

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Propriedades biológicas, digestão *in vitro* e transporte celular de duas frutas
nativas da Mata Atlântica: Cambuci e Uvaia**

Pollyanna Souza Batista

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2024**

Pollyanna Souza Batista
Engenheira Industrial Química

**Propriedades biológicas, digestão *in vitro* e transporte celular de duas frutas nativas da
Mata Atlântica: Cambuci e Uvaia**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011.

Orientador:
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

Piracicaba
2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Batista, Pollyanna Souza

Propriedades biológicas, digestão *in vitro* e transporte celular de duas frutas nativas da Mata Atlântica: Cambuci e Uvaia / Pollyanna Souza Batista. versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2024.

72 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Frutas nativas 2. Atividade biológica 3. Cambuci 4. Uvaia 5. Potencial antioxidante I. Título

Aos entusiastas da pesquisa que chegaram nesse trabalho e
aos que facilitaram a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, que com seu cenário de paisagens naturais inspiradoras foi motivadora nesta jornada do doutorado.

Ao meu renomado orientador professor Dr. Severino Matias de Alencar, dono de um profissionalismo ímpar, que acreditou no meu potencial, me acolheu em sua equipe e concedeu todo suporte necessário para meu desenvolvimento como cientista.

Ao Projeto temático Nativas, em especial ao seu coordenador professor Dr. Ângelo Pedro Jacomino, que me permitiu conhecer o universo das frutas nativas brasileiras e é um dos maiores entusiastas do mundo na valorização desse patrimônio nacional, e à pesquisadora desse projeto, Msc. Isabela Taver, por todo apoio com as coletas das frutas e companheirismo nas disciplinas.

Aos meus colegas de trabalho que passaram pelos Laboratórios de Bioquímica e de Cultivo celular da ESALQ, por toda cordialidade e ensinamentos. À Dra. Adna Prado e à Regina Gonçalves, por toda disponibilidade e apoio nos experimentos. Ao Dr. Alan Sartori, pelo incentivo e conselhos.

Aos companheiros de bancada e grandes amigos, em ordem alfabética, Msc. Ana Sofia Saliba, Dra. Fernanda Papa, José Eduardo e Msc. Larissa Catelli, com quem dividi meu dia-a-dia na ESALQ, conquistas, alegrias, boas notícias e também inseguranças e aflições, e que permaneceram em minha vida e em meu coração.

À coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa, um recurso fundamental para conclusão desse estudo.

Finalmente, meu agradecimento pessoal à minha família, incluindo meu esposo, mãe, irmão, cunhada, sobrinha e *pets*, que me concedem amor e apoio incondicionais, me edificam e me permitem ser quem eu sou.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	9
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
1.1.1. DUAS FRUTAS NATIVAS SUBEXPLORADAS DA FAMÍLIA MYRTACEAE: CÂMBUCI E UVAIA.....	11
1.1.2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	14
1.1.3. COMPOSTOS FENÓLICOS NA DIETA.....	15
1.1.4. CAROTENOIDES: B-CAROTENO E AÇÃO PROVITAMÍNICA.....	18
1.1.5. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF-κB.....	20
1.1.6. MODELO INFOGEST DE DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	21
1.1.7. TRANSPORTE EPITELIAL EM CÉLULAS CACO-2.....	22
1.1.8. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CELULAR (AAC) EM MODELO DE CÉLULAS CACO-2.....	24
1.1.9. TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> EM MODELO <i>GALLERIAS MELLONELLA</i>	25
REFERÊNCIAS.....	27
2. CAPÍTULO 1 - MUDANÇAS DO PERFIL FENÓLICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIA DE <i>CAMPOMANESIA PHAEA</i> E <i>EUGENIA PYRIFORMIS</i> APÓS A DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA E TRANSPORTE EM CÉLULAS CACO-2.....	31
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2.1. INTRODUÇÃO.....	33
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.2.1. COLETA DAS AMOSTRAS.....	34
2.2.2. DIGESTÃO GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>	35
2.2.3. TRANSPORTE EM CÉLULAS CACO-2.....	36
2.2.3.1. CULTIVO CELULAR.....	36
2.2.3.2. ENSAIO MTT PARA VIABILIDADE CELULAR.....	36
2.2.3.3. ENSAIO DE TRANSPORTE EM TRANSWELL®.....	36
2.2.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO FENÓLICA.....	37
2.2.5. ANÁLISE DA CAPACIDADE DESATIVADORA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO).....	38
2.2.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CELULAR.....	39
2.2.7. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	40
2.2.8. TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> EM MODELO <i>G. MELLONELLA</i>	40
2.2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
2.3.1. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA POR LC-ESI-IT-MS/MS.....	41
2.3.1.1. IDENTIFICAÇÃO TENTATIVA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DA UVAIA E CÂMBUCI.....	41
2.3.1.2. IDENTIFICAÇÃO TENTATIVA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DA UVAIA E CÂMBUCI APÓS A DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> E TRANSPORTE EM CÉLULAS CACO-2.....	43
2.3.2. TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	45
2.3.3. CAPACIDADE DESATIVADORA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	46
2.3.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CELULAR (AAC) EM CÉLULAS CACO-2.....	49
2.3.5. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	51
2.3.6. TOXICIDADE AGUDA <i>IN VIVO</i>	54
2.4. CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

3. CAPÍTULO 2 - EMULSÕES À BASE DE LEITE E ÓLEO DE SOJA INCORPORADAS À UVAIA: DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> E BIOACESSIBILIDADE DO <i>BETA</i> CAROTENO.....	60
RESUMO	60
ABSTRACT	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.1. INTRODUÇÃO.....	62
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	63
3.2.1. AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA.....	63
3.2.2. PREPARO DOS PRODUTOS EMULSIONADOS	63
3.3. ENSAIO DE DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	64
3.3.1. EXTRAÇÃO DOS CAROTENOIDES DA UVAIA E FRAÇÃO MICELAR	65
3.3.2. ANÁLISE POR HPLC.....	65
3.3.3. CÁLCULO DA BIOACESSIBILIDADE <i>IN VITRO</i>	66
3.3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.5. CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICES	
APÊNDICE A- CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC DA FRAÇÃO MICELAR DOS PRODUTOS EMULSIONADOS E INCORPORADOS À UVAIA A PARTIR DA EMULSÃO DE FONTE LIPÍDICA (LT): LEITE A 3% DE GORDURA, (CL): CREME DE LEITE A 17% DE GORDURA, (O3): 3% ÓLEO DE SOJA, (17): 17% ÓLEO DE SOJA.	71
.....	72

RESUMO

Propriedades biológicas, digestão *in vitro* e transporte celular de duas frutas nativas da Mata Atlântica: Cambuci e Uvaia

Nas últimas décadas, observa-se um crescente interesse no meio científico em caracterizar e estudar as propriedades biológicas e nutricionais das frutas nativas do Brasil, visando sua inclusão na dieta da população. No entanto, é essencial compreender se os compostos bioativos presentes nessas frutas são efetivamente bioacessíveis e disponíveis para o organismo, uma vez que o processo digestivo pode degradá-los ou modificá-los. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo geral avaliar o efeito da digestão *in vitro* de duas frutas nativas, o Cambuci (*Campomanesia phaea*) e a Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess), sobre suas propriedades biológicas. Foi realizada a digestão *in vitro* das frutas pelo método INFOGEST, seguida pelo transporte epitelial em células Caco-2. Posteriormente, avaliou-se o extrato, a fração bioacessível e as frações transportadas quanto às atividades anti-inflamatória e antioxidante celular (AAC), desativação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e identificou-se os compostos fenólicos presentes pela análise em LC-ESI-IT-MS/MS. Além disso, foi conduzida uma simulação de digestão da Uvaia reconstituída e dos produtos emulsionados, analisando o efeito da presença de lipídeos na bioacessibilidade do β -caroteno. Quanto à AAC, as concentrações eficazes para redução de 50% de fluoresceína (EC50) foram de $17,91 \pm 0,3$ mg/mL para o Cambuci e $20,3 \pm 0,56$ mg/mL para a Uvaia. As frações digeridas e basolaterais de ambas as frutas, quando utilizadas em concentrações superiores a $200 \mu\text{g/mL}$, demonstraram a capacidade de reduzir a via inflamatória NF- κ B, bem como as citocinas TNF- α e quimiocina CXCL2/MIP-2. Em relação às atividades antioxidantes, ambas as frutas exibiram a capacidade de desativar ERO, inclusive após a digestão *in vitro* e o transporte através das células Caco-2. Na Uvaia foram identificados compostos fenólicos como o ácido elágico, o ácido tri-O-metilelágico, derivados de ácido cumárico, ácido 4'-O-metilelágico 3-(2,3 -di-O-acetil)- α -L-ramnosídeo, quercetina-3-O-pentosídeo e quercetina-galoil-ramnosídeo, entre outros. Após a digestão e transporte celular, foram identificados o ácido málico e o ácido cinâmico na Uvaia. No Cambuci, foram identificados kaempferol 7-O-hexuronida, quercetina-galoil-ramnosídeo, ácido cafeico-hexose-desoxihexose, ácido 3,7-O-diferuloil-4-O-cafeoil quínico, ácido tri-cafeoilquínico, 1,2,6-Tri-O-galloyl- β -D-glucose, e dímero de Procianidina B. Além disso, o ácido quínico foi identificado na fração digerida e basolateral do Cambuci. Quanto à toxicidade em larvas de *Galleria mellonella*, a Uvaia não demonstrou toxicidade, enquanto o Cambuci apresentou EC50 de 136,0 g/Kg. Quanto a bioacessibilidade do β -caroteno em produtos emulsionados, o derivado da Uvaia incorporado à emulsão contendo 17,0% de óleo de soja exibiu uma bioacessibilidade de 16,9%, em contraste com os 10,7% observados na Uvaia reconstituída. Esse resultado ressalta que a presença de lipídeos promoveu a micelarização do β -caroteno. Assim, tanto a Uvaia quanto o Cambuci demonstraram possuir propriedades bioativas significativas, mesmo após a simulação do processo digestivo e o transporte através da barreira intestinal, destacando-se como importantes frutas nativas brasileiras com potencial impacto positivo na saúde dos consumidores.

Palavras-chave: Frutas nativas; Atividade biológica; Cambuci; Uvaia; *Campomanesia phaea* ; *Eugenia pyriformis* Cambess

ABSTRACT

Biological properties, *in vitro* digestion and cellular transport of two native fruits of the Atlantic Forest: Cambuci and Uvaia

In recent decades, there has been a growing interest in the scientific community in characterizing and studying the biological and nutritional properties of native Brazilian fruits, with the aim of incorporating them into the population's diet. However, it is essential to understand whether the bioactive compounds present in these fruits are effectively bioaccessible and available to the organism, as the digestive process can degrade or modify them. In this context, this study had the general objective of evaluating the effect of *in vitro* digestion of two native fruits, Cambuci (*Campomanesia phaea*) and Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess), on their biological properties. The *in vitro* digestion of the fruits was performed using the INFOGEST method, followed by epithelial transport in Caco-2 cells. Subsequently, the extract, bioaccessible fraction, and transported fractions were evaluated for anti-inflammatory and cellular antioxidant activities (AAC), deactivation of reactive oxygen species (ROS), and phenolic compound identification by LC-ESI-IT-MS/MS analysis. Additionally, a simulated digestion of reconstituted Uvaia and emulsified products was conducted to analyze the effect of lipid presence on the bioaccessibility of β -carotene. Regarding AAC, the effective concentrations for 50% reduction (EC50) were 17.91 ± 0.3 mg/mL for Cambuci and 20.3 ± 0.56 mg/mL for Uvaia. The digested and basolateral fractions of both fruits, when used at concentrations above 200 μ g/mL, demonstrated the ability to reduce the NF- κ B inflammatory pathway, as well as the cytokines TNF- α and CXCL2/MIP-2. In terms of antioxidant activities, both fruits showed the capacity to deactivate ROS, even after *in vitro* digestion and transport through Caco-2 cells. In Uvaia, phenolic compounds such as ellagic acid, tri-O-methyl ellagic acid, derivatives of coumaric acid, 4'-O-methyl ellagic acid 3-(2,3-di-O-acetyl)- α -L-rhamnoside, quercetin-3-O-pentoside, and quercetin-galloyl-rhamnoside, among others, were identified. After cell digestion and transport, malic acid and cinnamic acid were identified in Uvaia. In Cambuci, compounds such as kaempferol 7-O-hexuronide, quercetin-galloyl-rhamnoside, caffeic acid-hexose-deoxyhexose, 3,7-O-diferuloyl-4-O-caffeoyl quinic acid, tri-caffeoylquinic acid, 1,2,6-Tri-O-galloyl- β -D-glucose, and Procyanidin B dimer were identified. Furthermore, quinic acid was identified in the digested and basolateral fraction of Cambuci. Regarding toxicity in *Galleria mellonella* larvae, Uvaia showed no toxicity, while Cambuci exhibited an EC50 of 136.0 g/Kg. As for the bioaccessibility of β -carotene in emulsified products, the Uvaia derivative incorporated into the emulsion containing 17.0% soybean oil exhibited a bioaccessibility of 16.9%, in contrast to the 10.7% observed in reconstituted Uvaia. This result highlights that the presence of lipids promoted the micellarization of β -carotene. Thus, both Uvaia and Cambuci demonstrated significant bioactive properties, even after simulating the digestive process and transport through the intestinal barrier, emphasizing their importance as native Brazilian fruits with the potential for a positive impact on consumer health.

Keywords: Native fruits; Biological activity; Cambuci; Uvaia
Campomanesia phaea; *Eugenia pyriformis* Cambess

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil, com a maior biodiversidade do mundo, abriga uma variedade de espécies frutíferas nativas de alto potencial biológico. Porém a produção de frutas no país, em sua maioria, concentra-se em espécies exóticas e, como consequência, há uma desvalorização de biomas únicos e das frutas nativas brasileiras, que em sua maioria são ainda desconhecidas (JACOMINO et al., 2018).

O cultivo e a comercialização de frutas nativas podem desempenhar um importante papel econômico no país, com a geração de renda de forma sustentável, desenvolvimento regional, incentivo à diversificação da matriz alimentícia vegetal e preservação da biodiversidade. Além disso, do ponto de vista de saúde, estudos recentes reforçam a importância dessas frutas brasileiras subexploradas em relação ao seu papel biológico, associando seu consumo a prevenção de diversas doenças crônicas e degenerativas por conta de sua composição rica em bioativos com características antioxidantes e anti-inflamatórias (SOARES et al., 2019).

As frutas nativas mais conhecidas e presentes na alimentação dos brasileiros são a jabuticaba, goiaba, maracujá e açaí, as quais podem ser facilmente encontradas em comércios. Dentre os fatores que contribuem para o baixo consumo de diversas outras frutas nativas brasileiras estão a consolidação da cadeia produtiva de frutas exóticas e a falta de informações do consumidor (DENARDIN et al., 2015; LAURINDO et al., 2023).

Para aumentar a visibilidade das frutas nativas pela população são necessários investimentos em *marketing* e a criação de canais de comercialização, aliados à ações de incentivos governamentais, parcerias com restaurantes e marcas, campanhas de conscientização, eventos temáticos e/ou feiras. Para exemplificar como esse conjunto de ações pode ter efetividade, pode-se citar o exemplo do açaí. Essa fruta nativa da região amazônica, antes consumida apenas localmente por comunidades da região norte do Brasil, ganhou visibilidade nos últimos anos como um alimento saudável e nutritivo. Isto foi em grande parte devido à disseminação do seu potencial energético e antioxidante, e no contexto atual o açaí se tornou uma das frutas mais conhecidas no mundo, sendo consumida em sobremesas, sucos, sorvetes e diversos outros produtos (FREITAS et al., 2019;).

É portanto de grande importância destacar que ainda são necessários estudos quanto às potencialidades biológicas e aplicações de diversas outras frutas nativas brasileiras subexploradas, principalmente em relação aos seus benefícios para a saúde, bioacessibilidade, composição

química, propriedades nutricionais, melhoramento genético, reprodução, pós colheita, dentre outros parâmetros, de maneira a tornar a cadeia de exploração desses recursos sustentável.

No contexto atual das pesquisas em torno das frutas nativas, é crescente o interesse pela composição quanto aos compostos bioativos, que são fitoquímicos encontrados em alimentos e que promovem efeito benéfico para a saúde através da modulação de processos metabólicos. As principais fontes de compostos bioativos de origem vegetal são os compostos fenólicos, carotenoides, tocoferóis, organossulfurados, dentre derivados dessas classes (HAMINIUK et al., 2014; MERCADANTE et al., 2017; SILVA et al., 2019).

A caracterização de compostos bioativos de um alimento é importante pois pode dar indícios sobre seu potencial biológico. Para prever a eficácia nutricional após a sua ingestão, são necessários estudos de digestibilidade e absorção. Tendo a digestão como um processo que submete o alimento a uma série de reações que transformam seus metabólitos, estudos de bioacessibilidade de compostos bioativos fornecem informações importantes sobre sua liberação da matriz alimentar, transformações sofridas no trato gastrointestinal e absorção no organismo (ALENCAR et al., 2023; CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; DE PAULO FARIAS et al., 2021).

De acordo com o exposto, este estudo visou contribuir com o conhecimento científico sobre frutíferas nativas brasileiras, ao se avaliar o potencial bioativo de duas frutas espécies da Mata Atlântica: o Cambuci (*C. phaea*) e a Uvaia (*E. pyriformis* Cambess).

No capítulo 1 foi feito um monitoramento do potencial antioxidante e anti-inflamatório do Cambuci e da Uvaia, observando-se os efeitos após a digestão gastrointestinal simulada e do transporte epitelial em células Caco-2 sobre os compostos fenólicos, capacidade desativadora de espécies reativas de oxigênio (ERO), atividade anti-inflamatória, atividade de antioxidante celular (AAC) e toxicidade *in vivo*.

No capítulo 2, visando a diversificação de produtos derivados de frutas nativas, foram propostos quatro modelos de produto emulsionado preparado com Uvaia liofilizada e reconstituída e diferentes fontes de lipídeo. Esta parte do trabalho teve como objetivo específico analisar a bioacessibilidade do β -caroteno nessas condições, o qual é um carotenóide presente em grande quantidade na Uvaia.

1.1. Revisão Bibliográfica

1.1.1. Duas frutas nativas subexploradas da família Myrtaceae: Cambuci e Uvaia

A família Myrtaceae é considerada uma das famílias mais bem representadas no Brasil. Fortemente concentradas na Mata Atlântica, as espécies frutíferas da família Myrtaceae representam grande importância para a biodiversidade desse bioma. Dentre essas, as frutas mais populares para os brasileiros estão a goiaba (*Psidium guajava* L.), pitanga (*Eugenia Uniflora* L.) e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart) O Berg.). No entanto, pertencem a essa família diversas outras espécies nativas e pouco exploradas, descritas na literatura com alto potencial biológico e de consumo (DONADO-PESTANA et al., 2018; TAVER et al., 2022).

A estruturação da exploração e comércio de frutas da família Myrtaceae são necessários para, além de promover o desenvolvimento de comunidades das áreas da Mata Atlântica, evitar a extinção dessa espécie, uma ameaça atual decorrente da degradação e desmatamento exacerbados nesse bioma (FREITAS et al., 2019; JUNIOR et al., 2020; SILVA et al., 2014).

Neste âmbito, introduz-se a seguir as duas frutas com essas características.

1.1.1.1. Cambuci

O Cambucizeiro, cientificamente denominado como *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum, é uma árvore frutífera nativa do Brasil encontrada na região da Mata Atlântica, pertencente à família botânica Myrtaceae. Seu fruto é popularmente conhecido como Cambuci, e essa denominação deriva do termo tupi guarani "kamu-si", fazendo alusão a um objeto de forma romboide utilizado pelos povos indígenas para consumo de água. A fruta em questão apresenta uma configuração morfológica similar à mencionada descrição (MOREIRA et al., 2022; TOKAIRIN et al., 2018).

Atualmente, mesmo que regionalmente, a visibilidade do Cambuci vem reconquistando espaço através de ações de preservação da biodiversidade e diversidade cultural. Um dos incentivos ao seu comércio é a Rota do Cambuci, um roteiro gastronômico e cultural criado em 2009 para fomentar as potencialidades de comercialização desta fruta na região da Serra do Mar, onde a fruta e seus derivados têm sido inseridos em comércios locais na forma de polpa ou de variados produtos artesanais. Atualmente a forma mais comum de consumo do Cambuci é em polpa congelada, adquirida principalmente por restaurantes de alta gastronomia do estado de São Paulo (TOKAIRIN et al., 2018).

Os Cambucizeiros são encontrados de forma nativa em pequenas áreas nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Também cultivado em quintais domésticos, a comercialização de Cambuci tem pequena escala e grande parte da produção e comércio são feitos por pequenos produtores (BIANCHINI et al., 2016).

Caracterizado como uma fruta de casca lisa e verde (Figura 1), com polpa suculenta de cor creme, poucas sementes e sabor adstringente, o Cambuci é ideal para o preparo de sucos, xaropes, mousses, geleias, sorvetes e licores. Essa fruta destaca-se ainda por sua característica sensorial olfativa agradável, de intenso aroma cítrico e adocicado (SANCHES-AZEVEDO et al., 2017; SILVA et al., 2012).



Figura 1. Aspecto visual do Cambuci (*Campomanesia phaea*). (FONTE: Do próprio autor)

Quanto as propriedades biológicas, o Cambuci é fonte de compostos bioativos que exercem ação antioxidante e antiinflamatória, como os compostos fenólicos e vitamina C, além de fonte de fibras e minerais. Soares et al. (2020) identificaram a quercetina, o ácido gálico e ácido cumárico, dentre os principais compostos fenólicos glicosilados na polpa da fruta. Os autores também encontraram atividade antioxidante, por meio da desativação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e atividade antiinflamatória, avaliada pelo ensaio de migração de neutrófilos em camundongos.

Importante ainda destacar que os principais desafios para consolidar a produção e comercialização do Cambuci são:

- Reprodução, que envolve estratégias de manejo, composição de solo e necessidade de polinizadores específicos;
- Colheita, já que uma mesma árvore pode apresentar frutos com diferentes graus de amadurecimento, dificultando inclusive a padronização das frutas;

-Pós-colheita e transporte, tendo-se que o Cambuci é altamente perecível, fazendo-se ainda necessário aprofundar estudos sobre armazenamento e conservação de suas propriedades (MOREIRA et al., 2022; VALLILO et al., 2005) .

1.1.1.2. Uvaia

A uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess) está dentre a família Myrtaceae, e é uma das espécies frutíferas nativas brasileiras ameaçadas de extinção. Com nome derivado do tupi *iwa-ya*, que significa “fruto azedo”, seus frutos são nomeados Uvaia, mas podem ser conhecidos por variações de nome como uvalha, ubaia ou Uvaia-do-mato. Sendo encontrada com maior abundância nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, muitos brasileiros reconhecem a fruta, porém seu comércio atualmente é praticamente escasso e seu cultivo restrito a poucos produtores, centros de pesquisas e pomares domésticos. Essa espécie, nativa da Mata Atlântica, tem sido resgatada em projetos de reflorestamento de área degradadas e de arborização urbana, inclusive para ornamentação (FREITAS et al., 2019; JACOMINO et al., 2018).

Os frutos da Uvaia tem características químicas que podem variar, com cores amarela à laranja, casca fina lisa ou levemente rugosa, formato piriforme ou arredondado (Figura 2), e geralmente possuem de 2 a 3 sementes. Sua polpa é carnosa e de alto rendimento, sabores que variam de doce à ácido, e aroma adocicado de descrição única, como resultado de sua composição rica em substâncias voláteis (SILVA et al., 2019; RAMIREZ et al., 2012).



Figura 2. Aspecto visual da Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess). (FONTE: Do próprio autor)

Quanto as características biológicas que destacam a Uvaia é relatado que seus frutos possuem altos teores de compostos bioativos, como os compostos das classes dos fenólicos e dos carotenoides, que lhe confere atividade antioxidante e antiinflamatória. As pesquisas recentes indicam que a ingestão de Uvaia contribui na dieta com alto teores de vitamina C e micronutrientes como Fe, Cu e Mn (LOPES et al., 2018).

Na culinária a Uvaia é considerada uma iguaria gastronômica, tradicionalmente utilizada em sucos, compotas, geléias, sorvetes e na produção de cervejas artesanais. Estudos propõem o uso de Uvaia em produtos alimentícios funcionais tendo a fruta como base (ZILLO et al., 2014; SGANZERLA & SILVA, 2022).

As aplicações da Uvaia estendem-se ainda ao mercado de cosméticos, utilizada em hidratantes e sabonetes. Além disso, a fruta, que é também rica em terpenos, tem seu valor agregado à sua capacidade fitoquímica através do uso de suas flores, folhas e frutos para extração de óleos essenciais (FREITAS et al., 2019). Assim, essas informações indicam que a Uvaia possui potencial biológico e nutricional para representar parte do mercado de frutas nativas, que indica sinais de evolução no Brasil.

As dificuldades encontradas para a implementação do comércio da Uvaia estão altamente ligadas à alta perecibilidade do fruto, que torna o transporte e armazenamento desafiadores (SILVA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2021).

1.1.2. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas ou íons que contêm oxigênio e são altamente reativos devido a elétrons desemparelhados em sua estrutura. Essas ERO incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($\bullet OH$), entre outros. ERO são naturalmente geradas no corpo como subprodutos do metabolismo do oxigênio, especialmente na mitocôndria da célula, onde a maior parte do oxigênio é consumido para produzir energia. Além disso, ERO são formadas durante processos inflamatórios, quando células do sistema imunológico as utilizam para combater patógenos ou têm sua formação induzida por fatores externos, como poluição, exposição à radiação, pesticidas e outros agentes ambientais, o que pode resultar em produção excessiva dessas espécies e causar efeitos negativos às células e biomoléculas (MELO et al., 2015; TREMOCOLDI et al., 2018).

O organismo possui um sistema de defesa antioxidante que inclui antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase, a glutathione redutase e a catalase, bem como antioxidantes não enzimáticos, como vitaminas (A, C e E) e minerais (selênio e zinco). Esses antioxidantes são fundamentais para manter o estresse oxidativo controlado. Eles fazem isso doando elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, transformando-os em formas mais estáveis e menos reativas. Além disso, os antioxidantes podem inibir a formação de ERO, complexar metais que podem catalisar a produção de ERO e desativar hidroperóxidos, evitando danos celulares adicionais (TREMOCOLDI et al., 2018).

No entanto, quando a produção de ERO supera a capacidade do sistema antioxidante do corpo de neutralizá-las, ocorre o estresse oxidativo, que é um processo associado à várias condições patológicas, como doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes e envelhecimento acelerado (ALÍA et al., 2006).

Compostos bioativos com ação antioxidante podem ser obtidos por meio da dieta, como é o exemplo dos compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas, encontrados em frutas, legumes e verduras. Portanto, manter uma dieta rica em antioxidantes provenientes de alimentos como frutas, legumes e verduras é fundamental para promover a saúde e reduzir o risco de doenças associadas ao estresse oxidativo. Além disso, é importante adotar um estilo de vida saudável, evitando fatores de risco, como exposição excessiva à radiação solar, poluição do ar e consumo excessivo de álcool, dentre outros fatores que podem aumentar a produção de ERO no corpo (GRANATO et al., 2018).

De forma geral, os compostos antioxidantes dos alimentos podem atuar:

- Capturando ERO, doando elétrons ou hidrogênio para os radicais livres de oxigênio, tornando-os mais estáveis e menos reativos e reduzindo a capacidade destes metabólitos de danificar as células;

- Como quelante de metais, ao se ligarem à íons metálicos que podem catalisar a formação de radicais livres no corpo. Ao quelar esses metais, os compostos fenólicos, por exemplo, podem prevenir a formação de radicais livres;

- Inibição de enzimas que produzem ERO no organismo (LOPES et al., 2018; OLENNIKOV et al., 2020; SILVA et al., 2019).

1.1.3. Compostos fenólicos na dieta

Os compostos fenólicos, ou polifenóis, são metabólitos secundários abundantemente presentes em plantas, vegetais e frutas, fornecendo a estes organismos proteção física e química a estresses como ataques de patógenos, insetos e radiação UV. Essa classe tem em sua estrutura química um anel aromático contendo uma ou mais hidroxilas substituintes (CHANG et al., 2019; RASERA et al., 2023; RATHEE et al., 2009).

A estrutura química dos compostos fenólicos está ligada ao seu potencial antioxidante, já que os grupos hidroxila tem facilidade em doar elétrons e/ou hidrogênios, tornando-os sequestradores de radicais livres ou quelantes de metais. Assim, esse grupo tem grande relevância dentre os antioxidantes naturais, além de relacionados às atividades antiinflamatória,

antiproliferativa, dentre outras, que contribuem na prevenção e tratamento de diversas doenças relacionadas ao estresse oxidativo (FLAMINI, 2003).

As frutas e vegetais são fontes notáveis de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, taninos e flavonoides, onde estão presentes de forma solúvel (livre ou esterificado) ou insolúvel (ligado à macromoléculas da parede celular, como por exemplo a celulose).

A Figura 3 apresenta os principais compostos fenólicos que podem ser encontrados nos alimentos.

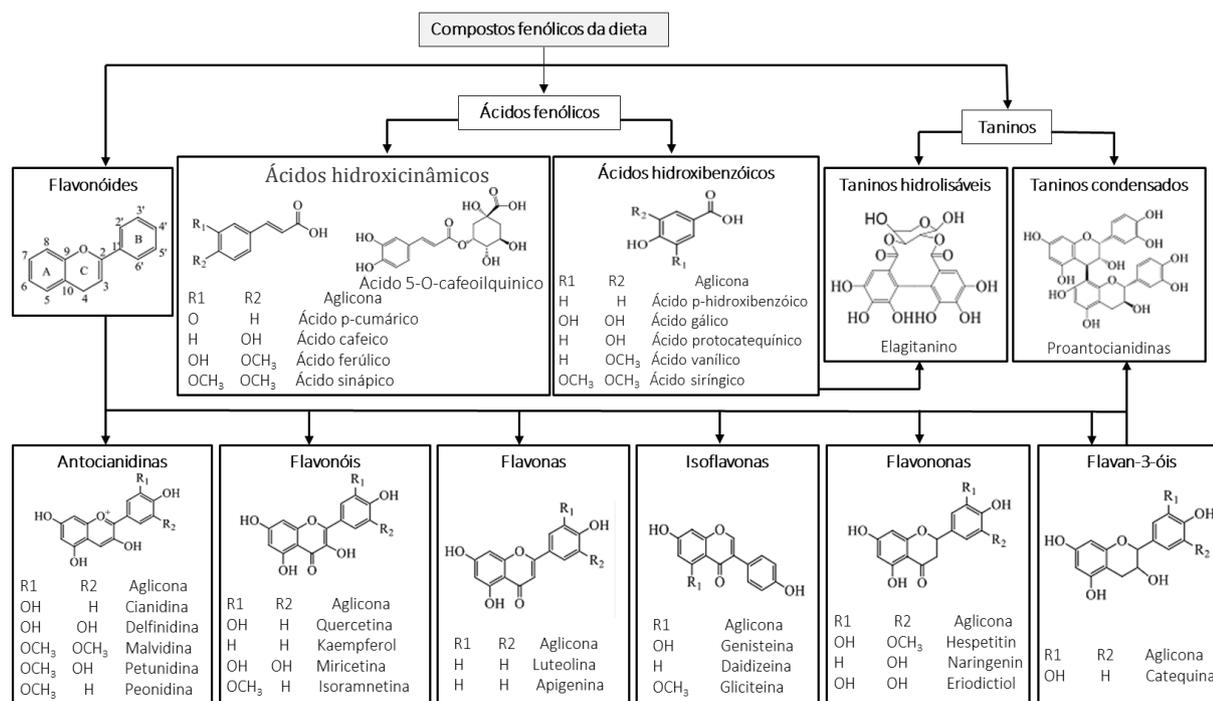


Figura 3. Principais compostos fenólicos da dieta. (FONTE: Adaptado de Spínola (2018))

Os flavonoides constituem o maior grupo dentre os compostos fenólicos e em frutas e vegetais encontram-se muitas vezes de forma conjugada à glicosídeos. As antocianidinas, importantes pigmentos de plantas, são uma subclasse dos flavonoides. São encontradas em uvas, mirtilos, amoras, repolho roxo, dentre outros vegetais e frutas de mesma tonalidade. Flavonóis como quercetina, kaempferol e miricetina são encontrados em diversas frutas e vegetais, dentre eles couve e espinafre. As flavonas são menos abundantes na dieta, sendo encontradas em grãos e chás, como luteolina e apigenina. Quanto as isoflavonas, como genisteina e daidzeina, são conhecidas por sua abundância na soja. O subgrupo das flavanonas, que tem como principais exemplos a naringenina e a hesperidina, podem ser encontrados em frutas cítricas. O último grupo da família de flavonoides é o dos flavan-3-óis, altamente presentes em vegetais e chás, como o chá verde, a exemplo da catequina SPINOLA, 2018).

Os ácidos fenólicos são classificados em hidroxicinâmicos, como ácido cafeico, e hidroxibenzóicos, como os ácidos gálico e vanílico. Esse grupo pode ser encontrado em frutas, cereais, ervas, dentre outros (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2010).

Polímeros de flavan-3-óis são da classe de taninos condensáveis, ou proantocianidinas. Os taninos hidrolisáveis são esterificados com os ácidos hidroxibenzóicos. Os taninos são encontrados em frutas, folhas, café e vinho, fornecendo sabor adstringente aos alimentos (CHANG et al., 2019).

Após a ingestão, os compostos fenólicos dos alimentos sofrem alterações físico-químicas e a liberação desses compostos da matriz alimentar ocorre pelas reações enzimáticas da digestão gastrointestinal. A bioacessibilidade dos compostos fenólicos depende da parcela retida na fase aquosa, ou seja, que não sofreu precipitação ou complexação junto aos sais minerais e enzimas. Suas formas livres podem ser absorvidas no intestino delgado onde, dentro das células intestinais, passam por reações de carboxilação, clivagem, descarboxilação, dentre outras (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014).

Ainda sobre a digestão e absorção de compostos fenólicos, estudos recentes consideram no processo a ação dos compostos fenólicos insolúveis, conjugados à macromoléculas da parede celular, que podem representar uma parcela considerável dos fenólicos totais. Estes podem ser liberados por processos térmicos, hidrólise enzimática ou fermentação, por exemplo (RASERA; DE CAMARGO; DE CASTRO, 2023).

A complexidade dos mecanismos de absorção dos compostos fenólicos pode ser observada na fase intestinal, em que a pancreatina pode agir liberando flavonoides monoglicosídeos acoplados com lipase e extratos biliares, facilitando sua absorção pelo intestino. Por outro lado, os grupos hidroxilas dos compostos fenólicos podem sofrer ação de degradação ou precipitação nessa etapa, devido às reações enzimáticas e de mudança de pH, que alteram a estabilidade desses compostos. Nesse processo, pode ocorrer a formação de derivados fenólicos de alto peso molecular e baixa solubilização e que influenciam a bioacessibilidade e o potencial bioativo dos compostos fenólicos, sabendo-se que estes estão relacionados às estruturas fenólicas (LI et al., 2016).

Estudos recentes demonstram que mesmo os compostos fenólicos não absorvidos podem ter ação biológica no organismo, já que estes podem ser catabolizados pela microbiota do cólon, por reação de fermentação. A microbiota é formada por uma variedade de microrganismos que secretam enzimas que aumentam a solubilidade destes compostos, que não

foram extraídos na digestão, convertendo-os em compostos de menor peso molecular (NEVES et al., 2018).

Na literatura, os dados mais consistentes sobre absorção e metabolismo dos compostos fenólicos são em torno dos flavonoides, como isoflavonas, quercetina, catequinas e ácidos fenólicos (ALENCAR et al., 2023; CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; RASERA; DE CAMARGO; DE CASTRO, 2023; SPRICIGO et al., 2021).

1.1.4. Carotenoides: β -caroteno e ação provitamínica

Carotenoides são uma classe de compostos lipossolúveis encontrados naturalmente em frutas, vegetais, flores, animais, microorganismos e algas, na forma livre ou esterificados com ácidos graxos. Eles conferem os pigmentos amarelo, alaranjado e vermelho, com a função de aumentar a atratividade das frutas, por exemplo, para estimular seu consumo e dispersão de sementes. Os carotenoides também estão presentes em vegetais e frutas de coloração verde, tendo a sua cor mascarada pela clorofila (MERCADANTE et al., 2017).

Quimicamente, os carotenoides são classificados em carotenos e xantofilas. Os carotenos são formados apenas por átomos de carbono e hidrogênio e as xantofilas possuem também oxigênio em sua estrutura, ligado em grupos funcionais adicionais, como hidroxila e carbonila (SILVA et al., 2014).

Dentre os carotenos, o β -caroteno é o mais conhecido. Esse carotenoide tem função biológica importante, pois possui atividade provitamina A. O grupo das xantofilas inclui luteína e zeaxantina como mais conhecidas, sendo que essas não são provitamínicas (MERCADANTE et al., 2017).

A ação provitamínica do β -caroteno inicia-se com a clivagem desse composto, que sofre conversão a diferentes formas de vitamina A. Na Figura 4 são apresentadas as reações de clivagem simétrica e assimétrica do β -caroteno, que ocorrem naturalmente no fígado.

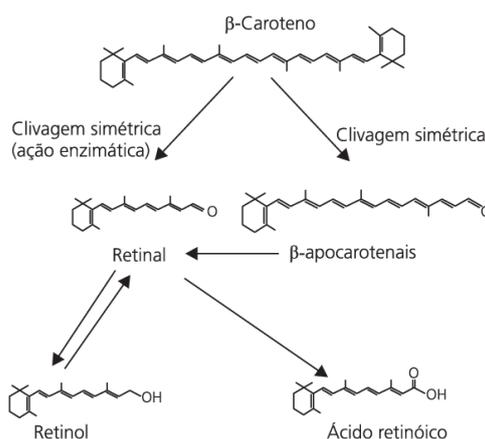


Figura 4. Reações de clivagem do β -caroteno. (FONTE. Adaptado de (KOPEC & FAILLA, 2018))

Nesse processo, a vitamina A (retinol) é convertida em retinal, por ação da enzima retinol dioxigenase, e o retinal pode ser convertido em ácido retinóico ou em retinol. A vitamina A é essencial para a saúde da visão, pele e manutenção da integridade do sistema imunológico (KOPEC & FAILLA, 2018).

Estudos recentes demonstram que a ingestão de alimentos ricos em carotenoides pode inibir doenças, por esses compostos apresentarem propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e imunomoduladoras (PEIXOTO et al., 2013). Da classe das frutas, os carotenoides predominantes são o β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno e zeaxantina.

Durante a digestão, para serem absorvidos pelo intestino, os carotenoides devem ser liberados da matriz alimentar em forma de gotículas de óleo. Essas gotículas são emulsificadas no intestino pelos sais biliares, formando micelas compostas por ácidos biliares e ácidos graxos livres, monoglicerídeos e fosfolipídeos. Essas micelas são então absorvidas pelas células epiteliais que revestem o trato intestinal, por mecanismo de difusão passiva (PARKER, 1996).

A bioacessibilidade dos carotenoides tem sido investigada em pesquisas *in vitro* e observa-se que as principais variáveis investigadas e que exercem influência na absorção destes compostos pelo organismo são: o processamento da matriz alimentar, quantidade de fibra do alimento e presença de lipídeo (MERCADANTE et al., 2017).

A presença de fibra pode diminuir a bioacessibilidade dos carotenoides, por dificultar a formação de micelas na digestão. Quanto ao tratamento térmico de alimentos, como cozimento, esse tem sido relatado como responsável por tornar a bioacessibilidade de carotenoides mais eficiente, convertendo esses compostos em formas mais facilmente absorvidas. Outra evidência é de que a absorção dos carotenoides pelo organismo pode ser

otimizada quando o alimento é consumido na presença de lipídeos, já que eles são lipossolúveis (KOPEC & FAILLA, 2018).

1.1.5. Atividade anti-inflamatória e fator de transcrição NF-kB

O processo de inflamação é uma complexa resposta de proteção do organismo desencadeada em resposta a lesões de origem biológica, física ou química. Essa resposta envolve a liberação de diversas proteínas mediadoras inflamatórias, tais como citocinas, quimiocinas, receptores e moléculas de adesão. Muitas dessas proteínas são naturalmente expressas em células sob condições normais, mas o aumento significativo de sua produção pode indicar a persistência de um estado inflamatório agudo (BLANCO; CONDINO NETO, 2003).

Um dos eventos centrais na resposta inflamatória é a ativação do fator nuclear Kappa B (NF-kB). Esse fator desempenha um papel crucial na transcrição de diversos genes, incluindo aqueles envolvidos na resposta inflamatória. Esses genes abrangem uma variedade de funções, como a produção de enzimas de defesa antioxidante, citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferons alfa (INF- α) e beta (INF- β), bem como moléculas de adesão, como ELAM-1 e ICAM-1. Quando inativo, o NF-kB encontra-se no citoplasma, ligado a uma proteína inibitória chamada I κ B (RATHEE et al., 2009).

A ativação do NF-kB pode ser desencadeada por estímulos extracelulares, como citocinas pró-inflamatórias, o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), proteínas virais, fatores indutores de estresse e ativadores de linfócitos, entre outros. Quando ativado, o NF-kB é translocado para o núcleo celular, onde se liga a sequências específicas de DNA, promovendo a transcrição de genes alvo. Esse processo de ativação envolve uma série de mecanismos de transdução de sinais intracelulares complexos (SOARES et al., 2019).

Os ensaios em culturas celulares representam uma das abordagens mais viáveis para avaliar a atividade anti-inflamatória de uma substância, e muitos estudos relevantes se baseiam no entendimento do mecanismo de ativação do NF-kB. De forma resumida, esses ensaios envolvem a exposição das células à substância em análise, seguida da mensuração de marcadores relacionados à resposta inflamatória, como citocinas pró-inflamatórias (INFANTE et al., 2016; LAZARINI et al., 2020; SARDI et al., 2017).

Produtos naturais são frequentemente investigados por seu potencial terapêutico em doenças inflamatórias, sendo a inibição do NF-kB um dos principais mecanismos de ação atribuídos a essas substâncias (LAZARINI et al., 2020). O entendimento desse mecanismo e a identificação de compostos capazes de modulá-lo têm implicações significativas no desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias e na promoção da saúde.

Alencar et al. (2023), utilizaram macrófagos transgênicos RAW 264.7 transfectados para investigar a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de própolis vermelha, avaliando a redução da ativação do NF- κ B, e os níveis de TNF- α e CXCL2/MIP-2.

1.1.6. Modelo INFOGEST de digestão *in vitro*

Os estudos de digestão *in vitro* representam uma abordagem valiosa e de maior acessibilidade em comparação à estudos epidemiológicos, oferecendo uma alternativa eficaz para avaliar as transformações de compostos bioativos em alimentos. Esses modelos *in vitro* podem ser divididos em duas categorias principais: dinâmicos e estáticos. Os modelos dinâmicos buscam replicar mais fielmente a cinética da digestão, controlando a liberação de fluidos, enzimas e variações de pH ao longo de um período de tempo determinada (MINEKUS et al., 2014).

No entanto, esses modelos tendem a ser mais complexos em termos de execução e exigem recursos adicionais. Por outro lado, os métodos estáticos simplificam o processo, dividindo a simulação da digestão em etapas que representam as fases oral, gástrica e intestinal. Nessa categoria, as variáveis da digestão simulada são controladas por meio de abordagens estáticas, tornando o processo mais acessível e de execução mais simples (QUATRIN et al., 2020).

A fim de promover a reprodutibilidade nos estudos de digestão *in vitro*, a rede INFOGEST desenvolveu um protocolo que padroniza um modelo estático de simulação da digestão de alimentos. Esse protocolo considera várias condições inerentes ao processo digestivo como temperatura, variações de pH, tempo de execução, concentrações de fluidos salivares, gástricos e intestinais, enzimas e sais biliares. Além disso, o protocolo leva em consideração as características específicas de diferentes matrizes alimentares (BRODKORB et al., 2019).

O modelo INFOGEST é particularmente relevante para a avaliação da liberação de fitoquímicos, como polifenóis e carotenoides, de alimentos para a fase aquosa durante a digestão simulada. Essa abordagem é apropriada para estudos de frutas e oferece uma maneira padronizada e confiável de avaliar como os compostos de interesse são liberados e se tornam disponíveis para absorção no intestino. Um aspecto importante abordado pelo protocolo INFOGEST é o preparo adequado das frutas quando utilizadas como matriz, que requer uma etapa de maceração para atender às especificações de consistência necessárias para a simulação da digestão (BRODKORB et al., 2019).

Citando ainda matrizes de produtos naturais brasileiros, Saliba et al. (2023) utilizaram o modelo INFOGEST para avaliar o impacto da digestão simulada nos fitoquímicos presentes em própolis orgânicas do sul do Brasil, que se mostraram resistentes ao trato gastrointestinal, mantendo sua atividade biológica dentro do esperado.

1.1.7. Transporte epitelial em células Caco-2

As células Caco-2 constituem uma linhagem de células humanas, derivadas de um adenocarcinoma de cólon, que em cultura são capazes de diferenciar-se espontaneamente em monocamadas, exibindo características funcionais e morfológicas de capacidade absorptiva semelhantes aos enterócitos do intestino delgado (LEA, 2015).

No intestino, o transporte de nutrientes bioacessíveis do trato gastrointestinal ocorre por uma única camada de células epiteliais que formam uma barreira seletiva. Esse processo possui complexidade por envolver diferentes vias de transporte de compostos da região apical para a basolateral, como apresentado na Figura 5.

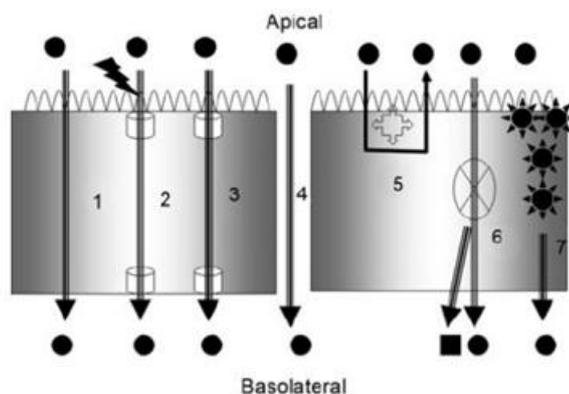


Figura 5. Esquematização de rotas e mecanismos de transporte no epitélio intestinal. (FONTE: (BALIMANE, HAN e CHONG, 2006).

A via mais comum de transporte de compostos é por absorção passiva (sem gasto energético) que ocorre pela rota transcelular (1), pelo interior dos enterócitos, ou pela rota paracelular (4), nos espaços intercelulares. A absorção por carreadores ocorre via transporte ativo (2) ou difusão facilitada (3). Na porção apical localizam-se ainda transportadores de membrana (5), enzimas (6) e receptores envolvidos no processo de endocitose (7), todos importantes para a proteção da barreira intestinal e metabolização e absorção de compostos (NATOLI et al., 2012).

O modelo de transporte epitelial de compostos utilizando células Caco-2 tem sido amplamente utilizado em estudos *in vitro*. Quando adequadamente reconstituídas, as células

Caco-2 diferenciam-se em monocamadas homogêneas e altamente polarizadas, com capacidade de absorção via microvilosidades, formação de junções oclusivas e expressão da maioria das enzimas e transportadores intestinais (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007). A representação dessa aplicação pode ser observada na Figura 6.

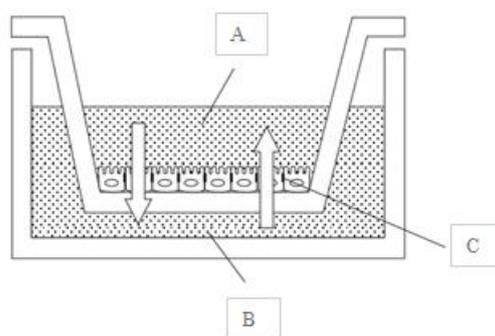


Figura 6. Representação esquemática de monocamadas de células Caco-2 em poço Transwell: (A) Compartimento apical (B) Compartimento basolateral (C) Juntas oclusivas. (FONTE. Adaptado de (SUN et al., 2008))

No experimento de transporte absorptivo, os compostos são adicionados na porção apical (A) e em seguida a fração transportada da porção basolateral (B) é coletada e analisada para avaliação da taxa de passagem.

Rotineiramente, a forma mais utilizada para verificar se as junções oclusivas estão bem definidas, indicando integridade da monocamada de células Caco-2, é por medição da resistência elétrica transepitelial (TEER). O procedimento é feito com auxílio de um voltímetro que mede a TEER através de microeletrodos posicionados nas porções apical e basolateral (NATOLI et al., 2012).

No cultivo de células Caco-2, as variáveis que mais influenciam para a boa reprodutividade da cultura são a origem da linhagem celular, qualidade do soro animal, quantidade de suplementos do meio de cultivo e o número da passagem celular. Deve-se destacar ainda a complexidade requerida no laboratório de cultivo, que demanda de profissionais capacitados para manipulação de células e um ambiente controlado em relação a contaminações externas. Uma vez estabelecido o protocolo, o uso de células Caco-2 torna-se ideal para prever o transporte de compostos bioativos em humanos (LEA, 2015).

Kobayashi et al. (2012), em estudo de avaliação dos mecanismos de absorção de compostos fenólicos em células Caco-2, observaram que os flavonoides erodictiol e hesperetina foram transportados tanto por transporte ativo como por difusão passiva.

1.1.8. Atividade antioxidante celular (AAC) em modelo de células Caco-2

Os modelos de estudos da atividade antioxidante celular (AAC) são promissores, pois permitem uma perspectiva biológica mais aprofundada sobre a ação antioxidante de compostos e representam um meio termo entre ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Os ensaios de AAC foram descritos em estudos pioneiros utilizando-se células hepáticas (KIRBY; VOUROS; KARGER, 1977). Kellet et al. (2018), consideram que atualmente os modelos que utilizam células Caco-2 em ensaios de AAC são adequados no fornecimento de informações sobre a absorção epitelial e o metabolismo de compostos com potencial antioxidante encontrados na dieta.

No método de AAC, monitora-se a inibição da oxidação causada por radicais peroxila, no interior da célula. A medição é acompanhada através do composto DCFH-DA, uma sonda fluorescente que, em sua forma de éster, adentra-se facilmente na célula Caco-2. Esse mecanismo é quimicamente representado na Figura 7.

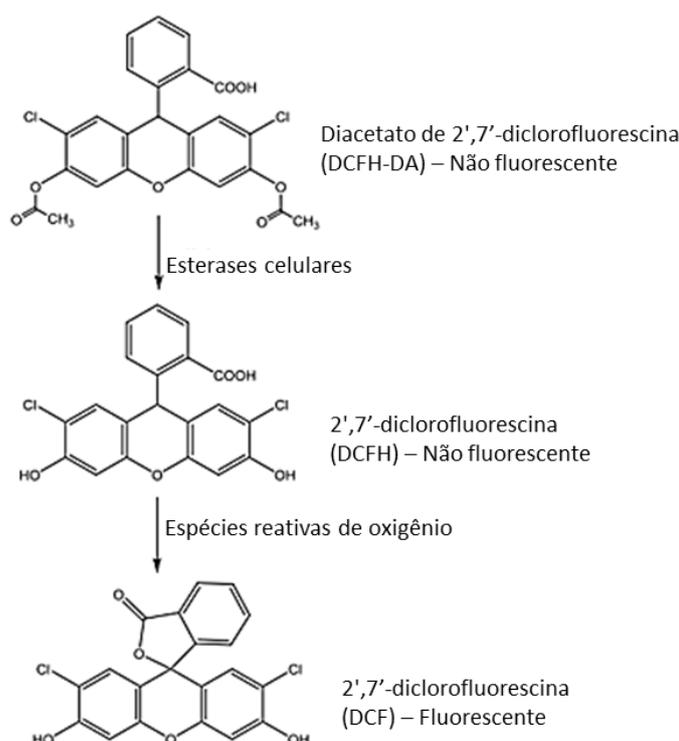


Figura 7. Reação química do Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) após interação com células Caco-2. FONTE: (Adaptado de KELLET et al., 2018)

Dentro da célula a sonda sofre desacetilação e é encontrada na forma mais oxidável (DCFH). É acrescentado então o ABAP, um gerador de radicais livres peroxila. Se a amostra testada contém compostos com capacidade antioxidante, esses compostos, uma vez dentro das células, eliminam os radicais livres formados (por diferentes vias) e protegem o DCFH de sofrer

oxidação, ou seja, impede a oxidação da sonda em DCF. No ensaio os resultados são calculados pelo valor relativo de redução de fluorescência, expressos em porcentagem.

Na literatura, a maioria dos estudos utilizam a linhagem celular hepática HepG2 na análise da AAC, portanto é necessário maior aprofundamento sobre o uso de células Caco-2 para essa finalidade, gerando assim meios de comparação de resultados, padronização de variáveis de ensaio e elucidação da ação antioxidante de compostos no interior das células (KELLETT et al., 2018; MARTINELLI et al., 2021).

1.1.9. Toxicidade *in vivo* em modelo *Gallerias mellonella*

A espécie *G. mellonella*, pertencente à família Pyralidae, é conhecida como mariposa da cera e possui um ciclo de vida que inclui ovos, larvas, pupas e adultos, sendo nativa da África e da Europa. Essas mariposas (Figura 8) têm sido identificadas como pragas, especialmente em colmeias de abelhas, onde se alimentam de mel, cera e pólen, além de representarem potenciais vetores de patógenos para as abelhas. Estudos sobre a biologia dessa larva revelaram que elas possuem um sistema imunológico estrutural e funcionalmente semelhante ao dos vertebrados (COSKUN et al., 2006; ELLIS et al., 2013).

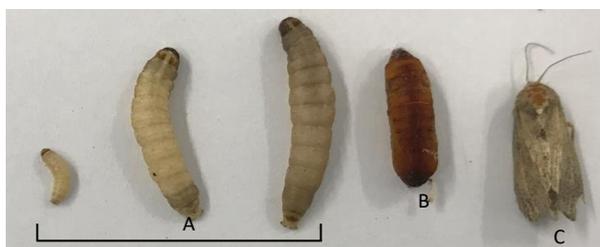


Figura 8. Aspecto visual de *Gallerias mellonellas* em fases: (A) Larvas em diferentes estágios de crescimento (B) Pupa (C) Mariposa. (FONTE: Do próprio autor)

Devido a essa semelhança, o modelo de *G. mellonella* tem sido considerado uma alternativa ética e economicamente viável em comparação com o uso de vertebrados em estudos de toxicidade *in vivo*. Em laboratório, as larvas passam por cuidados específicos para garantir seu bem-estar e minimizar o sofrimento, sendo alimentadas com cera de abelha, pólen e rações formuladas com base em cera e mel (SARDI et al., 2017).

Os testes de toxicidade com larvas de *G. mellonella* geralmente são conduzidos na fase final do estado larval, quando atingem um peso entre 180 e 350 mg e um comprimento de 250 a 300 mm. A avaliação da toxicidade é baseada na taxa de sobrevivência das larvas após a

exposição a uma substância ou amostra por um período de tempo pré-definido (SUAY-GARCÍA et al., 2019).

Esse modelo tem se mostrado eficaz na avaliação da toxicidade de várias matrizes alimentares, incluindo espécies de frutas nativas brasileiras (SARDI et al., 2017; SOARES et al., 2019). Na área de fitoquímicos naturais, Lazarini et al. (2020) utilizaram o modelo *G. mellonella* para investigar a toxicidade de extratos de frutas nativas da espécie *Eugenia neonitida* Sobral.

Em suma, os principais aspectos que tornam esse modelo uma abordagem valiosa na avaliação da segurança e toxicidade de alimentos, incluindo as frutas nativas são:

- Semelhança ao sistema imunológico humano, já que as *G. mellonella* possuem células imunológicas, como hemócitos, que são análogas aos glóbulos brancos humanos, e produzem moléculas de defesa imunológica semelhantes às citocinas;

- Relativa facilidade de manutenção em laboratório, exigindo instalações pouco complexas em comparação a outros modelos com mamíferos;

- Ética e redução no uso de animais, promovendo a redução no número de vertebrados usados em experimentação, alinhando-se aos princípios de refinamento na pesquisa científica.

Embora existam diferenças significativas entre as respostas biológicas de larvas e mamíferos, este modelo representa uma abordagem valiosa na avaliação da toxicidade de substâncias naturais (WIJESINGHE et al., 2020).

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S. M. DE et al. Dynamic gastrointestinal digestion/intestinal permeability of encapsulated and nonencapsulated Brazilian red propolis: Active compounds stability and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 411, p. 1-9 2023.
- ALÍA, M. et al. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 212, n. 2, p. 110-118, 2006.
- BIANCHINI, F. G. et al. Caracterização morfológica e química de frutos de Cambucizeiro. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 10-18, 2016.
- BLANCO, M. L.; CONDINO NETO, A. O fator nuclear Kappa B: Uma nova perspectiva para o estudo de drogas antiinflamatórias. **Rev. Ciênc. Méd.**, v. 12, n. 4, p. 341-349, 2003.
- BRODKORB, A. et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991-1014, 2019.
- CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 155-171, 2014.
- CHANG, Z. et al. A Comprehensive Review of the Structure Elucidation of Tannins from Terminalia Linn. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 1-26, 2019.
- COSKUN, M. et al. Effects of Different Honeycomb and Sucrose Levels on the Development of Greater Wax Moth *Galleria mellonella* Larvae. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 8, n. 6, p. 855-858, 2006.
- DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387-398, 2015.
- DONADO-PESTANA, C. M. et al. Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 42-49, 2018.
- ELLIS, J. D.; GRAHAM, J. R.; MORTENSEN, A. Standard methods for wax moth research. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, p. 2-17, 2013.
- FARIAS, D. DE P. et al. Effect of *in vitro* digestion on the bioaccessibility and bioactivity of phenolic compounds in fractions of *Eugenia pyriformis* fruit. **Food Research International**, v. 150, p. 2-7, 2021.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R. et al. Simple LC-MS determination of citric and malic acids in fruits and vegetables. **Chromatographia**, v. 72, n. 2, p. 55-62, 2010.
- FLAMINI, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 22, n. 4, p. 218-250, 2003.
- FREITAS, T. P. et al. Aroma and soluble solid contents of the Uvaia - a native Atlantic rainforest fruit—are negatively affected by early harvest. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 7, 2019.
- GRANATO, D. et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods. **Food Chemistry**, v. 264, p. 471-475, 2018.

- HAMINIUK, C. W. I. et al. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2862-2866, 2014.
- HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G. E.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2111-2119, 2007.
- INFANTE, J. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored Brazilian native fruits. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 2016.
- JACOMINO, A. P. et al. Uvaia - *Eugenia pyriformis* Cambess. Em: **Exotic Fruits Reference Guide**, v. 1, p. 435-438, 2018.
- JUNIOR, A. G. M. et al. Desconhecimento e indisponibilidade das frutas nativas da mata atlântica contribuem com hábitos alimentares restritos e sem diversidade. **South American Development Society Journal**, v. 6, n. 17, p. 269, 2020.
- KELLETT, M. E.; GREENSPAN, P.; PEGG, R. B. Modification of the cellular antioxidant activity (CAA) assay to study phenolic antioxidants in a Caco-2 cell line. **Food Chemistry**, v. 244, p. 359-363, 2018.
- KOPEC, R. E.; FAILLA, M. L. Recent advances in the bioaccessibility and bioavailability of carotenoids and effects of other dietary lipophiles. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, p. 16-30, 2018.
- LAURINDO, L. F. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) in Health and Disease: A Critical Review. **Nutrients**, v. 15, n. 4, p. 1-59, 2023.
- LAZARINI, J. G. et al. Anti-inflammatory and antioxidant potential, in vivo toxicity, and polyphenolic composition of *Eugenia selloi* B.D.Jacks. (pitangatuba), a Brazilian native fruit. **PLoS ONE**, v. 15, n. 6, p. 1-16, 2020.
- LEA, T. The Impact of Food Bioactives on Health: *In Vitro* and Ex Vivo Models. **Springer International Publishing**, v.1, p. 103-111, 2015.
- LI, Z. H. et al. Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 5, p. 805-810, 2016.
- LOPES, J. M. M. et al. A preliminary exploration of the potential of *Eugenia uvalha* Cambess juice intake to counter oxidative stress. **Food Research International**, v. 105, p. 563-569, 2018.
- MARTINELLI, E. et al. Current perspectives in cell-based approaches towards the definition of the antioxidant activity in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 116, p. 232-243, 2021.
- MELO, P. S. et al. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p. 160-169, 2015.
- MERCADANTE, A. Z. et al. Carotenoid esters in foods - A review and practical directions on analysis and occurrence. **Food Research International**, v. 99, p. 830-850, 2017.
- MINEKUS, M. et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

- MOREIRA, R. O. et al. Genetic diversity of Cambuci [*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum] revealed by microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 69, n. 4, p. 1557-1570, 2022.
- NATOLI, M. et al. Good Caco-2 Cell Culture Practices. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 8, p. 1243-1246, 2012.
- NEVES, N. DE A. et al. Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of jaboticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, v. 252, p. 61-71, 2018.
- OLENNIKOV, D. N.; VASILIEVA, A. G.; CHIRIKOVA, N. K. Fragaria viridis fruit metabolites: Variation of LC-MS profile and antioxidant potential during ripening and storage. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 9, p. 1-25, 2020.
- PARKER, R. S. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. **FASEB Journal**, v. 10, p. 542-551, 1996.
- PEIXOTO, F. M. et al. Bioaccessibilidade *in vitro* de carotenóides em oito cultivares de batata doce (*Ipomoea batatas* Lam). **Higienistas de alimentos**, v. 27, p. 272-276, 2013.
- QUATRIN, A. et al. Bioaccessibility and catabolism of phenolic compounds from jaboticaba (*Myrciaria trunciflora*) fruit peel during *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 1-14, 2020.
- RAMIREZ, M. R. et al. Evaluation of the polyphenolic content, anti-inflammatory and antioxidant activities of total extract from eugenia pyriformes cambess (Uvaia) fruits. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 405-412, 2012.
- RASERA, G. B.; DE CAMARGO, A. C.; DE CASTRO, R. J. S. Bioaccessibility of phenolic compounds using the standardized INFOGEST protocol: A narrative review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 22, n. 1, p. 260-286, 2023.
- RATHEE, P. et al. Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review. **Inflammation & Allergy-Drug Targets**, v. 8, p. 229-235, 2009.
- RODRIGUES, L. M. et al. Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) residue as a source of antioxidants: An approach to ecofriendly extraction. **LWT**, v. 138, n. 138, p. 3-8, 2021.
- SALIBA, A. S. M. C. et al. Simulated gastrointestinal digestion/Caco-2 cell transport: Effects on biological activities and toxicity of a Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 403, n. 403, p. 2-9, 2023.
- SANCHES AZEVEDO, M.C.; SILVA, R.R.E.; JACOMINO, A.P.; GENOVESE, M.I. Physicochemical variability of Cambuci fruit (*Campomanesia phaea*) from the same orchard, from different locations and at different ripening stages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.97, n.2, p.526-535, 2017.
- SARDI, J. DE C. O. et al. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 280-287, 2017.
- SGANZERLA, W. G.; SILVA, A. P. G. Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess – Myrtaceae): An overview from the origin to recent developments in the food industry – A bibliometric analysis. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 10, p. 1-10, 2022.

- SILVA, A. P. G. et al. Ripe ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* miller) fruits express high contents of bioactive compounds and antioxidant capacity. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 3, p. 1-6, 2018.
- SILVA, A. P. G. et al. Chemical composition, nutritional value and bioactive compounds in six Uvaia accessions. **Food Chemistry**, v. 294, p. 547-556, 2019.
- SILVA, I.G. et al. Estudo de caracterização do fruto Cambuci (*Campomanesia phaea* (O.Berg.) Landrum) e sua aplicação no processamento de geléia. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.30, n.1, p.83-90, 2012.
- SILVA, N. A. DA et al. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5072-5084, 2014.
- SOARES, J. C. et al. Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and anti-inflammatory activity. **Food Chemistry**, v. 281, p. 178-188, 2019.
- SPINOLA, V. A. R. **Nutraceuticals and Functional Foods for Diabetes and Obesity Control**. Madeira: Madeira Chemistry Center, v.72, p. 9722-9735, 2018.
- SPRICIGO, P. C. et al. Classical food quality attributes and the metabolic profile of Cambuci, a native brazilian atlantic rainforest fruit. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 1-17, 2021.
- SUAY-GARCÍA, B. et al. New solvent options for in vivo assays in the *Galleria mellonella* larvae model. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 776-782, 2019.
- SUN, H. et al. The Caco-2 cell monolayer: Usefulness and limitations. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 4, n. 4, p. 395-411, 2008.
- TAVER, I. B. et al. Bioactive Compounds and *In Vitro* Antioxidant Capacity of Cambuci and Uvaia: An Extensive Description of Little-Known Fruits from the Myrtaceae Family with High Consumption Potential. **Foods**, v. 11, n. 17, p. 1-13, 2022.
- TOKAIRIN, T. DE O.; NETO, H. B.; JACOMINO, A. P. Cambuci - *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum. **Exotic Fruits Reference Guide**. v. 1, n.1, p. 91-95, 2018.
- TREMOCOLDI, M. A. et al. Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1-12, 2018.
- VALLILO, M.I.; GARBELOTTI, M.L.; OLIVEIRA, E.D.; LAMARDO, L.C.A. Características físicas e químicas dos frutos do Cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.2, p. 241-244, 2005.
- WAN, H. et al. A Caco-2 cell-based quantitative antioxidant activity assay for antioxidants. **Food Chemistry**, v. 175, p. 601-608, 2015.
- WIJESINGHE, G. K. et al. Effect of cinnamomum verum leaf essential oil on virulence factors of candida species and determination of the in-vivo toxicity with galleria mellonella model. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, n. 8, p. 1-13, 2020.
- ZILLO, R. R. et al. Parâmetros físico-químicos e sensoriais de polpa de Uvaia (*Eugenia Pyriformis*) submetidas à pasteurização. **Bioenergia em revista**, v. 2, n. 4, p. 20-33, 2014.

2. CAPÍTULO 1 - MUDANÇAS DO PERFIL FENÓLICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Campomanesia phaea* E *Eugenia pyriformis* APÓS A DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA E TRANSPORTE EM CÉLULAS CACO-2

Resumo

Os compostos fenólicos presentes em dietas ricas em frutas e vegetais têm despertado interesse devido aos seus efeitos benéficos para a saúde, incluindo a redução do risco de doenças como câncer, esclerose e outras condições relacionadas ao envelhecimento. Os mecanismos subjacentes a esses efeitos na saúde abrangem a proteção contra os danos causados pelos radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO), bem como a mitigação da inflamação. No entanto, há uma lacuna nos estudos quando se trata da identificação de compostos bioativos e da avaliação das atividades antioxidantes e anti-inflamatórias de frutas nativas após ingeridas, e a compreensão desses efeitos é fundamental para validar os benefícios obtidos após sua ingestão. Neste capítulo são apresentados resultados sobre o potencial bioativo, que envolve atividades antioxidantes e anti-inflamatória e toxicidade *in vivo* do Cambuci (*Campomanesia phaea*) e da Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess), antes e após submetidas a digestão *in vitro* acoplada ao modelo de absorção intestinal utilizando células Caco-2. As propriedades biológicas avaliadas foram a atividade antioxidante celular em células Caco-2, atividade anti-inflamatória por ensaio de ativação do fator de transcrição NF-kappa B (NF-κB) seguida pela quantificação da citocina TNF-α e a quimiocina CXCL2/MIP-2, capacidade desativadora de ERO e toxicidade *in vivo* em modelo *Galleria mellonella*. Os resultados mostraram que, de forma geral, o Cambuci e a Uvaia são duas frutas nativas que possuem grande potencial bioativo ainda após digeridas, apresentando atividade antioxidante intracelular, em que o Cambuci mostrou fluorescência reduzida em 50% na concentração de 17,91±0,3 mg/mL, demonstrando maior AAC do que a Uvaia, a qual apresentou concentração de 20,3±0,56 mg/mL para essa mesma porcentagem de redução. Para a atividade anti-inflamatória, as frações digeridas e basolaterais das duas frutas na concentração acima de 200 µg/mL exerceram efeito na redução da via de inflamação NF-κB, da citocina TNF-α e quimiocina CXCL2/MIP-2. Em relação à capacidade para desativar ERO, o Cambuci e a Uvaia apresentaram atividade antioxidante antes e após digestão *in vitro* e passagem pela barreira de células Caco-2, porém apresentando comportamento distinto para cada espécie em questão.

Palavras-chave: Frutas nativas; Compostos fenólicos; Atividade antioxidante; Atividade anti-inflamatória; *Campomanesia phaea* ; *Eugenia pyriformis* Cambess

CHANGES IN THE PHENOLIC PROFILE, ANTIOXIDANTS AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF *Campomanesia phaea* AND *Eugenia pyriformis* AFTER SIMULATED GASTROINTESTINAL DIGESTION AND TRANSPORT IN CACO-2 CELLS

Abstract

The phenolic compounds present in diets rich in fruits and vegetables have attracted interest due to their beneficial effects on health, including reducing the risk of diseases such as cancer, sclerosis, and other age-related conditions. The underlying mechanisms for these health effects include protection against damage caused by free radicals and other reactive oxygen species (ROS), as well as the mitigation of inflammation. However, there is a gap in studies when it comes to the identification of bioactive compounds and the assessment of antioxidant and anti-inflammatory activities of native fruits after ingestion, and understanding these effects is crucial to validate the benefits obtained after consumption. In this chapter, results are presented on the bioactive potential (including antioxidant and anti-inflammatory activities and *in vivo* toxicity) of Cambuci (*Campomanesia phaea*) and Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess), before and after undergoing *in vitro* digestion coupled with an intestinal absorption model using Caco-2 cells. The biological properties evaluated included intracellular antioxidant activity in Caco-2 cells, anti-inflammatory activity through NF-kappa B (NF-κB) transcription factor activation assay followed by quantification of TNF-α cytokine and CXCL2/MIP-2 chemokine, ROS scavenging capacity, and *in vivo* toxicity in the *Galleria mellonella* model. The results showed that, overall, Cambuci and Uvaia are two native fruits that have significant bioactive potential even after ingestion, exhibiting intracellular antioxidant activity. Cambuci showed a 50% reduced fluorescence at a concentration of 17.91 ± 0.3 mg/mL, demonstrating a higher AOC than Uvaia, which had a concentration of 20.3 ± 0.56 mg/mL for the same percentage of reduction. For anti-inflammatory activity, the digested and basolateral fractions of both fruits at concentrations above 200 μg/mL had an effect on reducing the NF-κB inflammation pathway, TNF-α cytokine, and CXCL2/MIP-2 chemokine. Regarding the ability to scavenge ROS, Cambuci and Uvaia exhibited antioxidant activity before and after *in vitro* digestion and passage through the Caco-2 cell barrier, but with distinct behavior for each species.

Keywords: Native fruits; Phenolic compound; Antioxidant activity; anti-inflammatory activity; *Campomanesia phaea*; *Eugenia pyriformis* Cambess

2.1. Introdução

A atividade biológica dos compostos fenólicos que compõem as frutas está dentre os motivos pelos quais o consumo de frutas está associado à benefícios para a saúde. Quimicamente, os compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos, cumarinas e flavonoides, são caracterizados por apresentarem anéis aromáticos (C6) ligados a um ou mais grupos hidroxila (-OH). No contexto vegetal, esses compostos podem ser encontrados na forma livre ou complexados com proteínas e açúcares, desempenhando um papel fundamental no metabolismo secundário das plantas, influenciando processos como pigmentação, crescimento, reprodução e defesa contra patógenos (INFANTE et al., 2016; MELO et al., 2015).

No organismo humano, os compostos fenólicos exercem ação antioxidante, atuando na proteção das células contra os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO). A ocorrência normal de ERO está intrinsecamente ligada ao metabolismo aeróbio, mas um desequilíbrio no sistema antioxidante pode resultar em danos oxidativos a componentes celulares, como proteínas e lipídeos. Esse processo está associado a disfunções celulares e metabólicas que desempenham um papel importante no desenvolvimento de doenças crônicas, como Alzheimer, diabetes tipo 2, doença de Parkinson, obesidade, entre outras (BASTOS et al., (2009).

No entanto, a relação entre o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos, como várias frutas, e a redução do risco de doenças requer uma investigação mais aprofundada, especialmente para cada tipo de matriz alimentar. Durante o processo de digestão, apenas uma fração dos compostos fenólicos presentes no alimento é liberada e solubilizada, e somente uma parte desses compostos é absorvida pelo intestino e disponibilizada para o organismo (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2020). Portanto, são necessários mais dados sobre a absorção desses compostos bioativos e seus efeitos biológicos após a digestão. Nesse contexto, os modelos *in vitro* apresentam uma vantagem significativa de custo em comparação aos estudos *in vivo*.

Os estudos de digestão *in vitro* oferecem uma alternativa viável para investigar as mudanças estruturais, a digestibilidade, a liberação e a absorção de componentes alimentares sob condições simuladas do trato gastrointestinal. A simulação da digestão gastrointestinal é baseada nos parâmetros fisiológicos humanos, como pH, concentração de sais, enzimas e temperatura, e tem sido amplamente aplicada em diversas áreas das ciências alimentares e nutricionais (BRODKORB et al., 2019; MINEKUS et al., 2014).

Para avaliar a absorção intestinal de compostos alimentares, o modelo de células Caco-2 tem sido amplamente utilizado recentemente. Essas células provenientes de carcinoma humano possuem a capacidade de se diferenciar em uma monocamada com características morfológicas e funcionais semelhantes às células enterócitos saudáveis que compõem a barreira intestinal (WAN et al., 2015; VILLALVA et al., 2018).

Nesse contexto, destacam-se duas frutas nativas pouco conhecidas, porém de notável potencial biológico: a Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) e o Cambuci (*Campomanesia phaea*). Ambas pertencentes à família Myrtaceae, são originárias da Mata Atlântica e sensorialmente se destacam por suas características aromáticas distintas.

O objetivo geral deste trabalho foi explorar o potencial bioativo do Cambuci (*C. phaea*) e da Uvaia (*E. pyriformis* Cambess), por meio da avaliação da composição fenólica, atividades antioxidante celular (AAC) e anti-inflamatória, capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a toxicidade *in vivo*, antes e após simulação da digestão gastrointestinal (fração digerida) e do transporte epitelial em monocamadas de células Caco-2 (fração basolateral).

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Coleta das amostras

O Cambuci (*C. phaea*) foi coletado em uma plantação comercial de plantas não clonadas, localizada no município de Natividade da Serra/SP (23°31'53" S e 45°27'45" O - Altitude: 624m) e a Uvaia (*E. pyriformis* Cambess) em uma propriedade privada em Cabo Verde/MG (21°28'10" S e 46°22'54" O - Altitude: 836m). As frutas coletadas manualmente de diferentes árvores em estágio de maturação avaliados por inspeção visual prontas para consumo e selecionadas considerando ausência de lesões e uniformidade de tamanho e cor (Cambuci: massa entre 40-50g, casca e polpa verdes; Uvaia: massa entre 15-25g, casca e polpa alaranjadas) (Figura 9). Foi utilizado ¼ de cada fruta (sem semente) com a finalidade de se produzir amostras representativas de aproximadamente 450g de fruta *in natura*, que foram utilizadas para o ensaio da digestão *in vitro* e nas análises subsequentes.

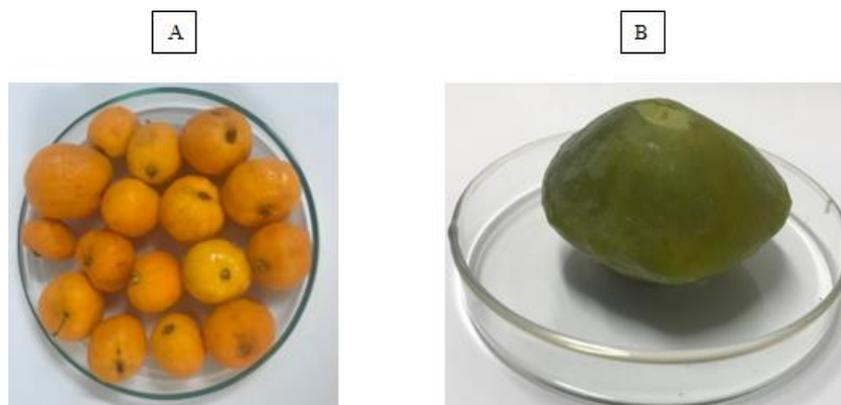


Figura 9. Aspecto visual das frutas nativas (A) Cambuci (*C. phaea*) (B) Uvaia (*E. pyriformis* Cambess).
(FONTE: Do próprio autor)

2.2.2. Digestão gastrointestinal *in vitro*

O experimento de simulação de digestão foi conduzido seguindo o modelo estático padronizado pela COST INFOGEST 2.0. Uma amostra de 5g de fruta *in natura* (polpa e casca), previamente macerada e homogeneizada, foi incubada em condições que simulam as etapas da digestão humana (oral, gástrica e intestinal). Na primeira etapa, foram adicionadas à amostra a solução salivar (pH ajustado para 7,0) e α -amilase (75 U/mL; A1031; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), incubados a 37°C sob agitação, por 2 minutos. Na etapa gástrica, foi adicionada a solução gástrica (pH ajustado para 3,0) e pepsina (2000 U/mL; P7000; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), incubados a 37°C sob agitação, por 2 horas. A digestão intestinal foi simulada pela adição da solução intestinal (pH ajustado para 7,0), pancreatina (100 U/mL; P7545; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) e sais biliares (10 mM; B8756; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), incubados a 37°C sob agitação, por 2 horas (BRODKORB et al., 2019).

Ao final, o material foi submetido a centrifugação e o sobrenadante resultante foi denominado de fração digerida (FDCA: fração digerida de Cambuci; e FDUV: fração digerida de Uvaia). Essas frações foram liofilizadas, ressuspensas em água destilada na concentração de 10 mg/mL e filtradas em filtros de celulose regenerada de 0,22 μ m para as análises químicas e biológicas.

2.2.3. Transporte em células Caco-2

2.2.3.1 Cultivo celular

As células Caco-2 utilizadas neste estudo foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC® HTB-37™). O cultivo das células deu-se em garrafas T75 de acordo com o protocolo de Hubatsch et al. (2007), em meio Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium (DMEM) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) a 37°C, numa atmosfera umidificada de 10% de CO₂ no ar.

2.2.3.2 Ensaio MTT para Viabilidade celular

Células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 104 células/poço. Após 24 h de incubação a 37°C o meio foi substituído por DMEM sem FBS, e as células tratadas com as frações digeridas (FDCA e FDUV) de Cambuci e de Uvaia, em diferentes concentrações. Solução Balanceada de Hank's (HBSS) foi usada como controle. No final do período de tratamento de 4 h, foi adicionado 20 µL (5 mg/mL) de Brometo de 3,4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Após 3 horas de incubação o meio contendo MTT foi removido completamente e o corante formazan foi solubilizado por Dimetilsulfóxido (DMSO) (100 µL/poço). A absorbância foi medida a 570 nM e os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis, em que 100% de viabilidade correspondem ao grupo de controle tratados apenas com HBSS (NATOLI et al., 2012).

2.2.3.3 Ensaio de transporte em Transwell®

Os experimentos de transporte em monocamadas de células Caco-2 foram conduzidos segundo Hubatsch et al. (2007). As células foram dissociadas das garrafas T75 e cultivadas nos suportes Transwell® de 6 *inserts* (Corning Life Sciences, Acton, USA, poro de 0,4 µm, 24 mm diâmetros), na concentração de 3x10⁵ células por insert. As células permaneceram incubadas a 37 °C atmosfera umidificada de 10% de CO₂ pelo período de 21 dias, tempo necessário para sua diferenciação em enterócitos absorptivos.

No momento do experimento, os *inserts* foram cuidadosamente lavados com Solução Balanceada de Hank's (HBSS) suplementada com 25 mM de HEPES (tampão de permeabilidade) e a resistência elétrica transepitelial (RET) foi avaliada. Foram utilizadas membranas com resistência medida acima de 165 mΩ/cm². Uma alíquota de 75 µL de frações digeridas das frutas, na concentração de 125 mg fruta/mL, foram incorporados ao

compartimento apical (concentração pré-determinada por ensaio de MTT). As placas foram mantidas por 4 horas em estufa a 37°C, e ao final desse tempo a integridade da monocamada de células Caco-2 foi reavaliada (VILLALVA et al., 2018).

As frações basolaterais foram coletadas, liofilizadas e armazenadas a -80°C até o momento das análises, as quais foram denominadas de fração basolateral de Cambuci FBCA e fração basolateral de Uvaia (FBUV). Essas frações ressuspensas em água destilada na concentração de 10 mg/mL e filtradas em filtros de celulose regenerada de 0,22 µm para as análises químicas e biológicas.

2.2.4. Composição química da fração fenólica

2.2.4.1. Preparo dos extratos a partir das frutas

Para as análises químicas das frutas nativas, apresentadas a seguir, foram feitas extrações etanólicas a partir do Cambuci e da Uvaia *in natura* (polpa e casca), para obtenção de extratos (ECA e EUV). Os resultados foram expressos em massa de fruta *in natura*, a título de comparação com as frações digeridas e transportadas. A extração seguiu em regime fechado, com a adição de 10 mL de etanol 80% (v/v) a 1 g de amostra de fruta, previamente liofilizada e moída, e agitado por 5 minutos em tubos de Falcon. A extração foi conduzida em ultrassom (180W) por 30 minutos, seguida por centrifugação e filtração. O sobrenadante foi armazenado a -80°C até o momento de uso nas análises. Para as análises cromatográficas, foi feita ainda extração em fase sólida (SPE) em Cartuchos de SPE LC-18 (2 g, Supelco, Bellefonte, PA, EUA), para remoção de açúcar e outros interferentes (BLOOR, 2001).

2.2.4.2. Análise da composição fenólica por LC-ESI-IT-MS/MS

Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu Co., Tokyo) com detector UV-Vis SPD-20A e espectrômetro de massa Amazon Speed ETD (Bruker Daltonics Corporation, Billerica, MA, EUA) com fonte de ionização por eletrospray (ESI) em modo negativo. Nebulizador: 27psi, *Dry gas*: 7L/min. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Phenomenex Luna C18 (4.6 x 250 mm x 5 µm). A fase móvel foi constituída por uma mistura de dois solventes: (A) solução de água e ácido fórmico 0,25% e (B) acetonitrila 80%, ácido fórmico 0,25% e água 19,75%. Vazão da fase móvel de 1,0 mL min⁻¹: gradiente iniciou em 10% do solvente B, passando a 20% de B em 10 minutos, 30% de B aos 20 minutos, 50% de B aos 30 minutos, 50% de B aos 32 min, 90% de B aos 38 min, retomando novamente a 10% de

B aos 45 minutos e finalizando a corrida aos 55 minutos. A análise dos dados foi realizada utilizando o software MAXIS 3G – Bruker Daltonics 4.3. E a identificação dos compostos foi feita por comparação do espectro de massas MS/MS e fórmulas moleculares disponíveis na literatura (SOARES et al., 2019).

2.2.4.3. Teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais das frutas e suas frações digeridas e basolaterais foi estimado de acordo com o método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu, descrito por Singleton et al. (1999). A absorvância foi determinada a 740 nm em espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (GAE)/ 100 g de fruta *in natura*.

2.2.5. Análise da capacidade desativadora de espécies reativas de oxigênio (ERO)

2.2.5.1. Sequestro do radical peroxila (ROO.)

A capacidade de sequestro do radical peroxila foi determinada monitorando-se o efeito das amostras no decaimento da fluorescência, provocado pela oxidação da fluoresceína induzida pelo radical peroxila (ORAC). O radical é formado pela decomposição do dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH). O meio reacional é composto por fluoresceína (152,4 nM), EBP, e AAPH (41,8mM) e amostra. A cinética de decaimento da fluorescência foi monitorada a cada 10 minutos durante 2 horas, em comprimentos de emissão e excitação de 528 ± 20 nm e 485 ± 20 nm, respectivamente. O Trolox foi o padrão utilizado e os resultados expressos como valor ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mg amostra}$) (MELO et al., 2015).

2.2.5.2. Sequestro do ácido hipocloroso (HOCl)

A capacidade de sequestro do ácido hipocloroso (HOCl) foi determinada pelo monitoramento do efeito do extrato sobre a oxidação do DHR (dihidrorodamina 123) para rodamina 123, induzida pelo ácido hipocloroso, como o descrito por Melo et al. (2015), com modificações. O ácido hipocloroso foi obtido a partir de uma solução 1% (m/v) de NaOCl com pH ajustado a 6,2 utilizando solução 10% de H_2SO_4 . A concentração do HOCl foi determinada em espectrofotômetro, a 235 nm, utilizando o coeficiente de absorção molar de $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A atividade sequestrante do HOCl foi determinada com o monitoramento da oxidação do DHR 123 (dihidrorodamina) a rodamina 123, em reação conduzida a 37°C . As leituras da

fluorescência foram determinadas em leitor de microplacas em emissão e excitação a 528 e 485 nm, respectivamente, com resultados expressos em IC₅₀ (µg/mL) (MELO et al., 2015).

2.2.5.3. Sequestro do radical superóxido (O₂^{•-})

Esta análise tem reação iniciada pelo sistema NADH/PMS (metassulfato de fenazina), em que a capacidade de sequestro do O₂^{•-} é determinada pelo monitoramento do efeito da amostra sobre a redução do NBT (tetrazólio nitroazul) para diformazana, formado pelo radical superóxido. A leitura foi feita por absorvância em 560 nm, por 5 minutos e os resultados foram expressos em IC₅₀ (µg/mL) (MELO et al., 2015).

2.2.5.4. Sequestro do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A análise do sequestro do peróxido de hidrogênio foi determinada de acordo com o método descrito por Chisté et al. (2011), com modificações. A atividade sequestrante do H₂O₂ foi determinada pelo monitoramento da oxidação da lucigenina em reação conduzida a 25°C. As leituras de quimiluminescência foram determinadas em leitor de microplacas após 5 minutos de incubação. Os resultados foram expressos em IC₅₀ (mg ou µg/mL).

2.2.6. Atividade antioxidante celular

Para este ensaio as células Caco-2 foram cultivadas como descritas no item 2.2.3.1. A atividade antioxidante celular foi avaliada segundo a metodologia descrita por Kellet et al. (2018), com modificações. Após dissociadas, as células foram semeadas em placa preta de 96 poços Corning Costar®, na concentração de 60x10⁴ células por poço e incubadas por 24 horas a 37°C, em atmosfera umidificada de 10% de CO₂.

No momento do experimento, as células foram lavadas com 100 µL de solução tampão fosfato-salino (PBS). Acrescentou-se então 50 µL da amostra (solução padrão de quercetina nas concentrações de 12,5 - 400 µM; FDCA e FDUV nas concentrações de 10 - 31,5 mg/mL) seguido de 50 µL da solução de DCFH-DA a 25µM. A placa foi incubada por 20 minutos a 37°C, em atmosfera umidificada de 10% de CO₂. Após esse tempo, foram feitas 3 lavagens nas células com 100 µL de solução tampão PBS e em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de AAPH 600 µM. A placa foi incubada em leitora de microplacas com detector de fluorescência programada à temperatura de 37°C, e foram realizadas leituras a cada 5 minutos, durante 90 minutos. A fluorescência foi medida a 485 nm de excitação e 538 nm de emissão.

A capacidade antioxidante celular das amostras foi determinada com base no percentual de diminuição da fluorescência e os resultados expressos em % de redução, ou, unidade AAC, obtida pela fórmula: Unidade AAC = $(1 - \text{área abaixo da curva da amostra} / \text{área abaixo da curva do controle}) * 100$.

2.2.7. Atividade anti-inflamatória

Macrófagos RAW 264.7 (BCRJ código 0212; Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivados utilizando meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), 1% (v/v) penicilina/estreptomicina e 0,12% (v/v) de anfotericina-B. As condições de cultura foram controladas à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ no ar. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas, e ao atingir a fase exponencial de crescimento com confluência de 60-80%, as garrafas foram raspadas e ressuspensas em novas garrafas.

A atividade anti-inflamatória foi avaliada pela ativação do fator de transcrição NF-kappa B (NF-κB) seguida pela quantificação da citonina TNF-α e a quimiocina CXCL2/MIP-2. No experimento de ativação de NF-kappa B (NF-κB), macrófagos RAW 264.7 transfectados com gene NF-κB foram semeados (3×10^5 cel/poço) em placas de 24 poços e incubadas overnight (37 °C, 5% CO₂). As células receberam amostras dos extratos das frutas e das frações digeridas e basolaterais, em concentrações pré-determinadas por MTT, antes da estimulação com LPS (lipoproteínas) (100 ng mL⁻¹) por 4 h. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado, e as células lisadas com tampão de lise (TNT) e alíquotas da suspensão (10 µL) foram adicionadas a 25 µL do reagente para o ensaio da luciferase (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A quantificação da luminescência foi realizada usando leitora de microplaca para luminescência (SpectraMax M3, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) (COOPER et al., 2010). Com o sobrenadante coletado foram quantificadas a citocina TNF-α e a quimiocina CXCL2/MIP-2 através do protocolo de ELISA da *R&D System*. Os resultados obtidos foram expressos em µg/mL.

2.2.8. Toxicidade *in vivo* em modelo *G. mellonella*

O modelo de avaliação da toxicidade sistêmica com as larvas de *G. mellonella* descrito por Megaw et al. (2015), com modificações, foi utilizado para determinar o LC₅₀ das amostras. Em resumo, as larvas de *G. mellonella* foram mantidas a 28 °C em incubadora BOD até o uso. Para o experimento, um grupo de larvas (n=30) foram selecionadas pela ausência de

melanização e peso unitário entre 0,2-0,3 g e separadas em placas de Petri (10 larvas/placa). O volume de 10 µL de amostra (ECA e EUV nas concentrações de 5 - 136 g/Kg; FDCA e FDUV brutas) foi injetado na hemocele de cada larva através do último proleg esquerdo, utilizando seringa Hamilton (Hamilton, Reno, NV) de 1 mL. Um grupo controle (n=10) foi feito com solução tampão com mono e bifosfato de sódio (pH = 7,4). Após o procedimento descrito, todos os grupos foram reincubados a 28°C e o monitoramento da viabilidade das larvas ocorreu por 72h, em intervalos de 24h, considerando não sobreviventes larvas sem movimento corporal e de pigmentação marrom escura (SARDI et al., 2017).

2.2.9. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente pela ANOVA. Os experimentos de atividades anti-inflamatória e antioxidante foram complementados pelo teste de Tukey, com nível de significância $p \leq 0,05$. As curvas de sobrevivência de toxicidade em *Gallerias mellonellas* foram determinadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) e obtidas pelo software GraphPad Prism 6.0.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Análise da composição fenólica por LC-ESI-IT-MS/MS

2.3.1.1 Identificação tentativa dos compostos fenólicos da Uvaia e Cambuci

A técnica cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI-IT-MS/MS) permitiu a separação e a identificação tentativa de 7 compostos fenólicos no extrato de Cambuci (ECA), incluindo taninos, flavonoides e ácidos fenólicos.

Tabela 1. Compostos fenólicos identificados no extrato de Cambuci (ECA) analisados por LC-ESI-IT-MS/MS.

#	Composto	[M-H]- m/z	Fragmentos MS ² m/z	RT (min)
1	Kaempferol 7-O-hexuronide	461,12	461,12; 314, 431, 285, 152	22,3
2	Caffeic acid-hexose-deoxyhexose	488,23	488,23; 325, 375, 343, 339,0	17,0
3	Procyanidin dimer B	577,50	577,50; 407,0	1,4
4	Quercetin-galoi-rhamnoside	599,20	599,20; 300,89; 301,0; 241, 207	26,2
5	1,2,6-Tri-O-galloyl-β-D-glucose	635,14	635,14; 617,0; 466,01; 315	11,5
6	3,7-O-diferuloyl-4-O-caffeoyl quinic acid	705,68	705,68; 571,0; 375, 312	40,8
7	Tri-caffeoylquinic acid	711,56	711,56; 503, 533	30,0

Fonte. Do próprio autor

O composto 1 foi identificado como Kaempferol 7-*O*-hexuronida (m/z 461,12), um flavonoide derivado de kaempferol presente em frutos e anteriormente identificado em uvas verdes (ŠUKOVIĆ et al., 2020). Derivados de Kaempferol já foram identificados em Cambuci (DONADO-PESTANA et al., 2015). Outro composto da classe dos flavonoides foi o de número 4, identificado como Quercetina-galoil-ramnosídeo (m/z 599,20), com fragmentação característica de quercetina (m/z 301,0).

Observa-se a presença de derivados de ácidos fenólicos, como o composto 2, que foi identificado como ácido cafeico-hexose-desoxihexose (m/z 488,23), observado anteriormente em frutos da família Myrtaceae (SANTOS et al., 2018). Da mesma classe, estão o composto 6, Ácido 3,7-*O*-diferuloil-4-*O*-cafeoil quínico (m/z 705,68), caracterizado pela perda de arila (571,0), e o composto 7, identificado como Ácido tri-cafeoilquínico (m/z 711,56) (SAID et al., 2017).

Da classe dos taninos hidrolisáveis, o composto 5 foi identificado como 1,2,6-Tri-*O*-galloyl- β -D-glucose (m/z 635,14). O composto 3 também está dentre os taninos, identificado como um dímero de Procianidina B, com fragmentação característica de isômeros de procianidina do tipo B, de ocorrência na natureza (CHANG et al., 2019).

Donado-Pestana et al. (2015) identificaram ácido elágico e derivados de quercetina em frutos de *C. phaea* O. Berg, e sugeriram que esses compostos exerceram atividade anti-inflamatória em tecidos adiposos de camundongos.

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos da análise do extrato de Uvaia (EUV).

Tabela 2. Compostos fenólicos identificados no extrato de Uvaia (EUV) e analisados por LC-ESI-IT-MS/MS.

#	Composto	[M-H] m/z	Fragmentos MS ² m/z	RT (min)
1	Ellagic acid	300,94	300,94; 255,30	2,1
2	Tri- <i>O</i> -methylellagic acid	343,42	343,42; 258,74 135,8	10,1
3	Quercetin-3- <i>O</i> -pentoside	436,51	436,51; 301, 394,61	
4	Caffeic acid derivative	491,90	491,90; 248,61; 358,00	47,3
5	Coumaric acid derivative	508,10	508,10; 426,21; 376,80	21,9
6	4'- <i>O</i> -Methylellagic acid 3-(2 ,3-di- <i>O</i> -acetyl)- α -L-rhamnoside	545,21	545,21; 315,0, 345, 417, 403	24,4
7	Quercetin-galoil-rhamnoside	599,19	599,19; 300,93; 301,7; 299,82	25,2

Fonte. Do próprio autor

O composto 1 foi identificado como ácido elágico (m/z 300,94). Esse composto possui grande número de grupos hidroxila e pertence à classe dos elagitaninos. Os compostos 2, 4, 5 e 6 foram identificados como derivados de ácidos fenólicos. O composto 2, ácido tri-*O*-metilelágico (m/z 343,42), um derivado de ácido elágico. O ácido elágico é importante por sua atividade antioxidante de eliminação de radicais livres. O composto 4 é um provável derivado de ácido cafeico, identificado com auxílio da literatura. O composto 5 foi tentativamente

identificado como derivado de ácido cumárico, devido a fragmentação que sugere perdas desse ácido (SPINOLA, 2018). O composto 6 foi identificado como Ácido 4'-O-metilelágico 3-(2,3-di-O-acetil)- α -L-ramnosídeo (m/z 545) com auxílio da observação da fragmentação em íon metil-elágico (m/z 315,0).

Na classe dos flavonoides, os compostos 3 e 7 são derivados de quercetina, sendo identificados como quercetina-3-*O*-pentosídeo (m/z 436,51), quercetina-galoil-ramnosídeo (m/z 599,19) e com íon produto m/z 301, formado por possível clivagem heterolítica da ligação O-glicosídica (ABDEL-HAMEED et al., 2013). Avula et al. (2021) demonstram que glicosídeos de quercetina também suprimiram a produção de ROS e IL-6 em células RAW264.7.

Rodrigues et al. (2021), identificaram ácidos fenólicos e flavonoides na Uvaia, dentre eles ácidos ascórbico, gálico e clorogênico, rutina, quercetina e miricetina. Silva et al. (2014) identificaram fenólicos glicosilados em sua maioria, como galoil hexosídeo e quercetina desoxihexosídeo.

Os compostos fenólicos identificados nos gêneros *C. phaea* e *E. pyriformis* Cambess constituem características bioativas importantes, de ação antioxidante e anti-inflamatórias (JACOMINO et al., 2018; TAVER et al., 2022; TOKAIRIN et al., 2018).

Há uma grande diversidade de compostos fenólicos identificados na literatura para a Uvaia quanto para o Cambuci. A diferença qualitativa e quantitativa na composição entre frutas da mesma espécie é justificada tanto pelas condições agronômicas de cultivo quanto pelas características ambientais, que influenciam na síntese de compostos fenólicos (LORENÇONI et al., 2020; TAVER et al., 2022).

2.3.1.2 Identificação tentativa dos compostos fenólicos da Uvaia e Cambuci após a digestão *in vitro* e transporte em células Caco-2

Como é possível observar na Tabela 3, o ácido quínico (m/z 191,04) foi identificado no Cambuci após a digestão (FDCA) e após o ensaio de absorção epitelial medido por transporte em células Caco-2 (FBCA). Na fruta esse composto foi identificado em suas formas derivadas, como ácido 3,7-*O*-diferuloil-4-*O*-cafeoilquínico e ácido tri-cafeoilquínico, indicando a liberação desse composto mediante as condições do processo de simulação da digestão gastrointestinal.

Tabela 3. Compostos fenólicos do Cambuci após digestão *in vitro* (FDCA) e transporte em células Caco-2 (FBCA) identificados provisoriamente por HPLC-ESI-MS.

#	Composto	[M-H]- <i>m/z</i>	Fragmentos MS ² <i>m/z</i>	RT (min)
FDCA				
1	Ácido quínico	191,04	191.05; 93.03; 85.02	2,6
FBCA				
1	Ácido quínico	191,04	191.05; 93.03; 85.02	2,6

Fonte. Do próprio autor.

Nas frações FBUV e FDUV apresentadas na Tabela 4, o composto 1 foi identificado como fragmento de ácido málico (*m/z* 155,00) e o composto 3 como ácido málico (*m/z* 133,01). Ácido málico está entre os principais ácidos orgânicos presentes em frutas, propiciando características de sabor, por exemplo, além de papel antioxidante, protegendo contra diversas doenças (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2010). Na mesma classe, o composto 2 foi identificado como ácido cinâmico (*m/z* 129,01). Em relação à matriz de origem, não foi possível identificar nenhum desses 2 compostos (Tabela 1), mas a partir da presença do mesmo após a digestão, há indícios de que os ácidos cinâmico e málico estejam presente na Uvaia na forma glicosilada, o que dificultou a identificação por fragmentação.

Tabela 4. Compostos fenólicos da Uvaia após digestão *in vitro* (FDUV) e transporte em células Caco-2 (FBUV) identificados provisoriamente por HPLC-ESI-MS.

#	Composto	[M-H]- <i>m/z</i>	Fragmentos MS ² <i>m/z</i>	RT (min)
FDUV				
1	Fragmento de ácido málico	115,00	115,00;118,99	3,4
2	Ácido cinâmico	129,02	129.02; 120.02; 103.00	4,4
3	Ácido málico	133,01	133,01; 115,00; 116,00; 89,02	2,7
FBUV				
1	Fragmento de ácido málico	115,00	115,00;118,99	3,4
2	Ácido cinâmico	129,02	129.02; 120.02; 103.00	4,4
3	Ácido málico	133,01	133,01; 115,00; 116,00; 89,02	2,7

Fonte. Do próprio autor.

Ácido cinâmico foi anteriormente observado em frutos de Uvaia, antes e após ensaio de digestão *in vitro*, bem como no extrato da fruta *in natura* (FARIAS et al., 2021).

A partir da identificação de compostos fenólicos da classe dos ácidos fenólicos nas frações digeridas e basolaterais das duas frutas, é possível concluir que o modelo de digestão *in vitro* e o transporte em monocamadas de células Caco-2 favoreceram a liberação e absorção de certos fenólicos.

Enquanto os resultados do presente trabalho sugerem maior liberação de ácidos fenólicos das frutas, Farias et al. (2021) observaram maior degradação desse grupo após o processo digestivo, em ambas as frações, quando comparado aos flavonóides identificados nos frutos e sementes de *Eugenia pyriformis*. Já Neves et al. (2018) observaram que dentre os compostos fenólicos da casca e da semente da jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*), a retenção de ácidos fenólicos foi maior, com bioacessibilidade de até 74%.

Maiores investigações são necessárias quanto ao efeito da digestão gastrointestinal da Uvaia e do Cambuci nos compostos fenólicos destas frutas. Uma série de interações que ocorrem dessas moléculas com os reagentes da digestão, enzimas, condições de pH, que pode ter diminuído a efetividade do processo digestivo ou ter causado degradação dos compostos fenólicos. As estruturas químicas sofrem por reação de hidrólise, descarboxilação, ou conjugação, levando a perdas com a de grupos hidroxila (FERNANDÉZ-FERNANDÉZ et al., 2010).

Ainda assim, os resultados observados após o transporte de fenólicos expostos às monocamadas de células Caco-2 mostram que certos compostos foram transportados para a fração basolateral, indicando potencial biodisponibilidade de fenólicos do Cambuci e da Uvaia após consumidos *in natura*.

2.3.2. Teor de compostos fenólicos totais

Os resultados dos teores de compostos fenólicos totais por *Folin-Ciocalteu* podem ser observados na Tabela 5. O Cambuci apresentou valor de 506,18 mg de equivalentes de ácido gálico por grama de fruta *in natura* (mg EAG/100 g). Após a simulação do processo digestivo, observou-se uma diminuição nesse valor, que atingiu 283,63 (mg EAG/100 g), representando uma perda aproximada de 44% em relação ao teor original de compostos fenólicos totais presentes na fruta. Subsequentemente, ao analisar a fração resultante do experimento de transporte através das células Caco-2, constatou-se uma significativa redução, culminando em 29,21(mg EAG/100 g).

Tabela 5. Quantificação dos compostos fenólicos totais.

	(mg EAG/100 g)		
	Fruta <i>in natura</i> *	Fração digerida	Fração basolateral
Cambuci	506,18±3,82	283,63±1,16	29,21±3,36
Uvaia	394,18±1,45	407,93±3,51	30,27±1,00

Fonte. Do próprio autor.

EAG= equivalente em ácido gálico.

*Ensaio realizado pelo método *Folin-Ciocalteu* nos extratos etanólicos ricos em compostos fenólicos e expressos em massa de fruta *in natura*.

No caso da Uvaia, a quantificação mostrou um teor de 394,18 (mg EAG/g). Após o processo de digestão simulada, houve um incremento no teor de compostos fenólicos totais, resultando em um valor de 407,93 (mg EAG/g). Isso sugere uma maior eficácia na liberação desses compostos após o processo de digestão. No entanto, ao analisar a fração basolateral após o experimento de absorção celular, observou-se uma redução significativa, resultando em 30,27 (mg EAG/g), o que representa uma diminuição de cerca de 76% em relação ao teor original presente na fruta.

Essa variação pode ser atribuída a fatores relacionados às transformações que os compostos fenólicos podem sofrer durante a digestão, bem como à redução esperada desses valores após o processo de transporte através do epitélio intestinal. É importante ressaltar que apenas uma fração dos compostos bioativos dos alimentos alcança efetivamente a fração basolateral e torna-se biodisponível no organismo (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014).

2.3.3. Capacidade desativadora de espécies reativas de oxigênio

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos pelos ensaios de capacidade desativadora de espécies reativas de oxigênio, que foram realizados utilizando as frutas e nas suas frações digeridas e basolaterais.

Em relação ao valor ORAC, o Cambuci apresentou incremento no valor da atividade antioxidante após a digestão *in vitro*, de 5,56 no ECA para 29,43 $\mu\text{mol TE/g}$ na FDCA. Após o ensaio de transporte celular, observou-se perda de atividade, com valor ORAC final de 1,58 $\mu\text{mol TE/g}$ para a FBCA.

Para a Uvaia, foi observado o mesmo comportamento de aumento do valor ORAC na fração FDUV em relação ao EUV, de 2,06 para 35,05 $\mu\text{mol TE/g}$. Após o transporte celular, apesar da redução da atividade antioxidante em relação à fração digerida, a Uvaia apresentou maior valor ORAC para a FBUV (9,75 $\mu\text{mol TE/g}$) do que para EUV (2,06 $\mu\text{mol TE/g}$), mostrando que a digestão favoreceu a atividade antioxidante na fração gastrointestinal e transportada.

Tabela 6. Dados da atividade antioxidante medida pela de capacidade desativadora de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Espécie	Fração	ROO [•] ($\mu\text{mol TE/g}$)*	HOCl EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	O ₂ ⁻ EC ₅₀ (mg/mL)	H ₂ O ₂ EC ₅₀ (mg/mL)
Cambuci (<i>C. phaea</i>)	ECA*	5,56 \pm 0,06 ^b	252,44 \pm 3,97 ^c	6,68 \pm 0,59 ^a	3,24 \pm 0,28 ^a
	FDCA	29,43 \pm 1,24 ^a	19,42 \pm 1,77 ^a	21,78 \pm 0,35 ^b	12,27 \pm 0,60 ^b
	FBCA	1,58 \pm 0,01 ^c	116,09 \pm 13,42 ^b	6,10 \pm 0,31 ^a	2,09 \pm 0,05 ^a
Uvaia (<i>E. pyriformis</i> Cambess)	EUV*	2,06 \pm 0,22 ^c	98,02 \pm 1,67 ^b	4,56 \pm 0,63 ^a	8,95 \pm 0,41 ^a
	FDUV	35,05 \pm 1,90 ^a	115,96 \pm 6,73 ^a	4,35 \pm 0,15 ^a	10,91 \pm 0,90 ^c
	FBUV	9,75 \pm 0,02 ^b	270,07 \pm 13,88 ^c	35,96 \pm 0,63 ^b	15,57 \pm 0,16 ^c

Fonte. Do próprio autor

FDCA: Fração digerida de Cambuci; FBCA: Fração basolateral de Cambuci; FDUV: Fração digerida de Uvaia; FBUV: Fração basolateral de Uvaia

TE: equivalente Trolox. EC₅₀: a concentração para retardar a fase de latência em 50%. Valores expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão

(a) (b) e (c) representam as diferenças significativas, conforme ANOVA seguida do teste de Tukey, utilizando valor de α de 5%.

*ECA e EUV: Ensaio realizado nos extratos etanólicos ricos em compostos fenólicos e expressos em massa de fruta *in natura*.

Quanto ao ensaio do ácido hipocloroso, o Cambuci se destacou quanto a capacidade de recuperação da atividade após a digestão e absorção em células Caco-2. Após digerida, foi requerida menor concentração para desativar 50% dessa ERO, indicando a liberação de compostos na FDCA que possuem maior capacidade em desativar o ácido hipocloroso. O ácido hipocloroso é uma espécie reativa altamente oxidante, produzida naturalmente em neutrófilos pela mieloperoxidase, que catalisa a reação de oxidação de íons cloreto pelo peróxido de hidrogênio.

A FBCA apresentou menor EC₅₀ (116,09 $\mu\text{g/mL}$) do que a ECA (252,44 $\mu\text{g/L}$). Já para a Uvaia houve um aumento dos valores de EC₅₀ com o processo de digestão e transporte, de 98,02 $\mu\text{g/L}$ na EUV, 115,96 $\mu\text{g/L}$ na FDUV e 270,07 $\mu\text{g/L}$ na FBUV, ou seja, necessitando de maior concentração para desativar o ácido hipocloroso.

Quanto ao sequestro do ânion superóxido, após a digestão *in vitro* o Cambuci mostrou perda da capacidade de desativação, com valor de EC₅₀ de 6,68 mg/mL na ECA e 21,78 mg/mL para a FDCA. No entanto, após o ensaio de transporte celular, houve recuperação da atividade antioxidante, pois o valor do EC₅₀ da FBCA foi de 6,10 mg/mL. Já a Uvaia, apesar de apresentar maior capacidade de desativação do ânion superóxido na fruta (4,56 mg/mL) e

manutenção dessa capacidade após a digestão (4,35 mg/mL), na atividade medida para a fração basolateral, foi necessária maior concentração da FBUV (35,96 mg/mL) para desativar a fase de latência dessa ERO em 50%.

No ensaio do H_2O_2 , o Cambuci (ECA) apresentou menor valor de EC_{50} (3,24 mg/mL) do que a EUV (8,95 mg/mL). Observa-se que após a digestão, a Uvaia apresentou maior capacidade antioxidante na fração FDUV (10,91 mg/mL). Porém, ao analisar as frações basolaterais, nota-se que a Uvaia sofreu outro decaimento de atividade, com EC_{50} da FBUV de 15,57 mg/mL. Já o Cambuci aumentou sua capacidade antioxidante após o transporte em monocamadas de células Caco-2, com valor de EC_{50} de 2,09 mg/mL para a FBCA.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), embora não seja considerado um radical livre, uma vez que não possui elétrons desemparelhados em sua última camada, atua na produção do radical hidroxila ($OH\cdot$) por meio de reações de Fenton ou de Haber-Weiss. A formação de $OH\cdot$ é relevante devido à sua alta reatividade e capacidade de desencadear processos prejudiciais ao organismo (ALÍA et al., 2005).

Os dados observados com relação à atividade antioxidante destacam a importância de uma avaliação individual das frutas nativas brasileiras no contexto de seu potencial bioativo frente a diversas espécies reativas de oxigênio (ERO). De maneira global, as análises demonstraram que tanto o Cambuci quanto a Uvaia possuem a capacidade de desativar essas espécies reativas de oxigênio, mesmo após serem submetidas a processos de digestão simulada *in vitro* e ao transporte através das células Caco-2. Esses resultados indicam perspectivas promissoras quanto ao potencial antioxidante dessas frutas após serem consumidas.

O aumento na atividade antioxidante observado após o processo de digestão pode ser explicado pela provável liberação de novos metabólitos de oxidação, os quais podem apresentar uma atividade antioxidante (capacidade sequestrante) superior à de seus precursores. É relevante mencionar que esses metabólitos podem ou não pertencer à classe dos compostos fenólicos.

Durante o processo de digestão e transporte epitelial, a ação das enzimas, a presença de sais biliares, a interação com as fibras alimentares da fruta e as complexas vias de absorção celular podem resultar em modificações nas estruturas químicas dos compostos fenólicos. Isso é particularmente notável nos grupos hidroxila, os quais estão intimamente associados ao potencial antioxidante de um dado composto (QUATRIN et al., 2020; WOJTUNIK-KULESZA et al., 2020).

2.3.4. Atividade antioxidante celular (AAC) em células Caco-2

Os ensaios baseados em atividade antioxidante celular são importantes pois fornecem uma perspectiva biológica do comportamento antioxidante em sistemas vivos (Kellet et al., 2018).

Neste ensaio, foram utilizadas células Caco-2 expostas às frações digeridas de Cambuci e de Uvaia nas concentrações de 10,41 a 31,25 mg de fruta/mL. Quercetina foi utilizada como padrão, em faixa de concentração que variou de 12,5 a 400 μM (Figura 10).

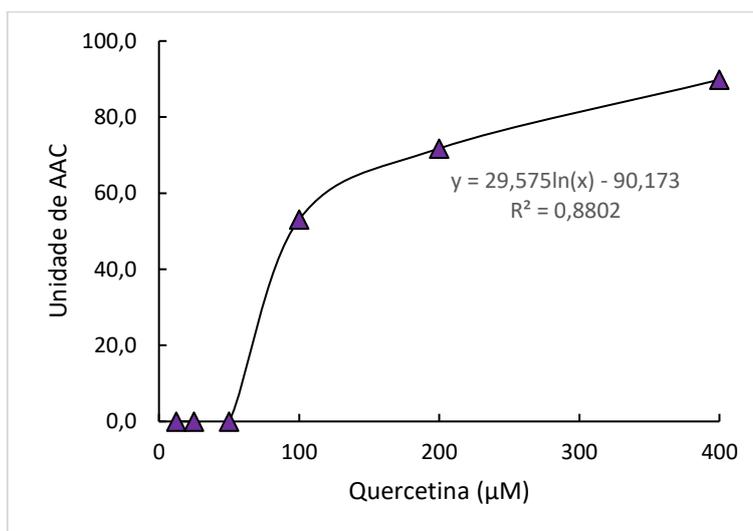


Figura 10. Atividade antioxidante celular (AAC) de padrões de quercetina (12,5 a 400 μM). (FONTE: Do próprio autor)

Dentre as frações digeridas das frutas, FDCA (Figura 11) mostrou fluorescência reduzida em 50% na concentração de $17,91 \pm 0,3$, demonstrando ligeiramente maior AAC do que FDUV (Figura 12), com concentração equivalente a $20,3 \pm 0,56$ para essa mesma porcentagem de redução. Observa-se que os dados da FBCA e FBUV se comportaram com relativa similaridade ao padrão de quercetina, que a 100 μM apresentou redução de $53,1 \pm 3,37\%$.

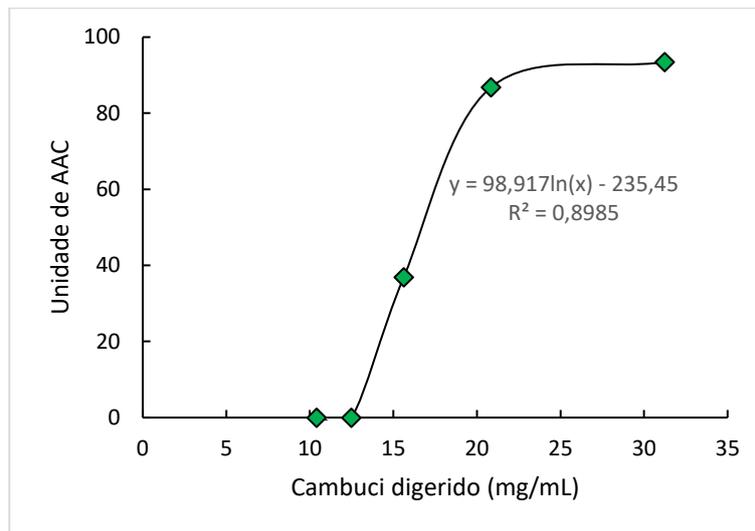


Figura 11. Atividade antioxidante celular (AAC) da fração digerida de Cambuci (FDCA). (FONTE: Do próprio autor)

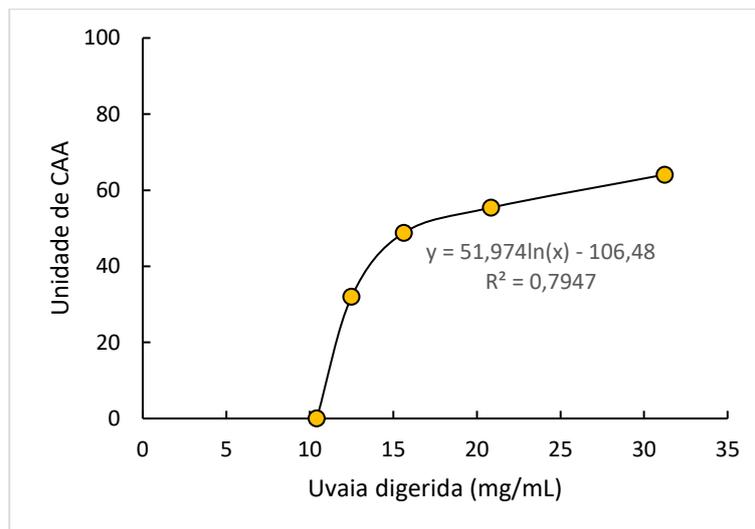


Figura 12. Atividade antioxidante celular (AAC) da fração digerida de Uvaia (FDUV). (FONTE: Do próprio autor)

Kellet et al. (2018), consideraram o modelo de AAC em células Caco-2 apropriado para este ensaio, observando uma redução de 63,6% no padrão de quercetina na concentração de 50 μ M e com comportamento da curva semelhante à observada neste estudo, o que contribui para a validação deste ensaio. Não foram encontrados dados na literatura acerca da AAC de frações digeridas de frutas, o que ressalta a importância dos resultados encontrados. De qualquer forma, ainda são necessários mais estudos para avaliação da capacidade antioxidante celular de alimentos (WOLFE & RUI, 2007).

Estes dados de AAC podem ser considerados complementares às atividades antioxidantes avaliadas pelas ERO das frutas após a digestão simulada, pois demonstram o poder antioxidante medido em condições intracelulares.

2.3.5. Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória do Cambuci e Uvaia foi avaliada pelo conjunto de ensaios de ativação do fator de transcrição NF-kappa B (NF- κ B), quantificação da citonina TNF- α e a quimiocina CXCL2/MIP-2 em células RAW expostas a (ECA e EUV), frações digeridas (FDCA e FDUV) e basolaterais (FBCA e FBUV). Os resultados encontrados estão apresentados nas Figuras 13 e 14.

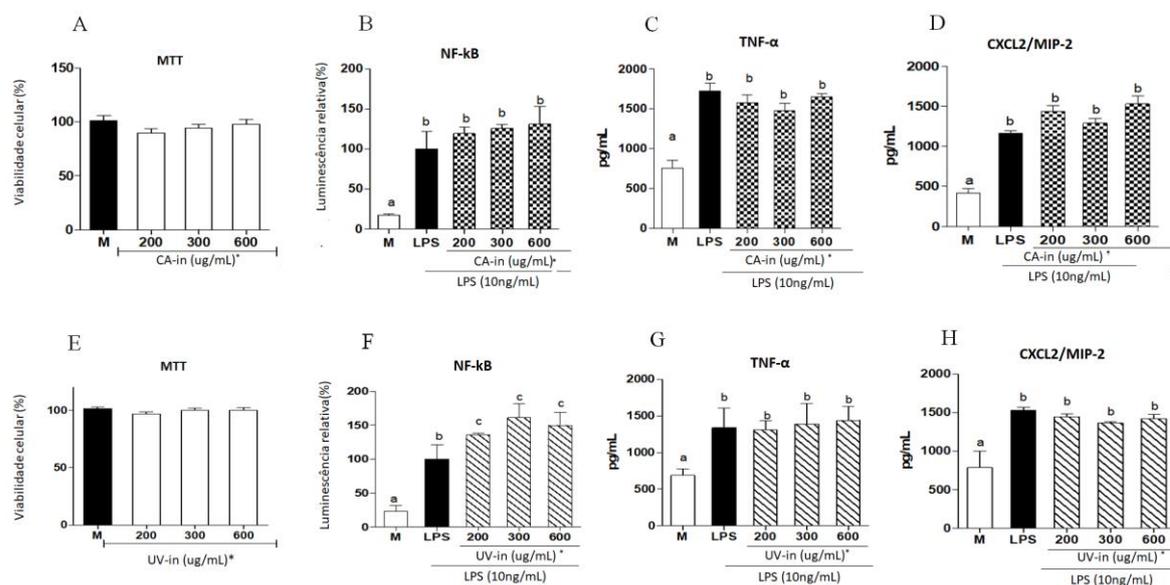


Figura 13. Atividade anti-inflamatória das frutas nativas: viabilidade celular (A) Cambuci *in natura* (ECA) (E) Uvaia *in natura* (EUV); níveis de ativação do NF-kB (B) ECA (F) EUV; ativação do TNF- α (C) ECA (G) EUV; redução da quimiocina CXCL2/MIP-2 (D) ECA (H) EUV. (FONTE: Do próprio autor)

Nota: No ensaio os macrófagos foram tratados com extratos etanólicos ricos em compostos fenólicos em diferentes concentrações por 30 min antes da estimulação com LPS (10 ng/mL). O grupo controle negativo foi tratado com o veículo. Os resultados são expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão (DP) e as barras indicam o DP. (a) (b) e (c) representam as diferenças significativas, conforme ANOVA seguida do teste de Tukey, utilizando valor de α de 5%.

* μ g de fruta *in natura*/mL tampão; ensaio realizado com extratos etanólicos ricos em compostos fenólicos.

Na figura 13 observa-se que pelo ensaio de MTT (A) e (E), as concentrações testadas de ECA e EUV apresentaram viabilidade celular acima de 90%, sendo então consideradas adequadas para o estudo. Contudo, quando analisados os efeitos dessas frações de 200, 300 e 600 μ g/mL nenhuma das amostras obtidas a partir das frutas mostraram redução na ativação de NF-kB, sugerindo que nessas concentrações essas frutas não demonstraram papel na modulação

de processos inflamatórios. A mesma tendência foi observada para os experimentos realizados com a citocina TNF- α e a quimiocina CXCL2/MIP-2.

Diante da identificação tentativa dos compostos fenólicos das frutas, tanto para o Cambuci quanto para a Uvaia, eram esperados efeitos na atividade anti-inflamatória, sugerindo a necessidade de se testar concentrações maiores, uma vez que essas frações demonstram desativar as ROS, que estão envolvidas na ativação do NF- κ B.

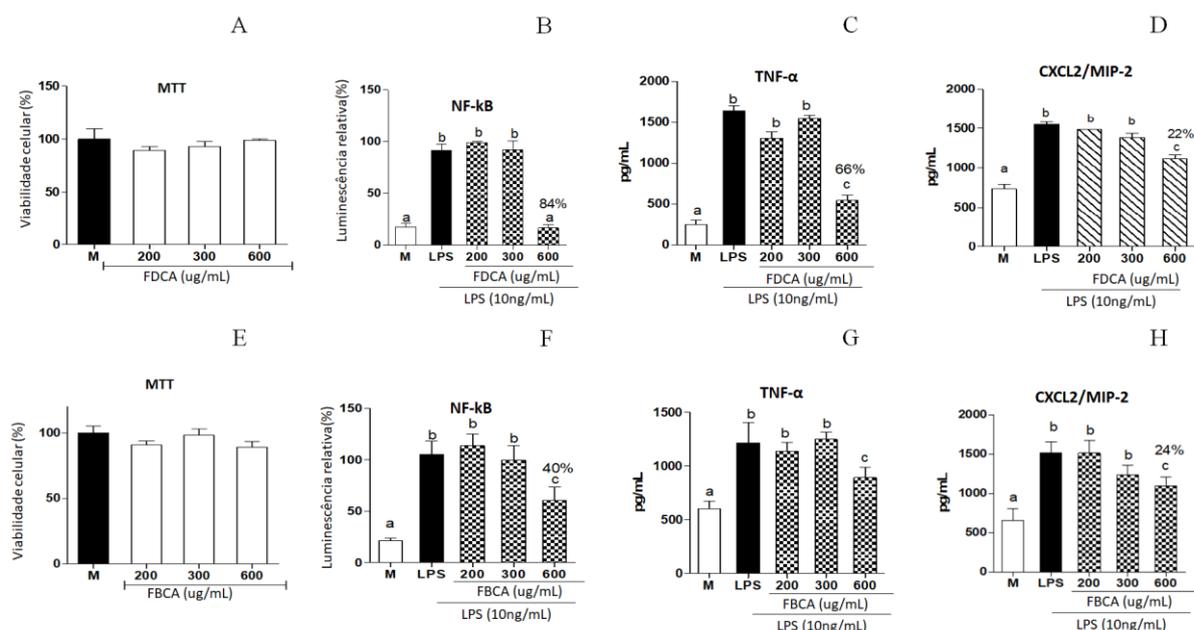


Figura 14. Atividade anti-inflamatória do Cambuci após digestão *in vitro* e transporte em células Caco-2: viabilidade celular (A) fração digerida de Cambuci (FDCA) (E) fração basolateral de Cambuci (FBCA); níveis de ativação do NF- κ B (B) FDCA (F) FBCA; ativação do TNF- α (C) FDCA (G) FBCA; redução da quimiocina CXCL2/MIP-2 (D) FDCA (H) FBCA. (FONTE: Do próprio autor)

Nota: No ensaio os macrófagos foram tratados com as frações obtidas após e digestão e transporte celular de Cambuci em diferentes concentrações por 30 min antes da estimulação com LPS (10 ng/mL). O grupo controle negativo foi tratado com o veículo. Os resultados são expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão (DP) e as barras indicam o DP. (a) (b) e (c) representam as diferenças significativas, conforme ANOVA seguida do teste de Tukey, utilizando valor de α de 5%.

Pelo ensaio de MTT (Figura 14), a fração digerida do Cambuci (FDCA) na concentração de 600 μ g/mL apresentou 100% de viabilidade (A). Para FBCA (E), a maior viabilidade (100%) foi observada na concentração de 300 μ g/mL. Contudo, as três concentrações testadas (200, 300 e 600 μ g/mL) foram consideradas adequadas para a análise, pois apresentaram viabilidade $>90\%$. Os dados em (B) mostram redução de 84% na ativação de NF- κ B para FDCA e 40% para FBCA (F) na concentração de 600 μ g/mL. Estes resultados sugerem que o Cambuci desempenhou um papel na modulação de processos inflamatórios após digestão e transporte pelas células epiteliais.

Nos resultados obtidos pelo teste ELISA, foram quantificadas a citocina TNF- α (C) e (G) e a quimiocina CXCL2/MIP-2 (D) e (H). A FDCA apresentou redução de TNF- α de 66% na concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$, mas após o transporte celular a FBCA mostrou perda na redução dessa citocina. Já para o teste utilizando quimiocina, FDCA e FBCA apresentaram resultados com valores próximos, de respectivamente 22 e 24%, tendo o Cambuci exercido maior efeito na redução da CXCL2/MIP-2 após o experimento em células Caco-2 e aumentando a perspectiva de atividade anti-inflamatória dessa fruta após ingerida.

Para a Uvaia, as concentrações de 200-600 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 15) apresentaram viabilidade celular acima de 90% para FDUV (A). As células RAW tratadas com as concentrações de 300 $\mu\text{g/mL}$ e 600 $\mu\text{g/mL}$ dessas frações apresentaram redução significativa na ativação de NF-kB, de 54% e 75%, respectivamente. Os dados obtidos após o teste ELISA indicam que para TNF- α essas mesmas concentrações foram capazes de impactar na redução da citocina em até 62%. Para o teste com CXCL2/MIP-2, a concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$ de FDUV exerceu efeito de redução de 28% dessa quimiocina.

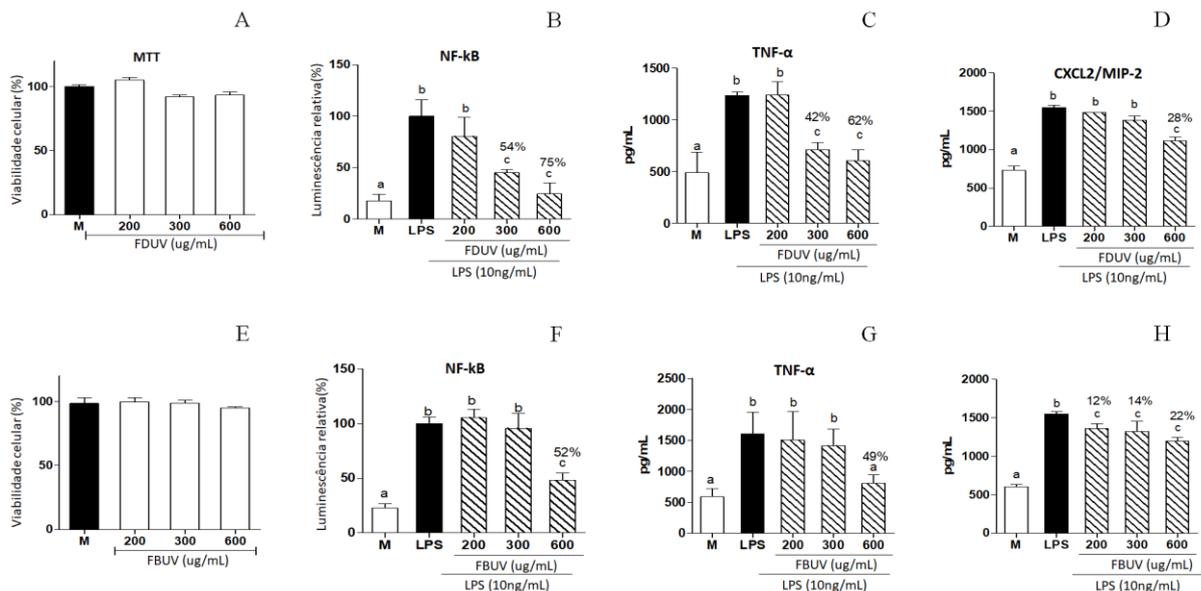


Figura 15. Atividade anti-inflamatória da Uvaia após digestão *in vitro* e transporte em células Caco-2: viabilidade celular (A) fração basolateral de Uvaia (FDUV) (E) fração digerida de Uvaia (FDUV); níveis de ativação do NF-kB (B) FDCA (F) FDUV; ativação do TNF- α (C) FDCA (G) FDUV; redução da quimiocina CXCL2/MIP-2 (D) FDCA (H) FDUV. (FONTE: Do próprio autor)

Nota: No ensaio os macrófagos foram tratados com as frações obtidas após e digestão e transporte celular de Cambuci em diferentes concentrações por 30 min antes da estimulação com LPS (10 ng/mL). O grupo controle negativo foi tratado com o veículo. Os resultados são expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão (DP) e as barras indicam o DP. (a) (b) e (c) representam as diferenças significativas, conforme ANOVA seguida do teste de Tukey, utilizando valor de α de 5%.

Para a fração FBUV houve redução de 52% na ativação do fator de transcrição NF- κ B, na concentração e 600 μ g/mL. Essa mesma concentração também foi capaz de reduzir em 49% a citocina TNF- α e em 22% a CXCL2/MIP-2. Ainda para a CXCL2/MIP-2, as concentrações de 200 μ g/mL e 300 μ g/mL exerceram redução de 12 e 14%, respectivamente.

O TNF- α e CXCL2/MIP-2 são importantes referências na investigação do potencial anti-inflamatório de compostos, uma vez que são associadas a respostas inflamatórias. Neutrófilos e macrófagos atuam liberando essas citocinas que aumentam o foco inflamatório dos tecidos celulares, podendo levar a doenças degenerativas graves, esclerose e câncer, dentre outras (HYE et al., 2007; VILLALVA et al., 2018).

Esses resultados apresentados após a fruta digerida e transportada em monocamadas de células epiteliais são de suma importância e proporciona indícios de que a inserção de Cambuci e Uvaia na dieta pode impactar positivamente na saúde, por possivelmente apresentar ação anti-inflamatória. Enquanto as concentrações testadas a partir dos extratos etanólicos da Uvaia e do Cambuci não exerceram impacto na redução das citocinas, ao se observar os dados apresentados após a simulação da digestão e transporte celular, concentrações equivalentes mostraram significativa atividade anti-inflamatória.

2.3.6. Toxicidade aguda *in vivo*

O modelo de toxicidade com *G. mellonella* foi utilizado para estimar a concentração segura de consumo de cada fruta nativa, sendo uma alternativa de baixo custo de análise de toxicidade *in vivo* cujos resultados se correlacionam com aqueles observados em mamíferos (SARDI et al., 2017).

Por este modelo, nenhuma das duas frutas nativas apresentaram toxicidade em doses comuns de consumo de frutas por seres humanos (Figuras 16 e 17).

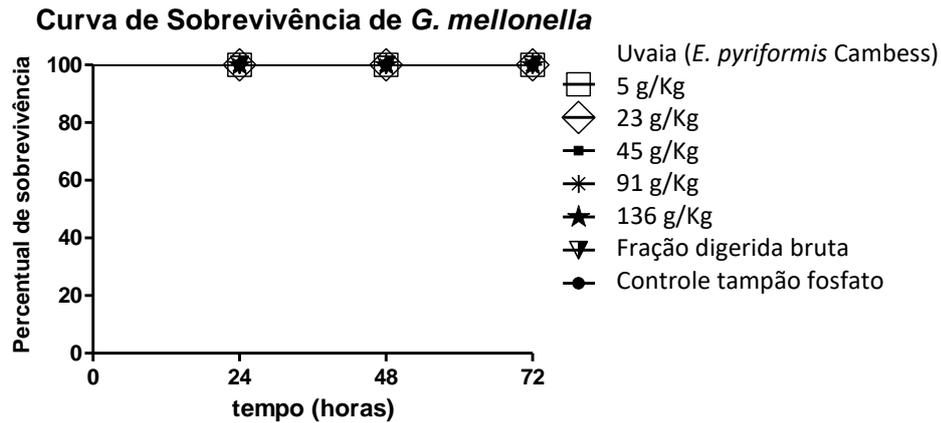


Figura 16. Curva de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella*. (FONTE: Do próprio autor)

Nota: Organismos expostos às soluções com extratos de Cambuci nas concentrações de 5 a 136 g/Kg e à fração digerida bruta. Ensaio realizado em triplicata (n=30) com o extrato etanólico rico em compostos fenólicos de Uvaia (EUV) e a fração digerida bruta (FDCA). Resultados expressos em g fruta *in natura*/Kg. Controle tampão fosfato foi injetado no grupo controle negativo (n=10).

De acordo com a Figura 16, a Uvaia não mostrou efeito letal na sobrevivência das larvas em nenhuma das doses testadas. O Cambuci, conforme os dados da Figura 17, reduziu em 50,0% da população na dose de 136,0 g/Kg de larva. Entretanto, essa concentração corresponde à ingestão de aproximadamente 6,80 Kg de fruta por um indivíduo de 50,0 Kg, demonstrando assim uma toxicidade muito baixa.

Em relação as frações digeridas das frutas, aplicadas em dose bruta após a digestão *in vitro* (5g/Kg), não exerceram efeito tóxico nas larvas.

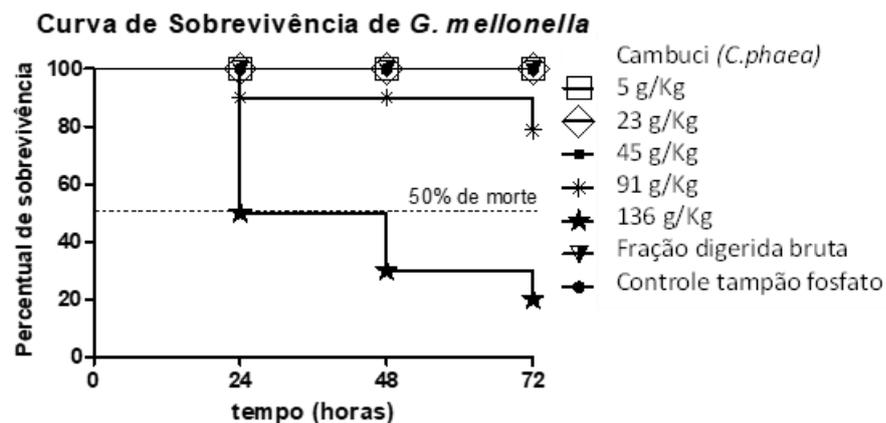


Figura 17. Curva de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella*. (FONTE: Do próprio autor)

Nota: Organismos expostos às soluções com extratos de Cambuci nas concentrações de 5 a 136 g/Kg e à fração digerida bruta. Ensaio realizado em triplicata (n=30) com o extrato etanólico rico em compostos fenólicos de Cambuci (ECA) e a fração digerida bruta (FDCA). Resultados expressos em g fruta *in natura*/Kg. Controle tampão fosfato foi injetado no grupo controle negativo (n=10).

Lazarini et al. (2020) utilizaram este mesmo modelo para a avaliação da toxicidade de partes de frutos de *Eugenia spp.* e também não observaram efeitos significantes na curva de sobrevivência das larvas. Quanto à toxicidade das frações oriundas da digestão simulada *in vitro* não foi encontrado nenhum trabalho na literatura, o que demonstra assim a importância de trabalhos nesta temática.

2.4. Conclusões

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que:

- Uvaia e Cambuci apresentam propriedades bioativas importantes e, portanto, têm potencial de impactar positivamente na saúde;
- Ambas frutas exibiram atividades antioxidantes após digeridas e transportadas, quanto à capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio e também a nível celular pela avaliação da atividade antioxidante celular;
- Foi observada atividade anti-inflamatória nas frações digeridas e basolaterais de Cambuci e Uvaia;
- Foram identificados compostos fenólicos já relatados na literatura com potencial antioxidante e anti-inflamatório em ambas as frutas;
- A Uvaia não mostrou toxicidade em galerias mellonelas, com maior concentração testada de 136,0 g/Kg de larva. Já o Cambuci reduziu em 50,0% da população na dose de 136,0 g/Kg de larva. Essa concentração corresponde à ingestão de uma alta quantidade da fruta, de aproximadamente 6,80 Kg de fruta por um indivíduo de 50,0 Kg;
- A maioria dos compostos fenólicos identificados nos extratos obtidos a partir das frutas não foram detectados após a digestão *in vitro* e transporte celular, provavelmente devido às transformações químicas decorrentes desses processos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, E. S. S.; BAZAID, S. A.; SALMAN, M. S. Characterization of the phytochemical constituents of taif rose and its antioxidant and anticancer activities. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-13, 2013.
- ALÍA, M. et al. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 19, n. 2, p. 119-128, 2005.
- AVULA, B. et al. Quantification and characterization of phenolic compounds from Northern Indian propolis extracts and dietary supplements. **Journal of AOAC International**, v. 103, n. 5, p. 1378-1393, 2021.
- BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, A. G. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.
- BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, v. 25, p. 3-14, 2001.
- BRODKORB, A. et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991-1014, 2019.
- CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 155-171, 2014.
- CHANG, Z. et al. A Comprehensive Review of the Structure Elucidation of Tannins from Terminalia Linn. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 1-26, 2019.
- CHISTÉ, R. C. et al. *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 419-426, 2011.
- COOPER, Z. A. et al. Febrile-range temperature modifies cytokine gene expression in LPS stimulated macrophages by differentially modifying NF-kB recruitment to cytokine gene promoters. **American Journal of Physiology**, v. 298, p. 171-181, 2010.
- DONADO-PESTANA, C. M. et al. Phenolic compounds from Cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg) fruit attenuate glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by a high-fat, high-sucrose diet. **Food Research International**, v. 69, p. 170-178, 2015.
- FARIAS, D. DE P. et al. Effect of *in vitro* digestion on the bioaccessibility and bioactivity of phenolic compounds in fractions of *Eugenia pyriformis* fruit. **Food Research International**, v. 150, p. 2-7, 2021.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R. et al. Simple LC-MS determination of citric and malic acids in fruits and vegetables. **Chromatographia**, v. 72, n. 2, p. 55-62, 2010.
- HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G. E.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2111-2119, 2007.
- HYE, H. Y. et al. Effects of diosmin, a flavonoid glycoside in citrus fruits, on P-glycoprotein-mediated drug efflux in human intestinal caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7620-7625, 2007.

- INFANTE, J. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored Brazilian native fruits. **Biological Properties of unexplored native fruits**, v. 11, n. 4, p. 1-13, 2016.
- JACOMINO, A. P. et al. Uvaia - *Eugenia pyriformis* Cambess. Em: Exotic Fruits Reference Guide, v. 1, p. 435-438, 2018.
- KELLETT, M. E.; GREENSPAN, P.; PEGG, R. B. Modification of the cellular antioxidant activity (CAA) assay to study phenolic antioxidants in a Caco-2 cell line. **Food Chemistry**, v. 244, p. 359-363, 2018.
- LAZARINI, J. G. et al. Anti-inflammatory and antioxidant potential, in vivo toxicity, and polyphenolic composition of *Eugenia selloi* B.D.Jacks. (pitangatuba), a Brazilian native fruit. **PLoS ONE**, v. 15, n. 6, p. 1-16, 2020.
- LORENÇONI, M. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of essential oil and ethanolic extract of *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 252, p. 1-10, 2020.
- MEGAW, J. et al. Galleria mellonella as a novel in vivo model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. **Chemosphere**, v. 139, p. 197-201, 2015.
- MELO, P. S. et al. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p. 160-169, 2015.
- MINEKUS, M. et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.
- NATOLI, M. et al. Good Caco-2 Cell Culture Practices. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 8, p. 1243-1246, 2012.
- NEVES, N. DE A. et al. Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of jaboticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, v. 252, p. 61-71, 2018.
- QUATRIN, A. et al. Bioaccessibility and catabolism of phenolic compounds from jaboticaba (*Myrciaria trunciflora*) fruit peel during *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 1-5, 2020.
- SAID, R. BEN et al. Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 1-18, 2017.
- SANTOS, P. F. P. et al. Polyphenol and triterpenoid constituents of *Eugenia florida* dc. (myrtaceae) leaves and their antioxidant and cytotoxic potential. **Quimica Nova**, v. 41, n. 10, p. 1140-1149, 2018.
- SARDI, J. DE C. O. et al. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 280-287, 2017.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of *Folin-Ciocalteu* reagent. **Polyphenols and flavonoids**, v. 1, p. 152-178, 1999.
- SOARES, J. C. et al. Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and antiinflammatory activity. **Food Chemistry**, v. 281, p. 178-188, 2019.

- SPINOLA, V. A. R. **Nutraceuticals and Functional Foods for Diabetes and Obesity Control**. Madeira: Madeira Chemistry Center, v. 1, p. 1-290, 2018.
- ŠUKOVIĆ, D. et al. Phenolic profiles of leaves, grapes and wine of grapevine variety vranac (*Vitis vinifera* L.) from Montenegro. **Foods**, v. 9, n. 2, 2020.
- TAVER, I. B. et al. Bioactive Compounds and *In Vitro* Antioxidant Capacity of Cambuci and Uvaia: An Extensive Description of Little-Known Fruits from the Myrtaceae Family with High Consumption Potential. **Foods**, v. 11, n. 17, p. 1-13, 2022.
- TOKAIRIN, T. DE O.; NETO, H. B.; JACOMINO, A. P. Cambuci - *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum. **Exotic Fruits Reference Guide**. v. 1, n.1, p. 91-95, 2018.
- VILLALVA, M. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities from the Basolateral Fraction of Caco-2 Cells Exposed to a Rosmarinic Acid Enriched Extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 1167-1174, 2018.
- WAN, H. et al. A Caco-2 cell-based quantitative antioxidant activity assay for antioxidants. **Food Chemistry**, v. 175, p. 601-608, 2015.
- WOJTUNIK-KULESZA, K. et al. Influence of *in vitro* digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—a non-systematic review. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1-28, 2020.
- WOLFE, K. L.; RUI, H. L. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8896-8907, 2007.

3. CAPÍTULO 2 - EMULSÕES À BASE DE LEITE E ÓLEO DE SOJA INCORPORADAS À UVAIA: DIGESTÃO *IN VITRO* E BIOACESSIBILIDADE DO *BETA* CAROTENO

Resumo

Neste estudo diferentes matrizes lipídicas foram empregadas na preparação das emulsões incorporadas de Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) reconstituída, resultando em quatro produtos emulsionados. Amostras de Uvaia, previamente submetidas a um processo de liofilização de 96 horas, foram reconstituídas na concentração de 22 mg/mL. Em seguida, essas amostras foram incorporadas às emulsões, que foram produzidas a partir de diferentes fontes lipídicas, incluindo óleo de soja, creme de leite e leite de vaca. Os produtos emulsionados resultantes dessa combinação de ingredientes foram subsequentemente submetidos a um processo de digestão gastrointestinal simulada, utilizando o método INFOGEST 2.0. A quantificação do β -caroteno foi realizada na Uvaia reconstituída antes e após a digestão *in vitro*, bem como nos produtos emulsionados. Os resultados revelaram que a presença de lipídeos no produto emulsionado com a maior concentração de óleo de soja se destacou, resultando em um notável aumento na quantidade de β -caroteno detectado na fração micelar. Especificamente, o produto denominado O17, derivado da Uvaia incorporada à emulsão contendo 17,0% de óleo de soja, apresentou uma bioacessibilidade de 16,9%. Na Uvaia reconstituída e submetida à digestão *in vitro* sem a presença de lipídeos (UR), o valor de bioacessibilidade do β -caroteno foi de 10,7%. Esses resultados demonstram a relevância da matriz lipídica na promoção da absorção de compostos bioativos, como o β -caroteno, possibilita o desenvolvimento de produtos alimentícios, e particularmente na criação de nutracêuticos que ofereçam benefícios adicionais à saúde dos consumidores.

Palavras-chave: Uvaia ;Carotenoide;Emulsão;*Beta* caroteno;*Eugenia pyriformis* Cambess

EMULSIONS BASED ON MILK AND SOYBEAN OIL INCORPORATED INTO UVAIA: IN VITRO DIGESTION AND BIOACCESSIBILITY OF *BETA* CAROTENE

Abstract

In this study, different lipid matrices were employed in the preparation of emulsions incorporated with reconstituted Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess), resulting in four emulsified products. Uvaia samples, previously subjected to a 96-hour freeze-drying process, were reconstituted at a concentration of 22mg/mL. Subsequently, these samples were incorporated into emulsions, which were produced from different lipid sources, including soybean oil, cream, and cow's milk. The resulting emulsified products from this combination of ingredients were then subjected to a simulated gastrointestinal digestion process using the INFOGEST 2.0 method. The quantification of β -carotene was performed on the reconstituted Uvaia before and after *in vitro* digestion, as well as on the emulsified products. The results revealed that the presence of lipids in the emulsified product with the highest concentration of soybean oil stood out, resulting in a significant increase in the amount of β -carotene detected in the micellar fraction. Specifically, the product named O17, derived from Uvaia incorporated into the emulsion containing 17.0% soybean oil, exhibited a bioaccessibility of 16.9%. In reconstituted Uvaia subjected to *in vitro* digestion without the presence of lipids (UR), the β -carotene bioaccessibility value was 10.7%. These results demonstrate the relevance of the lipid matrix in promoting the absorption of bioactive compounds such as β -carotene, enabling the development of food products, and particularly in the creation of nutraceuticals that offer additional health benefits to consumers.

Keywords: Uvaia; Carotenoids; Emulsion; *Beta* caroteno; *Eugenia pyriformis* Cambess

3.1. Introdução

Os frutos de Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess), pertencentes à família Myrtaceae, figuram entre as frutas nativas subexploradas da Mata Atlântica brasileira que detêm potencial para comercialização, dadas as suas características sensoriais concomitantes com aspectos biológicos (JACOMINO et al., 2018).

Para estabelecer uma base sólida para o comércio da Uvaia e disseminar os benefícios de sua inclusão na dieta, é de suma importância superar os desafios associados à sua perecibilidade, caracterizada por sua fragilidade e alta suscetibilidade à oxidação. Recentes investigações têm proposto alternativas tecnológicas para a conservação da Uvaia, e dentro deste contexto, o processamento da Uvaia emerge como potencial solução (SGANZERLA & SILVA, 2022).

Entre os processos preconizados para a preservação das propriedades biológicas e sensoriais da Uvaia, destaca-se a liofilização, que pode incrementar a estabilidade da fruta durante o armazenamento, preservando, em geral, sua estrutura bruta. Portanto, esse método desempenha um papel relevante ao atender às demandas dos consumidores em períodos de entressafra, minimizando as perdas pós-colheita e contribuindo para a manutenção das propriedades biológicas e sensoriais da Uvaia (RAMIREZ et al., 2012).

Os potenciais efeitos benéficos do consumo de Uvaia para a saúde estão intrinsecamente associados à sua composição rica em fitoquímicos com atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, destacando-se o elevado teor de carotenoides, cuja presença é indicada por sua coloração amarelo-alaranjada. Alguns carotenoides, como o β -caroteno, exercem atividade pró-vitamina A e desempenham funções fundamentais no organismo (ETCHEVERRY et al., 2012).

Após a ingestão de produtos ricos em carotenoides, é sabido que apenas uma fração desses compostos é liberada na matriz alimentar após a digestão e, conseqüentemente, torna-se disponível para a absorção intestinal (MERCADANTE et al., 2017). Isso reforça a importância de dados relativos à bioacessibilidade dos carotenoides presentes na Uvaia.

Os lipídios constituem a classe orgânica mais estudada quanto ao impacto na bioacessibilidade dos carotenoides, devido à sua capacidade de aumentar a absorção dessa classe de compostos. Os óleos e gorduras da dieta atuam como "veículos" que protegem e facilitam o transporte dos carotenoides pelas membranas celulares, incrementando, assim, sua bioacessibilidade. No entanto, a incorporação de carotenoides em Uvaia não é trivial, principalmente devido à sua baixa solubilidade em água. Uma solução amplamente adotada na indústria alimentícia é a incorporação em emulsões (SONG et al., 2019).

Portanto, o objetivo deste estudo foi propor modelos de produtos emulsionados obtidos a partir de diferentes fontes e concentrações de lipídios incorporados de Uvaia reconstituída, além de avaliar a bioacessibilidade do β -caroteno, tanto antes quanto após a digestão simulada *in vitro*.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Aquisição e processamento da matéria-prima

As amostras de Uvaia (*E. pyriformis* Cambess) foram adquiridas na cidade de Cabo Verde - MG. As frutas foram selecionadas de acordo com o grau de maturação e tamanho, apresentando casca e polpa alaranjadas, adequadas para consumo. Foi feita higienização das frutas e em seguida despulpamento manual, retirando-se as sementes, e as polpas obtidas foram estocadas em freezer a -80°C por 48h. Em seguida, as polpas de Uvaia foram submetidas à liofilização, em que o processo de secagem teve duração de 96h, e moídas. Todas etapas foram realizadas ao abrigo da luz, com objetivo de minimizar a degradação dos carotenoides constituintes.



Figura 18. Aspecto visual de amostras de Uvaia (*E. pyriformis* Cambess) após liofilização e moagem. (FONTE: Do próprio autor)

3.2.2. Preparo dos produtos emulsionados

Os produtos emulsionados foram preparados utilizando diferentes fontes de lipídeos, pelo método de inversão de fases incorporados à Uvaia reconstituída. As fontes de óleo/gordura para preparo da emulsão foram óleo de soja refinado, creme de leite a 17% de gordura e leite de vaca a 3% de gordura. Para as emulsões com óleo de soja e leite de vaca foi utilizado Tween 20 como agente emulsificante. As misturas foram homogeneizadas com uso de Ultra-Turrax por 5 minutos na rotação de 15.000 rpm.

Para obtenção dos produtos emulsionados finais, 10 g de cada tipo de emulsão foram adicionadas à 10 g de Uvaia reconstituída (UR) na concentração de 22 mg/mL, com uso de

Ultra-Turrax na rotação de 5.000 rpm até a completa homogeneização. A Tabela 1 apresenta a composição final de cada produto emulsionado, denominados O3: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo 3,0% de óleo de soja; O17: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo 17,0% de óleo de soja; CL: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo creme de leite de 17,0% de gordura; LT: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo leite de vaca a 3,0% de gordura.

Tabela 7. Composição final dos produtos emulsionados

Produto emulsionado (100 g)	O3	O17	CL	LT
Água (g)	46,5	32,5	-	-
Óleo de soja (g)	3,0	17,0	-	-
Creme de leite 17% gordura (g)	-	-	50,0	-
Leite 3% gordura (g)	-	-	-	50,0
Tween 20 (g)	0,5	0,5	-	-
Uvaia reconstituída (g)	50,0	50,0	50,0	50,0

UR: Uvaia liofilizada e reconstituída a 22mg/mL. O3: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo 3,0% de óleo de soja; O17: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo 17,0% de óleo de soja; CL: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo creme de leite de 17,0% de gordura; LT: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo leite de vaca a 3,0% de gordura.

3.3. Ensaio de digestão *in vitro*

A digestão *in vitro* foi conduzida seguindo o modelo estático padronizado pela COST INFOGEST (BRODKORB et al., 2019). Cinco gramas da amostra (Uvaia reconstituída ou produto emulsionado) foi incubada sob agitação a 37°C, em condições que simulam as etapas oral, gástrica e intestinal, da digestão humana. Na etapa oral (volume final de 10 mL), foram adicionadas solução salivar (pH ajustado para 7,0) e α -amilase (75 U/mL; A1031; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), incubados por 2 minutos. Na etapa gástrica (volume final de 20 mL), foi adicionada a solução gástrica (pH ajustado para 3,0) e pepsina (2000 U/mL; P7000; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), incubados por 2h. A etapa intestinal se deu pela adição da solução intestinal (pH ajustado para 7,0), lipase pancreática (125 U /mL; L3126; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), pancreatina (100 U /mL; P7545; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) e sais biliares (10 mM; B8756; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), obtendo volume final de 40 mL. O produto da digestão *in vitro* foi centrifugado por 45 minutos a 10000 rpm, e o sobrenadante utilizado, denominado de fração micelar.

3.3.1. Extração dos carotenoides da Uvaia e fração micelar

A extração dos carotenoides da Uvaia foi adaptada de Farias et al. (2020), a partir de 3 g de Uvaia liofilizada e hidratada extraídas com 30 mL de acetona a temperatura ambiente em um almofariz de porcelana contendo 5g de celite. O extrato foi filtrado em funil de Büchner com placa porosa sob vácuo. Este procedimento foi repetido até a descoloração completa do material. Em funil de separação realizou-se uma etapa de partição, adicionando o extrato a 25 mL de éter de petróleo. Esta mistura foi lavada com 400 mL de água destilada, e após a separação, a fase inferior foi descartada e o sobrenadante filtrado em funil contendo sulfato de sódio anidro. O solvente foi completamente evaporado sob fluxo de nitrogênio, obtendo-se um extrato seco rico em carotenoides.

A extração dos carotenoides das frações micelares da Uvaia e produtos emulsionados foi realizada conforme Liu et al. (2018), com adaptações. De forma resumida, 5 mL de éter de petróleo/etanol (1:1, v/v) foram adicionados a 3-7 mL da fração micelar e agitado em vórtex por 1 minuto. O processo seguiu com centrifugação a 4°C, por 10 minutos a 800g, e então coletado o sobrenadante. O processo foi repetido 3 vezes e os extratos submetidos à fluxo de nitrogênio para remoção do solvente, obtendo-se extratos secos das frações micelares. Os extratos obtidos foram armazenados sob proteção da luz, a -80°C e tempo máximo de 3 dias, antes de serem analisados.

3.3.2. Análise por HPLC

A quantificação do β -caroteno foi realizada de acordo com o método descrito em Sá & Rodriguez-Amaya (2004). Foi utilizado um HPLC (Shimadzu® LC-20A Proeminence, Kyoto, Japão) e coluna polimérica YMC™ C30 (150 × 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m), a 30°C. A fase móvel constituiu-se de MeOH e MTBE 92: 8 (v/v), sendo a corrida foi feita em sistema isocrático com fluxo de 1,2 mL/min. Os extratos, frações micelares e produtos emulsionados foram ressuspensos em etanol: acetato de etila (1: 1, v/v), filtrados (PTFE 0,22 μ m) e injetados 30 μ L.

O β -caroteno foi identificado tendo como base a ordem de eluição, tempo de retenção e comparação do espectro do padrão a 450 nm. A quantificação foi feita a partir da curva analítica ($r^2=0,99$) de sete pontos de trans- β Caroteno (0,5–50 mg/mL). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.3.3. Cálculo da bioacessibilidade *in vitro*

O cálculo da bioacessibilidade do β -caroteno da Uvaia reconstituída e dos produtos emulsionados é apresentado na Equação 1. O mesmo foi baseado na eficiência da micelarização após a digestão, representado pela razão entre a quantidade de β -caroteno extraído das micelas e a quantidade de β -caroteno extraído das amostras.

$$\text{Bioacessibilidade } in vitro \text{ do } \beta - \text{ caroteno (\%)} = \frac{\beta\text{-caroteno na fração micelar}}{\beta\text{-caroteno na amostra}} \times 100 \quad \text{Eq.1}$$

3.3.4. Análise estatística

Os processos de extração foram realizados em triplicata, e os valores foram expressas como média \pm desvio padrão.

3.4. Resultados e discussão

A Uvaia liofilizada apresentou na sua composição 550,00 μg β -caroteno/g. O trans- β -caroteno foi confirmado via coeluição com o padrão (Figura 19), bem como comparação das características UV- vis e dados da literatura (SANTOS et al., 2023).

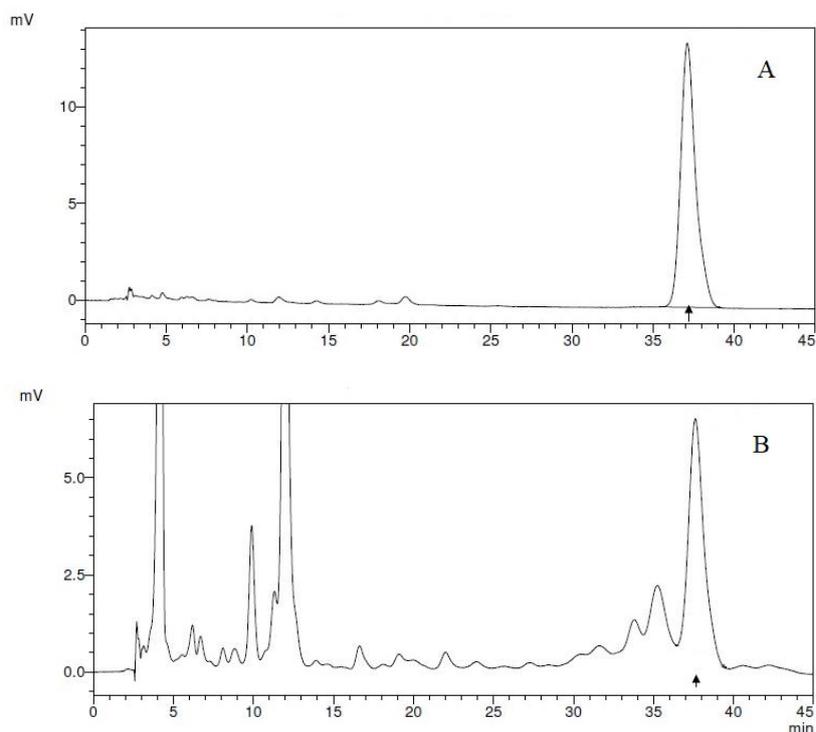


Figura 19. Cromatogramas obtidos por HPLC: (A) padrão β -caroteno; tempo de retenção do β -caroteno=37,26 min, (B) Uvaia reconstituída (*Eugenia pyriformis* Cambess); tempo de retenção do β -caroteno=37,61min. (FONTE: Do próprio autor)

De acordo com a Tabela 8, pode-se verificar que o modelo de digestão *in vitro* foi efetivo para a avaliação da bioacessibilidade do β -caroteno, possibilitando assim a quantificação desse composto na fração micelar.

Tabela 8. Quantificação do β -caroteno na Uvaia reconstituída e produtos emulsionados após digestão *in vitro*.

Amostra	Fração micelar $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g Uvaia liofilizada}$
UR	590,00 \pm 0,2
O3	15,9 \pm 0,2
O17	92,7 \pm 0,4
CL	69,8 \pm 0,2
LT	55,9 \pm 0,2

UR: Uvaia reconstituída (22 mg/mL); O3: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo 3,0% de óleo de soja; O17: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo 17,0% de óleo de soja; O3: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo creme de leite de 17,0% de gordura; LT: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo leite de vaca a 3,0% de gordura.

A Figura 20 apresenta a bioacessibilidade calculada do β -caroteno. A bioacessibilidade desse composto depende de diferentes variáveis como interações do produto com os sais de bile, lipases e outras enzimas, e inclusive da concentração de lipídeo, que pode interferir na taxa de digestão lipídica. Em relação aos carotenóides no geral, o β -caroteno tem maior facilidade de micelarização, devido a presença do anel β -ionona nas extremidades da cadeia que o tornam menos apolar se comparado, por exemplo, ao licopeno (KOPEC; FAILLA, 2018).

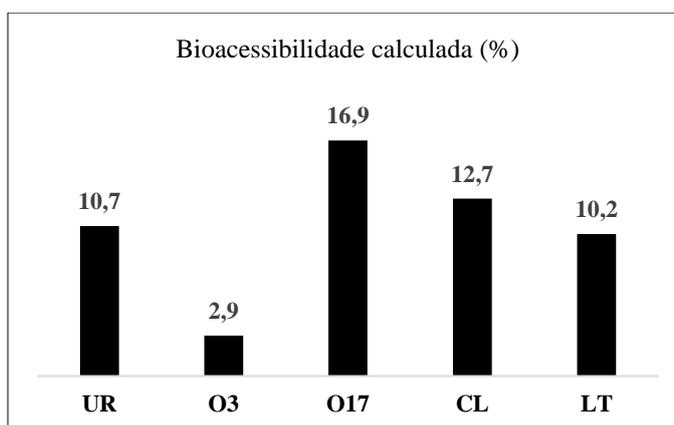


Figura 20. Bioacessibilidade em porcentagem da Uvaia reconstituída e produtos emulsionados.

(FONTE: Do próprio autor)

Nota: Bioacessibilidade calculada a partir da Equação 1. UR: Uvaia reconstituída (22 mg/mL); O3: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo 3,0% de óleo de soja; O17: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo 17,0% de óleo de soja; CL: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo creme de leite de 17,0% de gordura; LT: produto de Uvaia reconstituída incorporada à emulsão contendo leite de vaca a 3,0% de gordura.

Observou-se na Figura 20 que a amostra O17, constituída por uma emulsão contendo 17,0% de óleo de soja, exibiu um aumento na bioacessibilidade em comparação com a Uvaia liofilizada digerida, pois foi encontrado um valor de 16,9%. Esse aumento também foi observado para o produto composto por 17% de gordura proveniente do creme de leite, denominado CL, o qual apresentou um valor de bioacessibilidade de 12,7%. Esses dados sugerem que a incorporação da Uvaia à emulsão promoveu uma maior transferência de β -caroteno para as micelas durante o processo de digestão, especialmente nas amostras com maior teor de lipídios, quando comparadas à micelarização da Uvaia reconstituída que não foi incorporada à emulsão (FAILLA et al., 2014).

É importante notar que, apesar de ambos os produtos possuírem um percentual semelhante de lipídios, a amostra O17 apresentou um incremento maior do valor de bioacessibilidade em comparação ao CL. Essa discrepância pode ser atribuída à presença de outros compostos na composição do creme de leite, os quais podem ter exercido influência na micelarização dos carotenoides. A amostra LT, composta por aproximadamente 3,0% de gordura proveniente do leite de vaca, apresentou bioacessibilidade de 10,2% para o β -caroteno similar à Uvaia reconstituída (10,7%).

Observa-se que a baixa porcentagem em lipídeos para O3 associado à composição em óleo de soja não favoreceu a micelarização do β -caroteno após a simulação da digestão. Nessa amostra de produto emulsionado com 3,0% de óleo de soja, o valor apresentado de 2,9% representa um decréscimo da bioacessibilidade do β -caroteno, em relação à Uvaia reconstituída.

Dentre as fontes de lipídeo, a quantidade de óleo de soja, rico em ácidos graxos poliinsaturados, impactou positivamente a bioacessibilidade do β -caroteno, considerando que a Uvaia incorporada ao produto emulsionado contendo 17% de óleo promoveu maior formação de micelas em comparação ao produto constituído de 3% desse lipídeo. O creme de leite, rico em gordura saturada de origem animal, também foi capaz de aumentar a bioacessibilidade da Uvaia liofilizada e reconstituída. Goltz et al. (2012), consideraram que a fonte de lipídeos tem menos impacto na absorção de carotenoides do que as quantidades.

Baseado na literatura, uma hipótese é de que as gotículas da emulsão O17 retardaram a interação entre os carotenoides presentes na Uvaia e os pró-oxidantes na fase aquosa da digestão gastrointestinal, agindo como uma barreira de proteção durante o processo (SONG et al., 2019).

3.5. Conclusões

Pode-se concluir pelos dados obtidos que houve incremento na bioacessibilidade do β -caroteno proveniente da Uvaia liofilizada e reconstituída na presença de lipídeo.

O modelo de produto emulsionado obtido a partir de óleo de soja na concentração de 17% incorporado à uvaia reconstituída foi o mais promissor dentre os estudados, apresentando a maior concentração de β -caroteno após submetido ao processo de digestão *in-vitro*.

REFERÊNCIAS

- BRODKORB, A. et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991-1014, 2019.
- SÁ, M. C.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables - Comparison of analytical and calculated data. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 1, p. 37-51, 2004.
- ETCHEVERRY, P.; GRUSAK, M. A.; FLEIGE, L. E. Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1-20, 2012.
- FAILLA, M. L. et al. Unsaturated fatty acids promote bioaccessibility and basolateral secretion of carotenoids and α -tocopherol by Caco-2 cells. **Food Function**, v. 5, p. 1101-1112, 2014.
- FARIAS, D. DE P. et al. Distribution of nutrients and functional potential in fractions of *Eugenia pyriformis*: An underutilized native Brazilian fruit. **Food Research International**, v. 137, p. 1-7, 2020.
- GOLTZ, S.R. et al. Meal triacylglycerol profile modulates postprandial absorption of carotenoids in humans. **Molecular Nutr. Food Res**, v. 56, p. 866-877, 2012.
- JACOMINO, A. P. et al. Uvaia - *Eugenia pyriformis* Cambess. Em: Exotic Fruits Reference Guide, v. 1, p. 435-438, 2018.
- KOPEC, R. E.; FAILLA, M. L. Recent advances in the bioaccessibility and bioavailability of carotenoids and effects of other dietary lipophiles. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, p. 16-30, 2018.
- LIU, W. et al. Encapsulation of β -carotene-loaded oil droplets in caseinate/alginate microparticles: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 527-535, 2018.
- MERCADANTE, A. Z. et al. Carotenoid esters in foods - A review and practical directions on analysis and occurrence. **Food Research International**, v. 99, p. 830-850, 2017.
- RAMIREZ, M. R. et al. Evaluation of the polyphenolic content, anti-inflammatory and antioxidant activities of total extract from *eugenia pyriformes* cambess (*Uvaia*) fruits. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 405-412, 2012.
- SANTOS, P. D. DE F. et al. Application of spray drying, spray chilling and the combination of both methods to produce tucumã oil microparticles: characterization, stability, and β -carotene bioaccessibility. **Food Research International**, v. 172, p. 1-12, 2023.
- SGANZERLA, W. G.; DA SILVA, A. P. G. Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess – Myrtaceae): An overview from the origin to recent developments in the food industry – A bibliometric analysis. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 10, p. 1-10, 2022.
- SONG, H. Y.; MOON, T. W.; CHOI, S. J. Impact of antioxidant on the stability of β -carotene in model beverage emulsions: Role of emulsion interfacial membrane. **Food Chemistry**, v. 279, p. 194-201, 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Cromatogramas obtidos por HPLC da fração micelar dos produtos emulsionados e incorporados à Uvaia a partir da emulsão de fonte lipídica (LT): leite a 3% de gordura, (CL): creme de leite a 17% de gordura, (O3): 3% óleo de soja, (17): 17% óleo de soja.

