UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Bioacessibilidade, atividade antioxidante e antiproliferativa de compostos
bioativos fenólicos de sucos de frutos da família Myrtaceae

Flávia Maria Beteto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Bioacessibilidade, atividade antioxidante e antiproliferativa de compostos
bioativos fenólicos de sucos de frutos da família Myrtaceae

Flávia Maria Beteto

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018. O original encontra-se
disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Beteto, Flávia Maria
B562b Bioacessibilidade, atividade antioxidante e antiproliferativa
de compostos bioativos fenólicos de sucos de frutos da família
Myrtaceae / Flávia Maria Beteto. -- São Paulo, 2015.
76p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental.

Orientador: Genovese, Maria Inés

1. Alimento : Composto fenólico : Ciência dos alimentos 2.
Proliferação celular 3. Bromatologia I. T. II. Genovese, Maria
Inés, orientador.

Flávia Maria Beteto

Bioacessibilidade, atividade antioxidante e antiproliferativa de compostos
bioativos fenólicos de sucos de frutos da família Myrtaceae

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Inés Genovese
Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2015.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Teresinha e Mário
e ao meu irmão Fábio
pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por todas as oportunidades que me julgou capaz de receber.

À minha família, que sempre me deu incentivo e apoio para que conseguisse concluir mais essa etapa da minha vida. Agradeço em especial a minha mãe, a qual obrigada é muito pouco para expressar toda minha gratidão e admiração e também ao meu irmão pela ajuda financeira durante todo esse período.

À minha orientadora Profa. Maria Inés Genovese, pela oportunidade, dedicação, incentivo, paciência e exemplo de pesquisadora.

Ao Prof. Thomas P. Ong pela possibilidade de utilização da sala de cultura celular, o que permitiu que este trabalho fosse desenvolvido e à sua aluna Gabriela R. Costa pela ajuda, treinamento e amizade.

Aos amigos de laboratório: Alice, Beatriz, Carlos, Daniel, Helena, Heloísa, Luana, Marcela, Márcio, Maria Gabriela, Renata e Tatyane. Obrigada pela colaboração e por tornarem os meus dias melhores, vocês são minha família na cidade grande!

Às técnicas do laboratório Rosa e Luciene pela ajuda nas análises e também aos funcionários do Departamento de Alimento e Nutrição Experimental: Cléo, Edilson, Mônica e Roberta.

Por fim, agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e a Fapesp pelo auxílio financeiro ao laboratório.

Meus sinceros agradecimentos...

RESUMO

BETETO, F. M. **Bioacessibilidade, atividade antioxidante e antiproliferativa de compostos bioativos fenólicos de sucos de frutos da família Myrtaceae.** 2015. 76f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Diversos estudos com compostos fenólicos têm demonstrado os efeitos benéficos destas substâncias frente a diversas patologias, incluindo alguns tipos de câncer. Considerando que os polifenóis da dieta, não absorvidos, podem permanecer no trato gastrointestinal por um período prolongado, e as células do epitélio intestinal podem ser regularmente expostas a estes compostos, é importante avaliar seu potencial efeito benéfico no trato gastrointestinal. Entretanto, é necessário determinar como o processo de digestão afeta a estabilidade e propriedades químicas destes compostos. O objetivo deste estudo foi avaliar a bioacessibilidade dos polifenóis de sucos de frutas da família Myrtaceae: cagaita (*Eugenia dysenterica* DC), camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh) e jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* B.), o efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre sua atividade antioxidante, e a ação dos polifenóis dos sucos digeridos sobre a proliferação, ciclo celular e apoptose em células Caco-2 de adenocarcinoma de cólon humano. A digestão simulada *in vitro* causou perdas de alguns compostos, tais como os derivados de cianidina encontrados na jaboticaba, possivelmente devido às condições do pH intestinal. No entanto, o conteúdo de ácido elágico livre aumentou em todos os sucos analisados, indicando a ocorrência de hidrólise durante o processo de digestão *in vitro*, liberando ácido elágico a partir dos elagitaninos. A atividade antioxidante dos polifenóis foi afetada de forma diferente pela digestão *in vitro*, de acordo com o suco, provavelmente relacionado à composição de polifenóis. Quanto à proliferação, ciclo celular e apoptose, os polifenóis a partir da fração bioacessível do camu-camu apresentou aproximadamente 30% de inibição da proliferação, seguido pela cagaita com 24%, ambos na maior concentração testada (50 µg EAG/mL). Jaboticaba não apresentou efeito inibitório nas concentrações testadas, entretanto os compostos fenólicos de todas as frações bioacessíveis (50 µg EAG/mL) apresentaram parada no ciclo celular na fase G2/M sem induzir apoptose nas células Caco-2. Os resultados sugerem que os polifenóis das Myrtaceae podem modular a proliferação nas células Caco-2 por bloqueio da progressão do ciclo celular na fase G2/M e assim oferecer efeitos benéficos para a saúde do trato gastrointestinal.

Palavras-chave: Myrtaceae, polifenóis, digestão *in vitro*, Caco-2.

ABSTRACT

BETETO, F. M. **Bioaccessibility, antioxidant and antiproliferative activity of bioactive phenolic compounds in juices from fruits of Myrtaceae family.** 2015. 76f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Several studies with phenolic compounds have shown the beneficial effects of these substances across various diseases, including some types of cancer. Considering that most of the polyphenols and their conjugates, unabsorbed, can remain in the lumen for a prolonged period, and epithelial cells lining the intestine are regularly exposed to these compounds, it is important to evaluate their potential beneficial effects in the gastrointestinal tract. However it is necessary to evaluate how the digestion process affects the stability and chemical properties of these compounds. The aims of this study were to evaluate the bioaccessibility of polyphenols in juices from Brazilian native fruits of the Myrtaceae family (cagaita, camu-camu and jaboticaba), the effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on their antioxidant activity, and the action of polyphenols from digested juices on proliferation, cell cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. The results showed that *in vitro* gastrointestinal digestion caused losses of some polyphenols, such as cyanidins derivatives from jaboticaba, possibly due to the exposure to conditions of intestinal pH. However, contents of free ellagic acid increased in all the juices analyzed, indicating the occurrence of hydrolysis during *in vitro* digestion process, releasing ellagic acid from the ellagitannins. The antioxidant activity was affected for different forms by the *in vitro* digestion, demonstrating be related to individual components present in each sample and the mechanisms by which they act as antioxidants. Regarding the evaluation of proliferation, cell-cycle and apoptosis, polyphenols from bioaccessible fractions of camu-camu showed about 30% of inhibition of proliferation, followed by cagaita with 24%, both at the highest concentration tested (50 µg GAE/mL). Jaboticaba did not show inhibitory effect at the concentrations tested but the phenolic compounds of all bioaccessible fractions (50 µg GAE/mL) showed arrest in G2/M phase of cell-cycle without inducing apoptosis in the Caco-2 cells. Results suggest that Myrtaceae polyphenols may modulate the proliferation of Caco-2 cells by blocking the progression of cell-cycle at G2/M phase, providing beneficial effects to gastrointestinal health.

Keywords: Myrtaceae; polyphenols; *in vitro* digestion; Caco-2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura Química dos Flavonoides.....	27
Figura 2 -	Estrutura Química dos Ácidos Fenólicos.....	28
Figura 3 -	Fórmulas Estruturais: a) flavonoide genérico; b) flavan-3-ol e c) procianidina (tanino condensado).....	29
Figura 4 -	(A) Cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i> DC.), (B) Camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i> McVaugh), (C) Jaboticaba (<i>Myrciaria Cauliflora</i> Berg).....	35
Figure 1 -	HPLC - Chromatogram profiles (270 nm) of flavonoids and phenolic acids in the fruits before and after <i>in vitro</i> digestion.....	58
Figure 2 -	Antioxidant activity of juices from cagaita, camu-camu and jaboticaba, before and after <i>in vitro</i> simulated gastrointestinal digestion.....	60
Figure 3 -	Effects of phenolic compounds (12.5, 25 and 50 µg GAE/mL) from bioaccessible fraction of cagaita (A), camu-camu (B) and jaboticaba (C), on Caco-2 cell proliferation (%) at 24 h.....	61
Figure 4 -	Cell- cycle distribution (%) of Caco-2 cells after treatment with phenolic compounds (50 µg GAE/mL) from bioaccessible fraction of cagaita, camu-camu and jaboticaba after <i>in vitro</i> digestion.	64

LISTA DE TABELAS

Table 1 -	Physicochemical characterization of the commercial frozen fruit pulps of cagaita, camu-camu and jaboticaba.....	56
Table 2 -	Tentative identification and quantification of the main flavonoids and phenolic acids in the juices before and after <i>in vitro</i> digestion by HPLC-DAD	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

~: aproximadamente	N: normalidade
®: marca registrada	μMol: micromol
+: mais	mmol: milimol
±: mais ou menos	EAG: equivalente de ácido gálico
<: menor	GAE: gallic acid equivalent
%: porcentagem	OMS: Organização Mundial da Saúde
g: gravitacional	IARC: International Agency for Research on Cancer
rpm: rotação por minuto	NCI: National Cancer Institute
°C: grau Celsius	UV: ultravioleta
Abs: absorbância	FDA: Food and Drug Administration
pH: potencial hidrogeniônico	ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
h: horas	LPH: Lactase Floridzina Hidrolase
min: minutos	SGLT1: transportadores de sódio dependente
v/v: volume/volume	CBG: β glicosidase citosólica
μm: micrometro	ST: Sólidos Totais
μ: micro	AT: Acidez Titulável
μg: micrograma	SST: Sólidos Solúveis Totais
mg: miligrama	AOAC: Association Of Analytical Communities
g: grama	CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
nm: nanômetro	HPLC: High Performance Liquide Chromatography
μL: microlitro	DAD: Detector de arranjo de Diodo
mL: mililitro	
nM: nanomolar	
mM: milimolar	
M: molar	

PA: Poliamida

PTFE: politetrafluoretileno

DPPH: 2,2- difenil-1- picrilhidrazil

ORAC: Capacidade de absorção do radical oxigênio

TROLOX: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico

AAPH: 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato

BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

SFB: Soro Fetal Bovino

DMSO: dimetilsulfóxido

PBS: tampão fosfato salino

RNase: ribonuclease

PI: iodeto de propídio

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

ANOVA: análise de variância

SPE: Solid Phase Extraction

Fw: fresh weight

SD: standard deviation

HCl: cloreto de sódio

NaCl: cloreto de sódio

NaHCO₂: bicarbonato de sódio

Na₂HPO₄: fosfato dissódico

KCl: cloreto de potássio

KH₂PO₄: fosfato monopotássico

NaOH: hidróxido de sódio

CaCl₂: cloreto de cálcio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Compostos Bioativos Fenólicos.....	26
1.1.1 Flavonoides	27
1.1.2 Ácidos Fenólicos.....	28
1.1.3 Taninos.....	28
1.2 Bioacessibilidade dos compostos bioativos fenólicos.....	30
1.3 Atividade antiproliferativa dos compostos fenólicos de alimentos	32
1.4 Frutos nativos brasileiros da família Myrtaceae	34
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIALE MÉTODOS	37
3.1 Material	37
3.2 Métodos.....	37
3.2.1 Caracterização físico química das polpas dos frutos.....	37
3.2.2 Preparação dos sucos.....	38
3.2.3 Bioacessibilidade.....	38
3.2.3.1 Digestão simulada <i>in vitro</i>	38
3.2.4 Preparação das amostras e análise dos compostos fenólicos (CLAE-DAD)	39
3.2.5 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	40
3.2.5.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro de radicais livres DPPH.....	40
3.2.5.2 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)	41
3.2.6 Linhagem celular e condições de cultivo.....	41
3.2.6.1 Proliferação celular.....	42
3.2.6.2 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	42
3.2.6.3 Apoptose	43
3.2.7 Análise estatística.....	43

4 RESULTADOS	45
4.1 <i>In vitro</i> bioaccessibility and antioxidant activity of polyphenols in juices from fruits of Myrtaceae and effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells.....	45
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, onde aproximadamente 7,6 milhões de óbitos são registrados a cada ano. Dentre as neoplasias mais prevalentes, destacam-se os tumores de mama, pulmão, colorretal, estômago e próstata. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), órgão relacionado à OMS, o número de casos de câncer no mundo poderá aumentar em 75% até 2030, podendo chegar a 90% em países menos desenvolvidos (BRAY et al., 2012; IARC, 2012).

O câncer colorretal é o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens, com 746 mil novos casos em 2012, e o segundo entre as mulheres, com 614 mil casos. O desenvolvimento deste tipo de câncer é mais frequente em países desenvolvidos e está diretamente relacionado à dieta e ao estilo de vida da população (INCA, 2014).

A possibilidade de redução do risco e tratamento de doenças através da alimentação tem despertado o interesse de muitos grupos de pesquisa, os quais tem dedicado uma maior atenção ao papel da dieta na saúde humana. No início da década de 90 foi lançado nos EUA, pelo Instituto Nacional do Câncer (National Cancer Institute - NCI), o programa inicialmente intitulado “5 a day for better health” (5 vezes ao dia para uma saúde melhor), cujo objetivo era estimular a população norte-americana a consumir pelo menos 5 porções diárias de frutas e hortaliças, buscando a prevenção de doenças. Cerca de uma década após seu lançamento, o programa foi modificado para “5-9 a day for better health” (5 a 9 vezes ao dia para uma saúde melhor) (WHO, 2003).

Estudos epidemiológicos demonstram que o consumo de frutas e vegetais pode estar relacionado com a diminuição no risco do desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, entre elas o câncer. De acordo com um estudo caso-controle, realizado no Oeste da Austrália, o consumo de frutas e vegetais reduz o risco de determinados tipos de câncer colorretal. Couve-de-bruxelas, repolho, couve-flor e brócolis foram associados à diminuição de incidência de tumores no cólon proximal e distal. Já a maçã foi relacionada a um menor risco de câncer no cólon distal (ANNEMA et al., 2011; ARTS & HOLLMAN, 2005; DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004; LEE & PARK, 2003; STEINMETZ & POTTER, 1996).

O efeito protetor das frutas e vegetais tem sido particularmente atribuído aos compostos com atividade antioxidante, entre eles os compostos bioativos fenólicos, também chamados de polifenóis. A atividade antioxidante destes compostos está relacionada com as suas estruturas químicas, incluindo a sua polaridade e também com a natureza e a posição dos grupos constituintes (SOARES, 2002). Estas características desempenham um importante papel na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, podendo atuar tanto na iniciação como na propagação dos processos oxidativos. Os compostos bioativos fenólicos podem atuar também como pró-oxidantes, induzindo a apoptose ou inibindo a proliferação celular, além de exercer vários outros efeitos biológicos através de interações diretas com receptores ou enzimas responsáveis pela transdução de sinal (D'ARCHIVIO et al., 2008; SOUZA et al., 2007).

Diversos estudos com compostos fenólicos têm demonstrado os efeitos benéficos destas substâncias frente a diversas patologias, entretanto a maioria utiliza as substâncias puras, isoladas a partir dos alimentos ou obtidas por síntese química, o que pode gerar resultados irreais ou superestimados da atividade biológica (SAURA-CALIXTO et al., 2007).

A bioacessibilidade dos polifenóis encontrados nos alimentos deve ser considerada, visto que a biodisponibilidade destes compostos pode ser substancialmente diferente quando em conjunto com a matriz do alimento. Considerando que o estudo *in vivo* destes componentes durante a passagem pelo trato gastrointestinal é dificultado, metodologias *in vitro* foram desenvolvidas como uma alternativa, onde é feita uma simulação das condições do processo de digestão no trato gastrointestinal. O presente estudo é importante para elucidar os possíveis mecanismos pelos quais os compostos bioativos fenólicos podem de fato oferecer benefícios ao organismo humano (MANACH et al., 2005; SAURA-CALIXTO et al., 2007).

1.1 Compostos Bioativos Fenólicos

Os polifenóis compreendem a maior classe de fitoquímicos presentes nos domínios vegetais. São compostos extra nutricionais e podem ser encontrados em sua forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998). São considerados produtos do metabolismo secundário de plantas, e o seu conteúdo nas frutas está fortemente relacionado ao grau de maturação, variedade, clima, composição do solo, localização geográfica e às

condições de armazenamento. Estão associados com o sistema de defesa das plantas contra patógenos e radiação UV, além de serem responsáveis pelo aroma, cor e adstringência em vários alimentos (MANACH et al., 2004; PELEG et al., 1988; YORDI et al., 2012).

As estruturas químicas dos compostos fenólicos possuem pelo menos um anel aromático ligado a um grupamento hidrofílico e, de acordo com a forma com que estes anéis ligam-se uns aos outros, são divididos em classes distintas. Os três maiores grupos de compostos fenólicos compreendem a classe dos flavonoides, dos ácidos fenólicos e dos taninos (D'ARCHIVIO et al., 2007).

1.1.1 Flavonoides

Os flavonoides compõem um grupo de polifenóis bastante diversificados e são caracterizados por sua estrutura básica de difenilpropano (C6-C3-C6). Estes são divididos em diversas subclasses, sendo elas: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, isoflavonas e antocianinas (**Figura 1**) (HERTOG et al., 1992; LIU, 2004). Os flavonoides representam cerca de dois terços dos polifenóis da dieta, sendo encontrados em sua maioria na forma glicosilada, embora os flavonoides em sua forma livre (agliconas) sejam mais ativos (MANACH et al., 2004).

Figura 1. Estrutura Química dos Flavonoides (Adaptado de MANACH et al., 2004).

1.1.2 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos são classificados em dois grupos, sendo eles os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e os derivados dos ácidos hidroxibenzóicos (**Figura 2**). O primeiro grupo apresenta a estrutura com nove átomos de carbono (C6-C3), dentre eles estão os ácidos p-cumáricos, ferúlicos, cafeicos, sinápticos e cinâmicos. Os derivados do ácido hidroxibenzóico possuem um grupo carboxílico ligado ao anel aromático (C6-C1) e entre esses se destacam os ácidos vanílico, siríngico, elágico e gálico (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004; SOARES, 2002). Os ácidos fenólicos também podem ser encontrados ligados entre si ou a outros compostos, tendo como exemplo o ácido clorogênico, o qual é originado da associação do ácido caféico com o ácido quínico (SOARES, 2002).

ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS

R1 = R2 = OH; R3 = H : Ácido protocatecuico
R1 = R2 = R3 = OH : Ácido gálico

ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS

R1 = OH : Ácido cumárico
R1 = R2 = OH : Ácido cafeico
R1 = OCH₃; R2 = OH : Ácido ferúlico

ÁCIDO CLOROGÊNICO

Figura 2 – Estrutura Química dos Ácidos Fenólicos (Adaptado MANACH et al., 2004).

1.1.2 Taninos

Os taninos são compostos de alto peso molecular e altamente hidroxilados, podendo formar complexos insolúveis com proteínas e carboidratos. Conferem aos alimentos a

sensação de adstringência devido a sua capacidade de precipitar proteínas salivares (FERREIRA, 2003). De acordo com a estrutura química, são classificados em dois grandes grupos: os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico (galotanino) ou ácido elágico (elagitanino) glicosilados, onde as hidroxilas do açúcar são esterificadas com os ácidos fenólicos. Os taninos condensados, ou também chamados proantocianidinas, são polímeros de alto peso molecular compostos, em sua maioria, pela unidade monomérica de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina). As proantocianidinas são assim denominadas por formarem após quebra oxidativa, em meio alcoólico ácido à quente, pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina (**Figura 3**) (BRAVO, 1998; COS et al., 2003; DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004; MONTEIRO et al., 2005).

Figura 3 - Fórmulas estruturais: a) flavonoide genérico, b) flavan-3-ol e c) procianidina (tanino condensado).

1.2 Bioacessibilidade dos compostos bioativos fenólicos

O conceito de biodisponibilidade foi inicialmente proposto pela Food and Drug Administration (FDA) especificamente para a área de farmacologia. Atualmente a ANVISA define biodisponibilidade como a medida da quantidade de um medicamento, contida em uma fórmula farmacêutica, que chega à circulação sistêmica e a velocidade na qual esse processo ocorre. A partir da década de 80 o termo começou a ser utilizado também relacionado a alimentos, visto que não é apenas importante saber se um nutriente está presente no alimento, e sim o quanto é biodisponível. O entendimento dos processos individuais de biodisponibilidade destes compostos e de seus metabólitos é essencial para compreender o seu mecanismo de ação, bem como a influência do composto na promoção da saúde (ANVISA, 2014; D'ARCHIVIO et al., 2007; HORST & LAJOLO, 2009).

Para que um composto químico possa exercer atividade biológica, deve atingir o alvo fisiológico em uma concentração mínima que apresente esse efeito. A liberação de um constituinte alimentar da matriz do alimento, tornando-o disponível para a absorção, é definida como bioacessibilidade (SAURA-CALIXTO et al., 2007).

A complexidade da matriz alimentar, a estrutura química do composto e a ingestão concomitante com outros alimentos podem facilitar ou dificultar a absorção, sendo assim, o consumo diário de alimentos com alto teor de compostos bioativos não pressupõe que estes atingirão o alvo fisiológico em concentrações ativas (HOLST & WILLIAMSON, 2008; OLIVEIRA et al., 2011). Assim, o primeiro passo para avaliar a biodisponibilidade dos componentes presentes nos alimentos é a digestão gastrointestinal, onde uma fração bioacessível é obtida (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2012; SAURA-CALIXTO et al., 2007).

Nos últimos anos, estudos de biodisponibilidade em seres humanos têm dado provas da absorção dos polifenóis e demonstrado que a absorção varia amplamente, dependendo do tipo de composto e matriz do alimento (MANACH et al., 2005). Em geral, a absorção de polifenóis é muito baixa (as concentrações totais de metabólitos no plasma estão na gama de nM até μ M) e o tempo para atingir a concentração máxima varia de 30 minutos a várias horas, dependendo do local de absorção (MANACH et al., 2005).

A maioria dos polifenóis em frutas se encontra na forma glicosilada ou como polímeros. As agliconas, as quais correspondem a apenas uma pequena parte dos polifenóis,

podem ser diretamente absorvidas no intestino delgado. Entretanto a maioria dos polifenóis na sua forma nativa (polímeros, glicosilados ou esterificados) precisam ser hidrolisados através da ação de enzimas digestivas e microflora bacteriana antes de serem absorvidos (D'ARCHIVIO et al., 2010; SCALBERT & WILLIAMSON, 2000).

Existem dois possíveis mecanismos pelos quais os glicosídeos podem ser hidrolisados. O primeiro mecanismo envolve a ação da lactase floridzina hidrolase (LPH), que está presente na parte externa da borda em escova das células epiteliais do intestino (DONOVAN et al., 2006; WILKINSON et al., 2003). O segundo mecanismo envolve a absorção dos glicosídeos, sem prévia hidrólise, através dos transportadores de glicose sódio dependente (SGLT1) presentes na borda em escova das células epiteliais, e posteriormente a desglicosilação pela ação da β -glicosidase citosólica (CBG). Os polifenóis que não são absorvidos no intestino delgado atingem o cólon onde sofrem modificações estruturais substanciais. A microflora do cólon hidrolisa glicosídeos em agliconas e degrada-os a ácidos fenólicos simples (AURA et al., 2005). Esta atividade é de grande importância para a ação biológica de polifenóis, uma vez que metabólitos ativos são produzidos pela microflora do cólon (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000).

Antes da passagem para a corrente sanguínea, os polifenóis são submetidos a outras modificações estruturais, devido ao processo de conjugação que ocorre no intestino delgado e, principalmente, no fígado. A conjugação, que inclui a metilação, sulfatação e glicuronidação, representa um processo de destoxificação metabólica comum a muitos xenobióticos que restringe os seus potenciais efeitos tóxicos e facilita a sua eliminação biliar e urinária por uma solubilidade aumentada e um peso molecular mais elevado. Embora o processo de conjugação por um lado produza metabólitos ativos de alguns polifenóis, por outro, reduz a quantidade total de polifenóis no sangue, aumentando a sua excreção. É importante ressaltar que os mecanismos de conjugação são altamente eficientes e agliconas livres estão geralmente ausentes ou presentes em baixas concentrações no plasma após o consumo de doses nutricionais (AURA et al., 2005; CROZIER et al., 2010).

Tendo em vista que a maior parte dos polifenóis e seus conjugados podem permanecer no lúmen intestinal por um período prolongado, e que as células epiteliais que revestem o intestino são regularmente expostas a estes compostos, é importante avaliar os seus possíveis efeitos benéficos no trato gastrointestinal, tais como a inibição da proliferação celular anormal e proteção contra o desenvolvimento de neoplasias (BERMÚDEZ-SOTO et al., 2007).

Contudo para estabelecer evidências conclusivas da eficácia dos polifenóis na prevenção de doenças e melhoria da saúde humana, é essencial determinar a distribuição destes compostos na dieta, bem como as interações biológicas que os polifenóis podem ter com macromoléculas, células, enzimas e microflora do cólon para avaliar a sua atividade biológica em tecidos alvo (HAMINIUK et al., 2012). Entretanto, devido à diversidade dos compostos fenólicos presentes nos alimentos, o estudo da sua biodisponibilidade é complexo (BRAVO, 1998).

1.3 Atividade antiproliferativa de compostos fenólicos de alimentos

Recentemente, considerável atenção tem sido destinada à identificação de fontes naturais capazes de inibir, retardar ou reverter os múltiplos estágios da carcinogênese. A existência de linhagens celulares derivadas de tumores, as quais podem ser continuamente subcultivadas *in vitro*, tem favorecido vários estudos e possibilitado a elucidação de mecanismos de ação de substâncias ativas (NACHTIGAL, 2011).

O potencial anticancerígeno de compostos fenólicos de alimentos tem sido observado em diversos estudos (GÓMEZ-ALONSO et al., 2012; LEE et al., 2006; RAMOS et al., 2011; VU et al., 2012), ressaltando a capacidade destes em inibir a proliferação celular e/ou induzir a apoptose. A apoptose, também conhecida como morte celular programada, elimina as células geneticamente danificadas ou células que podem ser inapropriadamente induzidas a proliferar, representando, assim, um mecanismo de proteção contra a transformação neoplásica e o desenvolvimento de tumores (D'ARCHIVIO et al., 2008; MASELLA et al., 2004).

A falta de regulação da apoptose pode exercer função crítica na oncogênese (WILLIAMS, 1991). Mertens-Talcott et al. (2006), ao estudarem o efeito de extratos polifenólicos isolados de uvas vermelhas muscadine, quanto à indução de morte celular em células Caco-2 de carcinoma de cólon, observaram que os extratos induziram apoptose, causaram uma diminuição do número de células e alterações na cinética do ciclo celular, de uma forma dependente da concentração. A eficácia dos compostos polifenólicos, relativa aos efeitos antiproliferativos, apresentou boa correlação com os teores de derivados de ácido elágico encontrados nos extratos avaliados.

Em estudo investigando o efeito antiproliferativo e citotóxico de mais de 30 tipos de flavonoides em células cancerosas de cólon humano (linhagens Caco-2 e HT-29), foi observado, para quase todos os compostos, redução no crescimento celular sem apresentar citotoxicidade (KUNTZ et al., 1999).

No entanto, os estudos apresentados anteriormente não levaram em conta as condições reais de consumo dos alimentos que os contêm, isto é, a bioacessibilidade e a estabilidade dos polifenóis frente ao processo de digestão gastrointestinal, o que pode afetar a estrutura e propriedades destes compostos. Neste contexto, Bermúdez-Soto et al. (2007), trataram células Caco-2 com suco de “chokeberry” (após digestão *in vitro*) a 2% (~ 85 µM compostos fenólicos) e 5% (~ 220 µM compostos fenólicos) em exposição repetitiva (2 horas por dia, durante 4 dias) e relataram a inibição do crescimento celular de aproximadamente 40 e 70%, respectivamente, em comparação com células não tratadas.

Cilla et al. (2009) avaliaram a bioacessibilidade dos compostos fenólicos de um suco concentrado composto por uva, laranja e damasco. Amostras dos sucos com adição de sulfato de ferro e sucos com adição de sulfato de ferro e leite desnatado também foram avaliadas. Após a digestão *in vitro*, a fração bioacessível foi avaliada quanto ao seu potencial efeito antiproliferativo em células Caco-2. As células foram incubadas durante 4 horas por dia durante quatro dias e também de forma contínua durante 24 horas. O suco digerido (~ 50 mM de fenólicos totais) sem a adição de sulfato de ferro ou leite foi a amostra que causou a maior inibição da proliferação celular nas duas condições experimentais.

O potencial antioxidante dos compostos fenólicos têm sido amplamente estudado e associado à diminuição do risco no desenvolvimento de câncers, já que estas substâncias podem atuar protegendo as células contra processos oxidativos, podendo atuar tanto na iniciação como na progressão do câncer. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que em certas condições, como em concentrações elevadas ou na presença de íons metálicos, os polifenóis podem atuar como pro-oxidantes. Ambos os mecanismos podem estar relacionados com a inibição da proliferação e morte celular, porém os mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos (LEA, 2010).

1.4 Frutos nativos brasileiros da família Myrtaceae

O Brasil, devido a sua vasta extensão territorial e posição geográfica, possui uma das maiores biodiversidades do planeta, com cerca de 18% das espécies de plantas existentes no mundo, as quais estão distribuídas em seis grandes biomas: Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pampas e Pantanal (IBGE, 2004; SILVA et al., 1994).

Myrtaceae é uma das mais importantes e conhecidas famílias frutíferas presentes no Brasil, com espécies nativas encontradas tanto em ambientes silvestres, como em pomares domésticos. Produzem frutos pequenos, saborosos e com alto teor vitamínico, os quais podem ser consumidos tanto *in natura*, quanto em forma de doces, geléias e licores. Dentre estes, destacam-se camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) e jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) (**Figura 4**) (LORENZI, 2008; SANTOS, 2006; SILVA et al., 2003).

O camu-camu é um fruto cultivado no Peru e Brasil, mais precisamente na região Amazônica. Comparado com outros frutos, o camu-camu é considerado uma fonte rica de vitamina C com valores de 1,9 a 2,3 g/100 g de matéria fresca, dependendo do estágio de maturação do fruto. Possui também altos teores de compostos fenólicos, como flavonoides e elagitaninos e demonstrou ter uma forte atividade antioxidante em estudos *in vitro* e *in vivo* (AKTER et al., 2011; FUJITA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2010). Entretanto, por ser pouco difundido comercialmente, o consumo do fruto ainda é restrito à região Norte (ABE, et al., 2012; GENOVESE et al., 2008; GONÇALVES et al., 2010).

A espécie *Eugenia dysenterica* DC, popularmente conhecida como cagaita, é um fruto nativo do Cerrado brasileiro. O fruto, apesar de pouco explorado, apresenta grande interesse econômico devido ao seu uso culinário e é usado em várias preparações regionais, como geleias, sorvetes, licores e sucos (LIMA et al., 2010; MARTINOTTO et al., 2008). É considerado uma fonte de vitamina C e de compostos fenólicos, incluindo a quercetina, elagitaninos, ácido elágico e campferol (CARDOSO et al., 2011; GONÇALVES et al., 2010). Apresenta grande potencial antioxidante e também propriedades laxativas, advindas de um peptídeo específico capaz de aumentar a motilidade intestinal (CARDOSO et al., 2011; GENOVESE et al., 2008; LIMA et al., 2010).

A jaboticaba se destaca entre as espécies nativas da Mata Atlântica, ocorrendo desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais, incluindo Mato Grosso do Sul e São Paulo, sendo este último estado o maior produtor do fruto (MATTOS, 1983). A jaboticabeira produz frutos pequenos, de casca negra e polpa branca que envolve de uma a quatro sementes. Comparadas com as *berries*, a jaboticaba destaca-se pelos elevados teores de derivados do ácido elágico e flavonóides, como as antocianinas presentes na casca (ABE et al., 2012; LEITE-LEGATTI et al., 2012).

Os frutos produzidos pelas espécies nativas são, ainda, pouco explorados comercialmente, porém podem ser uma possível fonte de renda para a população local (ALMEIDA et al., 2011). Os frutos nativos brasileiros da Família Myrtaceae, por serem excelentes fontes de derivados de ácido elágico, podem ter grande potencial antiproliferativo. No entanto, ainda não há estudos a esse respeito.

Figura 4 - A) Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.), (B) Camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh), (C) Jaboticaba (*Myrciaria Cauliflora* Berg)

2 OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS:

Avaliação da bioacessibilidade dos compostos fenólicos presentes em sucos de frutos da família Myrtaceae, cagaita, camu-camu e jaboticaba, os efeitos do processo de digestão gastrointestinal *in vitro* na atividade antioxidante e a ação dos polifenóis da fração bioacessível na proliferação celular, ciclo celular e apoptose em células Caco-2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Avaliação do perfil cromatográfico dos compostos fenólicos presentes nos sucos antes e após a digestão *in vitro*;

Determinação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos nos sucos antes e após a digestão *in vitro*;

Avaliação do efeito dos compostos fenólicos presentes na fração bioacessível após a digestão *in vitro* na proliferação celular, ciclo celular e apoptose em linhagens celulares Caco-2 de adenocarcinoma de cólon humano.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Foram analisados três sucos distintos, preparados utilizando polpas comerciais congeladas de frutos nativos pertencentes à família Myrtaceae, sendo eles: cagaita, camu-camu e jaboticaba. As polpas de cagaita (Lote: L1-004, data de fabricação: 26/outubro/2013) foram fornecidas pela Cooperativa dos Agricultores Familiares e Agroextrativistas Grande Sertão (Montes Claros - MG), as de camu-camu (data de fabricação: agosto/2012) pelo Belaiaçá® (Castanhal - PA) e as de jaboticaba (Lote: 1508, data de fabricação: 17/dezembro/2014) pelo Sítio do Bello® (Paraibuna-SP). As polpas foram armazenadas a -80 °C até o momento das análises.

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterização físico química das polpas dos frutos

Foram realizadas análises de sólidos totais (ST), acidez titulável (AT), sólidos solúveis totais (SST), pH e fibras segundo determinação da AOAC (2005). O pH foi determinado utilizando-se potenciômetro digital (Hanna instruments pH 20 – pH 21), calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 e os SST foram determinados por refratometria, utilizando refratômetro digital (Reichert Analytical Instruments r² mini), e os resultados expressos em °Brix. A determinação de açúcares totais foi realizada conforme descrito por Dubois et al.(1956) e expressa em (g/100 g de polpa).

3.2.2 Preparação dos sucos

Os sucos foram preparados de acordo com as orientações do fornecedor: 100 g de polpa fresca + 200 mL de água destilada à temperatura ambiente. Posteriormente os sucos foram homogeneizados em liquidificador e utilizados nas análises seguintes. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

3.2.3 Bioacessibilidade

A bioacessibilidade dos compostos fenólicos presentes nos sucos foi avaliada através da simulação das condições do processo de digestão no trato gastrointestinal, de acordo com método descrito por Cilla et al. (2009), com algumas modificações descritas a seguir.

3.2.3.1 Digestão simulada *in vitro*

Foram utilizados 80 g de suco preparado como descrito em 3.2.2. Para simular a digestão gástrica ajustou-se o pH dos sucos para 2,0 com HCl 6 M. O pH foi checado após 15 min e se necessário, reajustado para 2,0. Em seguida os sucos foram digeridos com uma solução de pepsina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA – P-7000) em HCl 0,1 N, suficiente para fornecer 0,02 g de pepsina/g de amostra, por 2 h, em banho-maria (37 °C), sob agitação. Após a incubação, os digeridos gástricos foram mantidos em banho de gelo por 10 min para interromper a ação da pepsina.

Para simular a digestão intestinal, o pH foi ajustado para 6,5 com NaHCO₂ 1 M e em seguida adicionou-se uma solução de pancreatina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA – P-1750) e sais biliares (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA – B-8631), suficiente para fornecer 0,005 g de pancreatina e 0,03 g de sais biliares/g de amostra. As amostras foram incubadas novamente por mais 2 h, em banho-maria (37 °C), sob agitação. Para interromper a digestão intestinal e assegurar a inativação de enzimas e estabilidade dos compostos fenólicos,

as amostras foram mantidas em banho de gelo por 10 min e o pH foi então ajustado para 2,0 com ácido fórmico (1,5%).

3.2.4 Preparação das amostras e análise dos compostos fenólicos (CLAE-DAD)

Alíquotas dos sucos após a digestão *in vitro* foram centrifugados a 3890 g por 60 min a 4°C (HERMLE Z326K, Labortechnik GmbH, Alemanha) para separar a fração solúvel (fração bioacessível). Os sucos antes da digestão *in vitro* também foram centrifugados para facilitar as análises. A identificação e quantificação dos principais flavonoides e ácidos fenólicos nos sucos, antes e após a digestão *in vitro*, foi realizada conforme Arabbi, Genovese & Lajolo (2004). Os sobrenadantes foram passados por colunas de Poliamida SC6 (PA) (1 g, Macherey-Nagel GmbH Co., Düren, Alemanha) previamente condicionadas com 20 mL de metanol e 60 mL de água. Em seguida lavou-se as colunas com água destilada e os compostos fenólicos foram eluídos com metanol e em seguida com metanol: amônia (99,5 : 0,5) e as frações coletadas separadamente. Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspendidas em 1 mL de metanol (grau cromatográfico) e filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana de politetrafluoretileno (PTFE) (Millipore Ltd., Bedford, MA) de 0,22 µm. A análise do perfil cromatográfico dos compostos fenólicos foi realizada por CLAE/DAD.

A separação dos compostos fenólicos foi realizada em coluna Prodigy5 µ ODS 250 x 4,60 mm (PhenomenexLtd, Reino Unido). Foi utilizado gradiente de solventes constituído por A. Água: Tetrahidrofurano: Ácido trifluoroacético (98: 2: 0,1) e B. Acetonitrila, na proporção de 17% de B por 2 min aumentando para 25% B após 5 min, 35% B após mais 8 min e 50% B após mais 5 min. Para limpeza da coluna foi aumentada então para 90% B e a seguir re-equilibrada nas condições iniciais por 10 min. Utilizou-se o cromatógrafo líquido Hewlett Packard série 1100, constituído por injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector de arranjo de diodo (DAD) (Palo Alto, EUA), controlados pelo software ChemStation. As amostras foram injetadas em duplicata e os polifenóis foram identificados através da comparação de tempo de retenção e espectro com os padrões. A quantificação foi baseada em calibração externa, e os padrões foram obtidos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA). Os resultados foram expressos em µg/mL de suco.

3.2.5 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

Para a determinação da atividade antioxidante, as amostras foram preparadas conforme descrito anteriormente em 3.2.3, entretanto, as frações metanol e metanol: amônia eluídas das colunas de PA foram coletadas juntas e após a rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 5 mL de metanol e armazenadas a -20 °C até o momento da análise.

3.2.5.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro de radicais livres (DPPH•)

A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do radical estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil – Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) pelos antioxidantes presentes na amostra, método proposto por Brand-Williams et al. (1995), com algumas modificações (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Preparou-se uma solução metanólica de DPPH• (0,05 mM) de forma a apresentar absorvância entre 0,6 e 0,7 em 517 nm. As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambrigde, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade foram adicionados 250 µL da solução de DPPH•, 50 µL de metanol para o grupo controle e o mesmo volume para uma solução-padrão de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (Trolox – Flucka Chemicals Suisse), na concentração de 250 µg/mL, e para as amostras (diluídas quando necessário). Foram efetuadas leituras de absorvância a 517 nm no tempo zero e após 20 min, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca Synergy™ H1 (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA) a 25 °C. Os cálculos foram efetuados segundo a fórmula:

$$\% \text{ Descoloração do DPPH} = \frac{(A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}}) \times 100}{A_{\text{branco}}}$$

Onde: A_{branco} = absorvância do controle (50 µL de metanol + 250 µL de DPPH).

A_{amostra} = absorvância da amostra.

Os resultados foram expressos em µmol equivalente de Trolox/mL de suco.

3.2.5.2 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

A capacidade de absorção do radical oxigênio foi determinada segundo metodologia descrita por D'ávalos et al., (2004), com algumas modificações descritas a seguir. As amostras, com as devidas diluições em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4, o controle e uma curva padrão de Trolox (400 µmol/L) foram misturados com 150 µL de uma solução de fluoresceína (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (40 nM/L) e incubados a uma temperatura de 37 °C por 15 min. Adicionou-se 25 µL da solução do radical peroxila 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) (Wako Chemicals Inc., Richmond, EUA) 153 mM para dar início a reação. A intensidade de fluorescência (485 nm/520 nm) foi verificada a cada 1 min até o tempo final de 60 min, em espectrofotômetro de fluorescência, marca Biotek modelo Synergy™ H1 (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA). A capacidade antioxidante foi determinada pela curva resultante da perda de fluorescência da fluoresceína versus a concentração de antioxidante. Os resultados foram expressos em mMol equivalentes de Trolox/mL de suco.

3.2.6 Linhagem celular e condições de cultivo

As células Caco-2 de adenocarcinoma de colon humano obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com alta concentração de glicose (4,5 g/L) (INVITROGEN, Carlsbad, EUA), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 1 % de aminoácidos não essenciais, 1 % de solução de L-glutamina e antimicrobianos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² (Corning Costar Corp, NY, EUA) em incubadora a 37 °C, sob atmosfera constituída de 5 % de CO₂ e 95% de umidade relativa.

Amostras (fração bioacessível, após digestão *in vitro*) obtidas por extração em fase sólida em colunas de poliamida SC6 como descrito em 3.2.4, eluídas com metanol e metanol:amônia, foram coletadas juntas, secas em rotaevaporador e ressuspensas em meio de cultura. Uma alíquota de cada extrato obtido foi coletada e o conteúdo de fenólicos totais

foi determinado pelo método de Folin Ciocalteu segundo Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos (1999) e os resultados expressos em μg equivalente de ácido gálico/mL. Os extratos foram diluídos e testados nas células nas concentrações 12,5, 25 e 50 μg equivalente de ácido gálico/mL para avaliação da proliferação celular e 50 μg equivalente de ácido gálico/mL nas análises de ciclo celular e apoptose.

3.2.6.1 Proliferação celular

Para avaliar a proliferação celular as células Caco-2 foram plaqueadas, em placas de 96 poços de fundo chato estéril, na concentração 2×10^5 células/mL. Após o plaqueamento as células foram mantidas em incubadora durante 24 h, para aderência celular. Posteriormente, o meio de cultura foi aspirado e novo meio foi adicionado juntamente com os extratos.

As células foram tratadas com os extratos conforme obtidos em 3.2.6 nas concentrações 12,5, 25 e 50 μg equivalente de ácido gálico/mL. O branco da digestão, composto por água, enzimas e sais biliares também passou pelos mesmos processos para obtenção do extrato e também foi analisado nas células para eliminar possíveis interferentes do meio da digestão e diluídos conforme as amostras. No final do período de incubação, durante 24 h, as células foram fixadas com 10 μL de solução de cristal violeta (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) 0,5% em ácido acético (30%), durante 15 min. Em seguida a placa foi lavada cuidadosamente com água destilada e secas em temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 100 μL de metanol por poço, para a solubilização do cristal violeta, e após 30 min realizou-se a leitura em leitor de microplaca SynergyTM H1 (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA) a 570 nm.

3.2.6.2 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Foram plaqueadas 2×10^5 células/mL em placas de 6 poços e incubadas por 24 h para aderência na placa. Após o período de incubação o meio foi retirado e as células foram tratadas com os extratos na concentração de 50 μg equivalente de ácido gálico/mL e incubadas novamente por 24 h. A análise do ciclo celular foi realizada conforme descrito por

Andrade et al. (2012), com algumas modificações. As células foram tripsinizadas e coletadas em tubos falcon. Em seguida fixou-se as células em 3 mL de etanol aquoso a 75 % gelado. As amostras foram agitadas cuidadosamente e incubadas “overnight” a 4 °C. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 1 mL de tampão fosfato-salino (PBS-A; 137 mM NaCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2,68 mM KCl; 1,76 mM KH₂PO₄) e centrifugadas novamente. O pellet foi ressuspensionado em 200 µL de uma solução de PBS contendo 10 µL/mL de iodeto de propídio (PI) e 10 µL de solução de RNase (100 mg/mL). Posteriormente, a suspensão celular foi incubada a 37 °C por 20 min e analisada. Os dados foram determinados em citometro de fluxo FACS CANTO II (BD Biosciences, USA).

3.3.6.3 Apoptose

A determinação foi realizada por citometria de fluxo com Kit FITC Annexin V Apoptose Detection Kit I (BD Biosciences, USA). As células (2×10^5 células/mL) foram plaqueadas durante 24 h em microplaca de 24 poços. Após a incubação, o meio foi retirado e as células foram tratadas com os extratos na concentração de 50 µg equivalente de ácido gálico/mL e incubadas novamente durante 24 h. Para controle positivo de apoptose um grupo de células foi tratado com Dimetilsulfoxido (DMSO) 10%. Posteriormente, as células foram tripsinizadas, coletadas e lavadas duas vezes com PBS (contendo 2% de soro fetal bovino). Em seguida foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min a temperatura ambiente e ressuspensionadas em tampão de ligação (10 mmol/L HEPES/NaOH, 140 mmol/L NaCl e 2.5 mmol/L CaCl₂). Foram adicionados 5 µL de Annexin V-FITC (1 mg/mL) seguido por 5 µL de PI (100 g/mL) e as células foram incubadas no escuro durante 15 min em temperatura ambiente. A análise foi realizada em citometro de fluxo FACS CANTO II (BD Biosciences, USA), usando o software Flow Jo vs 10.0.8.

3.4 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ desvio-padrão e as análises estatísticas foram realizadas usando Teste T-

Student pareado. Diferenças entre as médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA) usando Teste de Tukey's. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$, utilizado o programa Graphpad Prism 6.0 (Graphpad Software, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na forma de artigo científico, conforme a seguir:

4.1 *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of polyphenols in juices from fruits of Myrtaceae and effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells

***In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of polyphenols in juices
from fruits of Myrtaceae and effects on proliferation, cell-cycle and
apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells**

FLÁVIA MARIA BETETO¹, GABRIELA REZENDE COSTA¹, THOMAS PRATES ONG¹,
MARIA INÉS GENOVESE^{1*}

*Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 3656; fax: +55 11 3815 4410.

E-mail address: genovese@usp.br

¹Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 14, São Paulo, SP, CEP
05508-900, Brasil

ABSTRACT

The aims of this study were to evaluate the bioaccessibility of polyphenols in juices from Brazilian native fruits of the Myrtaceae family (cagaita, camu-camu and jaboticaba), the effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on their antioxidant activity, and the action of polyphenols from bioaccessible fractions on proliferation, cell cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. The results showed that *in vitro* gastrointestinal digestion caused losses of some polyphenols, such as cyanidins derivatives from jaboticaba, possibly due to the exposure to conditions of intestinal pH. However, contents of free ellagic acid increased in all the juices analyzed, indicating the occurrence of hydrolysis during the *in vitro* digestion process, releasing ellagic acid from the ellagitannins. The antioxidant activity was affected differently by *in vitro* digestion, according to the juice, probably related to phenolic composition. Regarding the evaluation of proliferation, cell-cycle and apoptosis, polyphenols from bioaccessible fractions of camu-camu showed about 30% of inhibition of proliferation, followed by cagaita with 24%, both at the highest concentration tested (50 µg GAE/mL). Jaboticaba did not show inhibitory effect at the concentrations tested but the phenolic compounds of all bioaccessible fractions (50 µg GAE/mL) showed arrest in G2/M phase of cell-cycle without inducing apoptosis in the Caco-2 cells. Results suggest that Myrtaceae polyphenols may modulate the proliferation of Caco-2 cells by blocking the progression of cell-cycle at G2/M phase, providing beneficial effects to gastrointestinal health.

Keywords: Myrtaceae; polyphenols; *in vitro* digestion; Caco-2

1 INTRODUCTION

Colon cancer is one of the most common types of cancer in developed countries and is directly related to diet and lifestyle. Several studies with phenolic compounds of fruits and vegetables have shown their beneficial effects against various diseases, including some types of cancer, especially of the digestive tract (Cilla et al., 2010; Tagliazucchi et al., 2010).

The protective effect of polyphenols has been particularly attributed to their antioxidant activity, as they can play an important role in neutralization or scavenging of free radicals and chelation of transition metals. The bioactive phenolic compounds may also act as pro-oxidants, inducing apoptosis or inhibiting cell proliferation (D'archivio et al., 2008; Souza et al., 2007). Ellagitannins and ellagic acid are polyphenols present in some fruits and nuts, such as pomegranates, raspberries, strawberries and walnuts. Under physiological conditions, ellagitannins are hydrolyzed to ellagic acid and posteriorly metabolized by the intestinal microbiota to form urolithins (Landete et al., 2011). Recent *in vivo* and *in vitro* studies have shown anticarcinogenic effects of ellagic acid, inhibiting cancer cell proliferation and inducing apoptosis (Zhang et al., 2014).

However, to determine the possible beneficial effects of these substances on health, it is essential to determine how gastrointestinal digestion affects the polyphenols and their antioxidant activity (Frontela-Saseta et al., 2011). One of the main limiting factors is their bioavailability, which depends on digestive stability and their release from the food matrix (Stanisavljevic et al., 2015; Tagliazucchi et al., 2010). Considering that most of the polyphenols and their conjugates, unabsorbed, can remain in the lumen for a prolonged period, and epithelial cells lining the intestine are regularly exposed to these compounds, it is important to evaluate their potential beneficial effects in the gastrointestinal tract (Bermúdez-Soto et al., 2007).

Brazil has a wide variety of native fruit species that remain underexplored. Among these are many species of Myrtaceae, including cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.), camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh) and jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg), which are excellent sources of bioactive compounds, such as flavonoids and ellagitannins (Abe et al., 2012; Genovese et al., 2008; Gonçalves et al., 2010). In fact, these fruits have been previously indicated as better ellagitannins sources than those from the Rosaceae family (Abe et al., 2012). Cagaita polyphenols showed beneficial health effects on obesity management in a

study with C57BL/6J mice fed on a high-fat high-sucrose diet (Donado-Pestana et al., 2015). Jaboticaba extracts showed beneficial health effects in diabetic rats improving lipid profile and reducing oxidative stress (Alezandro et al., 2013).

No study was conducted to evaluate the antiproliferative activity of polyphenols from cagaita and camu-camu. Regarding jaboticaba, Leite-Legatti et al. (2012) evaluated the effects of a extract from the peel, rich in anthocyanins, on different cell lines: U251 (glioma, central nervous system); UACC-62 (melanoma), MCF7 (breast), NCI-ADR/RES (adriamycin-resistant ovarian cancer); 786-0 (kidney), NCI-H460 (lung, non-small cells), PC-3 (prostate), OVCAR-3 (ovary), HT29 (colon), and K-562 (leukemia) and VERO (a non-tumoral cell line, green monkey kidney). The extract showed antiproliferative effects against leukemia (K-562) and prostate (PC-3) cells. However, in most studies no account was taken of the gastrointestinal digestion process, getting unrealistic or overestimated results of the biological activity as the compounds originally present in fruits hardly reach the tumor tissue (Cilla et al., 2010).

The aims of the present study were to evaluate the bioaccessibility of polyphenols in juices from Brazilian native fruits of the Myrtaceae family (cagaita, camu-camu and jaboticaba), the effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on their antioxidant activity, and the action of polyphenols from bioaccessible fractions on proliferation, cell cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Three different juices were prepared using 200 mL of distilled water and 100 g of the frozen commercial pulps of the fruits from the Myrtaceae family: cagaita, camu-camu and jaboticaba. The pulps of camu-camu (produced in August, 2012) were obtained from Belaiaçá® (Castanhal – PA, Brazil), cagaita pulp (Lot: L1-004) from Cooperativa dos Agricultores Familiares Agroextrativistas Grande Sertão® (Montes Claros – MG, Brazil) and the jaboticaba pulp (Lot: 1508) from Sitio doBello® (Paraibuna-SP, Brazil).

2.2 Methods

2.2.1 Physicochemical characterization of the pulps

The total solids (TS), titrable acidity (TA) and fiber content of the frozen pulps were determined according to AOAC (AOAC, 2005). The pH was measured with a potentiometer (Hanna pH21) and soluble solids (SS) (°Brix) with a refractometer (Reichert r2 mini). Total sugars (TS) were determined using the method of Dubois et al. (1956) and expressed as g/100 g of pulp fresh weight (fw).

2.2 *In vitro* gastrointestinal digestion

The juices were subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion as previously described by Cilla et al. (2009), with some modifications. Briefly, to simulate gastric digestion, the juices (80 g) were adjusted to pH 2.0 with 6 M HCl and incubated with pepsin (0.02 g/g sample) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA – P-7000)/HCl in a shaking water bath at 37 °C/120 strokes per minute for 2 h. For the intestinal digestion, the pH was raised to 6.5 with addition of 1 M NaHCO₃, and a pancreatin (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA – P-1750) plus bile salts (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA – B-8631) solution, sufficient to provide 0.005 g pancreatin and 0.03 g bile salt/g sample, was added and incubation was continued for 2 h. Control samples (distilled water instead of juice) were subjected to the same *in vitro* digestion. After digestion, samples were acidified to pH 2.0 with formic acid (1.5%) to ensure inactivation of enzymes and stability of phenolic compounds.

2.3 Sample preparation and analysis of phenolic compounds by HPLC-DAD

Aliquots of juices after *in vitro* digestion were centrifuged (HERMLEZ326K centrifuge, Labortechnik GmbH, Germani) at 3890 g for 60 min at 4 °C, to separate the bioaccessible fraction. Juices before *in vitro* digestion were also centrifuged to facilitate the analysis. The identification and quantification of the main flavonoids and phenolic acids in the juices before and after the digestion were performed as described previously (Arabbi, Genovese, & Lajolo, 2004), adding the samples onto a preconditioned (20 mL of methanol, 60 mL of water) polyamide SC6 SPE tube (1 g, Macherey-Nagel GmbH and Co., Düren, Germany). After washing with water, phenolic compounds were eluted with 50 mL of

methanol to elute neutral phenolics, and with 50 mL of methanol: ammonia (99.5:0.5) to elute acidic phenolics. These two fractions were evaporated to dryness under reduced pressure at 39 °C, redissolved in HPLC grade methanol (1 mL) and filtered through 0.22 µm PTFE (polytetrafluoroethylene) filters (Millipore Ltd, Bedford, MA). Identification and quantification were performed using a Prodigy ODS3 reversed phase silica column (5 µm, 250 × 4.6 mm, Phenomenex Ltd, Torrance, CA), in an analytical reversed-phase HPLC (Hewlett-Packard 1100) system with an autosampler and a quaternary pump coupled to a diode array detector, with flow rate of 1 mL/min, using solvents water: tetrahydrofuran: trifluoroacetic acid (98:2:0.1) (A) and acetonitrile (B). Solvent gradient started with 17% B for 2 min increasing to 25% B after 5 min, to 35% B after a further 8 min and to 50% B after 5 min. Pure standards of quercetin, ellagic acid, myricetin, rutin and cyanidin-3-rutinoside, obtained from Sigma- Aldrich Co. (St. Louis, EUA), were used for calibration. Calibration was performed by injecting the standards three times at five different concentrations. Peak identification was performed by comparing retention times and diode array spectral characteristics with the standards and the library spectra. Quantification of phenolic compounds was performed by comparing the peak area of the sample with that of the standards peak area injected, and effected on the basis of external standard curves ($r \geq 0.998$) for peaks detected and identified at 270 nm with spectral characteristics similar to the their respective standard.

2.4 Antioxidant activity

The samples of juices and their bioaccessible fractions obtained after *in vitro* digestion were prepared as described in 2.3, with some modifications. After adding the samples onto a preconditioned polyamide SPE SC6 tube and eluting phenolic compounds with methanol and methanol: ammonia (99:5:0.5), these two fractions were collected together, dried under pressure at 37 °C and redissolved in methanol (5 mL). The samples were evaluated in relation to antioxidant activity by the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay (Dávalos, Gómez-Cordovés, & Bartolomé, 2004) and the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) radical-scavenging assay (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). Results were expressed as µmol of Trolox equivalent/mL of juice.

2.5 Cell line and culture conditions

Human colon cancer cell line Caco-2 were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil) and grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 1 % (v/v) antibiotics (penicillin/streptomycin), 1 % (v/v) non-essential amino acids and 1 % (v/v) L-glutamine. Cells were maintained at 37 °C in an incubator under 5% CO₂/95 % air atmosphere at constant humidity.

Samples obtained by solid phase extraction (SPE) in polyamide SC6 SPE tubes as described previously in 2.3, eluted with methanol and methanol: ammonia (99:5:0.5), were collected together, dried under pressure at 37 °C and redissolved in culture medium. Cells were treated with SPE extracts obtained from bioaccessible fractions after *in vitro* digestion. An aliquot of each SPE extract was collected and the total phenolic content was determined by Folin Ciocalteu assay (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, 1999). Results were expressed as µg gallic acid equivalent (GAE)/mL. Extracts were diluted and tested in the concentrations 12.5, 25 and 50 µg GAE/mL for cell proliferation analysis, and 50 µg GAE/mL for the evaluation of the cell cycle and apoptosis.

2.6 Cell proliferation test

Caco-2 cells (2×10^5 cells/mL) were placed in 96- well plates and allowed to adhere for 24 h. Cells were exposed to different sample concentrations (12.5, 25 and 50 µg GAE/mL) and incubated for 24 h. The blank of digestion (water + mix enzymes + salts) was tested, to eliminate the possible interferences of digestion media, in the same dilution used for SPE extracts obtained from bioaccessible fractions after *in vitro* digestion. At the end of incubation period, cells were stained with 0.5% crystal violet solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) in acetic acid (30%) for 15 min at room temperature and rinsed thoroughly with distilled water. After air-drying, crystal violet was solubilized in 200 µL ethanol for 30 min, and the optical density at 570 nm was measured using a microplate reader SynergyTM H1 (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA). Data were reported as means $\pm$ SEM.

2.7 Cell cycle analysis

Caco-2 cells were plated in 6-well plates at a density of 2×10^5 cells/mL. After 24 h of incubation, the cells were treated with 50 μ g GAE/mL, and incubated for 24 h. The cell cycle analysis were performed as described previously (Andrade et al., 2012). Following trypsinization, the harvested cells were fixed for 30 min on ice in 75% ice-cold ethanol. The samples were incubated overnight at 4 °C, washed with phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 2.68 mM KCl; 1.76 mM KH_2PO_4) and resuspended in 200 μ L of a solution of PBS containing propidium iodide (PI) (10 μ g/mL) and RNase (100 mg/mL). The samples were then incubated for 20 min at 37 °C and analyzed on a FACS CANTO II flow cytometer (BD Biosciences, USA). The assays were done in triplicate.

2.8 Determination of apoptosis

Caco-2 cells were stained with Annexin V coupled with fluorescein isothiocyanate (FITC) and PI using an Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, USA). Caco-2 cells (2×10^5 cells/mL) were seeded for 24 h on a 24-well plate and treated with 50 μ g GAE/mL of each extract. After 24 h of incubation, cells were collected and resuspended in binding buffer (10 mmol/L HEPES/NaOH, 140 mmol/L NaCl and 2.5 mmol/L CaCl_2). Cells were incubated in the dark for 15 min at room temperature with Annexin V-FITC (1 mg/mL), followed by the addition of PI solution (100 μ g/mL) and analyzed on a FACS CANTO II flow cytometer (BD Biosciences, USA), using Flow Jo vs 8.8.6 software. The assays were done in triplicate.

2.9 Statistical analysis

All results were presented as means $\pm$ SD and statistical analyses were performed using paired T-student test. Differences between means were determined by one-way ANOVA using Tukey's test. Statistical significance was defined to be at a level of $p < 0.05$ by Graphpad 6.0 (Graphpad Software, San Diego, CA).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Physicochemical characterization of the frozen commercial pulps

Camu-camu fruit has high vitamin C and polyphenols contents and has shown powerful anti-oxidative and anti-inflammatory properties when administered to human smokers. These effects were related to phenolics, since they were not observed in those volunteers who had vitamin C supplementation at the same concentration found in the fruit (Inoue et al., 2008). Cagaita fruit is used in various regional preparations and in alternative medicine by local communities to treat diarrhea, diabetes, and jaundice (Lima et al., 2010; Martinotto et al., 2008). Jaboticaba has shown strong *in vitro* antioxidant activity and inhibitory effects on cell proliferation (Leite-Legatti et al., 2012). The fruits camu-camu, cagaita and jaboticaba are typical of Amazonian, Cerrado and Atlantic Forest biome, respectively. The production of these fruits is still local and their availability is dependent on the crop, however the consumption is possible through commercial frozen pulps.

The physicochemical characterization of the camu-camu, cagaita and jaboticaba frozen commercial pulps is presented in **Table 1**. Comparing the three pulps, camu-camu was the more acid and less sweet, and jaboticaba the sweetest. The low pH and high acidity observed for camu-camu pulp is probably related to the very high ascorbic acid content (Akter et al., 2011; Fujita et al., 2013). Camu-camu is considered an acidic fruit and non-sweet, similar to tahiti lime (Barros et al., 2012). Jaboticaba pulp presented the highest % of total solids, total soluble solids and total sugar, among the pulps analyzed, similar to the results reported by Lima et al. (2008). Jaboticaba has an optimal sensory acceptance due to the high sugar content. Cagaita pulp showed the lowest titrable acidity, higher pH and intermediate values of total solids, total soluble solids, titrable acidity and total sugar, compared with the others. Similar results were reported by Cardoso et al. (2011) for cagaita fruit: pH 3.3, 0.73 g acid citric/100 g titrable acidity, 9.12 °Brix total soluble solids and 8.44% total solids. Among the pulps analyzed, camu-camu had the highest fiber content, followed by jaboticaba and cagaita.

Table 1. Physicochemical characterization of the commercial frozen fruit pulps of cagaita, camu-camu and jaboticaba.

Parameter	Cagaita	Camu-camu	Jaboticaba
Total solids (%)	9.63 ^a ± 0.04	5.40 ^b ± 0.02	11.99 ^c ± 0.00
Total soluble solids (°Brix)	8.42 ^a ± 0.17	4.62 ^b ± 0.14	11.5 ^c ± 0.04
pH	3.43 ^a ± 0.01	2.89 ^b ± 0.00	3.36 ^c ± 0.01
Titrate acidity (g acid citric/100 g)	0.74 ^a ± 0.01	2.26 ^b ± 0.00	1.52 ^c ± 0.01
Total sugar (g glucose/100 g)	4.75 ^a ± 0.10	1.11 ^b ± 0.15	7.25 ^c ± 0.53
Fiber (g/100 g)	0.86 ^a ± 0.01	1.46 ^b ± 0.01	1.29 ^c ± 0.03

Note: Numbers in the line followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$). Data are presented as mean ± SD (n = 3).

3.2 Effect of *in vitro* digestion on phenolic compounds of fruit juices

The tentative identification and quantification of the main flavonoids and phenolic acids in the juices before and after *in vitro* gastrointestinal digestion are presented in **Table 2**. The compounds were significantly affected by the *in vitro* simulated digestion process. Some compounds remained stable, while others increased or suffered degradation. The HPLC-chromatogram profiles (270 nm) of juices before and after *in vitro* digestion are presented in **Figure 1**.

Among the juices analyzed, anthocyanins were present only in jaboticaba, whereas quercetin glycosides and free ellagic acid were present in all the three. Quercetin derivatives other than rutin and free ellagic acid were identified in the cagaita juice. In the camu-camu juice, myricetin derivatives, quercetin derivatives other than rutin, rutin and free ellagic acid were found. Cyanidin derivatives, cyanidin-3-rutinoside, quercetin derivatives other than rutin and free ellagic acid were identified in the jaboticaba juice. The quercetin derivatives contents in the juices of cagaita and jaboticaba increased after *in vitro* digestion. In camu-camu juice myricetin derivatives and rutin also increased. This increase may be due to the effects of digestion condition (temperature, pH, enzymes and bile salts) on their releasing from the food matrix (Bouayed et al., 2011).

After *in vitro* digestion, there was an increase in the free ellagic acid content for the three juices. The fruits of Myrtaceae family are rich in ellagitannins, and this increase may be due to hydrolysis of these compounds, releasing free ellagic acid. Previous studies simulating *in vitro* digestion have shown that, in general, ellagitannins are quite stable under the

physiological conditions of the stomach. The acidic conditions (pH 1.8-2.0) and enzymes present in the stomach do not cause hydrolysis of the ellagitannins and no degradation has been observed (Tomas-Barberan et al., 2009). However, under the physiological conditions of the small intestine, ellagitannins were hydrolyzed releasing free ellagic acid, which can be due to pH and effects of pancreatic enzymes and bile salts (Larrosa et al., 2010).

Table 2. Tentative identification and quantification of the main flavonoids and phenolic acids in the juices before and after *in vitro* digestion by HPLC-DAD.

<i>Sample</i>	<i>Compounds</i>	<i>Before digestion</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>After digestion</i> ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Cagaita</i>	<i>Quercetin derivatives</i>	$1.90^a \pm 0.23$	$3.58^b \pm 0.12$
	<i>Free ellagic acid</i>	$0.95^a \pm 0.05$	$4.84^b \pm 0.52$
<i>Camu-camu</i>	<i>Myricetin derivatives</i>	$2.14^a \pm 0.04$	$2.80^b \pm 0.11$
	<i>Quercetin derivatives</i>	$0.61^a \pm 0.02$	$0.64^a \pm 0.04$
	<i>Rutin</i>	$0.99^a \pm 0.03$	$1.20^a \pm 0.09$
	<i>Free ellagic acid</i>	$0.66^a \pm 0.06$	$3.52^b \pm 0.34$
<i>Jaboticaba</i>	<i>Cyanidin derivatives</i>	11.39 ± 0.14	<i>n.d.</i>
	<i>Cyanidin-3-rutinoside</i>	$10.44^a \pm 0.07$	$9.80^b \pm 0.02$
	<i>Quercetin derivatives</i>	$0.89^a \pm 0.03$	$1.31^b \pm 0.14$
	<i>Free ellagic acid</i>	$6.15^a \pm 0.24$	$17.42^b \pm 0.53$

Note: Numbers in the line followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$). Results are expressed as mean $\pm$ SD values ($n = 3$); n.d., not detected.

In jaboticaba juice, after *in vitro* digestion, cyaniding derivatives were not identified and cyanidin-3-rutinoside decreased. At pH 2 or below, the anthocyanins are found in the form of flavinium cation, but may be found in three other secondary molecular forms, the quinoidal bases, the carbinol pseudobase and the chalcone pseudobase. As the pH is raised to around 7, colorless chalcone pseudobase predominates. Chalcone formation is also favored by prolonged exposure to high temperatures and may increase the degradation of B and C rings, resulting in the destruction of the anthocyanin chromophore (McDougall et al., 2007).

Figure 1. HPLC - Chromatogram profiles (270 nm) of flavonoids and phenolic acids in the fruit juices before and after *in vitro* digestion. Cagaita juice fraction methanol (1A); Cagaita juice fraction methanol: ammonia (1a); Cagaita juice, after *in vitro* digestion, fraction methanol (1B); Cagaita juice, after *in vitro* digestion, fraction methanol: ammonia (1b); Camu-camu juice fraction methanol (2A); Camu-camu juice fraction methanol: ammonia (2a); Camu-camu juice, after *in vitro* digestion, fraction methanol (2B); Camu-camu juice, after *in vitro* digestion, fraction methanol: ammonia (2b); Jaboticaba juice fraction methanol (3A); Jaboticaba juice fraction methanol: ammonia (3a); Jaboticaba juice, after *in vitro* digestion, fraction methanol (3B); Jaboticaba juice, after *in vitro* digestion, fraction methanol: ammonia (3b). Quercetin derivatives (1); Free ellagic acid (2); Ellagic acid derivatives (2b); Myricetin derivatives (3); Rutin (4); Cyanidin-3-rutinoside (5); Cyanidin derivatives (6).

The instability of anthocyanins after the simulation of intestinal digestion has been demonstrated in previous studies (Bermúdez-Soto et al, 2007; Bouayed et al, 2011; McDougall et al., 2005; Tagliazucchi et al., 2010). Bermúdez-Soto et al. (2007) investigated the effects of *in vitro* digestion (gastric and duodenal) on stability and composition of the major polyphenols in chokeberry juices. The simulation of gastric digestion process had no substantial effect on the phenolic compounds present in the juice, however, these compounds were significantly altered during pancreatic digestion, especially anthocyanins, which decreased about 43%. In another study evaluating the bioaccessibility of phenolic compounds from grapes, it was also observed a reduction of 58.1% of total anthocyanins present in the samples after intestinal digestion (TAGLIAZUCCHI et al., 2010).

3.3 Antioxidant activity

Gastrointestinal digestion can degrade and/or alter the chemical structure of polyphenols leading to significant changes in the antioxidant activity. Two different antioxidant assays (DPPH• and ORAC) were used to measure the antioxidant activity of polyphenols from cagaita, camu-camu and jaboticaba juices before and after *in vitro* digestion. The antioxidant activity is evaluated basically by two different mechanisms, through the transfer of hydrogen atoms or electron transfer (Prior et al., 2005). The method of DPPH• was proposed first by Brand Williams et al. (1995) and has been one of the most used methods to evaluate the antioxidant activity of fruit. The principle of the method is based on the measurement on the reducing ability of antioxidants present in the sample toward DPPH• (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), through an electron transfer reaction (PRIOR et al., 2005). ORAC assay measures antioxidant activity by inhibition of peroxyl radical induced by hydrogen atom transfer (Alves et al., 2010; Prior et al., 2005).

Results showed some differences according to the method used (**Figure 2**). Antioxidant activity of cagaita juice polyphenols showed the same profile when evaluated by both methods (DPPH• and ORAC), and increased after *in vitro* digestion. The antioxidant activity of camu-camu juice polyphenols evaluated by the DPPH• assay decreased after *in vitro* digestion and did not change when evaluated by ORAC. For jaboticaba juices, opposite results were obtained by the two methods. The antioxidant activity evaluated by DPPH• assay decreased after *in vitro* digestion and increased when measured by ORAC method.

Cilla et al. (2011) evaluated the influence of *in vitro* gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages by ORAC and TEAC (Trolox equivalent antioxidant

capacity) assays and found a significant increase in total antioxidant capacity (ORAC and TEAC) of the bioaccessible fractions, compared with the respective fruit beverages. The increase of antioxidant capacity was associated to release of mainly polyphenols from the food matrix by the action of digestive enzymes. In other study (Ryan and Prescott, 2010) evaluating the antioxidant activity of commercial fruit juices after *in vitro* digestion, it was observed a significant increase for fresh cranberry, red grape and pomegranate juice, no alteration for some orange juices and a decrease for fresh grapefruit and pineapple juices.

The antioxidant activity seems to be related to individual components present in the sample and the mechanisms by which they may act as antioxidants, synergistically or not. The chemical structure of polyphenols plays an important role in the free radical-scavenging activity, which is dependent on the number and position of hydrogen-donating hydroxyl groups on the aromatic rings of the phenolic compounds (Bouayed et al., 2011).

Figure 2. Antioxidant activity of juices from cagaita, camu-camu and jaboticaba, before and after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. Note: Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3). Different letters for each group sample indicate significant differences (p < 0.05).

3.4 Inhibition of Caco-2 cell proliferation by phenolic compounds from juices after *in vitro* digestion

Cell proliferation of colon cancer cell line was evaluated using crystal violet assay after treatments with phenolic compounds (12.5, 25 and 50 μ g GAE/mL) from bioaccessible fractions of cagaita, camu-camu and jaboticaba juices after *in vitro* digestion, and compared to untreated cell (control). The blank of digestion (water + mix enzymes + salts) was tested to

eliminate the possible interferences of digestion media in the same dilution used for SPE extracts obtained from bioaccessible fractions after *in vitro* digestion.

The effects of polyphenols on cell proliferation are shown in **Figure 3**. Phenolic compounds from bioaccessible fraction of camu-camu showed about 30% of inhibition of proliferation at the highest concentration tested (50 μg GAE/mL) and approximately 11% with 25 μg GAE/mL. The polyphenols from bioaccessible fraction of cagaita inhibited 24% the proliferation only at the highest concentration. Jaboticaba did not show inhibitory effect at the concentrations tested. The blank of digestion did not affect cell proliferation, eliminating possible interferences from the digestion media.

Figure 3. Effects of phenolic compounds (12.5, 25 and 50 μg GAE/mL) from bioaccessible fraction of cagaita (A), camu-camu (B) and jaboticaba (C), on Caco-2 cell proliferation (%) at 24 h. Blank of digestion (water + mix enzymes + salts) were tested, to eliminate the possible interferences of digestions. Values (%) are expressed as mean $\pm$ SD (n = 3). Different letters indicate significant difference compared to untreated cells (control) ($p < 0.05$).

Jara-Palacios et al. (2015) reported an inhibition of proliferation in colon cancer cells (Caco-2) with purified white grape pomace extract (PWGPE) and individual phenolic compounds (catechin, epicatechin, quercetin and gallic acid). PWGPE (100 µg/mL) inhibited the proliferation of cells by 52.1% at 48 h, whilst catechin, epicatechin, quercetin and gallic acid (60 µg/mL) inhibited growth by 65.2%, 62.2%, 81.0% and 71.0%, respectively, at 72 h.

In another study, Pinto et al. (2010) evaluated the antiproliferative activities of ellagic acid standard, purified ellagitannins, and strawberry extract against cancer cells of distinct histological origins: MCF-7 (breast), NCI-ADR (breast, multi drug resistant phenotype), NCI 460 (lung, non-small cells), UACC62 (melanoma), 786-0 (kidney), OVCAR03 (ovarian), PC03 (prostate), K-562 (erythromyeloblastoid leukemia), and HT-29 (colon) in different concentrations (0.25, 2.5, 25, and 250 mg/mL). It was observed that ellagic acid had the highest percentage inhibition of cell proliferation and the strawberry extract had the lowest efficacy, indicating that there was no synergism between the compounds present in this fruit. Compared to our study, all the juices evaluated had a significant rise in free ellagic acid content after simulating the gastrointestinal digestion. However, polyphenols in the bioaccessible fraction from jaboticaba had no antiproliferative effect at the concentrations tested, much lower than those used by Pinto et al. (2010). Here, it was observed that the concentration of 100 µg GAE/mL was cytotoxic to the cells.

Although the antiproliferative activity of polyphenols has been studied, most of the studies did not take into account the real conditions of food consumption. It is necessary to evaluate the stability of polyphenols after the process of digestion, which may affect their structure and properties (Saura-Calixto et al., 2007). In this context, Bermúdez-Soto et al. (2007) treated Caco-2 cells with chokeberry juice (after *in vitro* digestion) to 2% (~ 85 µM phenolic compounds) and 5% (~ 220 µM phenolic compounds) in repetitive exposure (2 hours per day for 4 days) and reported the inhibition of cell growth of approximately 40 and 70%, respectively, compared to untreated cells. In another study with digested chokeberry juice, Caco-2 cells were treated for 72 h with concentrations 1, 5 and 10 µg/mL. Data showed that juices in the presence of a complex food matrix showed antiproliferative capacity inhibiting proliferative rate of Caco-2 cells by ~25% (Stanisavljević et al., 2015).

In this study, the polyphenols from bioaccessible fractions were tested in the cells for 24 h with continuous incubation. The antiproliferative effect found in this study was accentuated, since these compounds were tested at low concentrations to simulate a real

consumption. Further studies are needed to evaluate the effect of these compounds after treatment with repeated exposure and for more time.

3.5 Cell- cycle distribution and apoptosis analysis

The ability of polyphenolic compounds to inhibit the proliferation of cancer cells via their effects on the cell-cycle and/or apoptosis has been shown in several studies (Gómez-Alonso et al., 2012; Lee et al., 2006; Mertens-Talcott et al., 2006; Ramos et al., 2011; Vu et al., 2012). In this study, Caco-2 cells were treated for 24 h with polyphenols (50 µg GAE/mL) from the bioaccessible fractions of cagaita, camu-camu e jaboticaba (condition in which it was observed the most significant antiproliferative activity). The changes observed in cell-cycle, compared with untreated cells, are shown in **Figure 4**. All the treatments showed arrest at G2/M phase concomitant with a decrease ($p < 0.05$) in S-phase. The inhibition of cell cycle progression is often associated with an antiproliferative mechanism (Shin et al., 2013). Although the polyphenols from the bioaccessible fraction of jaboticaba juice did not inhibit cell proliferation, similar effects on the cell cycle compared with other samples were obtained. The results suggest that phenolic compounds from the bioaccessible fractions could modulate the proliferation of Caco-2 cells by blocking the progression of the cell-cycle at G2/M phase.

Kao et al. (2015) found similar results for apple polyphenols and observed cell cycle arrest at G2/M phase. Accordingly, González-Sarrías et al. (2014) showed arrest in S and G2/M phase in human colon cancer cell lines (Caco-2, SW480 and HT-29) after treatment with urolithins (metabolites derived from ellagic acid and ellagitannins).

The progression of cell cycle phases (G0/G1, S and G2/M) are controlled by the activity of proteins called cyclins and their uncontrolled expression has been demonstrated in cancer cells. Cyclin B1 is a critical regulator of mitosis and a decrease in expression is correlated with arrest in both S and G2/M phase (González-Sarrías et al., 2012; Visanji et al., 2006). In concordance, Larrosa et al. (2006) evaluated the effects of ellagitannins (punicalagin) and ellagic acid on Caco-2 cells and found a down regulation of cyclins A and B1 and cell cycle arrest in S phase, however this was not evaluated in our study.

3.5 Cell- cycle distribution and apoptosis analysis

Figure 4. Cell- cycle distribution (%) of Caco-2 cells after treatment with phenolic compounds (50 μ g GAE/mL) from bioaccessible fraction of cagaita, camu-camu and jaboticaba after *in vitro* digestion. Values (%) are expressed as mean $\pm$ SD (n = 3). Different letters indicate significant difference compared to untreated cells (control), among the groups (p < 0.05).

Another parameter observed in the cell-cycle DNA is the percentage of cells in sub G0, which can be used as an indication of apoptosis. Induction of apoptosis, also called programmed cell death, is also related to the antiproliferative activity and represents a protective mechanism against neoplastic transformation and tumor development (D'ARCHIVIO et al. 2008; MASELLA et al, 2004).

In this study, after treatment with polyphenols there was no increase of the percentual cell in sub G0. To confirm these results, a specific analysis to evaluate cell death mechanisms was conducted. The cells were incubated with 50 μ g GAE/mL from bioaccessible fraction of cagaita, camu-camu e jaboticaba, for 24 h, and the apoptosis was determined by flow cytometer. The results indicated that, under the conditions evaluated, the polyphenols did not induce apoptosis in the cells (data not shown). Similar result was found by Cilia et al. (2008), who reported that extracts from digested juices 7.5% (~50 μ M phenolic compounds) did not induce apoptosis, evaluated by flow cytometer and microscopic analysis.

5 CONCLUSION

The simulated gastrointestinal digestion affected the polyphenol profile and contents, and, as expected, the antioxidant activity. Polyphenols from bioaccessible fractions of cagaita, camu-camu and jaboticaba did not induce apoptosis, but polyphenols from bioaccessible

fraction of camu-camu and cagaita inhibited cell proliferation and all the juices arrested the cell cycle progression. These results suggest that Myrtaceae polyphenols may modulate the proliferation of Caco-2 cells by blocking the progression of cell-cycle at G2/M phase, providing beneficial effects to gastrointestinal health.

Acknowledgements

The authors thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP 2013/19797-6) and National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) (470338/2013-0) for the financial support.

REFERENCES

- Abe, L.T., Lajolo, F.M., Genovese, M.I. (2012). Potencial dietary sources of ellagic acids and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg). *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 92(8), 1679-1687.
- Akter, M. S., Oh, S., Eun, J. -B., Ahmed, M. (2011). Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. *Food Research International*, 44(7), 1728–1732.
- Alezandro, M.R., Granato, D., Genovese, M.I. (2013). 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*, 54(1), 650-659.
- Alves, C.Q., David, J.M., David, J.P., Bahia, M.V., Aguiar, R.M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33(10), 2202-2210.
- Andrade, F.O., Nagamine, M.K., Conti, A., Chaible, L.M., Fontelles, C.C., Jordão Junior, A.A., Vannucchi, H., Dagli, M.L.Z., Bassoli, B.K., Moreno, F.S., Ong, T.P. (2012). Efficacy of the dietary histone deacetylase inhibitor butyrate alone or in combination with vitamin A against proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 45(9), 841-850.
- Arabbi, P.R., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. (2004). Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1124–1131.
- Association Official Analytical Chemistry (AOAC) (2005). *Official methods of analysis* (18th ed.) (Washington).
- Barros, H.R.M., Ferreira, T.A.P.C., Genovese, M.I. (2012). Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*, 134(4), 1892–1898.

- Bermudez-Soto, M.J., Tomas-Barberan, F.A., Garcia-Conesa, M.T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102(3), 865–874.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14–21.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT — Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Cardoso, L.M., Martino, H.S.D., Moreira, A.V.B., Ribeiro, S.M.R., Pinheiro-Sant’Ana, H.M. (2011). Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. *Food Research International*, 44, 2151–2154.
- Cilla, A., Gonzles-Sarras, A., Toms-Barbern, F.A., Espin, J.C., Barber, R. (2009). Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 114(3), 813–820.
- Cilla, A., Lagarda, M.J., Barber, R., Romero, F. (2010). Original Polyphenolic profile and antiproliferative activity of bioaccessible fractions of zinc-fortified fruit beverages in human colon cancer cell lines. *Nutricin Hospitalaria*, 25(4), 561–571.
- Cilla, A., Perales, S., Lagarda, M.J., Barber, R., Clemente, G., Farr, R. (2011). Influence of storage and in vitro gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 87–94.
- Dvalos, A., Gmez-Cordovs, C., Bartolom, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48–54.
- D’Archivio, M., Santangelo, C., Scazzocchio, B., Vari, R., Filesi, C., Masella, R., Giovannini, C. (2008). Modulatory Effects of Polyphenols on Apoptosis Induction: Relevance for Cancer Prevention. Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9 (3), p. 213–228.
- Donado-Pestana, C.M., Belchior, T., & Genovese, M.I. (2015). Phenolic compounds from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit prevent body weight and fat mass gain induced by a high-fat, high-sucrose diet. *Food Research International*, (in press).
- Dubois, M., Giles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- Fujita, A., Borges, K., Correia, R., Franco, B.D.G.M., Genovese, M.I. (2013). Impact of spouted bed drying on bioactive compounds, antimicrobial and antioxidant activities of commercial frozen pulp of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh). *Food Research International*, 54, 495–500.

Frontela-Saseta, C., López-Nicolás, R., González-Bermúdez, C.A., Peso-Echarri, P., Ros-Berruazo, G., Martínez-Graciá, C., Virgili, F. (2011). Evaluation of antioxidant activity and antiproliferative effect of fruit juices enriched with Pycnogenol® in colon carcinoma cells. The effect of *in vitro* gastrointestinal digestion. *Phytotherapy research*, 25(12), 1870–1875.

Genovese, M.I., Pinto, M.S., Gonçalves, A.E.S.S., & Lajolo, F.M. (2008). Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. *Food Science and Technology International*, 14(3), 207–214.

Gómez-Alonso, S., Collins, V.J., Vauzour, D., Rodríguez-Mateos, A., Corona, G., Spencer, J.P.E. (2012). Inhibition of colon adenocarcinoma cell proliferation by flavonols is linked to a G2/M cell cycle block and reduction in cyclin D1 expression. *Food Chemistry*, 130(3), 493–500.

Gonçalves, A.E.S.S., Lajolo, F.M., Genovese, M.I. (2010). Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4666–4674.

González-Sarrías, A., Giménez-Bastida, J.A., Núñez-Sánchez, M.Á., Larrosa, M., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C. (2014). Phase-II metabolism limits the antiproliferative activity of urolithins in human colon cancer cells. *European journal of nutrition*, 53(3), 853–64.

González-Sarrías, A., Li, L., Seeram, N.P. (2012). Effects of maple (Acer) plant part extracts on proliferation, apoptosis and cell cycle arrest of human tumorigenic and non-tumorigenic colon cells. *Phytotherapy Research*, 26(7), 995–1002.

Inoue, T., Komoda, H., Uchida, T., Node, K. (2008). Tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties. *Journal of Cardiology*, 52(2), 127–132.

Jara-Palacios, M.J., Hernanz, D., Cifuentes-Gomez, T., Escudero-Gilete, M.L., Heredia, F.J., Spencer, J.P. (2015). Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. *Food Chemistry*, 15(183), 78–82.

Kao, Y., Kuo, Y., Lee, Y., Yang, S., Chen, W., Lee, H. (2015). Apple polyphenol induces cell apoptosis, cell cycle arrest at G2/M phase, and mitotic catastrophe in human bladder transitional carcinoma cells. *Journal of Functional Foods*, 14, 385–394.

Landete, J. M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44(5), 1150–1160.

Larrosa, M., García-Conesa, M.T., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A. (2010). Ellagitannins, ellagic acid and vascular health – Review. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 513–539.

Larrosa, M., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C. (2006). The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid which induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 611–625.

Lee, S.Y.H., Munerol, B., Pollard, S., Youdim, K.A., Pannala, A.S., Kuhnle, G.G., Debnam, E.S., Rice-Evans, C., Spencer, J.P. (2006). The reaction of flavanols with nitrous acid protects against N-nitrosamine formation and leads to the formation of nitroso derivatives which inhibit cancer cell growth. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(2), 323–334.

Leite-Legatti, A., Batista, A.G., Dragano, N.R.V., Marques, A.C., Malta, L.G., Riccio, M.F., Eberlin, M.N., Machado, A.R.T., Carvalho-Silva, L.B., Ruiz, A.L.T.G., Carvalho, J.E., Pastore, G.M., Maróstica Junior, M.R. (2012). Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. *Food Research International*, 49(1), 596-603.

Lima, A.J.B., Corrêa, A.D., Alves, A. P.C., Abreu, C.M.P., Dantas-Barros, A. M. (2008). Caracterização química do fruto jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. *Archivos Latino americanos de Nutrición*, 58(4), 416–421.

Lima, T.B., Silva, O.N., Silva, P., Rocha, V.M., Grossi-de-Sa, T.L., Franco, O.L., Leonardecz, E. (2010). *In vivo* effects of Cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) leaf extracts on diarrhea treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-10.

Martinotto, C., Paiva, R., Soares, F.P., Santos, B.R., Nogueira, R.C. (2008). Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). *Boletim Técnico*, 78, 1-21.

Masella, R., Vari, R., D'Archivio, M., Di Benedetto, R., Matarrese, P., Malorni, W., Scazzocchio, B., Giovannini, C. (2004). Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *Journal of Nutrition*, 134(4), 785-791.

McDougall, G.J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D. (2005). Assessing Potential Bioavailability of Raspberry Anthocyanins Using an in Vitro Digestion System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5896–5904.

McDougall, G.J., Fyffe, S., Dobson, P., Stewart, D. (2007). Anthocyanins from red cabbage – stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 68(9), 1285-1294.

Mertens-Talcott, S.U., Lee, J.H., Percival, S.S., Talcott, S.T. (2006). Induction of cell death in Caco-2 human colon carcinoma cells by ellagic acid rich fractions from muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5336-5343.

Pinto, M.S., Carvalho, J.E., Lajolo, F.M., Genovese, M.I. (). Evaluation of Antiproliferative, Anti-Type 2 Diabetes, and Antihypertension Potentials of Ellagitannins from Strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch.) Using *In Vitro* Models. *Journal of Medicinal Food*, 13(5), 1027-1035.

Prior, R. L., Wu, X. L., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.

Ramos, S., Rodríguez-Ramiro, I., Martín, M.A., Goya, L., Bravo, L. (2011). Dietary flavanols exert different effects on antioxidant defenses and apoptosis/proliferation in Caco-2 and SW480 colon cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 25, 1771–1781.

- Ryan, L., Prescott, S.L. (2010) .Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an *in vitro* digestion. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(6), 1191–1197.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501.
- Shin, S.Y., Yoon, H., Ahn, S., Kim, D., Bae, D., Koh, D., Lee, Y.H., Lim, Y. (2013). Structural Properties of Polyphenols Causing Cell Cycle Arrest at G1 Phase in HCT116 Human Colorectal Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 16970-16985.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants*, 299(Pt A), 152–178.
- Sousa, C.M.M., Silva, H.R., Vieira-Jr, G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., Araújo, D.S., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S., Chaves, M.H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30(2), 351-355.
- Stanisavljević, N., Samardžić, J., Janković, T., Šavikin, K., Mojsin, M., Topalović, V., Stevanović, M. (2015). Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro* simulated digestion in the presence of food matrix. *Food Chemistry*, 175(15), 516-522.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606.
- Tomás-Barberan, F.A., Espin, J. C., Garcia-Conesa, M. (2009). Bioavailability and metabolism of ellagic acid and ellagitannins. *Chemistry and Biology of Ellagitannins*. World Scientific, London, 273–297.
- Visanji, J.M., Thompson, D.G., Padfield, P.J. (2006). Induction of G₂/M phase cell-cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Letters*, 237, 130-136.
- Vu, K.D., Carlettini, H., Bouvet, J., Côté, J., Doyon, G., Sylvain, G., Lacroix, M. (2012). Effect of different cranberry extracts and juices during cranberry juice processing on the antiproliferative activity against two colon cancer cell lines. *Food Chemistry*, 132(2), 959–967.
- Zhang, H.M., Zhao, L., Li, H., Xu, H., Chen, W.W., Tao, L. (2014). Research progress on the anticarcinogenic actions and mechanisms of ellagic acid. *Cancer Biology and Medicine*, 11(2), 92-100.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potencial dietary sources of ellagic acids and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba* (Vell) Berg). **Journal of The Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1679-1687, 2012.
- ANDRADE, F.O. et al. Efficacy of the dietary histone deacetylase inhibitor butyrate alone or in combination with vitamin A against proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 841-850, 2012.
- ANNEMA, N. et al. Fruit and vegetable consumption and the risk of proximal colon, distal colon, and rectal cancers in a case-control study in Western Australia. **Journal of The American Dietetic Association**, v. 111, p. 1479-1490, 2011.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Glossário de Definições Legais** Portaria nº 3.916/MS/GM, de 30 de outubro de 1998. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/glossario/glossario_b.htm >. Acesso em 29/03/14.
- 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.
- ARTS, I. C. W.; HOLLMAN, P. C. H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 317-325, 2005.
- AKTER, M. S., OH, S., EUN, J. -B., 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.
- AURA, A. M. *et al.* In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. **European Journal of Nutrition**, v. 44, p. 133–142, 2005.
- BERMUDEZ-SOTO, M. J.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; GARCIA-CONESA, M. T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. **Food Chemistry**, v. 102, p. 865–874, 2007.

- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, **Nutrition Reviews**, v 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- BRAY, F. et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. **The Lancet Oncology**, v.13, p.790-801, 2012.
- CARDOSO, L. M. et al. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Reasearch International**, v. 44, p. 2151–2154, 2011.
- CILLA, A. et al. Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. **Food Chemistry**, v. **114**, p. 813–820, 2009.
- COS, P. et al. Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1345-1359, 2003.
- CROFT, R. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annuary of New York Academy of Science**, v. 845, p. 435-442, 1998.
- CROZIER, A; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 446-467, 2010.
- D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Review. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.
- D'ARCHIVIO, M. et al. Modulatory Effects of Polyphenols on Apoptosis Induction: Relevance for Cancer Prevention. Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 213-228, 2008.
- D'ARCHIVIO, M. et al. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 1321–1342, 2010.

- DÁVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVES, C.; BARTOLOME, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 48-54, 2004.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- DONOVAN, J. L. Absorption and metabolism of dietary plant secondary metabolites. **Plant Secondary Metabolites**, Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd, 2006. p. 303–351.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema B-caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 6, n. 2, p. 446-452, 2006.
- FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. J.; SLADE, D. Phytochemistry of the mopane, *Colophospermum mopane*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 31-51, 2003.
- FUJITA, A. et al. Impact of spouted bed drying on bioactive compounds, antimicrobial and antioxidant activities of commercial frozen pulp of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh). **Food Research International**, v. 54, p. 495–500, 2013.
- GENOVESE, M.I. et al. 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.
- GÓMEZ-ALONSO, S., et al. Inhibition of colon adenocarcinoma cell proliferation by flavonols is linked to a G2/M cell cycle block and reduction in cyclin D1 expression. **Food Chemistry**, v. 130, p. 493–500, 2012.
- GONÇALVES, A.E.S.S., LAJOLO, F.M., GENOVESE, M.I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4666–4674, 2010.
- HAMINIUK, C. W. I. et al. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023-2044, 2012.
- HERTOG, M. G. L.; HOLLAM, P. C. H.; KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruit commonly consumed in

- The Netherlands. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 40, p. 2379-2383, 1992.
- HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemical: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 73-82, 2008.
- HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de Compostos Bioativos de Alimentos. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. São Paulo: Ed Manole, 2009. Cap. 36, p. 772-807.
- IBGE. **Mapa de Biomas e de Vegetação** (2004). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169>. Acesso em 29/01/13.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em 15/05/2014.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. **Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012**. França, 2012. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em 15/05/2014.
- KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **European Journal of Nutrition**, v. 38, p.133-142, 1999.
- LEA, M. A. Fruit phenolics in colon cancer prevention and treatment. In: **Bioactive Foods and Extracts: Cancer Treatment and Prevention**. WATSON, R.R.; PREEDY, V. R. Boca Raton, Flórida: Ed CRC Press, 2010. Cap 26, p. 415-426.
- LEE, B. M.; PARK, K. K. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. **Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 523-524, p. 265-278, 2003

- LEE, S.Y.H. et al. The reaction of flavanols with nitrous acid protects against N-nitrosamine formation and leads to the formation of nitroso derivatives which inhibit cancer cell growth. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, p. 323–334, 2006,
- LEITE, A. V. et al. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried Jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, p. 2277-2283, 2011.
- LIMA, T.B. et al. *In vivo* effects of Cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) leaf extracts on diarrhea treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011, 1-10, 2010.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. v. 1, 5 ed., Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 368p
- MARTINOTTO, C. et al. Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). *Boletim Técnico*, v. 78, p. 1-21, 2008.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.
- MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 230S–242S, 2005.
- MASELLA, R. et al. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell- mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 785-791, 2004.
- MATTOS, J. L. R. **Frutíferas Nativas do Brasil: Jaboticabeiras**. Porto Alegre: Nobel, 1983, 92 p.
- MERTENS-TALCOTT, S. U. et al. Induction off cell death in Caco-2 human colon carcinoma cell by ellagic acid rich fractions from Muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 5336-5343, 2006.
- MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

- NACHTIGAL, G. C. **Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de extratos das plantas *Jodina rhombifolia* HOOK et Arn. e *Carapa guianensis* Aubl sobre células HL-60, Linfoma Daudi e Fibroblastos NIH-3T3.** 2011. 101 f. Dissertação (Doutorado em Saúde e Comportamento), Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, 2011.
- OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.
- PELEG, H., BODINE, K. K., NOBLE, A. C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.
- RAMOS, S. et al. Dietary flavanols exert different effects on antioxidant defenses and apoptosis/proliferation in Caco-2 and SW480 colon cancer cells. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 1771-1781, 2011.
- RODRIGUES, R. B. et al. Na Amazonian fruit with a high potencial as a natural source of vitamin C: the camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Fruits**, v. 56, n. 5, p. 345-354, 2001.
- RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidants activity as effected by *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 136, p. 206-212, 2012.
- SANTOS, M. S. **Caracterização físico-química e aproveitamento tecnológico do *Psidium cattleianum* Sabine (Araçá-vermelho).** 2006. 177 f. Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.
- SAURA-CALIXTO, F., SERRANO, J.; GOÑI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, v. 101, p. 492-501, 2007.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.
- SILVA, C. V. et al. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 213-221, 2003.
- SILVA, J. A.; SILVA, D. B.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Frutas Nativas do Cerrado.** Embrapa, Brasília, 1994, 166 p.

- 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 in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, p. 71-81, 2002.
- SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- STEINMETZ, K. A.; POTTER, J. D. Vegetables, fruits, and cancer prevention: A review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 96, n. 10, p. 1027-1039, 1996.
- VU, K.D. et al. Effect of different cranberry extracts and juices during cranberry juice processing on the antiproliferative activity against two colon cancer cell lines. **Food Chemistry**, v. 132, p. 959–967, 2012.
- WILLIAMS, G.T. Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. **Cell**, v. 65, p. 1097-1098, 1991.
- WILKINSON, A. P. et al. Hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase is the first step in the uptake of daidzein glucosides by rat small intestine *in vitro*. **Xenobiotica**, v. 33, n. 3, p. 255–264, 2003.
- WHO - World Health Organization. **Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic. Geneva, 2003.** Disponível em:<
<http://www.fao.org/docrep/005/ac911e/ac911e00.HTM>>. Acesso em 02/05/2014.
- YORDI, E.G. et al. Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. In: BOUAYED, J.; BOHN, T. **Well-Being and Health**. Ed Nutrition, 2012, cap. 2, p. 23-48.