV são responsáveis por 31% das mortes ocorridas no mundo, configurando a maior causa de morte, fato que se comprova no Brasil. As doenças coronarianas e o acidente vascular cerebral são os principais contribuintes para estes óbitos e se caracterizam como eventos agudos causados pelo bloqueio do fluxo sanguíneo para o coração e cérebro (WHO, 2016).

As DCV podem ser desencadeadas a partir de alterações metabólicas, como aquelas decorrentes da hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo, presentes no excesso de peso e na obesidade (SCHERER; HILL, 2016). O aumento da adiposidade, em especial no tecido adiposo visceral, quase sempre resulta em um elevado *turnover* de ácidos graxos livres (AGL). Pelo sistema portal, estes AGL chegam aos hepatócitos onde podem ser utilizados como substratos para a síntese de triacilgliceróis que serão armazenados e/ou secretados como VLDL, contribuindo para o aumento da adiposidade e dislipidemia, respectivamente (CORNIER et al., 2008).

Estes AGL também participam da gliconeogênese, que acarreta na diminuição da captação hepática de glicose e, portanto, reduz a sensibilidade à insulina nos músculos, fígado e tecido adiposo. Para compensar os elevados níveis de glicose sérica provenientes da resistência à insulina, as células β pancreáticas aumentam a secreção deste hormônio. Todavia, em indivíduos suscetíveis, esta hipersecreção pode se tornar ineficiente em resposta à disfunção

das células β pancreáticas. Isto desencadearia um estado de glicolipotoxicidade, responsável pela apoptose de células β pancreáticas e consequente instalação de DM2 (FU; GILBERT; LIU, 2013). Não obstante, o tecido adiposo excessivo apresenta elevada secreção de resistina e adipocinas, bem como alta infiltração de células imunes, em especial macrófagos com fenótipo M1, os quais sintetizam citocinas pró-inflamatórias e colaboram para o estresse oxidativo celular. Estes eventos acentuam a inflamação, estimulam a vasoconstrição e promovem resistência à insulina e lipólise de triacilgliceróis (FUSTER et al., 2016).

Embora a hipersecreção compensatória de insulina seja responsável por evitar o desenvolvimento de DM2 em muitos indivíduos obesos, sabe-se que a hiperinsulinemia corrobora para reabsorção de sódio e ativação do sistema nervoso simpático, contribuindo para a elevação da pressão sanguínea (CORNIER et al., 2008). Ademais, o DM2 está associado a inúmeras complicações cardiovasculares, cujos mecanismos são fundamentados na constante produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO desviam intermediários do sistema glicolítico para vias de sinalização de células patogênicas, facilitam o transporte nuclear de fatores de transcrição pró-aterogênicos e acentuam o estresse oxidativo mitocondrial, estimulando a transcrição de genes promotores de aterosclerose (SHAH; BROWNLEE, 2016).

De modo geral, a fisiopatologia básica das DCV se apoia no desequilíbrio entre as substâncias vasoativas que controlam a estrutura e a função vascular. O predomínio de substâncias vasoconstritoras, como a angiotensina II, em relação às vasodilatadoras, como o óxido nítrico, acarreta a disfunção endotelial, prejudicando a vasodilatação endotélio dependente, o que pode resultar na redução do fluxo sanguíneo (FAVERO et al., 2014).

A fim de compensar este estado não fisiológico, o organismo lança mão de alguns mecanismos, como a liberação de renina. Esta enzima atua sobre o angiotensinogênio produzido pelo fígado, convertendo-o em angiotensina I que é transformada, pela enzima conversora de angiotensina I (ECA), em angiotensina II, cuja resposta é o aumento da pressão sanguínea. Esta resposta ocorre em função da ligação da angiotensina II especialmente a receptores do tipo AT1, responsáveis pela transdução da maioria das ações deste peptídeo, tais como a diferenciação e proliferação celular, o aumento da reabsorção tubular de sódio e água, hipersecreção de substâncias vasoconstritoras e a ativação do sistema nervoso simpático. Além disso, a angiotensina II catalisa a inativação da bradicinina impedindo-a de exercer suas propriedades vasodilatadora e natriurética (CAREY, 2015).

Além de aumentar a pressão sanguínea, a angiotensina II juntamente com outros fatores de risco contribui para o estresse oxidativo vascular, induz a expressão de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias no endotélio e promove proliferação e migração de células

musculares lisas. O estresse oxidativo no endotélio facilita a entrada de LDL na camada íntima do vaso sanguíneo, que após ser oxidada desencadeia um processo inflamatório local por meio da produção de moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento. Como consequência, ocorre a proliferação de macrófagos com expressão de receptores *scavengers*, responsáveis por capturar a LDL oxidada e assim, originar as células espumosas, que por sua vez induzem a formação da placa de ateroma. Quando ocorre apoptose das células espumosas há a formação de um núcleo necrótico, que assim como as células espumosas funcionais, pode ser coberto por células musculares lisas, formando uma placa fibrosa que pode se romper (SUGAMURA; KEANEY, 2011; CAREY, 2015).

A hiperatividade plaquetária, geralmente presente em indivíduos portadores de DM2, resistentes à insulina, obesos e/ou tabagistas, contribui para a adesão e agregação plaquetária no local da ruptura desta placa, favorecendo a trombogênese que, assim como a placa de ateroma, pode diminuir ou ocluir a luz dos vasos sanguíneos e promover isquemia e consequentes complicações cardiovasculares. Ademais, qualquer estímulo inflamatório nos vasos sanguíneos facilita a adesão das plaquetas ao endotélio, uma vez que estas células promovem um desajuste de mecanismos antiadesivos na parede vascular e aumentam a expressão de moléculas de adesão no endotélio, o que pode contribuir para a ocorrência de estenose do vaso sanguíneo (LUSIS, 2000; GHOSHAL; BHATTACHARYYA, 2014).

O estilo de vida constitui um dos principais desencadeantes do desenvolvimento das DCV, pois são hábitos diários como dieta pouco saudável, inatividade física, tabagismo e alcoolismo que contribuem para ocasionar fatores de risco como hiperglicemia, dislipidemia e aumento da circunferência da cintura, da pressão sanguínea e da atividade plaquetária (WHO, 2016).

Estudos têm demonstrado a importância do consumo de alimentos fontes de CBF, uma vez que estão diretamente relacionados com a redução do risco de desenvolvimento de DCV. Diversos efeitos são sugeridos para explicar estes resultados e muitos deles demonstram o papel dos CBF na imunomodulação e na redução do estresse oxidativo celular, cuja consequência é a diminuição do processo inflamatório (GARCIA-CONESA, 2015). O estudo TOSCA.IT, realizado com 2573 voluntários portadores de DM2, demonstrou que a ingestão de uma dieta rica em CBF está associada à redução de fatores de risco para DCV e a um menor grau de inflamação subclínica nestes indivíduos (VITALE et al., 2016).

Estes compostos parecem participar do controle pressórico, melhoram a função endotelial e o perfil lipídico sérico, aumentam a atividade antiplaquetária e normalizam os níveis de glicose e insulina plasmáticas. Alguns mecanismos relacionados a estas ações são

decorrentes da inibição de transportadores de glicose e de enzimas envolvidas na homeostase deste nutriente, como a α -amilase pancreática e enzimas presentes na borda em escova do intestino delgado, denominadas α -glicosidases (ANHÊ et al., 2013). Ademais os referidos compostos podem estimular a vasodilatação endotélio-dependente e suprimir a síntese de vasoconstritores, bem como inibir a atividade da lipase pancreática e da ECA, enzimas implicadas na digestão de lipídeos e na regulação da pressão sanguínea, respectivamente. Ainda, podem modular as interações intercelulares e a atividade das plaquetas de forma a atenuar respostas relacionadas à hiperagregabilidade destas células (RANGEL-HUERTA et al., 2015).

1.4 ENZIMAS DIGESTIVAS E ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I

Como mencionado, algumas condições patológicas como DM2, obesidade, dislipidemia e aumento da pressão sanguínea têm importante papel no desenvolvimento e na complicação das DCV. Uma das características destas patologias é o desequilíbrio na homeostase da glicose e dos ácidos graxos, que ocorrem, na maioria das vezes, em função da desproporção entre o consumo destes nutrientes e o gasto energético do indivíduo.

Para que os carboidratos e os lipídeos sejam absorvidos e utilizados pelo organismo é necessário que enzimas como α -amilase, α -glicosidase e lipase exerçam suas atividades no trato gastrointestinal, sendo que quanto maior a disponibilidade destes nutrientes maior a atividade desempenhada por estas enzimas (GOODMAN, 2010).

As α -amilases, presentes na saliva e no suco pancreático, são enzimas responsáveis pela digestão do amido dietético. A α -amilase pancreática é uma endo-hidrolase cujo sítio ativo encontra-se entre os domínios A e B, onde acontece a hidrólise das ligações glicosídicas α -D-(1 $\rightarrow$ 4). Por conseguinte, ocorre a liberação de dextrinas, as quais consistem em uma mistura de maltose, maltotriose e oligossacarídeos (WHITCOMB; LOWE, 2007). A digestão destes produtos, bem como de outros dissacarídeos livres da dieta, ocorre pela ação de exo-hidrolases presentes na borda em escova do intestino delgado, denominadas α -glicosidases. Após completa digestão do amido e dos dissacarídeos livres, ocorre a liberação de monossacarídeos, principalmente glicose, que serão absorvidos pelo epitélio intestinal (LIN; LEE; CHANG, 2015).

A lipase pancreática é a principal enzima envolvida na digestão dos triacilgliceróis dietéticos. É constituída por uma cadeia oligomérica, na qual se encontram os domínios N e C-terminal. Uma vez ativa, esta enzima hidrolisa triacilgliceróis previamente emulsificados pelos

sais biliares, liberando ácidos graxos e mono/diglicerídeos. Estes ácidos graxos podem passar pelo processo de β -oxidação, gerando energia ou são armazenados no tecido adiposo, enquanto as moléculas de glicerol são utilizadas pelo fígado para a produção de glicogênio (MILED et al., 2000; WHITCOMB; LOWE, 2007).

Conhecendo a função de α -amilase, α -glicosidase e lipase, abordagens terapêuticas foram desenvolvidas visando a inibição da atividade de tais enzimas. Desta maneira, é possível diminuir a hidrólise e consequente absorção de carboidratos e lipídeos, e assim, atenuar suas concentrações no organismo, contribuindo para o tratamento e redução de risco de doenças como DM2, obesidade e suas complicações (TUCCI; BOYLAND; HALFORD, 2010).

Do mesmo modo, a inibição da atividade da ECA constitui um dos modelos farmacológicos utilizados no tratamento do aumento da pressão sanguínea, prevalente em aproximadamente 40% da população mundial com idade maior que 25 anos. Esta patologia é determinada por valores da pressão sanguínea sistólica maiores ou iguais a 140 mm Hg e/ou da pressão sanguínea diastólica maior ou igual a 90 mm Hg. A elevação destes valores é diretamente proporcional ao aumento do risco de danos ao coração e aos vasos sanguíneos de órgãos como cérebro e rins (WHO, 2014).

Existem duas isoformas desta enzima, a ECA testicular e a ECA somática, sendo esta última diretamente envolvida no sistema renina-angiotensina. A forma somática é expressa como ectoenzima na superfície das células endoteliais por todo o organismo, especialmente nos pulmões, rins e intestino. A ECA encontrada na circulação sanguínea é decorrente da clivagem do domínio transmembrânico da ECA somática, o qual é responsável por mantê-la ancorada no tecido (SPARKS et al., 2014).

Esta enzima é uma zinco-metaloprotease de cadeia polipeptídica simples, cuja estrutura apresenta dois domínios catalíticos (amino e carboxi-terminal), ambos dependentes do íon cloreto e com diferentes perfis de inibição. O domínio carboxi-terminal é responsável por converter a angiotensina I em angiotensina II, um peptídeo vasoconstritor. Todavia, a ECA também pode inativar a bradicinina, peptídeo com propriedades vasodilatadoras e natriuréticas, por meio de sua atuação no sistema caliceína-cinina. Todos estes efeitos, quando em desequilíbrio, contribuem para o aumento pressórico (WEI et al., 1991; SU, 2014) (**Figura 3**).

Tratamentos alternativos baseados no uso de fitoquímicos, como os CBF presentes em plantas medicinais, têm demonstrado efeitos promissores na inibição das enzimas digestivas e da ECA (ASGAR, 2013; SHUKOR et al., 2013; BUCHHOLZ; MELZIG, 2015). Um trabalho de revisão demonstrou a importância dos polifenóis sobre a inibição da atividade da ECA. As antocianinas delfinidina-3-O-sambubiosídeo e cianidina-3-O-sambubiosídeo, isoladas de

extratos de hibisco, foram eficientes em inibir a ECA de maneira dose-dependente. Esta inibição também foi demonstrada pelos flavanóis, tais como os monômeros e polímeros de catequina e epicatequina, presentes em chás e no chocolate amargo. Os flavonóis, quercetina e campferol, bem como compostos pertencentes às classes flavonas e isoflavonas, também apresentam potencial anti-hipertensivo (BALASURIYA; RUPASINGHE, 2011).

Figura 3- Alterações nos sistemas renina-angiotensina e calicreína-cinina que contribuem para o aumento da pressão sanguínea (Adaptado de Su, 2014).

Portanto, é pertinente a realização de estudos que avaliem a capacidade inibitória dos CBF presentes em frutos nativos do Brasil, bem como de frutas tradicionais consumidas pela população brasileira, sobre a atividade das enzimas α -amilase pancreática, α -glicosidase, lipase pancreática e ECA. Para isso, um *screening* foi realizado a fim de comparar a eficiência dos extratos destas amostras, e assim, definir as duas frutas com efeitos inibitórios mais potentes sobre estas enzimas.

1.5 AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados presentes no sangue e se originam na medula óssea a partir dos megacariócitos. Seu papel primário está associado a hemostasia, podem apresentar atributos multifuncionais e ser utilizadas como marcadores para diversas doenças, como as cardiovasculares. No sistema hemostático, as plaquetas são responsáveis pelo processo de coagulação, sendo capazes de minimizar a perda sanguínea e

manter a integridade do endotélio, possibilitando o fluxo sanguíneo regular. Entre as complicações decorrentes do mal funcionamento deste sistema está a formação de trombos (GHOSHAL; BHATTACHARYYA, 2014).

Como pode ser observado na **Figura 4**, os mecanismos de ação necessários para a formação do trombo são estimulados principalmente a partir da presença de algum dano vascular, o qual expõe as plaquetas a componentes da matriz subendotelial, tais como o fator von Willebrand e o colágeno, promotores da adesão plaquetária ao local lesionado. As plaquetas aderidas são ativadas e passam a apresentar pseudópodes, expressam receptores de adesão como as integrinas e complexos glicoprotéicos (GP) e secretam agentes autócrinos, como a adenosina difosfato (ADP) e o tromboxano A2 (TA2), os quais possibilitam a ativação de outras plaquetas e a agregação entre elas, resultando na formação de um tampão hemostático primário. Outra substância exposta a partir da ruptura do vaso é o fator tissular (FT), responsável pela ativação do fator de coagulação VII (FVII). O complexo FT/FVII possibilita uma cascata de eventos que envolvem diversos fatores de coagulação, a qual culmina na formação de protrombinase, enzima que converte protrombina em trombina. O fibrinogênio se liga a receptores GPIIb/IIIa, presentes nas plaquetas, contribuindo para a agregação destas células, simultaneamente, a trombina pode clivar outras unidades de fibrinogênio dando origem à fibrina, uma proteína que estabiliza o tampão hemostático primário, possibilitando a formação do trombo (VERSTEEG et al., 2013).

Figura 4. Representação esquemática da formação do trombo como consequência da ruptura da placa de ateroma (Adaptado de Vilahur e Badimón (2013)).

Para evitar a ativação excessiva do sistema de coagulação, o organismo conta com inibidores fisiológicos deste processo, tais como o inibidor da via do FT, as proteínas C e S e a antitrombina. Ademais, o sistema fibrinolítico é de grande importância para a hemostasia, pois promove o equilíbrio entre a formação e a dissolução do coágulo, evitando eventos hemorrágicos e trombóticos (GHOSHAL; BHATTACHARYYA, 2014).

Indivíduos portadores de DM2, resistentes à insulina, obesos e/ou tabagistas geralmente apresentam comprometimento do sistema hemostático, tais como: disfunção endotelial; hiperatividade e hipercoagulabilidade plaquetária; alta produção hepática de fatores de coagulação e de fibrinogênio e/ou baixa atividade do sistema fibrinolítico. Todas estas alterações podem acarretar complicações cardiovasculares, como a aterotrombose. Uma das abordagens terapêuticas para a redução do risco destas complicações é a utilização de antiagregantes plaquetários, os quais apresentam diferentes vias de atuação (ALESSI; JUHAN-VAGUE, 2008). Entre os mecanismos de ação atribuídos a estes fármacos estão a prevenção da produção de TA2 e a inibição de receptores de superfície das plaquetas, como o complexo GPIIb/IIIa, as integrinas e o receptor para ADP (P2Y₁₂).

Entre as novas abordagens terapêuticas estudadas estão aquelas fundamentadas na utilização de compostos bioativos de alimentos, tais como os polifenóis, os quais têm demonstrado potencial antiagregante cujos mecanismos de ação podem ser equiparados àqueles desempenhados pelas drogas já existentes (VILAHUR; BADIMON, 2013). De acordo com o trabalho de revisão realizado por Santhakumar et al. (2014), compostos fenólicos de várias classes podem inibir a agregação das plaquetas. As catequinas e epicatequinas presentes no cacau diminuíram a agregação das plaquetas por diversos mecanismos, enquanto a quercetina e o ácido elágico foram eficientes em inibir a agregação induzida por ADP.

1.6 BIOACESSIBILIDADE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS FENÓLICOS

Biologicamente, para que os CBF exerçam efeitos para além do trato gastrointestinal (TGI), tais como inibição da ECA e inativação de receptores plaquetários, é necessário que estes compostos estejam biodisponíveis. Para isso, devem ser absorvidos, metabolizados, transportados pela circulação, e por meio desta, alcançarem os tecidos-alvo em concentrações efetivas (VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2014).

Entre os processos que contribuem para a biodisponibilidade destes compostos está a bioacessibilidade, que consiste na liberação do composto da matriz alimentar e na manutenção da sua estabilidade durante o processo digestivo (ALMINGER et al., 2014). Tal liberação é

fundamental para a absorção dos polifenóis e ocorre, de forma geral, desde a boca até o intestino a partir de ações mecânicas (mastigação, peristaltismo), químicas (pH e temperatura) e enzimáticas (OZDAL et al., 2016). Geralmente, os CBF encontrados nos vacúolos das plantas, bem como aqueles associados de forma fraca à parede celular do vegetal são liberados a partir de processos mecânicos, enquanto os polifenóis que estão ligados fortemente à parede celular são liberados como consequência de atividades químicas e enzimáticas presentes no TGI (TAGLIAZUCCHI et al., 2010).

As agliconas bioacessíveis são absorvidas por transporte passivo ou paracelular, pois têm baixo peso molecular e são substâncias hidrofóbicas. Entretanto, a maioria dos CBF liberados da matriz alimentar está sob a forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros, os quais são muito hidrofílicos. Estes compostos podem sofrer modificações estruturais que garantam o aumento de sua lipofilicidade e consequente absorção (DOMÍNGUEZ-AVILA et al., 2017).

Existem dois principais mecanismos pelos quais os glicosídeos são modificados estruturalmente e liberam agliconas passíveis de absorção. O primeiro é mediado pela enzima lactase florizina hidrolase, presente na borda em escova das células do epitélio intestinal, responsável pela desglicosilação destes compostos. O segundo ocorre por intermédio de transportadores de glicose dependentes de sódio, os quais conduzem os glicosídeos até o interior das células epiteliais para serem hidrolisados por β -glicosidases citosólicas (VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2014). Algumas vezes estes mecanismos são insuficientes para garantir a absorção de alguns CBF, como os taninos e polifenóis associados à fibra alimentar. Tais compostos seguem até o cólon onde podem modular o perfil da microbiota ou serem hidrolisados por enzimas bacterianas, cujos principais produtos são os ácidos fenólicos (OZDAL et al., 2016).

Os compostos liberados pelos mecanismos supracitados podem sofrer reações de fase II ainda nos enterócitos ou, após serem absorvidos, podem alcançar o fígado e serem metabolizados mediante reações de conjugação. Estas reações são catalisadas por três principais enzimas (catecol-*O*-metiltransferase, UDP-glicuroniltransferase e sulfotransferase), as quais garantem a formação de metabólitos ativos que atuarão em locais específicos e aumentam a solubilidade dos CBF, tornando-os suscetíveis a excreção (VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2014).

Embora a biodisponibilidade seja essencial para que os polifenóis desempenhem suas funções no organismo, é imprescindível reconhecer o importante papel da bioacessibilidade destes compostos para que um metabólito apresente atividade biológica. Fatores como a complexidade da matriz alimentar e a estrutura química do composto podem interferir na

bioacessibilidade. Saura-Calixto, Serrano e Goñi (2007) demonstraram que apenas cerca de 48% dos polifenóis dietéticos encontram-se bioacessíveis no intestino delgado.

Tendo em vista que os polifenóis mais bioacessíveis não são necessariamente aqueles presentes em maior concentração no alimento, é pertinente investigar a liberação dos compostos fenólicos da matriz alimentar de frutos nativos brasileiros, considerados fontes destas substâncias. Tal investigação pode ser realizada por meio da simulação da digestão gastrointestinal, uma vez que este processo é determinante para a biodisponibilidade e bioatividade destes compostos.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a bioacessibilidade dos CBF presentes em frutos nativos brasileiros da família Myrtaceae e seus efeitos *in vitro* sobre mecanismos de ação relacionados ao desenvolvimento das DCV.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Realizar um *screening* dos extratos brutos para avaliar a capacidade inibitória dos CBF de frutas tradicionais (banana, laranja, maçã, mamão e manga) e frutos nativos (cagaita, cambuci, camu-camu e jabuticaba), sobre a atividade das enzimas α -amilase pancreática, α -glicosidase, lipase pancreática e ECA;
- ❖ Selecionar, por meio do *screening*, as duas frutas com a melhor capacidade inibitória sobre a atividade das enzimas citadas acima;
- ❖ Determinar o efeito da digestão *in vitro* dos frutos selecionados, sobre o conteúdo e o perfil de seus CBF;
- ❖ Avaliar a capacidade inibitória dos CBF das polpas de cambuci e jabuticaba, obtidos antes e depois da digestão *in vitro*, sobre a atividade da ECA;
- ❖ Verificar a capacidade inibitória dos CBF das polpas de cambuci e jabuticaba, obtidos antes e depois da digestão *in vitro*, sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Foram utilizadas polpas comerciais congeladas dos frutos nativos e polpas obtidas em laboratório a partir da homogeneização das partes comestíveis das frutas tradicionais *in natura*. As polpas de cagaita (Lote: 2255, data de fabricação: fevereiro/2016), cambuci (Lote: 2166, data de fabricação: janeiro/2016) e jabuticaba (Lote: 2186, data de fabricação: fevereiro/2016) foram adquiridas na empresa Sítio do Bello (Paraibuna, São Paulo) e a polpa de camu-camu (Lote: 0012222, data de fabricação: março/2016) foi fornecida pela empresa Bela Iaçá (Castanhal, Pará). As frutas tradicionais (banana nanica, laranja pêra, maçã fuji, mamão formosa e manga Tommy) foram obtidas em abril de 2016 na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo, prontas para consumo.

A amostragem para as polpas comerciais e para laranja, maçã e banana foi realizada com base numa amostra com peso líquido igual a um quilograma. Para manga e mamão, o peso líquido considerado foi de dois e quatro quilogramas, respectivamente. Após homogeneizar cada amostra em liquidificador doméstico, dez por cento de sua massa final foram armazenados em embalagem à vácuo sob temperatura de -20°C até o momento das extrações.

3.2 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE

A umidade das polpas foi determinada de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). Este método baseia-se na perda de massa por secagem até peso constante. A umidade das amostras com mais de 10% de açúcar foi determinada por secagem sob pressão reduzida à temperatura de 70°C e para amostras com teor de açúcar inferior a 10% foi utilizada metodologia por secagem em estufa convencional a 105°C.

3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROMETANÓLICOS (EXTRATO BRUTO)

Os compostos fenólicos das polpas foram extraídos com solução metanol: água (70:30, v/v), ou metanol: água: ácido acético (70:30:0,5, v/v/v) para amostras contendo antocianinas, na razão 1:50 (p/v). A massa pesada para cada amostra foi determinada de acordo com sua umidade, de modo que o peso da amostra em base úmida fosse equivalente a um grama da mesma em base seca. Em triplicata, as amostras foram submetidas a agitação durante 60

minutos. A seguir, foram centrifugadas a 11510 x g por 15 minutos e os resíduos foram re-extraídos em Ultra-Turrax (METABO, GE 700 basic, Nürtingen, Alemanha) por 3 minutos e submetidos a nova centrifugação. Os sobrenadantes foram filtrados em papel de filtro Whatman nº 6, rotaevaporados (BUCHI, R-210, Flawil, Suíça), ressuspensos em água destilada e armazenados sob temperatura de -20°C até o momento das análises relativas ao *screening* enzimático.

3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada de acordo com Singleton et al. (1999) com algumas modificações. Foram utilizados 0,25 mL dos extratos brutos obtidos em 3.3 e dos extratos ricos em CBF obtidos em 3.7, aos quais foram adicionados 2 mL de água destilada, 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (F9252 - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Após agitação, os tubos foram incubados em banho a 37°C durante 30 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (SHIMADZU, UV-1650PC, Quioto, Japão) com comprimento de onda de 750 nm. Os resultados foram obtidos a partir de uma curva padrão de equivalente de ácido gálico (EAG) e expressos em miligrama de EAG por 100 gramas de amostra em base seca (mg EAG/ 100 g b.s.).

3.5 SCREENING – DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DOS EXTRATOS BRUTOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em IC₅₀, representado pela massa em base seca da fruta (mg b.s.) ou pela massa de fenólicos totais (µg EAG) capaz de inibir 50% da atividade da enzima em um mL de reação. Este valor foi calculado por meio de equações obtidas a partir de curvas de dose-resposta (% inibição x mg b.s./ mL reação ou µg EAG/mL reação).

3.5.1 α-amilase pancreática

A capacidade inibitória dos extratos hidrometanólicos sobre a atividade da enzima α-amilase suína (A3176 – Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foi avaliada de acordo com o método cromogênico descrito no *Worthington Enzyme Manual* (1993), com modificações. Esta

metodologia quantifica a maltose formada pela ação da enzima α -amilase sobre o amido (S2004 - Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA), utilizado como substrato. Para isso, uma solução 5 U/mL da enzima dissolvida em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,9) contendo 0,006 M de cloreto de sódio foi preparada. O amido 1% (m/v) foi preparado utilizando este mesmo tampão sob aquecimento. Para o ensaio, 125 μ L do extrato devidamente diluído e 125 μ L da solução enzimática foram incubados por 10 minutos a 25° C. A seguir, 125 μ L de substrato foram adicionados aos tubos de ensaio e incubados novamente por 10 minutos a 25° C. Depois deste período, 250 μ L de DNS (96 mM - 3,5-ácido dinitrosalicílico) foram adicionados aos tubos de ensaio, os quais foram incubados por 10 minutos a 100° C. Depois do resfriamento, foram adicionados cerca de 3,5 mL de água destilada e a seguir realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm (SHIMADZU, UV-1650PC, Quioto, Japão). No branco da amostra e no controle negativo a solução tampão foi utilizada em substituição à solução enzimática e ao extrato, respectivamente.

3.5.2 α -glicosidase

A inibição da atividade da enzima α -glicosidase *in vitro* (G5003 - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) pelos extratos brutos foi determinada pelo método cromogênico descrito por McCue, Known e Shetty (2005). Este método verifica a produção de glicose, liberada a partir da hidrólise do substrato 4-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo (N7006 - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) pela enzima. Para tanto, uma solução de enzima 1 U/mL dissolvida em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,9) foi preparada, este tampão também foi utilizado para a diluição do substrato (5 mM). Em microplacas de poliestireno com 96 cavidades, 50 μ L de extrato devidamente diluído foram incubados com 100 μ L da solução enzimática por 10 minutos a 25° C e então, realizou-se a leitura nº 1. A seguir, 50 μ L de substrato foram adicionados à mistura e incubados por cinco minutos a 25° C, procedendo a leitura nº 2. Para o controle negativo, o extrato foi substituído por solução tampão. As leituras foram realizadas em espectrofluorímetro por meio da medida da absorbância a 405 nm (BIOTEK, Synergy H1, Winooski, EUA).

3.5.3 Lipase pancreática

A inibição da atividade da enzima lipase pancreática suína *in vitro* (L3126 - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) pelos extratos hidrometanólicos foi avaliada de acordo com o método fluorimétrico descrito por Buchholz e Melzig (2016), com modificações. Para isso, foi

preparada uma solução de concentração 1 mg/mL da enzima em tampão Tris-HCl 13 mM (pH 8,0) contendo 150 mM de NaCl e 1,3 mM de CaCl₂. A solução do substrato 4-metilumbeliferil oleato 0,1 mM (75164 – Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foi preparada em DMSO (Dimetilsufóxido $\geq$ 99,9% (472301 - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). Em microplacas de poliestireno com 96 cavidades foram adicionados 25 μ L do extrato devidamente diluído, 50 μ L de substrato e 25 μ L de solução de lipase pancreática, os quais foram incubados a 37 °C por 30 minutos. Depois da incubação, 100 μ L de citrato de sódio 0,1 M (pH 4,2) foram adicionados à mistura para cessar a reação. Para o controle negativo, o extrato foi substituído pela solução tampão. O produto 4-metilumbeliferona liberado a partir da hidrólise do substrato foi quantificado em espectrofluorímetro (λ ex = 355 nm, λ em = 460 nm) (BIOTEK, Synergy H1, Winooski, EUA).

3.5.4 Enzima Conversora de Angiotensina I

A inibição da atividade da ECA de pulmão de coelho (A2580 - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foi avaliada pelo método fluorimétrico descrito por Carmona et al. (2006). Neste procedimento é determinado o aumento da fluorescência devida à hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH (Abz: ácido *o*-aminobenzóico; Dnp: 2,4-dinitrofenil) (AminoTech, São Paulo, Brasil) pela enzima. Isso ocorre em função da separação do grupo fluorescente (Abz) do grupo supressor de fluorescência intramolecular (Dnp). A solução da enzima 0,1 U/mL foi preparada em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0), contendo 100 mM de NaCl e 10 μ M de ZnCl₂, e o substrato 1 mg/mL foi dissolvido em DMSO (dimetilsufóxido $\geq$ 99,9%). O ensaio foi realizado em espectrofluorímetro (HITACHI, F2000, Tóquio, Japão) adicionando-se 345 μ L de tampão e 4 μ L do substrato em uma cubeta de quartzo sob agitação constante. Ao atingir a temperatura de 37 °C foi adicionada a solução da ECA e a velocidade da enzima foi acompanhada (λ ex = 320 nm, λ em = 420 nm) através da determinação da fluorescência em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) por minuto, durante aproximadamente cinco minutos. A seguir, volumes crescentes do extrato bruto foram adicionados à mistura e para cada adição os valores de UAF/min foram registrados.

Este mesmo ensaio foi utilizado para a avaliação da capacidade inibitória dos extratos ricos em compostos fenólicos (item 3.7) dos dois frutos selecionados a partir do *screening*. Com propósito comparativo, o lisinopril, inibidor sintético da ECA, foi utilizado como controle positivo.

3.6 BIOACESSIBILIDADE – SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL

A bioacessibilidade dos compostos fenólicos presentes nas polpas das duas frutas selecionadas pelo *screening* (cambuci e jabuticaba) foi avaliada por meio de simulação das condições do processo de digestão no trato gastrointestinal (digestão *in vitro*), de acordo com o método descrito por Gião et al. (2012), com algumas modificações.

Em triplicata, as polpas de cambuci e jabuticaba foram submetidas ao processo de digestão *in vitro*. Como controle para cada fruta foi utilizada água destilada. Para simular a digestão gástrica, o pH das polpas e dos controles foi ajustado para 2,0 com HCl 1 M. A seguir, para cada grama de amostra foram adicionados 0,05 mL de uma solução de pepsina (P-7000 - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (25 mg/mL) e esta mistura foi incubada em banho-maria (JULABO, SW20, Seelbach, Alemanha) sob temperatura de 37°C e agitação de 130 rpm durante 60 minutos. Após este período, os digeridos gástricos foram mantidos em banho de gelo por 10 minutos a fim de interromper a ação da pepsina.

Para simulação da digestão intestinal, o pH dos digeridos gástricos foi ajustado para 6,0 com NaHCO₃ 1 M. Em seguida, para cada grama de amostra foram adicionados 0,25 mL de uma solução de pancreatina (P-1750 - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (2 g/L), esta mistura foi incubada em banho-maria sob temperatura de 37°C e agitação de 45 rpm por 120 minutos. Para interromper a digestão intestinal e assegurar a inativação das enzimas e a estabilidade dos compostos fenólicos, as amostras foram mantidas em banho de gelo por 10 minutos e o pH foi ajustado para 4,0 com solução de HCl 1 M. Após o processo de digestão *in vitro*, as polpas e os controles digeridos foram centrifugados a 11510 x g por 40 min e os sobrenadantes (fração solúvel) foram submetidos à extração em fase sólida.

3.7 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS: EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Para a obtenção dos extratos ricos em compostos fenólicos a partir dos sobrenadantes provenientes das polpas antes e depois da digestão *in vitro*, foi realizado extração em fase sólida em colunas de poliamida (PA) (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Alemanha) e de octadecilsilano (C18) (Supelco, Bellefonte, EUA).

Para esta extração as colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 100 mL de metanol e 200 mL de água destilada. A seguir os sobrenadantes das polpas antes e depois da digestão *in vitro* foram passados nas colunas e os compostos retidos foram eluídos com metanol

puro e metanol:amônia (99,5:0,5, v/v), esta última solução foi utilizada apenas para a extração em coluna de poliamida. Após secagem completa por meio de rotaevaporação, os extratos ricos em compostos fenólicos foram ressuspensos em metanol e filtrados em filtros de polietileno com membrana de politetrafluoretileno (Millipore Ltda., Billerica, EUA) de 0,45 µm. As triplicatas destes extratos foram utilizadas para a quantificação de ácidos fenólicos e de flavonoides por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado com Detector de Arranjo de Diodo (CLAE/DAD).

Para as análises de quantificação de fenólicos totais e proantocianidinas, bem como para as análises inibitórias da atividade da ECA e de agregação plaquetária, as frações metanol e metanol: amônia, eluídas das colunas de PA, foram coletadas juntas.

3.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A identificação e a quantificação de flavonoides e ácidos fenólicos foram realizadas utilizando coluna Prodigy 5 µm ODS3 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, EUA), de acordo com Arabbi et al. (2004). O gradiente de solvente utilizado foi constituído por (A) Água: Tetrahydrofurano: Ácido trifluoroacético (98:2:0,1, v/v/v) e (B) Acetonitrila nas seguintes condições de eluição: 2 min – 17% (B); 7 min – 25% (B); 15 min – 35% (B) e 20 min – 50% (B). Para a limpeza da coluna foi aumentado (B) para 100% e em seguida, para o reequilíbrio da mesma, as condições iniciais foram retomadas por 10 min. O cromatógrafo utilizado foi o do sistema Hewlett Packard 1100, equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector com arranjo de diodo, controlados pelo software ChemStation. As triplicatas de cada extrato foram injetadas, tendo seus polifenóis identificados por meio da comparação de tempo de retenção e do espectro com os padrões. A quantificação foi baseada em calibração externa e os padrões foram obtidos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). Os resultados foram expressos em mg por 100 g de amostra em base seca (mg/ 100 g b.s.).

3.9 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO TOTAL

A determinação do ácido elágico total foi realizada de acordo com as condições otimizadas por Pinto, Lajolo e Genovese (2008). As extrações foram realizadas em triplicata, para isso, alíquotas dos extratos enriquecidos em colunas C18 foram transferidas para frascos de vidro autoclavável e evaporadas até secagem completa em evaporador analítico (THERMOFISHER, Reacti-Therm III, Waltham, EUA). A seguir, para a hidrólise dos

elagitaninos, foram adicionados 2 mL de solução de ácido trifluoracético 2 N, esta mistura foi submetida à temperatura de 120 °C sob pressão por 90 minutos em autoclave. Após hidrólise, foram adicionados 1 mL de álcool butílico terciário o qual foi submetido a evaporação. Após secagem, os extratos foram ressuspensos em metanol grau CLAE, filtrados em filtros de polietileno com membrana de politetrafluoretileno (Millipore Ltda., Billerica, EUA) de 0,45 µm de poro e submetidos a análise por CLAE.

Os elagitaninos foram quantificados por meio da diferença entre o teor de ácido elágico total e a quantidade de ácido elágico livre, sendo expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra em base seca (mg EAG/ 100 g b.s.).

3.10 DETERMINAÇÃO DE PROANTOCIANIDINAS PELO MÉTODO 4-DIMETILAMINOCINAMALDEÍDO (DMAC)

Esta análise foi realizada com os extratos obtidos conforme o item 3.7, pela metodologia descrita por Prior et al. (2010). Em microplacas de poliestileno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, EUA) foram adicionados 210 µL de uma solução reagente de DMAC em etanol: água: ácido clorídrico (75: 12,5: 12,5, v/v/v) e 70 µL do extrato devidamente diluído. Uma curva padrão foi preparada com diferentes concentrações de procianidina B2 (HPLC, purity > 99%, Extrasynthèse) em metanol. A leitura da absorbância foi realizada a cada 30 minutos em comprimento de onda de 640 nm utilizando-se espectrofluorímetro de microplaca (BIOTEK, Synergy H1, Winooski, EUA) a 25°C. Os resultados foram expressos como mg equivalente de procianidina B2 por 100 g de amostra em base seca (mg PB2/100 g b.s.).

3.11 DETERMINAÇÃO DE PROANTOCIANIDINAS PELO MÉTODO BUTANOL-HCL

Este ensaio foi baseado no método cromogênico descrito por Porter et al. (1985). Em tubos de ensaio foram adicionados 2,5 mL de solução de sulfato de ferro (0,154 mg/mL) preparada em solução de n-butanol e ácido clorídrico (3:2 v/v). A seguir, 250 µL dos extratos obtidos no item 3.7, devidamente diluídos, foram adicionados aos tubos. Esta mistura foi incubada por 15 minutos sob temperatura de 95°C. Após o resfriamento, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (SHIMADZU, UV-1650PC, Quioto, Japão) com comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos como mg de cianidina-3-rutinosídeo/ 100 g de amostra em base seca (mg C3R/100 g b.s.).

3.12 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DOS EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ADP

A amostra para o estudo da inibição da agregação plaquetária foi composta por 30 ratos machos da linhagem Sprague-Dawley (*NTacFFcfiq:SD*) obtidos no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sendo o projeto aprovado pelo comitê de ética no uso de animais desta mesma instituição (Protocolo número 528) (**Anexo A**). Todos os animais receberam dieta padrão e água *ad libitum* até a oitava semana de idade, período em que foram submetidos a anestesia com isoflurano 100% (1 mL/mL) por via inalatória para coleta do sangue por meio de punção da aorta abdominal. Para evitar a coagulação do sangue, o mesmo foi coletado em tubos contendo citrato de sódio 3,8% (1:9) (BD VACUTAINER®, Porto Matilda, EUA), os quais foram submetidos à centrifugação (370 x g por 10 minutos a 25°C) para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) (LIU et al., 2015).

Os extratos ricos em compostos fenólicos obtidos a partir das colunas PA e C18, provenientes das polpas antes e depois do processo de digestão *in vitro*, foram rotaevaporados e devidamente diluídos em solução salina (NaCl 0,9 %). Estes extratos tiveram a capacidade inibitória avaliada em triplicata de ratos, de acordo com metodologia turbidimétrica descrita por Born, Cross e Fields (1963), com modificações segundo Liu et al. (2015). Um volume de 15 µL dos extratos em diferentes concentrações foi pré-incubado a 37°C por cinco minutos com 225 µL de PRP. A seguir, 10 µL de solução de ADP (10 µM) foram adicionados a esta mistura para a indução da agregação plaquetária, a qual foi registrada por 5 minutos em agregômetro de plaquetas (QUALITERM, PA-04, São Paulo, Brasil). O plasma pobre em plaquetas, obtido por meio de uma segunda centrifugação (740 x g; 10 minutos, 25°C) do sangue, foi utilizado como branco para zerar o equipamento. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em IC₅₀, calculados por meio de equações obtidas a partir de curvas de dose-resposta (% inibição x mg b.s./ mL reação ou µg EAG/mL reação).

3.13 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Todas os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados pelo Programa GraphPad Prism 5.0 (SAN DIEGO, CA, EUA) e expressos como média ± desvio padrão. Os dados obtidos para o *screening* enzimático foram submetidos à transformação de

Box-Cox, a fim de encontrar um λ ideal de modo que os dados transformados se aproximassem de uma distribuição normal. O λ e a respectiva função utilizada para transformar cada grupo de dados encontram-se apresentados no **Apêndice A**.

Os resultados obtidos no *screening* e nos ensaios de capacidade inibitória da atividade da ECA e da agregação plaquetária, foram submetidos à análise de variância das médias e consequente teste de comparações múltiplas (Tukey). Nestes dois ensaios, tais testes foram utilizados para avaliar qual o fruto (cambuci ou jabuticaba) e qual o tipo de extrato (C18 ou PA) teve o melhor potencial inibitório. A comparação entre os teores de CBF presentes na polpa de cada fruto, antes e depois de ser digerida, bem como a influência da bioacessibilidade destes compostos sobre os valores de IC50 obtidos em ambos os ensaios, foram analisadas a partir da utilização do teste t pareado. Para avaliar as correlações entre as variáveis foi utilizado o teste de Pearson. A significância estatística para todos os testes foi definida como $p < 0,05$.

Para a escolha das duas frutas a serem utilizadas nas próximas etapas do trabalho, optou-se por uma otimização de respostas com o auxílio do programa Minitab Statistical Software 17 (STATE COLLEGE, PA, EUA). Este procedimento utiliza o cálculo da “desejabilidade” geral como parâmetro para otimização, avaliando o impacto de diversas variáveis sobre uma resposta, sendo que a melhor resposta é dada por uma “desejabilidade” próxima de 1 e distante de 0 (CANDIOTE et al., 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SCREENING – EFEITO *IN VITRO* DOS EXTRATOS BRUTOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Além de possibilitar a seleção das duas frutas a serem utilizadas nas análises consequentes deste trabalho, este *screening* salienta a importância da introdução de frutos nativos brasileiros na dieta, mesmo na forma de polpas congeladas, uma vez que os teores de CBF apresentados pelos extratos brutos destas polpas foram em média 10 vezes maiores que aqueles encontrados nos extratos provenientes das frutas tradicionalmente consumidas por nossa população (**Tabela 1**). Isto pode ser explicado, em parte, pelas condições ambientais adversas dos biomas em que estas espécies nativas são encontradas, pois a síntese dos metabólitos secundários é influenciada pela interação entre as plantas e seu habitat (GOBBO-NETO; LOPES, 2006).

Tabela 1 - Conteúdo de fenólicos totais e umidade de polpas comerciais de frutos nativos e das partes comestíveis de frutas tradicionais.

Polpas comerciais	Fenólicos totais (mg EAG/ 100 g de b.s.)	Umidade (%)
Cagaita	1057 ± 18	90,23 ± 0,01
Cambuci	1413 ± 55	91,48 ± 0,02
Camu-camu	3989 ± 190	95,23 ± 0,01
Jabuticaba	1767 ± 96	89,05 ± 0,06
Partes comestíveis		
Banana	59 ± 1	72,5 ± 0,1
Laranja	454 ± 22	89,11 ± 0,04
Maçã	201 ± 17	82,9 ± 0,1
Mamão	312 ± 28	88,08 ± 0,04
Manga	92 ± 6	82,48 ± 0,03

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3). b.s.: amostra em base seca.

Além de apresentarem concentrações de fenólicos totais inferiores, as frutas tradicionais exibem perfis de CBF diferentes daqueles observados para os frutos nativos. Segundo a base de dados europeia *Phenol-Explorer* e os dados fornecidos pelo *United States Department of Agriculture* (USDA), poucas informações estão disponíveis sobre o conteúdo de polifenóis de

banana, mamão e manga, sendo que as principais classes documentadas são os flavanóis e as proantocianidinas, cujos valores reportados são muito baixos. A maçã apresenta catequinas e derivados de quercetina e a laranja, principalmente, as flavanonas hesperidina e naringerina (USDA, 2004; NEVEU et al., 2010; USDA, 2014).

Por outro lado, cagaita, cambuci, camu-camu e jabuticaba exibem perfis de CBF bastante semelhantes entre si. Os principais flavonoides encontrados nestes frutos são representados pelos derivados de quercetina e de cianidina, sendo que estes últimos (da classe das antocianinas) são encontrados apenas no camu-camu e na jabuticaba. Ainda, é notável a presença das proantocianidinas, elagitaninos e outros derivados de ácido elágico nestes frutos (ALEZANDRO; GRANATO; GENOVESE, 2013; DONADO-PESTANA; BELCHIOR; GENOVESE et al., 2015; GONÇALVES et al., 2014; SANCHES AZEVEDO et al., 2017).

Tanto o teor quanto o perfil dos CBF presentes nos nove extratos utilizados neste *screening* parecem influenciar na inibição da atividade das enzimas estudadas. Embora os mecanismos de inibição enzimática por estes compostos ainda não estejam totalmente elucidados, sabe-se que interações não covalentes ocorrem entre polifenóis e enzimas. Enquanto os grupos fenólicos podem formar pontes de hidrogênio com os grupos polares enzimáticos, as frações galoil destes compostos interagem com os aminoácidos hidrofóbicos encontrados nas enzimas (ASGAR, 2013).

Considerando o grande número de amostras utilizadas no *screening*, optou-se pela utilização de extratos brutos, os quais apresentam baixo custo quando comparados a outros métodos de extração. Ao contrário de extratos ricos em CBF, obtidos por extração em fase sólida, os extratos brutos podem conter outros compostos capazes de inibir as enzimas digestivas e a ECA. Desta forma, a expressão dos resultados de IC₅₀ com base no teor de fenólicos totais dos extratos brutos não é a melhor maneira para avaliar os resultados, uma vez que este valor não inclui todos os prováveis inibidores enzimáticos presentes no extrato e podem resultar de possíveis sinergismos e antagonismos entre as substâncias contidas na amostra, os quais também podem influenciar na capacidade inibitória (PODSEDEK et al., 2014). Contudo, este IC₅₀ pode ser utilizado na tentativa de se entender, em parte, a eficiência dos CBF presentes em cada fruta. De modo geral, os resultados para a capacidade inibitória obtidos neste *screening* foram discutidos segundo o IC₅₀ expresso em massa de fruta em base seca. Entretanto, para fins comparativos, os valores de IC₅₀ foram expressos em concentração de base seca de amostra de massa de fenólicos por mL de reação.

Todos os extratos foram capazes de inibir as enzimas em estudo, porém, aqueles obtidos das polpas comerciais de frutos nativos demonstraram capacidade inibitória muito maior que os extratos provenientes das frutas tradicionais (**Figura 5**).

Figura 5 – Efeito inibitório dos extratos brutos de frutos nativos e frutas tradicionais sobre as enzimas α -amilase [A], α -glicosidase [B], lipase [C] e ECA [D].

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Letras minúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$). b.s.: amostra em base seca; BN: banana; CB: cambuci; CG: cagaita; CC: camu-camu; JB: jabuticaba; LA: laranja; MÇ: maçã; MM: mamão; MG: manga.

Pelos dados presentes na **Tabela 2** pode-se constatar que os teores de fenólicos demandados de algumas frutas tradicionais (banana, manga e maçã), para inibir 50% da atividade das enzimas α -amilase pancreática, α -glicosidase, lipase pancreática e ECA, foram semelhantes àqueles requeridos pelos frutos nativos (cambuci e jabuticaba). Entretanto, para que estas concentrações de fenólicos sejam acessíveis para tais inibições, é necessária uma quantidade muito superior de base seca destas frutas tradicionais quando comparadas à massa de frutos nativos.

Tabela 2 - Valores de IC50 expressos em massa de base seca da amostra (mg b.s./mL reação) e em conteúdo de fenólicos totais (μg EAG/ mL reação).

Frutas	<i>Amilase</i>		<i>Glicosidase</i>	
	b.s.	EAG	b.s.	EAG
CG	$0,349 \pm 0,008$	$3,67 \pm 0,08$	$0,233 \pm 0,005$	$2,45 \pm 0,05$
CB	$0,111 \pm 0,007$	$1,57 \pm 0,09$	$0,12 \pm 0,01$	$1,7 \pm 0,2$
CC	$0,231 \pm 0,004$	$9,2 \pm 0,2$	$0,14 \pm 0,01$	$5,6 \pm 0,4$
JB	$0,14 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,2$	$0,111 \pm 0,006$	$1,92 \pm 0,09$
BN	$1,8 \pm 0,1$	$1,12 \pm 0,08$	$2,36 \pm 0,09$	$1,42 \pm 0,05$
LA	$1,08 \pm 0,06$	$4,9 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,7$
MÇ	$0,91 \pm 0,09$	$1,8 \pm 0,2$	$2,16 \pm 0,09$	$4,3 \pm 0,2$
MM	$1,83 \pm 0,07$	$5,7 \pm 0,6$	$2,49 \pm 0,09$	$7,8 \pm 0,3$
MG	$1,5 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2$

Frutas	<i>Lipase</i>		<i>ECA</i>	
	b.s.	EAG	b.s.	EAG
CG	$0,0211 \pm 0,0009$	$0,23 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,03$	$5,7 \pm 0,3$
CB	$0,0151 \pm 0,0009$	$0,21 \pm 0,01$	$0,151 \pm 0,001$	$2,1 \pm 0,2$
CC	$0,0216 \pm 0,0007$	$0,86 \pm 0,03$	$0,188 \pm 0,008$	$7,5 \pm 0,3$
JB	$0,0104 \pm 0,0006$	$0,183 \pm 0,007$	$0,14 \pm 0,01$	$1,7 \pm 0,1$
BN	$0,043 \pm 0,004$	$0,025 \pm 0,002$	$1,2 \pm 0,1$	$0,71 \pm 0,06$
LA	$0,056 \pm 0,004$	$0,25 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,07$	$3,1 \pm 0,3$
MÇ	$0,053 \pm 0,002$	$0,106 \pm 0,003$	$0,67 \pm 0,09$	$1,3 \pm 0,2$
MM	$0,036 \pm 0,004$	$0,11 \pm 0,01$	$1,04 \pm 0,13$	$3,2 \pm 0,4$
MG	$0,051 \pm 0,003$	$0,046 \pm 0,003$	$0,98 \pm 0,14$	$1,1 \pm 0,2$

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). b.s.: amostra em base seca; EAG: equivalentes de ácido gálico. BN: banana; CB: cambuci; CG: cagaíta; CC: camu-camu; JB: jabuticaba LA: laranja; MÇ: maçã; MM: mamão; MG: manga

Em relação às enzimas α -amilase pancreática e α -glicosidase, os valores de IC50 obtidos para as frutas tradicionais variaram de 0,9 a 2,5 mg b.s./mL reação, enquanto os frutos nativos apresentaram valores entre 0,11 e 0,35 mg b.s./mL reação, sendo os extratos de cambuci e jabuticaba os melhores inibidores para ambas as enzimas (**Figura 5**). A concentração de compostos fenólicos necessária para inibir a α -amilase foi similar entre banana, manga e cambuci (em média 1,3 μg de EAG/ mL reação) e para a α -glicosidase, esta semelhança ocorreu entre banana, manga, cambuci e jabuticaba (em média 1,8 μg de EAG/ mL reação). Porém, para que estas concentrações de CBF sejam atingidas e desempenhem efeitos sobre o metabolismo dos carboidratos, deve-se ter cerca de 10 a 20 vezes mais massa destas frutas tradicionais em relação às massas de cambuci e jabuticaba (**Tabela 2**).

Um estudo realizado com 30 frutas comumente consumidas na Polônia demonstrou que as *berries*, como framboesa, mirtilo, groselha e *cranberry*, foram mais eficientes em inibir a

atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase do que maçã, banana e laranja (PODSEDEK et al., 2014). Resultados semelhantes podem ser observados no trabalho de Tan e Chang (2017), no qual extratos brutos de amora, mirtilo e de chás verde e preto foram melhores em inibir estas duas enzimas, quando comparados ao brócolis e ao repolho roxo. Uma das possíveis explicações para as respostas obtidas por estes autores e os resultados do presente trabalho, pode ser as semelhanças entre os perfis de CBF apresentados pelos frutos nativos, as *berries* e os chás. Em uma observação geral, nota-se que os compostos predominantes nestes alimentos são as proantocianidinas, os elagitaninos e as antocianinas (NEVEU et al., 2010).

A inibição destas duas enzimas digestivas constitui uma das abordagens terapêuticas para o tratamento do DM2 e para o controle da resistência à insulina, pois promove a normalização da glicemia pós-prandial por meio da redução da digestão e consequente absorção dos carboidratos (TUCCI; BOYLAND; HALFORD, 2010). Além do tratamento direto destas patologias, sabe-se que o controle da glicemia é de extrema importância para a redução do risco de desenvolvimento de DCV nestes pacientes (VITALE et al., 2016).

A acarbose® é o principal fármaco utilizado na inibição da α -amilase e α -glicosidase, todavia, pode apresentar efeitos adversos como flatulência, diarreia, dores abdominais, náuseas e vômitos (TUCCI; BOYLAND; HALFORD, 2010). Desta forma, a utilização de fitoquímicos como adjuvantes no tratamento destas alterações metabólicas pode contribuir para amenizar os efeitos adversos deste medicamento (DEO et al., 2016). Um trabalho realizado em nosso laboratório verificou que os compostos fenólicos presentes no suco de cagaita foram mais eficientes que a acarbose® em inibir a α -glicosidase *in vitro*, porém, o contrário foi observado para a α -amilase (ARAUJO, 2015).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que os compostos fenólicos contidos nos extratos brutos podem contribuir para a inibição *in vitro* destas enzimas. Ainda, outros estudos realizados com a utilização de extratos ricos em CBF de diversas fontes demonstram o potencial destas substâncias em inibir a ação das enzimas relacionadas à digestão dos carboidratos (ASGAR, 2013). Esta inibição parece ocorrer também *in vivo*, já que o consumo de 300 mL de sucos clarificados de cagaita, cambuci, camu-camu ou jabuticaba foi capaz de reduzir a glicemia pós-prandial de indivíduos saudáveis após a ingestão de 50 g de pão branco em 2 horas (BALISTEIRO et al., 2017). Além disso, estes compostos parecem melhorar a captação de glicose excessiva pelos músculos e tecido adiposo, auxiliar o armazenamento de glicose na forma de glicogênio por meio do aumento da atividade da glicoquinase hepática, desempenhar efeitos anti-inflamatórios e ainda, proteger as células pancreáticas da glicotoxicidade (ANHÊ et al., 2013).

Assim como no metabolismo dos carboidratos, as alterações no metabolismo dos lipídeos podem estar associadas à obesidade e a complicações cardiovasculares (SCHERER; HILL, 2016). Uma das formas de tratamento destas patologias, relacionadas ao desequilíbrio na homeostase dos lipídeos, consiste na inibição da enzima lipase pancreática. Deste modo, cerca de um terço dos triacilgliceróis dietéticos deixam de ser digeridos e absorvidos pelo intestino. O orlistate® é o principal inibidor das lipases intestinais, porém, seu uso está associado a efeitos adversos no trato digestório, como a esteatorreia (TUCCI; BOYLAND; HALFORD, 2010). Portanto, substâncias naturais, em especial os polifenóis, têm sido foco de pesquisas que avaliam novas alternativas ao uso de inibidores sintéticos da lipase pancreática (LUNAGARIYA et al., 2014). Donado-Pestana, Belchior e Genovese (2015) verificaram que os compostos fenólicos do extrato enriquecido de cagaita foram tão eficientes quanto o orlistate® em inibir a atividade da lipase pancreática *in vitro*.

Os resultados do *screening* realizado neste trabalho confirmam uma possível ação inibitória destes compostos sobre a atividade da lipase pancreática. O perfil e o teor de polifenóis dos extratos das polpas comerciais dos frutos nativos podem ter sido responsáveis por efeitos inibitórios mais expressivos em relação àqueles presentes nos extratos das frutas tradicionais (**Figura 5**), sendo a jabuticaba o fruto que apresentou a menor massa necessária para inibir 50% da atividade da lipase. A eficiência dos CBF deste fruto foi parecida com a dos polifenóis de cagaita, cambuci, laranja, mamão e maçã, contudo, para que esta inibição ocorra é necessário cerca de duas a cinco vezes menos massa em base seca de jabuticaba, cagaita e cambuci em relação a estas três frutas tradicionais (**Tabela 2**).

A maioria dos estudos demonstra que extratos ricos em taninos condensados, geralmente provenientes de chás, e em taninos hidrolisáveis, derivados das *berries*, são excelentes inibidores da lipase pancreática (HE; LV; YAO, 2006; McDOUGALL; KULKARNI; STEWART, 2009). De acordo com Buchholz e Melzig (2015), isso acontece porque o efeito inibitório dos CBF sobre esta enzima é dependente do número e da posição dos grupamentos hidroxílicos do composto. Além disso, estes autores verificaram forte correlação entre o grau de polimerização dos flavanóis e sua capacidade inibitória. Portanto, a existência de taninos nos frutos nativos e o déficit destes compostos nas frutas tradicionais podem constituir um dos fatores determinantes para os resultados obtidos neste *screening*.

Além de promoverem a redução da atividade da lipase pancreática, os CBF podem desempenhar outros mecanismos associados à perda de peso e à melhora do quadro dislipidêmico. Estudos têm esboçado o potencial destes compostos em reduzir o consumo alimentar e a diferenciação dos pré-adipócitos e sua proliferação, bem como aumentar a

apoptose de adipócitos (HSU; YEN, 2008). Ainda, podem desempenhar ações que contribuem para a redução do risco das DCV, pois são capazes de elevar as concentrações de HDL colesterol, enquanto reduzem os níveis de LDL colesterol e triacilgliceróis plasmáticos, secreção de citocinas inflamatórias no tecido adiposo e recrutamento de macrófagos em camundongos (DONADO-PESTANA et al., 2015; DONADO-PESTANA; BELCHIOR; GENOVESE, 2015).

Em adição a todos os efeitos citados, os CBF podem exercer mecanismos que influenciam diretamente algumas condições recorrentes nas DCV, como no aumento da pressão sanguínea (RANGEL-HUERTA et al., 2015). A forma pela qual os polifenóis podem normalizar os níveis pressóricos é semelhante àquela exercida pelos fármacos inibidores da ECA, como o lisinopril. A inativação desta enzima impede que a angiotensina I seja convertida em angiotensina II e que a bradiquinina seja degradada. Desta maneira, as consequências associadas a ações vasopressivas desreguladas e ao aumento da secreção de aldosterona são amenizadas (SPARKS et al., 2014).

Os extratos dos frutos nativos apresentaram capacidade inibitória da ECA, em média, 3,6 vezes maior que os extratos das frutas tradicionais (**Figura 5**). Os melhores inibidores desta enzima foram cambuci e jabuticaba, enquanto banana, manga e mamão foram as frutas com os maiores IC₅₀ em mg b.s./mL reação.

A correlação inversa ($r > -0,7$; $p < 0,05$) apresentada entre o IC₅₀ destes extratos brutos e o seu conteúdo de fenólicos totais, em consonância com as respostas observadas em estudos cujos ensaios enzimáticos foram realizados com extratos ricos nestes compostos, indicam que os polifenóis presentes nos frutos nativos podem ser importantes inibidores enzimáticos. Isto foi comprovado no ensaio da ECA, cujos resultados serão discutidos adiante (item 4.3), no qual os extratos ricos em CBF provenientes das polpas de cambuci e jabuticaba apresentaram importante inibição desta enzima *in vitro*. Estes resultados, ao contrário daqueles obtidos nos ensaios realizados com os extratos brutos, podem ser atribuídos exclusivamente aos polifenóis presentes nas amostras.

O procedimento estatístico utilizado para definir as duas frutas cujos extratos foram mais eficientes em inibir as quatro enzimas foi baseado no cálculo da “desejabilidade” geral, sendo que quanto mais próxima de 1, maior a “desejabilidade” desta resposta. De acordo com os valores de “desejabilidade” obtidos, a jabuticaba e o cambuci foram os frutos selecionados para o ensaio de bioacessibilidade e para a avaliação da capacidade inibitória de seus CBF sobre a atividade da ECA e sobre a agregação plaquetária. Estes dois frutos apresentaram valores de

0,996 e 0,970, respectivamente. Os demais resultados foram inferiores a 0,904, sendo que a “desejabilidade” para as frutas tradicionais variou de 0 a 0,271.

Apesar das respostas positivas encontradas neste *screening*, entende-se que os CBF precisam estar bioacessíveis no organismo para, então, estarem disponíveis e desempenharem suas ações biológicas, tal como a inibição enzimática (VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2014). Ao contrário das enzimas digestivas localizadas no TGI, as principais isoformas da ECA, responsáveis pela regulação da pressão sanguínea, são encontradas nas superfícies das células endoteliais e livres no plasma. Desta forma, é importante que os CBF sejam absorvidos e cheguem em concentrações adequadas na corrente sanguínea (SHUKOR et al., 2012; SPARKS et al., 2014). Tendo em vista a importância da bioacessibilidade neste processo, foi realizada a simulação do processo digestório das polpas de cambuci e jabuticaba, possibilitando a avaliação do efeito de seus CBF, antes e depois deste processo, sobre a ECA.

4.2 BIOACESSIBILIDADE – EFEITO DA DIGESTÃO *IN VITRO* SOBRE OS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS POLPAS COMERCIAIS DE CAMBUCI E JABUTICABA

A digestão gastrointestinal *in vitro* é comumente usada para o estudo da liberação de compostos da matriz alimentar e a estabilidade dos mesmos sob as condições digestivas. É considerado um método simples e rápido, contudo, é necessária a utilização de controles negativos para que se monitorem possíveis respostas inesperadas nas análises seguintes (WANG et al. 2016).

Os resultados obtidos para os controles utilizados durante a simulação da digestão demonstraram que as enzimas e as soluções usadas para a correção do pH durante este processo não agiram como interferentes nas análises de caracterização química das amostras digeridas. Desta forma, todas as variações observadas na concentração e no perfil dos compostos fenólicos foram atribuídas ao processo digestório *per se*.

Os extratos de cambuci e jabuticaba, obtidos a partir do uso do adsorvente C18, apresentaram teores de fenólicos totais 7 e 4 vezes superiores, respectivamente, àqueles encontrados nos extratos PA. A retenção irreversível dos taninos pela resina de PA explica grande parte desta diferença, uma vez que os extratos PA provenientes da polpa de cambuci, antes e depois da digestão *in vitro*, apresentaram valores aproximadamente 95% e 75% menores de proantocianidinas e elagitaninos, respectivamente, em relação ao extrato C18. Esta redução foi de cerca de 76% de proantocianidinas e 37% de elagitaninos nos extratos PA obtidos a partir da polpa de jabuticaba (**Tabelas 3 e 4**).

Tabela 3 - Bioacessibilidade dos CBF da polpa de cambuci, obtidos a partir de extração em fase sólida (EFS) em resinas de C18 (octadecilsilano) e PA (poliamida).

Compostos fenólicos - Cambuci	EFS	Antes da digestão	Depois da digestão
<i>Fenólicos Totais (mg EAG/100 g b.s.)</i>	C18	446 ± 5 ^a	472 ± 25 ^b
	PA	59 ± 4 ^a	73 ± 4 ^b
<i>Ácidos fenólicos e flavonoides (mg/100 g b.s.)</i>			
Ácido elágico livre	PA	2,7 ± 0,1 ^a	5,8 ± 0,4 ^b
Derivados de ácido elágico	PA	1,6 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,1 ^b
Derivados de quercetina	PA	0,63 ± 0,04 ^a	1,40 ± 0,04 ^b
<i>Elagitaninos (mg/100 g b.s.)*</i>	C18	221 ± 23 ^a	268 ± 26 ^a
	PA	48 ± 3 ^a	50 ± 3 ^a
<i>Proantocianidinas</i>			
DMAC (mg PB2/100 g b.s.)	C18	43 ± 3 ^a	46 ± 4 ^a
	PA	1,31 ± 0,02 ^a	1,41 ± 0,08 ^a
Butanol-HCl (mg C3R/100 g b.s.)	C18	57 ± 4 ^a	65 ± 7 ^a
	PA	3,4 ± 0,3 ^a	3,9 ± 0,3 ^a

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$); EAG: equivalente de ácido gálico; b.s.: amostra em base seca; PB2: procianidina B2; C3R: cianidina-3-rutinosídeo; DMAC: método 4-dimetilaminocinamaldeído.

*Calculado por diferença: ácido elágico total-ácido elágico livre.

Tabela 4 - Bioacessibilidade dos CBF da polpa de jabuticaba, obtidos a partir de extração em fase sólida (EFS) em resinas de C18 (octadecilsilano) e PA (poliamida).

Compostos fenólicos – Jabuticaba	EFS	Antes da digestão	Depois da digestão
<i>Fenólicos Totais (mg EAG/100 g b.s.)</i>	C18	2057 ± 48 ^a	1230 ± 69 ^b
	PA	490 ± 13 ^a	393 ± 21 ^b
<i>Ácidos fenólicos e flavonoides (mg/100 g b.s.)</i>			
Ácido elágico livre	PA	31 ± 2 ^a	77 ± 4 ^b
Derivados de ácido elágico	PA	14,8 ± 0,5 ^a	4,5 ± 0,3 ^b
Derivados de quercetina	PA	2,5 ± 0,2 ^a	2,67 ± 0,03 ^a
Derivados de cianidina	PA	68,4 ± 0,7 ^a	37,3 ± 2,6 ^b
<i>Elagitaninos (mg/100 g b.s.)*</i>	C18	628 ± 40 ^a	638 ± 54 ^a
	PA	410 ± 28 ^a	385 ± 36 ^a
<i>Proantocianidinas</i>			
DMAC (mg PB2/100 g b.s.)	C18	139 ± 7 ^a	147 ± 4 ^a
	PA	30 ± 2 ^a	35,8 ± 0,9 ^a
Butanol-HCl (mg C3R/100 g b.s.)	C18	121 ± 10 ^a	131 ± 4 ^a
	PA	32 ± 2 ^a	29 ± 1 ^a

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$); EAG: equivalente de ácido gálico; b.s.: amostra em base seca; PB2: procianidina B2; C3R: cianidina-3-rutinosídeo; DMAC: método 4-dimetilaminocinamaldeído.*Calculado por diferença: ácido elágico total-ácido elágico livre.

Estas diferenças na composição química dos eluatos provenientes das colunas C18 e PA, é explicado pelo tipo de ligação química ocorrente entre o adsorvente utilizado e os compostos fenólicos. Enquanto a resina C18 permite a completa extração dos compostos fenólicos, isto é, flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, a resina PA tem a capacidade de se ligar irreversivelmente aos taninos por meio de fortes ligações de hidrogênio, retendo-os em sua maioria (SIGMA-ALDRICH, 2015). Desta forma, os dois extratos apresentam todos os compostos fenólicos, contudo, o extrato obtido a partir da coluna de C18 pode ser considerado rico em taninos, ao passo que o extrato adquirido pela coluna de PA apresenta baixa concentração desta classe de compostos.

Os cromatogramas obtidos por CLAE para as duas amostras estão apresentados nas **Figuras 6 e 7**. Os perfis fenólicos foram similares para as polpas comerciais dos dois frutos estudados, todavia, as concentrações de ácidos fenólicos, flavonoides e taninos foram muito superiores nos extratos obtidos da polpa de jabuticaba, antes e depois de sua digestão, em relação aos extratos provenientes da polpa de cambuci sob o mesmo tratamento. Os elagitaninos e as proatocianidinas foram os principais CBF encontrados em ambos os frutos, seguidos pelos derivados de cianidina na jabuticaba e pelo ácido elágico e derivados de quercetina no cambuci.

Como pode ser observado na **Tabela 3**, o teor de fenólicos totais encontrado na polpa de cambuci apresentou diferença significativa depois da sua digestão *in vitro*. Isto pode ter ocorrido em função do aumento, superior a 50%, das concentrações de ácidos fenólicos e flavonoides, tais como o ácido elágico e os derivados de quercetina (isoarminetina-3-O-glicosídeo) (**Figura 6**). Mosele et al. (2015) simularam a digestão de suco, polpa e extrato de romã e também observaram que a quantidade de ácido elágico livre nas amostras digeridas se elevou expressivamente. Segundo estes autores, o aumento nas concentrações deste ácido fenólico pode estar ligado à sua liberação da matriz alimentar, uma vez que naturalmente podem estar associados a componentes da parede celular vegetal.

Figura 6 – Cromatogramas e espectros UV de ácido elágico livre [1], derivados de ácido elágico [2], derivados de quercetina [3] e ácido elágico total [4] dos extratos obtidos a partir da polpa de cambuci antes e depois da digestão *in vitro*.

A: fração Metanol:Amônia-270 nm (PA); B: fração Metanol -270 nm (PA); C: fração Metanol-270 nm (C18); ad: antes da digestão; dd: depois da digestão. Nos espectros UV, linhas azuis são as bandas de absorção dos extratos e linhas vermelhas são as bandas de absorção dos padrões.

Figura 7 – Cromatogramas e espectros UV de ácido elágico livre [1], derivados de ácido elágico [2], derivados de quercetina [3], ácido elágico total [4] e derivados de cianidina [5] dos extratos obtidos a partir da polpa de jaboticaba antes e depois da digestão *in vitro*.

A: fração Metanol:Amônia-270 nm (PA); B: fração Metanol -270 nm (PA); C: fração Metanol-525 nm (PA); D: fração Metanol-270 nm (C18); ad: antes da digestão; dd: depois da digestão. Nos espectros UV, linhas azuis são as bandas de absorção dos extratos e linhas vermelhas são as bandas de absorção dos padrões.

De acordo com o apresentado na **Tabela 4**, o mesmo processo aconteceu com o teor de ácido elágico livre na polpa de jabuticaba. No caso deste fruto, é possível observar uma redução significativa da presença de glicosídeos de ácido elágico depois da digestão, o que pode ter colaborado para o aumento da quantidade de ácido elágico livre (agliconas). Alguns autores sugerem que o aumento das concentrações deste ácido fenólico também pode ser decorrente da hidrólise dos elagitaninos ao entrarem em contato com o pH alcalino do intestino (TOMÁS-BARBERAN; ESPÍN; GARCÍA-CONESA, 2009). Contudo, isto parece não ter ocorrido durante a simulação gastrointestinal, uma vez que os teores de elagitaninos de ambas as polpas, calculados a partir da diferença entre as quantidades de ácido elágico total e ácido elágico livre, não apresentaram variações significativas depois da digestão (**Tabelas 3 e 4**). Em concordância com o observado neste trabalho, alguns estudos *in vitro* e ensaios clínicos têm demonstrado que o ácido elágico e grande parte dos elagitaninos chegam intactos ao intestino grosso, onde são metabolizados pela microbiota colônica, originando metabólitos bioativos denominados urolitinas (LUDWIG et al., 2015; OZDAL et al., 2016).

O conteúdo de fenólicos totais presentes na polpa de jabuticaba diminuiu significativamente depois do processo digestório. Isto pode ter sido resultante da redução expressiva dos derivados de cianidina, como a cianidina-3-rutinosídeo (**Figura 7**). É sabido que, de acordo com o pH do meio em que se encontram, as antocianinas podem ocorrer em quatro estruturas moleculares, sendo elas: cátion flavilium, base quinoidal, chalcona pseudobase e carbinol pseudobase. O cátion flavilium (vermelho) e a base quinoidal (azul) são predominantes em pH ácido, enquanto o aumento do pH favorece a abertura dos anéis B e C deste flavonoide e consequentemente, a degradação de seu cromóforo, levando à formação de chalconas pseudobases incolores (KAMILOGLU et al., 2017). Portanto, a transição das antocianinas do meio ácido presente na fase gástrica para o ambiente alcalino da fase intestinal pode ter colaborado para a redução de 45% da sua bioacessibilidade (**Tabela 4**).

Em relação às concentrações de proantocianidinas, antes e depois da digestão *in vitro*, é possível notar nas **Tabelas 3 e 4** que não houve diferenças significativas para nenhum dos frutos estudados. Os resultados indicam que estes taninos apresentaram alta estabilidade durante a simulação gastrointestinal, sendo preservados de 85% a 95% destes compostos. De acordo com Del Rio et al. (2010), este comportamento ocorre porque apenas uma pequena porcentagem dos taninos condensados se torna bioacessível no intestino delgado, e o restante é transformado pela microbiota colônica em ácidos fenólicos. Além disso, sabe-se que proantocianidinas com alto peso molecular e taninos hidrolisáveis podem estar ligados fortemente às fibras dietéticas, o que restringe a bioacessibilidade destes polifenóis (ALMINGER et al., 2014).

Alguns trabalhos *in vitro* e *in vivo* também verificaram estabilidade gastrointestinal dos taninos condensados (SERRANO et al., 2009; LI et al., 2015). Entretanto, pesquisas realizadas com pacientes ileostomizados demonstraram que, após o consumo de bebidas ou alimentos fonte de proantocianidinas, a porcentagem de recuperação destes compostos no fluido ileal apresentou grande variação (7% a 99%). Segundo estes autores, esta variação é advinda das diferenças estruturais entre os tipos de proantocianidinas, as quais podem influenciar na sensibilidade destes compostos às condições do trato gastrointestinal (BORGES et al., 2013; BROWN et al., 2014).

Além da maioria das proantocianidinas e elagitaninos seguirem até o intestino grosso e serem metabolizados por bactérias colônicas, estes compostos também podem agir como pré-bióticos modulando a microbiota intestinal (OZDAL et al., 2016). Ainda, quando bioacessíveis, estes compostos podem desempenhar atividades biológicas diretamente na mucosa ou no lúmen intestinal, tais como proteção contra o estresse oxidativo e inibição de algumas enzimas digestivas, como aquelas avaliadas no *screening* deste trabalho (LI et al., 2015).

4.3 EFEITO *IN VITRO* DOS EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE A ATIVIDADE DA ECA

A angiotensina II é o principal hormônio efetor do sistema renina-angiotensina, sendo proveniente da ação da ECA sobre a angiotensina I. Este peptídeo exerce ações de maneira endócrina, parácrina e autócrina, todas responsáveis pelo controle da pressão sanguínea e do balanço eletrolítico. Os inibidores da ECA são importantes anti-hipertensivos utilizados no tratamento das doenças cardiovasculares, por isso, pesquisas constantes e o desenvolvimento de novos inibidores desta enzima estão dentro das prioridades das ciências médicas modernas (REGULSKA et al., 2014). O principal objetivo destas pesquisas é a eliminação dos efeitos adversos destes inibidores, tais como tosse seca e angioedema. Com este mesmo propósito, estudos têm buscado nos produtos naturais derivados de plantas, substâncias que ajam como inibidores da ECA ou como adjuvantes no tratamento da hipertensão (GONÇALVES; ROMANO, 2017).

Apesar do potencial inibitório dos CBF sobre a atividade da ECA *in vitro* ser copiosamente estudado, trabalhos que avaliam o efeito da simulação da digestão na capacidade inibitória destes compostos sobre esta enzima são escassos. Um trabalho realizado com extratos (brutos e purificados) de casca e semente de uva, considerados ricos em proantocianidinas, demonstrou que a simulação da digestão foi mais eficiente em hidrolisar os taninos presentes

nos extratos purificados, em relação aos extratos brutos. Esta hidrólise foi responsável pela diminuição do peso molecular destes compostos, o que se relacionou inversamente à capacidade inibitória dos mesmos sobre a atividade da ECA. Por outro lado, a estabilidade dos taninos condensados, presentes nos extratos brutos depois de passar pelo intestino, refletiu no aumento da capacidade inibitória destes polifenóis (FERNÁNDEZ; LABRA, 2013).

Segundo Saura-Calixto, Serrano e Goñi (2007), os CBF presentes em alimentos líquidos são 100% bioacessíveis no intestino delgado, enquanto compostos presentes nos alimentos de matrizes sólidas exibem cerca de 50% de bioacessibilidade no intestino delgado e 40% no intestino grosso. Assim, a complexidade da matriz alimentar está inversamente relacionada à hidrólise das estruturas destes compostos no TGI e ao potencial inibitório dos mesmos sobre a atividade da ECA, o que explica as diferenças entre os resultados obtidos no presente trabalho (Figura 8) e aqueles observados por Fernández e Labra (2013).

Figura 8 – Efeito inibitório dos extratos enriquecidos em CBF, provenientes de polpas comerciais de cambuci [A] e jabuticaba [B], antes e depois da digestão *in vitro*, sobre a atividade da ECA.

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Letras minúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significativas entre os IC50 dos extratos C18 e PA provenientes das polpas de cambuci [A] ou jabuticaba [B], antes e depois da digestão *in vitro* ($p \leq 0,05$). EAG: equivalente de ácido gálico; PA: poliamida; C18: octadecilsilano.

Os CBF contidos nos extratos PA e C18, obtidos antes e depois da digestão *in vitro* das polpas de cambuci e jabuticaba, inibiram a atividade da ECA de maneira dose-dependente. (Figura 9). Contudo, o aumento nas concentrações de ácido elágico livre e de derivados de quercetina, bem como a redução dos teores de derivados de cianidina depois da digestão, parecem não ter apresentado ação direta sobre a capacidade inibitória de ambos os frutos, já

que os valores de IC₅₀ não foram significativamente alterados depois deste processo (**Figura 8**). Pesquisadores que investigaram a capacidade inibitória de 22 polifenóis purificados sobre a atividade da ECA observaram que a quercetina foi o flavonoide mais eficiente em inibir esta metaloprotease, enquanto entre os 11 ácidos fenólicos testados, o ácido elágico foi aquele que apresentou o menor IC₅₀ (SHUKOR et al., 2013).

Figura 9 - Curvas de dose-resposta obtidas para os extratos provenientes da polpa de cambuci [A] e jabuticaba [B], antes e depois da digestão, sobre a atividade da ECA *in vitro*.

○ antes da digestão; ● depois da digestão; PA: poliamida; C18: octadecilsilano; EAG: equivalente de ácido gálico.

As diferenças do potencial inibitório da quercetina e do ácido elágico, observadas entre estes dois trabalhos, podem ser decorrentes do tipo de amostra utilizada, visto que os eluatos das colunas PA e C18 são constituídos por diversas classes de CBF, ao passo que, no estudo citado a capacidade inibitória de cada composto foi testada individualmente. Segundo McDougall, Kulkarni e Stewart (2009), interações sinérgicas entre os polifenóis também podem proteger a estabilidade de compostos ativos. Deste modo, o aumento da bioacessibilidade do ácido elágico e dos derivados de quercetina pode ter auxiliado na estabilidade dos taninos após a digestão *in vitro* e, indiretamente, corroborou para a manutenção da capacidade inibitória destes compostos ao final deste processo (**Figura 8**).

Apesar dos flavonoides identificados (derivados de quercetina e de cianidina) nos dois frutos não terem apresentado correlação com a inibição da atividade da ECA (**Tabela 5**), trabalhos realizados com extratos de outras amostras observaram o importante papel destes compostos sobre a redução da atividade desta enzima (BALASURIYA; RUPASINGHE, 2011). Os mecanismos inibitórios apresentados por estes compostos são resultantes das características estruturais dos flavonóis e das antocianinas, como a presença de catecol no anel B e de uma hidroxila no carbono 3 do anel C. Além disso, estes flavonoides apresentam estrutura plana, considerada indispensável para a inibição de metaloproteases (OJEDA et al., 2010; GUERRERO et al., 2012).

Tabela 5 - Coeficiente de correlação de Pearson entre os compostos fenólicos identificados nos frutos estudados e os IC50 obtidos para a ECA.

Composto IC50	FT	AEL	DAE	DQ	DC	ET	PAC
Jabuticaba	-0,90*	0,02	-0,03	-0,03	-0,02	-0,95*	-0,99*
Cambuci	-0,99*	0,09	0,09	0,09	-	-0,96*	-0,98*

*p-valor estatisticamente significativo ($p < 0,001$). IC50: μg EAG/mL reação; ECA: enzima conversora de angiotensina; FT: fenólicos totais; AEL: ácido elágico livre; DAE: derivados de ácido elágico; DQ: derivados de quercetina; DC: derivados de cianidina; ET: elagitaninos; PAC: Proantocianidinas pelo método 4-dimetilaminocinamaldeído.

Em relação à influência do tipo de extrato sobre a inibição da atividade da ECA, nota-se que todos os eluatos procedentes das colunas de C18 apresentaram valores de IC50 (mg EAG/mL reação) em média cinco vezes menores do que os extratos eluídos das colunas de PA (**Figura 9**). É sabido que a eficácia dos polifenóis, individualmente, depende da sua afinidade de ligação, tipo de mecanismo e local de ação, porém, sinergismos e antagonismos entre diferentes compostos podem potencializar ou reduzir a capacidade inibitória dos extratos

(BOATH, STEWART, MCDUGALL, 2012). Logo, as concentrações mais elevadas de elagitaninos e proantocianidinas nos extratos C18, bem como possíveis interações entre estes polifenóis e outros compostos fenólicos, podem ter favorecido o melhor desempenho inibitório dos extratos C18 em relação aos extratos PA.

A contribuição dos taninos hidrolisáveis presentes no cambuci e na jabuticaba parece ter sido fundamental na inibição da ECA *in vitro*, visto que a correlação inversa entre estes compostos e os valores de IC50 obtidos para ambos os frutos foi forte e significativa (**Tabela 5**). Ademais, a estabilidade destes compostos, durante a digestão *in vitro*, pode ter refletido na semelhança estatística entre a capacidade inibitória dos extratos antes e depois deste processo (**Figura 8**). O efeito destes taninos sobre esta metaloprotease também foi visto por Pinto et al. (2010), os quais verificaram que os elagitaninos purificados de morango foram mais eficientes em inibir a ECA, do que o ácido elágico purificado desta mesma fruta.

A relação entre os elagitaninos e a saúde vascular é amplamente estudada, dado que apresentam atividades antiaterogênica, antitrombótica, anti-inflamatória e antiangiogênica *in vitro* e *in vivo* (LARROSA et al., 2010). A romã é um dos principais alimentos utilizados para o estudo das ações destes polifenóis, os quais correspondem a 92% dos CBF presentes no suco desta fruta. Estudos que avaliaram o consumo deste suco demonstraram seu potencial em atenuar a pressão sanguínea de pacientes saudáveis e hipertensos, sendo a ação inibitória dos elagitaninos sobre a atividade da ECA, um dos mecanismos responsáveis pela proteção cardiovascular (BASU; PENUGONDA, 2009). Além da alta concentração de elagitaninos, os extratos C18 também apresentam teores elevados de proantocianidinas, as quais também podem ter agido de maneira favorável à inibição enzimática (**Figura 8**). Respostas como as obtidas em nosso trabalho têm despertado o interesse de muitos pesquisadores, uma vez que o estudo do papel dos taninos condensados na inibição da ECA constitui um dos caminhos para o entendimento da associação entre o consumo de alimentos ricos nestes compostos e a redução da pressão sanguínea (HÜGEL et al., 2016).

Uma das explicações para o efeito inibitório exercido pelos taninos condensados é atribuída ao alto peso molecular destes compostos, o que possibilita que os mesmos atuem sobre os dois sítios ativos da ECA, enquanto monômeros e dímeros parecem inibir preferencialmente o sítio ativo amino-terminal (ACTIS-GORETTA et al., 2003). Tal inibição parece ser decorrente da formação de pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxílicos destes polímeros e os sítios ativos da enzima. Além disso, o grupamento catecol e o oxigênio presente no anel heterocíclico das proantocianidinas são capazes de quelar o zinco, metal essencial para a atividade da ECA (GUERRERO et al., 2012).

Embora as concentrações de proantocianidinas dos frutos nativos estudados tenham apresentado correlação forte, negativa e significativa com os valores de IC₅₀ (**Tabela 5**), Eriz et al. (2011) demonstraram que, para a inativação desta enzima, as concentrações destes compostos são menos importantes do que o seu peso molecular e sua estrutura química. Segundo estes autores, extratos de cascas de uva foram mais eficientes em inibir a ECA, mesmo apresentando menor quantidade de taninos condensados, do que os extratos de sementes desta fruta. Tal potencial inibitório foi associado à maior disponibilidade de grupamentos OH, alto grau de polimerização e à presença de unidades de epigallocatequinas nas estruturas das proantocianidinas presentes nas cascas da uva.

Este fato também pôde ser percebido ao comparar o efeito inibitório exibido pelos extratos PA de cada fruto nativo estudado. Apesar dos extratos de jabuticaba terem apresentado concentrações superiores para todos os compostos analisados, os extratos de cambuci foram significativamente mais eficientes em inibir a ECA. Por outro lado, os extratos C18 destes dois frutos não apresentaram diferenças estatísticas entre os seus valores de IC₅₀ (**Figura 8**). Isto sugere que, apesar das semelhanças entre as classes de polifenóis encontradas no cambuci e na jabuticaba, as diferenças estruturais de seus compostos podem ter influenciado o desempenho inibitório dos extratos. Possíveis diferenças estruturais entre os taninos de ambos os frutos também podem ter favorecido a inibição enzimática, uma vez que, mesmo contendo aproximadamente três vezes menos proantocianidinas e elagitaninos, os extratos C18 de cambuci, tanto antes (ad) quanto depois da digestão (dd) *in vitro*, apresentaram valores de IC₅₀ em µg EAG/mL reação (ad: $2,2 \pm 0,2$; dd: $2,6 \pm 0,2$) estatisticamente iguais àqueles exibidos pelos extratos C18 de jabuticaba (ad: $4,3 \pm 0,4$; dd: $4,1 \pm 0,3$).

Segundo Tan, Chang e Zhang (2017), correlações estatísticas não podem provar totalmente a relação de causa e efeito entre um composto fenólico específico e a inibição enzimática, pois a combinação de polifénóis que compõem os extratos pode apresentar efeitos sinérgicos e antagônicos, podendo levar a incertezas dos resultados. Por outro lado, a utilização de extratos ricos em CBF permite avaliar a correlação entre os fenólicos totais e a capacidade inibitória da ECA (**Tabela 5**).

Diante da possibilidade do consumo das polpas destes frutos nativos, nota-se que para atingir os valores de IC₅₀ alcançados pelos polifenóis *in vitro*, seria necessário o dobro de polpa de cambuci, em base seca, em relação à massa de jabuticaba (**Tabela 6**). Além disso, os valores de IC₅₀ obtidos para os CBF provenientes dos dois frutos estudados, antes e depois da digestão *in vitro*, foram muito superiores àquele apresentado pelo lisinopril (0,06 µg/mL). Estes resultados sugerem que este inibidor sintético da ECA não pode ser totalmente substituído pelos

compostos fenólicos do cambuci e da jabuticaba. Contudo, a possibilidade da associação destes compostos ao uso de inibidores sintéticos desta enzima deve ser investigada, a fim de analisar o desempenho dos polifenóis como adjuvantes no controle da pressão sanguínea.

Tabela 6 – Capacidade inibitória dos CBF presentes nas polpas de cambuci e jabuticaba, antes e depois da digestão *in vitro*, sobre a atividade da ECA.

Polpa Comercial	IC50 (mg b.s./mL reação)	
	Antes da digestão	Depois da digestão
<i>Cambuci</i>	0,39 ± 0,02 ^{a,B}	0,44 ± 0,04 ^{a,A}
<i>Jabuticaba</i>	0,18 ± 0,02 ^{b,D}	0,29 ± 0,03 ^{b,E}

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas entre os IC50 dos extratos de cambuci ou jabuticaba, antes e depois da digestão *in vitro* (p ≤ 0,05). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas entre os extratos de cambuci e jabuticaba, antes ou depois da digestão *in vitro*. b.s.: amostra em base seca.

Como mencionado, o teor de taninos presentes nestes dois frutos não apresentou variação após a simulação gastrointestinal, mas exibiram grande capacidade inibitória sobre a atividade da ECA. Alguns estudos encontraram atividade desta enzima na mucosa intestinal e sugerem que a presença de grandes concentrações de compostos fenólicos no TGI pode atuar na inibição desta metaloprotease a nível intestinal. Entretanto a relevância desta inibição precisa ser confirmada, dada a falta de elucidação do papel fisiológico da ECA neste órgão (OTTAVIANI et al., 2006).

Diante disso, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que possibilitem a liberação controlada de proantocianidinas e elagitaninos diretamente na corrente sanguínea pode ser considerado uma estratégia para a inibição da ECA encontrada nas membranas das células endoteliais e solúvel no plasma sanguíneo. Esta estratégia já é utilizada para a administração da forma ativa do enalapril, denominado enalaprilato, considerado o único inibidor da ECA que pode ser utilizado por via intravenosa (AYAZ et al., 2016).

Além da capacidade anti-hipertensiva dos CBF, ensaios clínicos têm comprovado a eficiência destes compostos sobre outros mecanismos de ação associados à redução do risco de desenvolvimento e ao tratamento das DCV. Os polifenóis podem atuar melhorando a disfunção endotelial, o enrijecimento dos vasos sanguíneos, quadros de dislipidemia e disglícemia, inflamação e desequilíbrio entre as funções de redução e oxidação celular (TOMÉ-CARNEIRO; VISIOLI, 2015). Ademais, estudos que avaliem a administração de metabólitos ativos advindos da metabolização dos polifenóis pela microbiota devem ser considerados, uma vez que metabólitos como urolitinas, equol, ácido hidroxifenilpropionico, hidroxifenilacético e

hesperitina, são capazes de desempenhar efeitos adicionais sobre a saúde cardiovascular (ESPÍN et al., 2017).

4.4 EFEITO *IN VITRO* DOS EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ADP

Além de terem papel central na hemostase e na trombose, as plaquetas também são cruciais no desenvolvimento da aterosclerose. O efeito dos CBF sobre a função plaquetária tem sido amplamente estudado *in vitro* e *in vivo*, e os dados obtidos suportam a hipótese de que estes compostos podem modular a ativação e a agregação plaquetária, contribuindo para inúmeros benefícios para a saúde cardiovascular. Estes resultados estimulam a busca de novas alternativas terapêuticas baseadas nos polifenóis, com vistas a reduzir os efeitos adversos provocados pelos antiagregantes sintéticos (VILAHUR; BADIMON, 2013; RISTIĆ; KROON; GLIBETIĆ, 2016). Apesar da infinidade de pesquisas acerca deste assunto, comparações entre trabalhos *in vitro* são dificultadas pela grande heterogeneidade das condições experimentais, dado que uma vasta quantidade de CBF tem sido testada em concentrações muito variadas e sob diferentes tempos de incubação com diversos agonistas plaquetários (ADP, colágeno, trombina, ácido araquidônico, etc.) (NATELLA et al., 2006).

No presente trabalho avaliou-se a via de agregação plaquetária ativada pelo ADP, uma vez que alguns CBF já demonstraram potencial inibitório sobre a mesma. Um dos mecanismos sugeridos para explicar este potencial *in vitro*, baseia-se na inibição da ligação do ADP aos receptores da família P2, especialmente o subtipo P2Y₁₂, responsável pela amplificação da reatividade plaquetária. Quando esta inibição ocorre *in vivo*, o complexo glicoproteico GPIIb/IIIa é inativado e fica impossibilitado de interagir com o fibrinogênio, comprometendo assim, o avanço do processo de agregação das plaquetas (JAGROOP et al., 2014). Os gráficos da **Figura 10** mostram que os polifenóis dos extratos C18 e PA, antes e depois da digestão *in vitro* das polpas de cambuci e jabuticaba, exerceram inibições de maneira dose-dependente sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.

Figura 10 - Curvas de dose-resposta obtidas para os extratos provenientes da polpa de cambuci [A] e jabuticaba [B], antes e depois da digestão, sobre a agregação plaquetária induzida por ADP *in vitro*.

○ antes da digestão; ● depois da digestão; PA: poliamida; C18: octadecilsilano; EAG: equivalente de ácido gálico.

A digestão *in vitro* da polpa de cambuci diminuiu significativamente a capacidade antiagregante dos seus polifenóis, mas ainda assim, os valores de IC₅₀ dos extratos deste fruto, expressos em µg EAG/mL de reação (C18ad: 159 ± 12; C18dd: 247 ± 43; PAad: 40 ± 4; PAdd: 93 ± 10), foram, em sua maioria, estatisticamente menores do que aqueles exibidos pelos extratos de jabuticaba (C18ad: 332 ± 33; C18dd: 225 ± 11; PAad: 278 ± 20; PAdd: 194 ± 8).

Como pode ser observado na **Figura 11**, ao contrário dos polifenóis do cambuci, a capacidade inibitória dos compostos presentes nos extratos C18 e PA da jabuticaba foi favorecida pelo processo digestório *in vitro*, uma vez que seus valores de IC50 depois da simulação da digestão reduziram em média 30%.

Figura 11 - Efeito inibitório dos extratos enriquecidos em CBF, provenientes de polpas comerciais de cambuci [A] e jabuticaba [B], antes e depois da digestão *in vitro*, sobre a agregação plaquetária induzida por ADP *in vitro*.

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Letras minúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significativas entre os IC50 dos extratos C18 e PA provenientes das polpas de cambuci [A] ou jabuticaba [B], antes e depois da digestão *in vitro* ($p \leq 0,05$). EAG: equivalente de ácido gálico; PA: poliamida; C18: octadecilsilano.

Para que se avalie melhor a influência da bioacessibilidade sobre a inibição da agregação das plaquetas pelos CBF, é pertinente conhecer a função destes extratos em outras vias de sinalização. Sabe-se que além dos efeitos positivos sobre a agregação plaquetária induzida por ADP, estes polifenóis podem atuar na inibição da via do ácido araquidônico, supressão do Ca^{2+} citoplasmático, bloqueio da secreção dos grânulos plaquetários, inibição da formação de tromboxano, entre outras (FAGGIO et al., 2017).

Os papéis dos flavonoides e dos ácidos fenólicos sobre a agregação plaquetária foram estudados por Moschona et al. (2017). Estes autores observaram que frações fenólicas provenientes de resíduos de vinho tinto e branco e de cascas de romã foram capazes de inibir a agregação das plaquetas *in vitro*, induzida por ADP ou colágeno. Entre os compostos isolados por estes autores, a quercetina e o ácido elágico foram aqueles com a melhor eficiência. Além disso, baseados na avaliação da estrutura química apresentada por algumas classes de flavonoides, outros pesquisadores concluíram que a quercetina e seus derivados apresentam características que favorecem a inibição da agregação plaquetária, tais como: a

presença de uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3, o grupo carbonila no carbono 4 e a hidroxila no carbono 3 do anel C e o catecol no anel B (BOJIC et al., 2011).

Com base nos resultados dos trabalhos citados, é provável que a presença de ácido elágico livre e de derivados de quercetina nos extratos de cambuci e jabuticaba tenha contribuído para a inibição da agregação plaquetária *in vitro*. Contudo, o aumento destes compostos depois da digestão *in vitro* parece ter favorecido positivamente apenas a capacidade inibitória dos extratos de jabuticaba, já que os valores de IC50 exibidos pelos extratos de cambuci aumentaram depois do processo digestório *in vitro* (**Figura 11**). Tendo em vista estas contradições entre as respostas obtidas, é pertinente que se avalie os compostos destas frutas de forma isolada, a fim de entender o real papel de cada um sobre a agregação das plaquetas. Ainda, nem todos os possíveis polifenóis presentes nestes frutos foram identificados por meio das metodologias utilizadas no presente trabalho, sendo assim, ações sinérgicas ou antagônicas entre os compostos dos extratos podem influenciar a capacidade antiagregante.

Em relação às antocianinas, Bojić et al. (2011) observaram que a ausência da carbonila no anel C deste flavonoide resultou na inibição menos potente da agregação plaquetária quando comparada à quercetina, cuja carbonila encontra-se presente. Esta observação, em conjunto com a relação inversa entre os valores de IC50 e o conteúdo de derivados de cianidina dos extratos de jabuticaba, infere que as antocianinas deste fruto não tiveram papel significativo na capacidade antiagregante, já que mesmo não apresentando este flavonoide, os extratos de cambuci apresentaram valores de IC50 duas a sete vezes menores que os extratos de jabuticaba (**Figura 11**). Além disso, a degradação das antocianinas pelo processo digestório pode ter contribuído para a formação de outros compostos e/ou alteração da proporção relativa entre os CBF presentes nos eluatos das colunas C18 e PA, resultando no aumento da capacidade antiagregante dos extratos de jabuticaba.

Quanto aos resultados obtidos pelos extratos PA e C18, observa-se que a maior concentração de taninos nestes últimos não foi capaz de favorecer a inibição da agregação plaquetária, uma vez que os valores de IC50 dos extratos PA de cambuci e jabuticaba foram, respectivamente, iguais ou menores que aqueles exibidos pelos extratos C18 (**Figura 11**). Estas respostas podem ser explicadas pelo fato que as (epi)catequinas, flavonóis que compõem as procianidinas, não apresentam características consideradas importantes para a inibição dos receptores de ADP e colágeno *in vitro*, tais como, estrutura planar e presença de uma carbonila no carbono 4 do anel C (WRIGHT et al., 2010). Respostas semelhantes foram observadas em outros trabalhos *in vitro*, porém, em uma perspectiva *in vivo*, os flavanóis e seus polímeros parecem ser os compostos que mais contribuem para melhorar a função plaquetária

(BACHMAIR et al., 2014). Estas contradições podem ser consequências das transformações que estes polifenóis sofrem durante o processo digestório *in vivo*, dada a possibilidade de metabolização dos mesmos pela microbiota (OZDAL et al., 2016).

Ainda, de acordo com Bojić et al. (2011), ao contrário da metilação, o aumento da hidroxilação de um composto é inversamente proporcional à sua capacidade antiagregante. Desta forma, se a hidrólise dos elagitaninos e das proantocianidinas tivesse ocorrido no TGI simulado, possivelmente ocorreria o aumento do potencial inibitório dos extratos provenientes destes frutos digeridos. Além disso, a baixa lipofilicidade dos taninos hidrolisáveis, resultante da abundância de hidroxilas na estrutura dos mesmos, pode ter reduzido a interação destes compostos com a membrana das plaquetas explicando, em parte, os resultados obtidos (**Figura 11**). Apesar destas constatações, um estudo verificou que a incubação de plaquetas com suco e extrato de romã, ricos em elagitaninos, foi capaz de inibir a ativação e a agregação plaquetária induzida por colágeno e ácido araquidônico (MATTIELLO et al., 2009).

Um trabalho de revisão avaliou o papel do consumo de extratos e alimentos fontes de compostos fenólicos sobre a função plaquetária. As diferenças (*design*, participantes, quantidade e forma de administração dos CBF e metodologias de avaliação da função plaquetária) observadas entre os 34 estudos analisados dificultam uma conclusão geral acerca do tema. A maioria dos trabalhos investigou o papel dos flavanóis e seus polímeros, seguidos pela avaliação dos flavonóis e antocianinas (BACHMAIR et al., 2014). Poucos pesquisadores estudaram o potencial dos elagitaninos, o que justifica a realização de novos estudos de intervenção para elucidar a capacidade antiagregante destes taninos (LARROSA et al., 2010).

Em relação ao consumo destes dois frutos nativos, percebe-se que para os compostos fenólicos da polpa de cambuci serem mais eficientes que aqueles da polpa de jabuticaba, seria necessária a ingestão de aproximadamente o dobro da massa em base seca do primeiro fruto em relação ao segundo (**Tabela 7**).

Tabela 7 – Capacidade inibitória dos CBF presentes nas polpas de cambuci e jabuticaba, antes e depois da digestão *in vitro*, sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.

Polpa Comercial	IC50 (mg b.s./mL reação)	
	Antes da digestão	Depois da digestão
<i>Cambuci</i>	35,258 ± 2,29 ^{a,B}	55,37 ± 7,06 ^{b,A}
<i>Jabuticaba</i>	15,268 ± 1,46 ^{d,C}	22,02 ± 1,756 ^{c,A}

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas entre os IC50 dos extratos de cambuci ou jabuticaba, antes e depois da digestão *in vitro* (p ≤ 0,05). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas entre os extratos de cambuci e jabuticaba, antes ou depois da digestão *in vitro*. b.s.: amostra em base seca.

Estes resultados demonstram a relevância de investigar mais profundamente o papel dos CBF destes frutos nativos sobre a agregação das plaquetas, a fim de sustentar estudos que avaliem a utilização destes polifenóis no desenvolvimento de agentes antiagregantes. Dada a absorção limitada das proantocianidinas e dos elagitaninos nos enterócitos e a existência de inibidores sintéticos de administração intravenosa (cangrelor® e o elinogrel®), que atuam sobre os receptores de ADP, é pertinente que se pesquise maneiras que permitam a liberação controlada destes compostos diretamente na corrente sanguínea (KHAN et al., 2016). Assim, os compostos com baixa bioacessibilidade no intestino delgado poderiam atuar diretamente nos receptores das plaquetas, amenizando a agregação entre elas.

Por fim, é sabido que a microbiota do cólon é de extrema importância na bioacessibilidade e biodisponibilidade dos CBF, especialmente das proantocianidinas e dos elagitaninos, contudo, a digestão realizada no presente trabalho foi simulada apenas até o intestino delgado. Deste modo, é pertinente conhecer o papel da microbiota colônica sobre os polifenóis destes frutos nativos, e então, avaliar a capacidade inibitória dos metabólitos provenientes deste processo sobre a atividade da ECA e a agregação plaquetária. Além disso, estes frutos podem ser utilizados em estudos que visem o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, tais como encapsulações e modificações químicas que aumentem a solubilidade dos compostos fenólicos no intestino delgado. Para isso, é fundamental o entendimento da relação entre a estrutura e a função apresentada por estes compostos (SHUKOR et al., 2013; SILVA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2016).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a eficiência da simulação do processo digestório em garantir a liberação dos CBF das matrizes alimentares das polpas de cambuci e jabuticaba. Contudo, a bioacessibilidade destes compostos parece ter sido importante apenas para a inibição da agregação plaquetária, uma vez que não houve melhora da capacidade inibitória dos mesmos sobre a atividade da ECA, depois da digestão *in vitro* das polpas. Ações sinérgicas ou antagônicas entre os compostos fenólicos presentes nos extratos podem ter tido grande importância sobre os dois mecanismos inibitórios avaliados neste trabalho.

Todos os extratos foram capazes de inibir a atividade da ECA e a agregação das plaquetas, mas aqueles provenientes do cambuci foram predominantemente mais eficientes do que os da jabuticaba. A maior concentração de taninos nos eluatos advindos das colunas C18 influenciou a redução dos valores de IC50 no ensaio enzimático, mas parece não ter participado diretamente da inibição da agregação plaquetária.

Tendo em vista a disponibilidade e as características sensoriais destes dois frutos, conclui-se que o consumo da jabuticaba *in natura* pela população é mais viável, porém, a preparação de novos produtos alimentares, a partir da utilização do cambuci e da jabuticaba, pode ser uma estratégia para a inserção destes frutos na dieta do brasileiro. Além disso, os CBF isolados destas nativas podem ser incorporados à matriz de produtos alimentares industrializados, a fim de melhorar suas características nutricionais, ou ainda, podem ser utilizados no desenvolvimento de nutracêuticos.

Mudanças no estilo de vida, baseadas na prática de atividade física e em uma alimentação rica em frutas e hortaliças, ainda é a melhor forma para a redução das taxas de mortalidade provocadas pelas DCV no mundo. Neste contexto, o consumo de frutos nativos e seus derivados, bem como a utilização de seus polifenóis purificados, podem ser adjuvantes favoráveis à redução dos riscos relacionados ao desenvolvimento das DCV.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 92, p. 1679–1687, 2012.
- ACTIS-GORETTA, L.; OTTAVIANIA, J. I.; KEENB, C. L.; FRAGA, C. G. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 555, p. 597–600, 2003.
- AGUILAR, G. A. Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. **Food Function**, v. 8, n. 1, p. 15–38, 2017.
- AKTER, S. M.; OH, S.; EUN, J.; AHMED, M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International**, v. 44, p. 1728–1732, 2011.
- ALESSI, M. C.; JUHAN-VAGUE, I. Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 6, p. 995–1000, 2008.
- ALEZANDRO, M. R.; GRANATO, D.; GENOVESE, M. I. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. **Food Research International**, v. 54, p. 650–659, 2013.
- ALMINGER, M.; AURA, A. M.; BOHN, T.; DUFOUR, C.; EL, S. N.; GOMES, A.; KARAKAYA, S.; MARTÍNEZ-CUESTA, M. C.; MCDOUGALL, G. J.; REQUENA, T.; SANTOS, C. N. In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 413–436, 2014.
- ANHÊ, F. F.; DESJARDINS, Y.; PILON, G.; DUDONNE, S.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.; MARETTE, A. Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. **PharmaNutrition**, v. 1, p. 105–114, 2013.
- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1124–1131, 2004.

ARAUJO, R. L. **Efeitos dos compostos fenólicos de *Eugenia Dysenterica* DC sobre a glicemia pós-prandial de indivíduos com síndrome metabólica e disglycemia.** 2015. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ASGAR, A Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A Review. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. June 2011, p. 91–103, 2013.

BASU, A.; PENUGONDA, K. Pomegranate juice: A heart-healthy fruit juice. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 1, p. 49–56, 2009.

AYAZ, S. I.; SHARKEY, C. M.; KWIATKOWSKI, G. M.; WILSON, S. S.; JOHN, R. S.; TOLOMELLO, R.; MAHAJAN, A.; MILLIS, S.; LEVY, P. D. Intravenous enalaprilat for treatment of acute hypertensive heart failure in the emergency department. **International Journal of Emergency Medicine**, v. 9, n. 1, 2015.

BACHMAIR, E. M.; OSTERTAG, L. M.; ZHANG, X.; ROOS, B. D. Dietary manipulation of platelet function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 144, p. 97–113, 2014.

BALASURIYA, B. W. N.; RUPASINGHE, H. P. V. Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension. **Functional Foods in Health and Disease**; v. 5, p. 172–188, 2011.

BALISTEIRO, D. M; ARAUJO, R L.;GIACAGLIA, L. R; GENOVESE, M. I. Effect of clarified Brazilian native fruit juices on postprandial glycemia in healthy subjects. **Food Research International**, 2017. doi:10.1016/j.foodres.2017.08.044.

BOATH, A. S.; STEWART, D.; McDOUGALL, G. 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.

BOJIC, M.; DEBELJAK, Z.; TOMICIC, M.; MEDIC-SARIC, M.; TOMIC, S. Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. **Nutrition Journal**, v. 10, n.73, p. 1-8, 2011.

BORGES, G.; LEAN, M. E. J.; ROBERTS, S. a; CROZIER, A. Bioavailability of dietary (poly)phenols: a study with ileostomists to discriminate between absorption in small and large intestine. **Food & Function**, v. 4, n. 5, p. 754–62, 2013.

BORN, B. Y. G. V. R.; CROSS, M. J.; FIELDS, I. The aggregation of blood platelets. **Journal of Physiology**), v. 168, pp. 178-195, 1963.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BROWN, E. M.; NITECKI, S.; PEREIRA-CARO, G.; MCDOUGALL, G. J.; STEWART, D.; ROWLAND, I.; CROZIER, A.; GILL, C. I. R. Comparison of in vivo and in vitro digestion on polyphenol composition in lingonberries: Potential impact on colonic health. **BioFactors**, v. 40, n. 6, p. 611–623, 2014.

BUCHHOLZ, T.; MELZIG, M. F. Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. **Planta Medica**, v. 81, p. 771–783, 2015.

BUCHHOLZ, T.; MELZIG, M. F. Medicinal plants traditionally used for treatment of obesity and diabetes mellitus – Screening for pancreatic lipase and α -amylase inhibition. **Phytotherapy Research**, v. 266, p. 260–266, 2016.

CANDIOTI, L. V.; ZANB, M. M.; CÁMARA, M. S.; GOICOECHE, H. C. Experimental design and multiple response optimization. using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014.

CARDOSO, L. M.; MARTINO, H. S, T.; MOREIRA, A. F. B.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Research International**, v. 44, p. 2151–2154, 2011.

CAREY, R. M. The Intrarenal Renin-Angiotensin System in Hypertension. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 22, n. 3, p. 204–210, 2015.

CARMONA, A. K.; SCHWAGER, S. L.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; STURROCK, E. D. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1971-1976, 2006.

CHEN, G.; CHEN, S.; ZHAO, Y.; LUO, C.; LI, J.; GAO, Y. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion. **Industrial Crops and Products**, v. 57, p.150–157, 2014.

CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1-20, 2013.

CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**, v. 120, p. 1019–1024, 2010.

CORNIER, M. A.; DABELEA, D.; HERNANDEZ, T. L.; LINDSTROM, R. C.; STEIG, M. J.; STOB, N. R.; VAN PELT, R. E.; WANG, H.; ECKE, R. H. The metabolic syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 29, p. 777–822, 2008.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001–1043, 2009.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, p.1818-1892, 2013.

DEO, P.; HEWAWASAM, E.; KARAKOULAKIS, A.; CLAUDIE, D. J.; NELSON, R.; SIMPSON, B. S.; SMITH, N. M.; SEMPLE, S. J. In vitro inhibitory activities of selected Australian medicinal plant extracts against protein glycation, angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes linked to type II diabetes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 435, 2016.

DOMÍNGUEZ-AVILA, J. A.; WALL-MEDRANO, A.; VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R.; CHEN, C.-Y. O.; SALAZAR-LÓPEZ, N. J.; ROBLES-SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ-DEL RIO, D.; CALANI, L.; CORDERO, C.; SALVATORE, S.; PELLEGRINI, N.; BRIGHENTI, F. Bioavailability and catabolism of green tea flavan-3-ols in humans. **Nutrition**, v. 26, n. 11–12, p. 1110–1116, 2010.

DONADO-PESTANA, C. M.; BELCHIOR, T.; FESTUCCIA, W. T.; GENOVESE, M. I. Phenolic compounds from cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg) fruit attenuate glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by a high-fat, high-sucrose diet. **Food Research International**, v. 69, p. 170–178, 2015.

DONADO-PESTANA, C. M.; BELCHIOR, T.; GENOVESE, M. I. Phenolic compounds fromcagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit prevent body weight and fat mass gain induced by a high-fat, high-sucrose diet. **Food Research International**, v. 77, p. 177–185, 2015.

DONADO-PESTAVA, C. M.; MOURA, M. H. C.; ARAUJO, R. L.; SANTIAGO, G. L.; BARROS, H. R.; GENOVESE, M. I. Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications. **Current Opinion in Food Science**, 2018. doi:: 10.1016/j.cofs.2018.01.001.

ERIZ, G.; SANHUEZA, V.; ROECKEL, M.; FERNÁNDEZ, K. Inhibition of the angiotensin-converting enzyme by grape seed and skin proanthocyanidins extracted from *Vitis vinífera* L. cv. Paris. **Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 860–865, 2011.

ESPÍN, J. C.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. **Biochemical Pharmacology**, 2017.

FAGGIO, C.; SUREDA, A.; MORABITO, S.; SANCHES-SILVA, A.; MOCAN, A.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. **Contents European Journal of Pharmacology**, v. 807, p. 91–101, 2017.

FAO- Food Agriculture Organization of the United Nations (2013). **FAOSTAT database**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>>. Acesso em: 10 jan 2018.

FAVERO, G.; PAGANELLI, C.; BUFFOLI, B.; RODELLA, L. F.; REZZANI, R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-28, 2014.

FERNÁNDEZ, K.; LABRA, J. Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 196–202, 2013.

FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. **Curr Diabetes Rev.**, v. 9, p. 25–53, 2013.

FUSTER, J. J.; OUCHI, N.; GOKCE, N.; WALS, K. Obesity-induced changes in adipose tissue microenvironment and their impact on cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 118, p. 1786–1807, 2016.

GARCÍA-CONESA, M.-T. Dietary Polyphenols against Metabolic Disorders: How Far Have We Progressed in the Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of These Compounds? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 9, p. 00–00, 2015.

GENOVESE, M. I.; DA SILVA PINTO, M.; GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v.14, p. 207–214, 2008.

GHOSHAL, K.; BHATTACHARYYA, M. Overview of platelet physiology: Its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

GIÃO, M. S.; GOMES, S.; MADUREIRA, A. R.; FARIA, A.; PESTANA, D.; CALHAU, C.; PINTADO, M. E.; AZEVEDO, I.; MALCATA, F. X. Effect of in vitro digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. **Food Chemistry**, v. 131, p. 761–767, 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374–381, 2007.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LELLIS-SANTOS, C.; CURI, R.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Frozen pulp extracts of camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) attenuate the hyperlipidemia and lipid peroxidation of Type 1 diabetic rats. **Food Research International Journal**, v. 64, p. 1–8, 2014.

GONÇALVES, S.; ROMANO, a. **Inhibitory properties of phenolic compounds against inhibitory properties phenolic compounds against enzymes linked diseases enzymes linked with human diseases**. In: Soto-Hernández. Phenolic Compound: Biological activity. INTECH, p. 99-118, 2017.

GOODMAN, B. E. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. **Advances in Physiology Education**, v. 34, p. 44–53, 2010.

GRESSLER, E., PIZO, M., MORELLATO L. P. C: Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 509–530, 2006.

GUERRERO, L.; CASTILLO, J.; QUIÑONES, M.; GARCIA-VALLVÍ, S.; AROLA, L.; PUJADAS, G.; MUGUERZA, B. Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–11, 2012.

HE, Q.; LV, Y.; YAO, K. Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1178–1182, 2006.

HSU, C. L.; YEN, G. C. Phenolic compounds: Evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, p. 53–61, 2008.

HÜGEL, H. M.; JACKSON, N.; MAY, B.; ZHANG, A. L.; XUE, C. C. Polyphenol protection and treatment of hypertension. **Phytomedicine**, v. 23, n. 2, p. 220–231, 2016.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Aquisição alimentar domiciliar per capita**. Rio de Janeiro, 2010. 282 p.

INADA, K. O. P.; OLIVEIRA, A. A.; REVORÊDO, T. B.; MARTINS, A. B. N.; LACERDA, E. C. Q.; FREIRE, A. S.; BRAZ, B. F.; SANTELLI R. E.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. C. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422–433, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, 1020 p.

INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, volume 2. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, 2010. 873 p.

JAGROOP, I. A. Plant extracts inhibit ADP-induced platelet activation in humans: Their potential therapeutic role as ADP antagonists. **Purinergic Signalling**, v. 10, p. 233–239, 2014.

KAMILOGLU, S.; OZKAN, G.; ISIK, H.; HOROZ, O.; VAN CAMP, J.; CAPANOGLU, E. Black carrot pomace as a source of polyphenols for enhancing the nutritional value of cake: An in vitro digestion study with a standardized static model. **Food Science and Technology**, v. 77, p. 475–481, 2017.

KHAN, N.; COX, A. R.; COTTON, J. M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral P2Y₁₂ inhibitors during the acute phase of a myocardial infarction: A systematic review. **Thrombosis Research**, v. 143, p. 141–148, 2016.

KHANBABAEE, K.; REE, T. Tannins: Classification and definition. *Natural Product Reports*, v. 18, p. 641–649, 2001.

KIM, H.; QUON M. J.; KIM, J. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. **Redox Biology**, v. 2, p.187–195, 2014.

LARROSA, M.; GARCÍA-CONESA, M. T.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Molecular Aspects of Medicine Ellagitannins , ellagic acid and vascular health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 513–539, 2010.

LENQUISTE, S. A.; BATISTA, G. G.; MARINELI, R. S.; DRAGANO, N. R. V.; MARÓSTICA JR, M. R. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, v. 49, p. 153–160, 2012.

LI, Q.; CHEN, J.; LI, T.; LIU, C.; WANG, X.; DAI, T.; MCCLEMENTS, D. J.; LIU, J. Impact of in vitro simulated digestion on the potential health benefits of proanthocyanidins from *Choerospondias axillaris* peels. **Food Research International**, v. 78, p. 378–387, 2015.

LIN, A. H. M.; LEE, B. H.; CHANG, W. J. Small intestine mucosal α -glucosidase: A missing feature of in vitro starch digestibility. **Food Hydrocolloids**, 2015. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.03.002.

LIU, Y.; PARK, J.; CHANG, K.; CHIN, Y.; LEE, M. Chemico-Biological Interactions a - and g -mangostin cause shape changes , inhibit aggregation and induce cytolysis of rat platelets. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 240–248, 2015.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233–241, 2000.

LUNAGARIYA, N. A.; PATEL, N. K.; JAGTAP, S. C.; BHUTANI, K. K. Inhibitors of pancreatic lipase: State of the art and clinical perspectives. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 897–921, 2014.

MAM – Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade brasileira** (c2016). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 07 nov. 2016.

MANACH, C.; MILENKOVIC, D.; WIELE, T. V.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; ROOS, B.; GARCIA-CONESA, M. T.; LANDBERG, R.; GIBNEY, E. R.; HEINONEN, M.; TOMÁS-BARBERÁN, F.; MORAND, C. Addressing the inter-individual variation in response to consumption of plant food bioactives - towards a better understanding of their role in healthy ageing and cardiometabolic risk reduction. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2016. doi 10.1002/mnfr.201600557.

MATTIELLO, T.; TRIFIRÒ, E.; JOTTI, G. S.; PULCINELLI, F. M. Effects of Pomegranate Juice and Extract Polyphenols on Platelet Function. **Journal of Medicinal Food**, 2009.

McCUE, P.; KNOWN, Y.; SHETTY, K. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting potencial of selected food. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, p. 184-195, 2005.

McDOUGALL, G. J.; KULKARNI, N. N.; STEWART, D. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. **Food Chemistry**, v. 115, p. 193–199, 2009.

MEC-Ministério da Educação (Brasil). **Cagaiteira (Eugenia dysenterica DC)**. Lavras, MG: UFLA, 2008. 21 p. (Boletim Técnico - n.º 78).

MILED, N.; CANAAN, S.; DUPUIS, L.; ROUSSEL, RIVIÈRE, M.; CARRIÈRE, F.; CARO, A.; CAMBILLAU, C.; VERGER, R. Digestive lipases: from three-dimensional structure of physiology. **Biochimie**, v. 82, p. 973–986, 2000.

MOSCHONA, A.; KYRIAKIDIS, K. D.; KLEONTAS, A. D.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Comparative Study of Natural Phenolic Acids and Flavonols as Antiplatelet and Anti-Inflammatory Agents. **The Grant Medical Journals**, v. 2, n. 4, p. 57-66, 2017.

MOSELE, J. I.; MACIÀ, A.; ROMERO, M. P.; MOTILVA, M. J.; RUBIÓ, L. Application of in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 529–540, 2015.

NATELLA, F.; NARDINI, M.; VIRGILI, F.; SCACCINI, C. Role of dietary polyphenols in the platelet aggregation network - A review of the in vitro studies. **Current Topics in Nutraceutical Research**, v. 4, n. 1, 2006.

NEVEU, V.; PEREZ-JIMÉNEZ, J.; VOS, F.; CRESPIY, V.; DU CHAFFAUT, L. MENNEN, L.; KNOX, C.; EISNER, R.; CRUZ, J.; WISHART, D.; SCALBERT, A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. **Database**, 2010. doi 10.1093/database/bap024.

OJEDA, D.; JIMÉNEZ-FERRER, E.; ZAMILPA, A.; HERRERA-ARELLANO, A.; TORTORIELLO, J.; ALVAREZ, L. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from Hibiscus sabdariffa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 7–10, 2010.

OTTAVIANI, J. I.; ACTIS-GORETTA, L.; VILLORDO, J. J.; FRAGA, C. G. Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. **Biochimie**, v. 88, n. 3–4, p. 359–365, 2006.

OZDAL, T.; SELA, D. A.; XIAO, J.; BOYACIOGLU, D.; CHEN, F.; CAPANOGLU, E. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 1–36, 2016.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, p. 270-278, 2009.
 PATTHAMAKANOKPORN, O.; PUWASTIEN, P.; NITITHAMYONG, A.; SIRICHAKWAL, P. P. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 241–24, 2008.

PINTO, M. S.; KWON, Y. I.; APOSTOLIDIS, E.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; SHETTY, K. Evaluation of red currants (*Ribes rubrum* L.), black currants (*Ribes nigrum* L.), red and green gooseberries (*Ribes uva-crispa*) for potential management of type 2 diabetes and hypertension using in vitro models. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 639–660, 2010.

PINTO, S.; LAJOLO, F. M.; INE, M. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch .). **Food Chemistry**, v. 107, p. 1629–1635, 2008.

PORTER, L.J., HRSTICH, L.N., CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, 223–230, 1985.

PODSĘDEK, A.; MAJEWSKA I.; REDZYNIA, M.; SOSNOWSKA, D.; KOZIOŁKIEWICZ, M. In vitro inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 4610–4617, 2014.

PRIOR, R. L.; FAN, E.; JI, H.; HOWELL, A.; NIO, C.; PAYNE, M. J.; REED, J. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 90, p. 1473–1478, 2010.

RANGEL-HUERTA, O. D.; PASTOR-VILLAESCUSA, B.; AGUILERA, C. M.; GIL, A. A systematic review of the efficacy of bioactive compounds in cardiovascular disease: phenolic compounds. **Nutrients**, v.7, p. 5177-5216, 2015.

REGULSKA, K.; STANISZ, B.; REGULSKI, M.; MURIAS, M. How to design a potent, specific, and stable angiotensin-converting enzyme inhibitor. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 11, p. 1731–1743, 2014.

RISTIĆ, A. K.; KROON, P.; GLIBETIĆ, M. Modulation of platelet function with dietary polyphenols: A promising strategy in the prevention of cardiovascular disease. **Agro FOOD Industry Hi Tech**, v. 26, n. 2, p. 15–19, 2015.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996–1002, 2010.

SCHERER, P. E.; HILL, J. A. Obesity, diabetes, and cardiovascular diseases. **Circulation Research**, v. 118, p. 1703–1705, 2016.

SANCHES AZEVEDO, M. C. S.; SILVA, R. R. E.; JACOMINO, A. P.; GENOVESE, M. I. Physicochemical variability of cambuci fruit (*Campomanesia phaea*) from the same orchard,

from different locations and at different ripening stages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2017. doi 0.1002/jsfa.7756.

SANTHAKUMAR, A. B.; BULMER, A. C.; SINGH, I. A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, 2014. doi.org/10.1111/jhn.12177 .

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GONI, I. Food Chemistry Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, v. 101, p. 492–501, 2007.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; DAUER, A.; AURA, A. Tannins : Current knowledge of food sources , intake , bioavailability and biological effects. **Nutrition and. Food Research**, v. 53 , p. 310–329, 2009.

SHAH, M. S.; BROWNLEE, M. Molecular and cellular mechanisms of cardiovascular disorders in diabetes. **Circulation Research**, v. 118, p. 1808–1829, 2016.

SHUKOR, N. A.; CAMP, J. V.; GONZALES, G. B.; STALJANSSENS, D.; STRUIJS, K.; ZOTTI, M. J.; RAES, K.; SMAGGHE, G. Angiotensin-Converting Enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: a study of structure activity relationships. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 11832–11839, 2013.

SILVA, B. V.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 50, p. 144–158, 2016.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SPARKS, M. A.; CROWLEY, S. D.; GURLEY, S. B.; MIROTSOU, M.; COFFMAN, T. M. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. **Comprehensive Physiology**, v. 4, p. 1201–1228, 2014.

SU, J. B. Different cross-talk sites between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system**, v. 15, n. 4, p. 319–28, 2014
SUGAMURA, K.; KEANEY JR, J. F, Reactive oxygen species in cardiovascular disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 978–992, 2011.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 599–606, 2010.

TAN, Y.; CHANG, S. K. C.; ZHANG, Y. Comparison of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. **Food Chemistry**, v. 214, p. 259–268, 2017.

TOMÁS-BARBERAN, F. A.; ESPÍN, J. C.; GARCÍA-CONESA, M. T. **Bioavailability and Metabolism of Ellagic Acid and Ellagitannins**. In: Stephane, Q. Chemistry and Biology of Ellagitannins: An underestimated class of bioactive plant polyphenols, World Scientific: Londres-UK, p. 273–297, 2009.

TOMÉ-CARNEIRO, J.; VISIOLI, F. Polyphenol-based nutraceuticals for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence. **Phytomedicine**, v. 23, n. 11, p. 1145–1174, 2016.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p. 1231–1246, 2010.

TUCCI, S. A.; BOYLAND, E. J.; HALFORD, J. C. The role of lipid and carbohydrate digestive enzyme inhibitors in the management of obesity: a review of current and emerging therapeutic agents. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy**, v. 3, p. 125–43, 2010.

USDA – United States Department of Agriculture. **Database for the proanthocyanidin content of selected foods**. Beltsville, 2004. 33 p.

USDA – United States Department of Agriculture. **Database for the flavonoid content of selected foods**. Beltsville, 2014. 176 p.

VALLILO, M.I.; GARBELOTTI, M.L.; OLIVEIRA, E.; LAMARDO, L.C.A. Physical and chemical characteristics of cambucizeiro's fruit (*Campomanesia phae*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 241-244, 2005.

VAUZOUR, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; CORONA, G.; ORUNA-CONCHA, M. J.; SPENCER, J. P. E. Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. **Nutrients**, v. 2, p. 1106-1131, 2010.

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R.; PALAFOX-CARLOS, H.; WALL-MEDRANO, A.; AYALA- ZAVALA, J. F.; CHEN, C. Y. O.; ROBLES-SÁNCHEZ, M.; ASTIAZARAN-GARCÍA, H.; ALVAREZ- PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Phenolic compounds: their journey after intake. **Food Function**, v. 5, p. 189–197, 2014.

VERSTEEG, H. H.; HEEMSKERK, J. W.; LEVI, M.; REITSMA, P. H. New fundamentals in hemostasis. **Physiology Reviews**, v. 93, n. 1, p. 327-58, 2013.

VILAHUR, G.; BADIMON, L. Antiplatelet properties of natural products. **Vascular Pharmacology**, v. 59, n. 3–4, p. 67–75, 2013.

VITALE, M.; VACCARO, O.; MASULLI, M.; BONORA, E.; DEL PRATO, S.; GIORDA, C. B.; NICOLUCCI, A.; SQUATRITO, S.; AUCIELLO, S.; BABINI, A. C.; BANI, L.; BUZZETTI, R.; CANNARSA, E.; CIGNARELLI, M.; CIGOLINI, M.; CLEMENTE, G.; COCOZZA, S.; CORSI, L.; D'ANGELO, F.; DALL'AGLIO, E.; DI CIANNI, G.; FONTANA, L.; GREGORI, G.; GRIONI, S.; GIORDANO, C.; IANNARELLI, R.; IOVINE, C.; LAPOLLA, A.; LAURO, D.; LAVIOLA, L.; MAZZUCCHELLI, C.; SIGNORINI, S.; TONUTTI, L.; TREVISAN, R.; ZAMBONI, C.; RICCARDI, G.; RIVELLESE, A. A. Polyphenol intake and cardiovascular risk factors in a population with type 2 diabetes: The TOSCA.IT study. **Clinical Nutrition**, 2016.

WANG, S.; AMIGO-BENAVENT, M.; MATEOS, R.; BRAVO, L.; SARRIÁ, B. Effects of in vitro digestion and storage on the phenolic content and antioxidant capacity of a red grape pomace. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 68, n. 2, p. 188–200, 2016.

WEI, L.; ALHENC-GELAS, F.; CORVOL, P.; CLAUS, E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 9002–9008, 1991.

WHITCOMB, D. C.; LOWE, M. E. Human pancreatic digestive enzymes. **Digestive diseases and sciences**, v. 52, p. 1–17, 2007.

WHO – World Health Organization. **Noncommunicable Diseases: Country Profiles 2014**. Geneva, 2014. 210p.

WHO – World Health Organization. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. Geneva, 2016 (Fact sheet n°317). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Acesso em: 08 nov 2016.

WORTHINGTON, V. Alpha amylase. In: **Worthington Enzyme Manual**. Whashington Biochemical Corp.Freehold, NJ, p. 36-41, 1993.

WRIGHT, B.; MORAES, L. A.; KEMP, C. F.; MULLEN, W.; CROZIER, A.; LOVEGROVE, J. A.; GIBBINS, J. M. RESEARCH PAPER A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function by quercetin and structurally related flavonoids. **British Journal of Pharmacology**, n. 159, p. 1312–1325, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Valores de λ e respectivas funções utilizadas para a normalização das respostas obtidas no *screening* enzimático e no ensaio de agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato.

Tabela 8 - Valores de λ e respectivas funções utilizadas para transformar as respostas obtidas nas análises cujos dados não apresentaram distribuição normal.

Análise	Valor de λ	Função
<i>Screening-IC50 (mg b.s/mL reação)</i>		
α -amilase pancreática	0	$\ln(\text{resposta})$
α -glicosidase	0	$\ln(\text{resposta})$
Lipase pancreática	-0,5	$\frac{1}{\sqrt{(\text{resposta})}}$
Enzima conversora de angiotensina	-0,5	$\frac{1}{\sqrt{(\text{resposta})}}$

*Os dados foram normalizados pela transformação de Box-Cox, com base no cálculo do valor do λ ideal para cada grupo de dados.

ANEXOS

ANEXO A – Documentos emitidos pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas com o fim de aprovar a realização do presente trabalho

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CEUA/FCF 63.2016-P528

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da bioacessibilidade e possíveis efeitos cardioprotetores dos compostos bioativos fenólicos de frutos da família das mirtáceas**, registrada com o nº **528**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Gabriela de Lima Santiago**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Maria Inês Genovese** – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **2 de setembro de 2016**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	19/08/2016 a 31/12/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato Sprague-Dawley
Número de animais	16
Peso/Idade	8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério FCF/IQ - USP

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 11 de outubro de 2016.

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
 Membro da CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP
 Telefone: (11) 3091 3622 - e-mail: ceuafcf@usp.br

Figura 12 – Aprovação concedida pelo CEUA para a realização do ensaio com animais.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 43.2017-P528

São Paulo, 04 de agosto de 2017.

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 04 de agosto de 2017, **aprovou** as alterações propostas para o projeto de pesquisa "**Avaliação da bioacessibilidade e possíveis efeitos cardioprotetores dos compostos bioativos fenólicos de frutos da família das mirtáceas**" (Protocolo CEUA nº 528), conforme constante nos documentos apresentados (pedido adicional de 14 animais).

Cordialmente,

Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
Vice-Coordenadora da CEUA/FCF/USP

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Gabriela de Lima Santiago
FBA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fone/Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

Figura 13 – Primeira aprovação concedida pelo CEUA para a realização de alterações no ensaio com animais.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 63.2017-P528

São Paulo, 13 de novembro de 2017.

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): **Gabriela de Lima Santiago**
FBA/FCF/USP

Assunto: **aprovação de alteração no Protocolo CEUA nº 528.**

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 10 de novembro de 2017, **APROVOU** a alteração proposta para o projeto de pesquisa "**Avaliação da bioacessibilidade e possíveis efeitos cardioprotetores dos compostos bioativos fenólicos de frutos da família das mirtáceas**" (Protocolo CEUA nº 528), conforme constante nos documentos apresentados (15 animais adicionais).

Cordialmente,

Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
Coordenadora da CEUA/FCF/USP

Figura 14 – Segunda aprovação concedida pelo CEUA para a realização de alterações no ensaio com animais.