

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Saúde Pública**

**Efeitos do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*)  
em pó nos mecanismos envolvidos com a absorção de  
colesterol *in vitro* e em células Caco-2.**

**Marcela de Souza Figueira**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Nutrição em Saúde Pública da  
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de  
São Paulo para obtenção do título de Doutora  
em Ciências.**

**Área de Concentração: Nutrição em Saúde  
Pública**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Aparecida  
Ferraz da Silva Torres.**

**São Paulo**

**2021**

**Efeitos do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*)  
em pó nos mecanismos envolvidos com a absorção de  
colesterol *in vitro* e em células Caco-2.**

**Marcela de Souza Figueira**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Nutrição em Saúde Pública da  
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de  
São Paulo para obtenção do título de Doutora  
em Ciências.**

**Área de Concentração: Nutrição em Saúde  
Pública**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Aparecida  
Ferraz da Silva Torres.**

**Versão revisada**

**São Paulo**

**2021**

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

#### Catálogo da Publicação

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

Figueira, Marcela de Souza

Efeitos do extrato aquoso de guaraná (Paullinia cupana) em pó nos mecanismos envolvidos com a absorção de colesterol in vitro e em células Caco-2 / Marcela de Souza Figueira; orientadora Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres. -- São Paulo, 2021.

128 p.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2021.

1. Guaraná. 2. Polifenóis. 3. Bioacessibilidade. 4. Colesterol. I. Torres, Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva, orient. II. Título.

Aos meus pais Wagner e Fatima, meus  
maiores amores nesta vida, a quem  
devo tudo o que hoje sou.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por permitir que eu chegasse até aqui, abrindo portas neste caminho que escolhi seguir;

Agradeço à minha mãe Fatima, meu exemplo de mulher forte e mãe dedicada e zelosa, por todo apoio e compreensão, desde o momento em que falei que iria prestar o processo seletivo até o momento da minha mudança; sei que não foi fácil para nós a minha saída de casa e a mudança de cidade, mas ela esteve ao meu lado o tempo todo;

À minha irmã Paula, por sempre “segurar a barra” em casa e por ser a minha mais empolgada companheira de passeios nesta grande São Paulo;

Ao meu pai Wagner, pelo incentivo aos estudos desde criança, sempre nos dando exemplo de dedicação ao trabalho, sendo determinante para que eu sempre buscasse cada vez mais; mesmo de longe, a torcida pelo sucesso é grande;

À toda a minha família, pelo carinho e torcida sempre;

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Saúde Pública, professores e funcionários, por me receberem como aluna e permitir a minha qualificação profissional;

À Profa. Elizabeth Torres, por abrir as portas para mim e por me aceitar como sua aluna de doutorado, no dia em que bati à sua porta no Departamento de Nutrição da FSP, na primeira vez que entrei nesta faculdade; mesmo me conhecendo tão pouco, confiou e acreditou em mim;

À Universidade Federal do Pará (minha querida UFPA), onde fiz minha graduação e meu mestrado, ao Instituto de Ciências da Saúde (ICS) e à Faculdade de Nutrição (FANUT) onde hoje trabalho, por concederem meu afastamento para realizar o Doutorado; é a minha segunda casa e onde conheci grandes profissionais e fiz grandes amizades. Não posso deixar de destacar a Professora Orquídea Santos, minha grande incentivadora para realizar o doutorado, a Professora Vanessa Costa, amiga nos momentos mais difíceis e o Professor Sandro Percário, meu mestre, exemplo de professor, orientador, profissional e amigo;

Ao professor Marcelo Macedo Rogero, por abrir as portas do laboratório de cultura de células, permitindo que eu cultivasse minhas queridas células, por ser meu supervisor durante o estágio em docência e por todas as contribuições ao projeto, desde a qualificação à defesa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por conceder o apoio regular à pesquisa, viabilizando a realização do meu projeto e das minhas análises;

Às técnicas de laboratório Geni e Rosana; a “Ge” e a “Ro”, que muitas vezes pareciam ser uma só pessoa, sempre foram sensacionais, desde a ajuda na elaboração do projeto, no planejamento e na execução das análises laboratoriais e até mesmo nas conversas na hora do famoso cafezinho da tarde; jamais poderei agradecer o quanto fizeram por mim nesta jornada;

À banca examinadora, pelas valiosas contribuições ao trabalho;

Aos meus amigos e colegas da FSP e de laboratório Ana Clara Pinaffi (Ana), Leonardo Negrão (Leo), Karina Cordeiro, Bruna Ruschel, Vinícius, Nathalie Dantas (Nat), Simone, Jamila e Liania, por todos os momentos divididos, alegrias, anseios, sucessos, frustrações, e por estarem tão perto mesmo quando as circunstâncias nos mantiveram tão longe; Maiara Soares (Ma) e Gloria Guizellini (Glorinha), minhas queridas amigas que levarei para a vida; com vocês aprendi o significado da parceria, da paciência, da amizade e do apoio incondicional; Cintia Silva e Amanda, por dividirem o conhecimento do cultivo das células Caco-2. Sou grata por serem a minha família em São Paulo e por serem o apoio e o exemplo nos momentos de dificuldades.

À minha prima Lu Magno, com quem dividi o nosso lar durante dois anos, agradeço os momentos de parceria e alegrias na nova trajetória que nós duas, coincidentemente, decidimos iniciar na mesma cidade, na mesma universidade e no mesmo período;

Aos amigos da minha saudosa e calorosa Belém, Larissa Melo, Camila Aguiar, Bethania Tavares, Elza Caroline, Lorena, Manu, Alessandra, Acácio, Karen, além dos que não estão em Belém, Luana Sá, Leandra e Betânia Alvarenga, amigos que mesmo longe, estão sempre por perto;

E finalmente, porém não menos importante, ao meu amor Adriano, pelo apoio incondicional desde o momento em que decidi fazer o doutorado em São Paulo, até o momento da mudança; durante todo este tempo eu tive um amigo leal, um parceiro fiel e um companheiro de vida e de sentimentos, junto com a nossa Gigi; mesmo nos momentos de dificuldades, seu carinho, amor e bom humor sempre me levaram para frente. Tudo teria sido muito mais difícil sem você!

A todos que direta ou indiretamente participaram da minha trajetória; seria impossível listar todos os nomes aqui, mas todos tiveram importante papel neste capítulo da minha vida.

“Nunca ande por trilhas, pois assim só  
irá até onde outros já foram.”

Alexander Graham Bell

FIGUEIRA, M. S. [Efeitos do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó nos mecanismos envolvidos com a absorção de colesterol *in vitro* e em células Caco-2]. 2021. Tese - Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2021.

## RESUMO

**Introdução** - O risco de doenças cardiovasculares, dentre elas a aterosclerose, está associado com a hipercolesterolemia, resultado de fatores de risco comportamentais, metabólicos e genéticos. Intervenções dietéticas como o uso do guaraná (*Paullinia cupana*), podem ser úteis, uma vez que é um alimento rico em compostos bioativos como as catequinas, que possuem elevada atividade antioxidante, inibem a oxidação da lipoproteína de densidade baixa (LDL) e a peroxidação lipídica, sendo capazes de reduzir a concentração plasmática de colesterol, por mecanismos ainda não totalmente elucidados. **Objetivo** - Investigar os efeitos do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó sobre mecanismos envolvidos com a absorção de colesterol em modelos *in vitro* e em células Caco-2. **Métodos** - O extrato aquoso do guaraná em pó foi submetido à digestão *in vitro*, os fenólicos totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu e a determinação do perfil de fenólicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detector UV/VIS a 210 nm. A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade de absorbância de radical oxigênio (*Oxygen Radical Absorbance Capacity* - ORAC) e foram avaliadas a capacidade de inibição da lipase pancreática, de ligação com ácidos biliares, de interação com a fosfatidilcolina micelar e de inibição da solubilização micelar do colesterol de forma *in vitro*. Foi realizado ensaio de permeação do colesterol por um período de 2 h em células Caco-2 semeadas e diferenciadas em placas *transwell* de 24 poços com uma solução de micelas de colesterol e extrato de guaraná em diferentes concentrações. O teor de colesterol permeado foi determinado por HPLC/UV a 206 nm. Foi realizado o ensaio de *Western blotting* para determinar o conteúdo proteico dos transportadores de colesterol (NPC1L1, ABCG5, ABCG8) e LXR-alfa em células intestinais Caco-2 após a incubação com diferentes concentrações do extrato em 2 e 16 horas. **Resultados:** O conteúdo total de fenólicos do extrato de guaraná foi 104,36 ( $\pm$  3,62) mg EAG/g de guaraná em pó. Após o processo de digestão, este valor foi de 48,62 ( $\pm$  3,97) mg EAG/g de guaraná em pó, demonstrando a bioacessibilidade dos polifenóis. Foram identificados os compostos procianidina B1 (1,56  $\pm$  0,04 mg/g) e B2 (2,34  $\pm$  0,06 mg/g), catequina (24,26  $\pm$  0,63 mg/g), epicatequina (20,39  $\pm$  1,20 mg/g) e cafeína (34,93  $\pm$  0,75 mg/g)

no extrato não digerido. Após digestão *in vitro*, somente a catequina, epicatequina e cafeína foram bioacessíveis com 181,16 %, 136,78 % e 213,51 % de bioacessibilidade, respectivamente. A atividade antioxidante do extrato aquoso não digerido foi menor que do digerido, sendo os valores finais de ORAC de 2512 ( $\pm$  399) e 4321 ( $\pm$  778)  $\mu$ mol Eq Trolox/g de guaraná em pó, respectivamente. O extrato exibiu uma atividade inibitória da enzima lipase pancreática de forma dose-dependente, com IC<sub>50</sub> de 1033  $\mu$ g/mL. O extrato também demonstrou uma capacidade de ligação ao taurocolato de sódio de 45,63 ( $\pm$  8,50) % e de 44,30 ( $\pm$  8,88) % com concentrações de 1,0 mg/mL e 0,5 mg/mL, respectivamente, correspondendo a 71,78 ( $\pm$  13,36) % e 93,11 ( $\pm$  18,65) % da capacidade de ligação da colestiramina quando utilizada nas mesmas concentrações. Observou-se uma redução de 20,47 ( $\pm$  10,24) % e 17,06 ( $\pm$  12,88) % na concentração da fosfatidilcolina micelar quando o guaraná foi utilizado nas concentrações de 1,0 e 0,50 mg/mL, respectivamente, em comparação com a micela padrão sem amostra e uma inibição da solubilização micelar do colesterol de 10,14 % pelo guaraná a 1,0 mg/mL. Após o experimento de permeação, as concentrações de colesterol no compartimento basolateral foram de 197,89 ( $\pm$  3,95), 151,76 ( $\pm$  1,39) e 94,51 ( $\pm$  9,49)  $\mu$ g/mL, quando 0,025, 0,050 ou 0,075 mg/mL de guaraná foram utilizados, respectivamente, demonstrando redução de 23,31 % e 52,24 % à medida que a concentração de guaraná utilizada aumentou. Observou-se uma redução do conteúdo proteico do NPC1L1 após 16 horas de incubação com guaraná nas concentrações de 0,050 e 0,075 mg/mL. Em relação ao ABCG5, observou-se um aumento do conteúdo nas concentrações de 0,025 e 0,075 mg/mL de guaraná após 02 horas. Não foram observadas diferenças importantes nos conteúdos de ABCG8 e do LXR-alfa. **Conclusões:** O extrato aquoso de guaraná em pó demonstrou uma redução da absorção de colesterol em células Caco-2. O extrato também demonstrou uma atividade inibitória da lipase pancreática dose-dependente, uma boa capacidade de ligação aos ácidos biliares e de interação com a fosfatidilcolina micelar, além de uma capacidade de inibição da solubilização micelar do colesterol de forma *in vitro*. O extrato também foi capaz de modular negativamente o conteúdo proteico do NPC1L1 e positivamente o conteúdo do ABCG5. A sua ingestão pode ser considerada uma importante fonte alimentar com potencial efeito hipocolesterolêmico, capaz de reduzir a absorção de lipídios no intestino, podendo ser utilizado como adjuvante na regulação da hipercolesterolemia, provavelmente devido à presença de polifenóis.

**Descritores:** Guaraná; Polifenóis; Bioacessibilidade; Colesterol.

FIGUEIRA, M. S. **Effects of the aqueous extract of guarana (*Paullinia cupana*) powder on the mechanisms involved with the absorption of cholesterol *in vitro* and in Caco-2 cells.** 2021. Thesis - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021. Portuguese.

## ABSTRACT

**Introduction** - The risk of cardiovascular diseases, such as atherosclerosis, is associated with hypercholesterolemia, a result of behavioral and metabolic risk factors. Dietary interventions with the use of guarana (*Paullinia cupana*) may be useful, since it is a food rich in bioactive compounds such as catechins, which have high antioxidant activity, inhibit oxidation of LDL-c and lipid peroxidation, being able to lower blood cholesterol levels, by mechanisms not yet fully elucidated. **Objective** - To investigate the effects of guarana (*Paullinia cupana*) powder aqueous extract on mechanisms involved with the absorption of cholesterol *in vitro* and in Caco-2 cells. **Methods** - The guarana powder aqueous extract was subjected to *in vitro* digestion, the total phenolics content were quantified by the Folin-Ciocalteu method and the determination of the phenolic profile was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) UV/VIS at 210 nm. The antioxidant activity was determined by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and the ability to inhibit pancreatic lipase, to binding with bile acids, the interaction with micellar phosphatidylcholine and the inhibition of micellar solubilization of cholesterol *in vitro* were evaluated. Cholesterol permeation assay was performed for a period of 2 hours in Caco-2 cells seeded and differentiated in 24-transwell plates with a solution of cholesterol micelles and guarana extract at different concentrations. The permeated cholesterol content was determined by HPLC/UV at 206 nm. The Western blotting assay was performed to determine the protein content of cholesterol transporters (NPC1L1, ABCG5, ABCG8) and LXR-alpha in Caco-2 cells after incubation with different concentrations of the extract in 2 and 16 hours. **Results:** The total phenolic content of the guarana extract was 104.36 ( $\pm$  3.62) mg EAG/g of guarana powder. After the digestion process, this value was 48.62 ( $\pm$  3.97) mg EAG/g of guarana powder, demonstrating the bioaccessibility of the polyphenols. Procyanidin B1 (1.56  $\pm$  0.04 mg/g) and B2 (2.34  $\pm$  0.06 mg/g), catechin (24.26  $\pm$  0.63 mg/g), epicatechin (20.39  $\pm$  1.20 mg/g) and caffeine (34.93  $\pm$  0.75 mg/g) were identified in the undigested extract. After *in vitro* digestion, only catechin, epicatechin and caffeine were bioaccessible with 181.16 %, 136.78 % and 213.51 %

of bioaccessibility, respectively. The antioxidant activity of the undigested aqueous extract was lower than that digested, with the final ORAC values of 2512 ( $\pm$  399) and 4321 ( $\pm$  778)  $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$  of guarana powder. The extract exhibited an inhibitory activity of the pancreatic lipase enzyme in a dose-dependent manner, with an  $\text{IC}_{50}$  of 1033  $\mu\text{g/mL}$ . The extract also demonstrated a sodium taurocholate binding capacity of 45.63 ( $\pm$  8.50) % and 44.30 ( $\pm$  8.88) % with concentrations of 1.0 mg/mL and 0.5 mg/mL, respectively, corresponding to 71.78 ( $\pm$  13.36)% and 93.11 ( $\pm$  18.65)% of the cholestyramine binding capacity when used at the same concentrations. A reduction of 20.47 ( $\pm$  10.24) % and 17.06 ( $\pm$  12.88) % was observed in the concentration of micellar phosphatidylcholine when guarana was used at concentrations of 1.0 and 0.50 mg/mL, respectively, compared to the standard micelle without sample and an inhibition of 10.14 % micellar cholesterol solubilization by guarana at 1.0 mg/mL. After the permeation experiment, the cholesterol concentrations in the basolateral compartment were 197.89 ( $\pm$  3.95), 151.76 ( $\pm$  1.39) and 94.51 ( $\pm$  9.49)  $\mu\text{g/mL}$ , when 0.025, 0.050 or 0.075 mg/mL of guarana were used, respectively, showing a reduction of 23.31 % and 52.24 % as the concentration of guarana used increased. A reduction in the protein content of NPC1L1 was observed after 16 hours of incubation with guarana at concentrations of 0.050 and 0.075 mg/mL. After 02 hours, an increase in the content of ABCG5 at concentrations of 0.025 and 0.075 mg/mL of guarana was observed. No significant differences were observed in the contents of ABCG8 and LXR- $\alpha$ . **Conclusions:** The aqueous extract of guarana powder showed a reduction in the absorption of cholesterol in Caco-2 cells. The extract also demonstrated a dose-dependent pancreatic lipase inhibitory activity, a good ability to bind bile acids and to interact with micellar phosphatidylcholine, in addition to an ability to inhibit micellar solubilization of cholesterol *in vitro*. The extract was also able to negatively modulate the protein content of NPC1L1 and positively the content of ABCG5. Its intake can be considered an important dietary source with a potential hypocholesterolemic effect, capable of reducing the absorption of lipids in the intestine, and can be used as an adjunct in the control of hypercholesterolemia, probably due to the presence of polyphenols.

**Descriptors:** Guarana; Polyphenols; Bioaccessibility; Cholesterol.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	20
1.1	CONCEITOS E EPIDEMIOLOGIA	20
1.2	COLESTEROL E ÁCIDOS BILIARES	23
1.2.1	Mecanismos de captação e absorção intestinal do colesterol	24
1.2.2	Transportadores de membrana celular	26
1.2.3	Receptor hepático X (LXR)	29
1.2.4	Metabolismo dos ácidos biliares	30
1.3	COMPOSTOS FENÓLICOS	32
1.3.1	Determinação do conteúdo de compostos fenólicos em amostras vegetais	35
1.3.2	Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos	37
1.3.3	Modelo experimental <i>in vitro</i> de avaliação de biacessibilidade e biodisponibilidade de compostos em células Caco-2	41
1.3.4	Efeitos benéficos dos polifenóis na saúde e sobre o metabolismo lipídico	46
1.4	GUARANÁ ( <i>Paullinia cupana</i> )	50
1.4.1	Efeitos benéficos do guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) na saúde	55
1.4.2	Efeitos benéficos do guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) na saúde cardiovascular	56
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	59
2.1	OBJETIVO GERAL	59
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
<b>3</b>	<b>MÉTODOS</b>	60
3.1	DESENHO DO ESTUDO	60
3.2	AMOSTRAS E PREPARO DOS EXTRATOS	60
3.3	DETERMINAÇÃO DOS SÓLIDOS SOLÚVEIS	61
3.4	DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO AQUOSO DO GUARANÁ EM PÓ	61
3.5	QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS	62

	FENÓLICOS DO EXTRATO AQUOSO DE GUARANÁ EM PÓ ANTES E APÓS A DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> E APÓS A PERMEAÇÃO EM CÉLULAS CACO-2	
3.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DE GUARANÁ EM PÓ ANTES E APÓS A DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	63
3.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA	64
3.8	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO COM ÁCIDOS BILIARES	65
3.9	PREPARO DE MICELAS DE COLESTEROL	66
3.10	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO COM A FOSFATIDILCOLINA MICELAR	66
3.11	ENSAIO DA INIBIÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO MICELAR DO COLESTEROL <i>IN VITRO</i>	67
3.12	CULTIVO DE CÉLULAS CACO-2	68
3.13	ANÁLISE DA PERMEAÇÃO DO COLESTEROL EM CÉLULAS CACO-2	68
3.14	QUANTIFICAÇÃO DO COLESTEROL NO PERMEADO DE CÉLULAS CACO-2	69
3.15	EXTRAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DE CÉLULAS CACO-2 PARA DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DOS TRANSPORTADORES DE COLESTEROL POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	70
3.16	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DOS EXTRATOS CELULARES	71
3.17	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	71
3.18	ANÁLISE DOS DADOS	72
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>73</b>
4.1	CONTEÚDO TOTAL DE FENÓLICOS DO EXTRATO AQUOSO DE GUARANÁ EM PÓ ANTES E APÓS A DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> E APÓS A PERMEAÇÃO EM CÉLULAS CACO-2	73
4.2	PERFIL DE FENÓLICOS DO EXTRATO AQUOSO DE	74

	GUARANÁ EM PÓ ANTES E APÓS A DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> E APÓS A PERMEAÇÃO EM CÉLULAS CACO-2	
4.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DE GUARANÁ EM PÓ ANTES E APÓS A DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	77
4.4	ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA	79
4.5	CAPACIDADE DE LIGAÇÃO COM ÁCIDOS BILIARES	84
4.6	INTERAÇÃO COM A FOSFATIDILCOLINA MICELAR	88
4.7	INIBIÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO MICELAR DO COLESTEROL <i>IN VITRO</i>	89
4.8	PERMEAÇÃO DO COLESTEROL EM CÉLULAS CACO-2	91
4.9	CONTEÚDO DE PROTEÍNAS DETERMINADO POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	94
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	105
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	106
	<b>APÊNDICES</b>	118
	Apêndice 1 - Curvas padrão do ácido gálico	118
	Apêndice 2 - Curvas de calibração dos padrões de fenólicos	119
	Apêndice 3 - Curva padrão do trolox	122
	Apêndice 4 - Curva padrão do taurocolato de sódio	123
	Apêndice 5 - Curva padrão do colesterol micelar	124
	Apêndice 6 - Curva padrão do colesterol no permeado de células Caco-2	125
	Apêndice 7 - Curvas padrão de albumina ( <i>bovine serum albumin</i> - BSA)	126
	<b>CURRÍCULO LATTES</b>	127
	<b>CURRÍCULO LATTES DO ORIENTADOR</b>	128

## Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Composição nutricional e fitoquímica do guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó.	55
Tabela 2 -	Conteúdo de fenólicos totais do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó não digerido, pós digestão <i>in vitro</i> e pós permeação em células Caco-2 na presença de colesterol.	73
Tabela 3 -	Quantificação de procianidinas, catequinas e cafeína do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó não digerido e bioacessibilidade pós digestão <i>in vitro</i> .	74
Tabela 4 -	Tempo de retenção, intervalo de linearidade, coeficiente de calibração, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de procianidinas, catequinas e cafeína por HPLC-UV, método isocrático a 210 nm.	76
Tabela 5 -	Valores de ORAC relativo e ORAC final do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó não digerido e pós digestão <i>in vitro</i> .	78
Tabela 6 -	Valores de taurocolato de sódio ligado ao extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó após a digestão <i>in vitro</i> e ligado à resina colestiramina.	84
Tabela 7 -	Percentual de inibição da solubilização micelar do colesterol na presença do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó após digestão <i>in vitro</i> .	89

## Lista de Figuras

Figura 1 -	Mecanismo de captação e absorção intestinal do colesterol.	26
Figura 2 -	Classificação dos compostos fenólicos e flavonoides.	33
Figura 3 -	Representação da estrutura química dos compostos fenólicos e dos flavonoides.	34
Figura 4 -	Definições e principais processos envolvidos na biodisponibilidade de compostos.	38
Figura 5 -	Cultivo e aparência das células Caco-2.	42
Figura 6 -	Diferenciação da monocamada de células Caco-2.	44
Figura 7 -	Cultivo e troca de meio de cultura de células Caco-2.	45
Figura 8 -	Características do fruto do guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ).	50
Figura 9 -	Formas de comercialização do guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ).	53
Figura 10 -	Desenho do estudo.	60
Figura 11 -	Cromatograma representativo da mistura de padrões de fenólicos injetados em HPLC-UV a 210 nm.	77
Figura 12 -	Cromatograma representativo do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó não digerido (preto), fração bioacessível após digestão <i>in vitro</i> (azul) e branco de enzimas digestivas e sais biliares (vermelho) injetados em HPLC-UV a 210 nm.	77
Figura 13 -	Curva de decaimento da fluoresceína (Intensidade da Fluoresceína relativa) <i>versus</i> tempo (minutos) induzida pelo radical AAPH na presença do extrato aquoso do guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó não digerido e pós digestão <i>in vitro</i> no ensaio da capacidade de absorbância de radical oxigênio ( <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> - ORAC), em comparação com o padrão Trolox.	79
Figura 14 -	Atividade inibitória da lipase pancreática do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó após digestão <i>in vitro</i> ( $IC_{50} = 1033 \mu\text{g/mL}$ ; $r^2 = 0,9915$ ).	80
Figura 15 -	Atividade inibitória da lipase pancreática do Orlistat ( $IC_{50} = 0,14 \mu\text{g/mL}$ ; $r^2 = 0,968$ ).	80
Figura 16 -	Percentual de ligação ao taurocolato de sódio do extrato aquoso	85

de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após a digestão *in vitro*, e do padrão colestiramina ( $p$  valor = 0,122).

- Figura 17 - Percentual de ligação ao taurocolato de sódio do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após a digestão *in vitro*, em relação ao padrão colestiramina. 85
- Figura 18 - Percentual de fosfatidilcolina em relação às micelas padrão após interação do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após a digestão *in vitro* com a fosfatidilcolina micelar. 88
- Figura 19 - Concentração de colesterol do compartimento basolateral em células Caco-2 após a permeação do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro* na presença de micelas de colesterol identificado por HPLC/UV a 206 nm. 92
- Figura 20 - Cromatograma do padrão de colesterol utilizado para quantificar o colesterol no permeado de células Caco-2 (Concentração: 262,5 µg/mL; identificado por HPLC/UV a 206 nm; tempo de retenção: 7 min). 93
- Figura 21 - Cromatograma do colesterol do compartimento basolateral em células Caco-2 após a permeação do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó digerido (0,025 mg/mL) na presença de micelas de colesterol (identificado por HPLC/UV a 206 nm; tempo de retenção: 7 min). 93
- Figura 22 - Cromatograma do colesterol do compartimento basolateral em células Caco-2 após a permeação do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó digerido (0,050 mg/mL) na presença de micelas de colesterol (identificado por HPLC/UV a 206 nm; tempo de retenção: 7 min). 93
- Figura 23 - Cromatograma do colesterol do compartimento basolateral em células Caco-2 após a permeação do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó digerido (0,075 mg/mL) na presença de micelas de colesterol (identificado por HPLC/UV a 206 nm; tempo de retenção: 7 min). 94
- Figura 24 - Efeito do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro* sobre o conteúdo proteico do NPC1L1 em 95

	células Caco-2.	
Figura 25 -	Efeito do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó após digestão <i>in vitro</i> sobre o conteúdo proteico do ABCG5 em células Caco-2.	96
Figura 26 -	Efeito do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó após digestão <i>in vitro</i> sobre o conteúdo proteico do ABCG8 em células Caco-2.	97
Figura 27 -	Efeito do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó após digestão <i>in vitro</i> sobre o conteúdo proteico do LXR-alfa em células Caco-2.	98
Figura 28 -	Comparação do efeito do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó após digestão <i>in vitro</i> sobre o conteúdo proteico de transportadores de colesterol em células Caco-2 após 02 horas <i>versus</i> 16 horas de exposição.	99
Figura 29 -	Efeito do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó após digestão <i>in vitro</i> sobre o conteúdo de NPC1L1 e sobre a captação e absorção de colesterol em células Caco-2.	100
Figura 30 -	Curva de calibração de ácido gálico do método de determinação do conteúdo de fenólicos totais do extrato aquoso do guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó (Curva 1).	118
Figura 31 -	Curva de calibração de ácido gálico do método de determinação do conteúdo de fenólicos totais do extrato aquoso do guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó (Curva 2).	118
Figura 32 -	Curva padrão da Procianidina B1 para a determinação do perfil de fenólicos do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó.	119
Figura 33 -	Curva padrão da Procianidina B2 para a determinação do perfil de fenólicos do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó.	119
Figura 34 -	Curva padrão da Catequina para a determinação do perfil de fenólicos do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó.	120
Figura 35 -	Curva padrão da Epicatequina para a determinação do perfil de fenólicos do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó.	120
Figura 36 -	Curva padrão da Cafeína para a determinação do perfil de fenólicos do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) em pó.	121

- Figura 37 - Curva de calibração de TROLOX do método de determinação da atividade antioxidante pelo ensaio da capacidade de absorbância de radical oxigênio (do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity* – ORAC) do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó. 122
- Figura 38 - Curva padrão do taurocolato de sódio para a determinação da capacidade de ligação aos ácidos biliares do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro*. 123
- Figura 39 - Curva padrão do colesterol para determinação da capacidade de inibição da solubilização micelar do colesterol do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro*. 124
- Figura 40 - Curva padrão do colesterol utilizada na quantificação de colesterol no permeado de células Caco-2. 125
- Figura 41 - Curva padrão de albumina (*bovine serum albumin* - BSA) para quantificação da proteína das amostras de extratos celulares (Curva 1). 126
- Figura 42 - Curva padrão de albumina (*bovine serum albumin* - BSA) para quantificação da proteína das amostras de extratos celulares (Curva 2). 126

## Siglas Utilizadas

4-MUO – 4-metilumbeliferil oleato

AAPH – dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano)

ABC – *ATP-binding cassette*

ACAT2 – *acyl-CoA:cholesterol acyltransferase isoform 2* (acilcolesterol aciltransferase 2)

AG – ácidos graxos

ANOVA – *analysis of variance* (análise de variância)

AOPP – *advanced oxidation protein products* (produtos da oxidação avançada de proteínas)

Apo – apolipoproteína

AUC – *area under curve* (área sob a curva)

AVC – acidente vascular cerebral

BCA – *bicinchoninic acid* (ácido bicinconínico)

BSA – *bovine serum albumin* (albumina sérica bovina)

CG – cromatografia gasosa

CL – colesterol livre

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*)

DCNT – doenças crônicas não transmissíveis

DAC – doença arterial coronariana

DAD – detector de arranjo de diodos

DCV – doenças cardiovasculares

DMEN – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EC – epicatequina

ECG – epicatequina galato

EGC – epigalocatequina

EGCG – epigalocatequina galato

ERO – espécies reativas de oxigênio

FL – fosfolípidos

FC – fosfatidilcolina

GAPDH – *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase* (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)

HAS – hipertensão arterial sistêmica

HDL – *high density lipoprotein* (lipoproteína de densidade alta)

HMG-CoA – hidroximetilglutaril Coenzima A

HPLC – *high performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

LD – limite de detecção

LDL – *low density lipoprotein* (lipoproteína de densidade baixa)

LDL-ox – LDL oxidada

LDLr – receptor de LDL

LP – lipoproteínas

LQ – limite de quantificação

LXR – *liver X receptor* (receptor hepático X)

MTP – *microsomal triglyceride transfer protein* (proteína microssomal de transferência)

NO – óxido nítrico

NPC1L1 – *Niemann-Pick C1-Like 1*

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORAC – *oxygen radical absorbance capacity* (capacidade de absorbância de radical oxigênio)

PB1 – procianidina B1

PB2 – procianidina B2

QM – quilomícrons

RXR – *retinoid X receptor* (receptor retinoide X)

SB – sais biliares

SM – síndrome metabólica

SOD – superóxido dismutase

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

TEER – *transepithelial electrical resistance* (resistência elétrica transepitelial)

TAG – triacilgliceróis

TJ – *tight junctions*

TRC – transporte reverso do colesterol

UV – Ultravioleta

VLDL – *very low density lipoprotein* (lipoproteína de densidade muito baixa)

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONCEITOS E EPIDEMIOLOGIA

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são as principais causas de óbitos no mundo e se caracterizam por ter uma etiologia múltipla, origem não infecciosa, apresentam longa duração e normalmente lenta progressão, associando-se a deficiências e incapacidades funcionais. Sua ocorrência é muito influenciada não apenas pelo estilo de vida, mas também pelas condições de vida e pelas desigualdades sociais. O número de pessoas, famílias e comunidades acometidas está aumentando e os fatores de risco comuns e modificáveis incluem tabaco, uso abusivo de álcool, dieta não saudável, atividade física insuficiente, sobrepeso/obesidade, aumento da pressão sanguínea, aumento da concentração de glicose na circulação e aumento do colesterol (MALTA e SILVA JR, 2013; WHO, 2020a).

As DCNT, como doenças cardíacas, câncer, doenças respiratórias crônicas e diabetes, representam uma ameaça para a saúde e desenvolvimento das nações. O aumento da ocorrência das DCNT observado nas últimas décadas reflete efeitos negativos do processo de globalização e urbanização rápida, como o sedentarismo e alimentação inadequada. Dentre estas doenças podemos destacar as doenças cardiovasculares (DCV), as quais, nas últimas décadas, foram responsáveis por 30% da mortalidade mundial (MALTA et al., 2011; MALTA e SILVA JR, 2013; SIMÃO et al., 2014).

Em 2016, cerca de 41 milhões de mortes ocorreram devido às DCNT, representando 71% do total de mortes. A maioria dessas mortes foi causada pelas quatro principais doenças não transmissíveis, dentre estas as doenças cardiovasculares, com 17,9 milhões de mortes, câncer, com 9 milhões de óbitos, doença respiratória crônica, com 3,8 milhões de mortes e diabetes, com 1,6 milhão de óbitos (WHO, 2020b).

No que se refere ao Brasil, as DCNT também constituem um grave problema de Saúde Pública e correspondem a 75 % das causas de mortes, com destaque para doenças do aparelho circulatório (31,3%), câncer (16,3%), doença respiratória crônica (5,8%) e diabetes (5,2%). Os processos de transição demográfica, epidemiológica e nutricional, a urbanização e o

crescimento econômico e social contribuem para o maior risco de desenvolvimento de doenças crônicas pela população (MALTA e SILVA JR, 2013; MALTA et al., 2017).

As DCV são definidas como distúrbios do coração e dos vasos sanguíneos e quatro das cinco mortes por esta causa (80%) são devidas a ataques cardíacos e a acidentes vasculares cerebrais (AVC). Os indivíduos em risco de DCV podem apresentar pressão arterial elevada, além de glicose e lipídios séricos alterados, bem como sobrepeso e obesidade. Todas estas alterações podem ser facilmente identificadas em serviços de atenção primária à saúde e aqueles indivíduos com maior risco de DCV identificados devem receber um tratamento adequado, podendo, conseqüentemente, prevenir mortes prematuras (WHO, 2020c).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as DCV constituem a principal causa de morte no mundo, com 17,9 milhões de óbitos todos os anos, correspondendo a 31% de todas as mortes, sendo que mais de 75% destas mortes ocorrem em países de média e baixa renda. A OMS relata que 85 % das mortes por DCV ocorrem por ataques cardíacos e derrames (WHO, 2020c).

No Brasil, as DCV também são a principal causa de morte. Apesar de a mortalidade ter caído ao longo dos anos (cerca de 34 % para doenças cerebrovasculares e 44% para outras doenças cardíacas), ela continua alta. Em 2004, a mortalidade por DCV foi de 286/100.000 pessoas, constituindo as doenças que geram os maiores custos com relação a internações hospitalares (em torno de 12,7 % em 2007) (MALTA e SILVA JR, 2013).

O risco de DCV, dentre elas a aterosclerose, está associado com fatores de risco comportamentais como uma dieta não saudável, inatividade física e uso de tabaco, bem como de variações na composição da microbiota intestinal e da genética do hospedeiro. Esses fatores de risco comportamentais impactam nos principais fatores de risco metabólicos, como o excesso de peso/obesidade, a hipertensão arterial, o aumento da glicose, a hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia (GARCIA-CONESA, 2017; MALTA e SILVA JR, 2013; TRISAT et al., 2017; WHO, 2020d). No que diz respeito às alterações nos padrões de dietas, observa-se o aumento do consumo de alimentos com elevada densidade calórica proveniente de gorduras, particularmente gordura saturada e baixos em carboidratos complexos (WHO, 2003).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial, que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. A disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção destas no espaço subendotelial, que ocorre de maneira proporcional à concentração destas lipoproteínas no plasma, principalmente as lipoproteínas de densidade baixa (LDL). Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação. As lesões iniciais, denominadas estrias gordurosas, caracterizam-se por acúmulo de colesterol em macrófagos, diferenciados a partir de monócitos que migram para o espaço subendotelial atraídos pela presença de moléculas de adesão leucocitária que, por sua vez, são estimuladas pela LDL oxidada. Os macrófagos repletos de lipídeos são chamados de células espumosas e constituem o principal componente das estrias gordurosas. Uma vez ativados, os macrófagos são responsáveis pela progressão da placa aterosclerótica por meio da secreção de citocinas inflamatórias e de enzimas proteolíticas, capazes de degradar colágeno e outros componentes teciduais locais (FALUDI et al., 2017).

Segundo SIMÃO et al. (2014) e SORAN et al. (2018), o colesterol elevado pode ser considerado o principal fator de risco modificável da doença arterial coronariana (DAC), e seu controle, principalmente da concentração do colesterol da lipoproteína de densidade baixa (LDL-c), traz grande benefício na redução de desfechos cardiovasculares como infarto e morte por doença coronariana. Intervenções dietéticas são recomendadas, uma vez que as concentrações plasmáticas de colesterol possuem correlação com o consumo aumentado de colesterol.

O impacto das morbidades supracitadas pode ser revertido por meio de intervenções amplas e custo-efetivas de promoção de saúde, para redução de seus fatores de risco, e pela melhoria da atenção à saúde, detecção precoce e tratamento oportuno. A mudança de estilo de vida é uma importante estratégia para prevenção de DCV. Intervenções dietéticas com uso de alimentos naturais podem ser úteis para indivíduos com risco cardiovascular. Neste sentido, o processamento lipídico no intestino tem sido identificado como um alvo em potencial para a inibição da absorção de gordura (ácidos graxos) e colesterol (MALTA et al., 2011; TRISAT et al., 2017).

## 1.2 COLESTEROL E ÁCIDOS BILIARES

Os lipídeos são substâncias orgânicas caracterizadas pela insolubilidade em meio aquoso. Dos pontos de vista fisiológico e clínico, os lipídeos circulantes biologicamente mais relevantes são os fosfolipídeos (FL), os triacilgliceróis (TAG), os ácidos graxos (AG) e o colesterol. Os fosfolipídeos formam a estrutura básica das membranas celulares. Os TAG são formados a partir de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e constituem uma das formas de armazenamento energético mais importantes no organismo, depositados nos tecidos adiposo e muscular. O colesterol, por sua vez, é precursor dos hormônios esteroidais, dos ácidos biliares e da vitamina D. Além disso, como constituinte das membranas celulares (ocupando os espaços entre os grupos polares), o colesterol atua na fluidez destas e na ativação de enzimas ali situadas (ZHAO e DAHLMAN-WRIGHT, 2010; PASSARELLI, 2011; XAVIER et al., 2013; SORAN et al., 2018).

As lipoproteínas (LP) constituem agregados macromoleculares que permitem a solubilização e o transporte desses lipídeos, que são substâncias geralmente hidrofóbicas, no meio aquoso plasmático. São compostas por lipídeos e proteínas denominadas apolipoproteínas (Apos), as quais possuem papéis estruturais e regulatórios, como a modificação da afinidade por receptores e da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas (PASSARELLI, 2011; XAVIER et al., 2013; SORAN et al., 2018).

O colesterol é fornecido ao organismo por duas vias, a exógena (a partir da dieta) ou endógena (sintetizado *de novo* por diversas células do corpo). O metabolismo do colesterol destas duas fontes, o qual é bastante complexo em humanos, determina a concentração de colesterol no sangue normais em jejum. Fatores como ácidos graxos e alterações metabólicas, como diabetes e obesidade, bem como fatores genéticos também influenciam a concentração de colesterol no sangue (ARNOLD e KWITEROVICH JR, 2003; ZHAO e DAHLMAN-WRIGHT, 2010).

Os principais fatores exógenos que podem aumentar a concentração plasmática de colesterol são: elevada ingestão de colesterol dietético e dietas com elevado teor de ácidos graxos saturados e calorias excessivas. O fígado, por sua vez, é o principal órgão de síntese de

colesterol endógeno, o qual regula rigorosamente a entrada de colesterol da dieta, a biossíntese do colesterol, a secreção e a absorção de colesterol das lipoproteínas plasmáticas, a conversão do colesterol em bile e a recaptção do colesterol biliar e de ácidos biliares do intestino para o fígado. Assim, um delicado equilíbrio é mantido entre a absorção do colesterol dietético, sua síntese e excreção fecal (ARNOLD e KWITEROVICH JR, 2003; KIDAMBI e PATEL, 2008).

Uma dieta humana normal contém em torno de 200 a 500 mg de colesterol por dia e cerca de 30 a 60 % do colesterol intestinal é absorvido. O restante é reabsorvido na forma de ácidos biliares ou eliminado por via fecal. O colesterol sanguíneo circula como um componente das lipoproteínas e sua concentração em humanos gira em torno de 10 a 300 mg/dL. As principais lipoproteínas plasmáticas contendo colesterol são os quilomícrons (QM), lipoproteína de densidade muito baixa (*very low density lipoprotein* - VLDL), lipoproteína de densidade baixa (*low density lipoprotein* - LDL) e lipoproteína de densidade alta (*high density lipoprotein* - HDL). Em adultos humanos, a HDL está envolvida na transferência do excesso de colesterol dos tecidos advindos da LDL para o fígado, processo este denominado transporte reverso do colesterol (TRC) (CHARLTON-MENYS e DURRINGTON, 2008). Os QM recebem destaque, uma vez que estão envolvidos no processo de absorção do colesterol intestinal, como descrito a seguir.

### 1.2.1 Mecanismos de captação e absorção intestinal do colesterol

Os triacilgliceróis provenientes da dieta sofrem ação da lipase pancreática no lúmen intestinal e são absorvidos na forma de ácidos graxos e monoacilgliceróis. No enterócito, são ressintetizados e se ligam à ApoB48 para formar os QM. O colesterol livre (CL) também é captado pelos enterócitos após a incorporação nas micelas no lúmen intestinal e, após a captação, atinge o retículo endoplasmático, onde é reesterificado em grande parte pela ação da enzima acilcolesterol aciltransferase 2 (*acyl-CoA:cholesterol acyltransferase isoform 2* - ACAT2), específica para o colesterol. Estes ésteres de colesterol formados sofrem a ação da proteína microsomal de transferência (*microsomal triglyceride transfer protein* - MTP), que transfere triacilgliceróis para os quilomícrons nascentes, tornando-os maduros. Uma vez conjugados, colesterol, fosfolípidos e apolipoproteínas nascentes (apoB48) são transportados ricos em triacilgliceróis do retículo endoplasmático ao aparelho de Golgi, na forma de

estrutura macromolecular complexa, denominada quilomícron e são secretados pelos enterócitos na linfa e atingem a circulação sanguínea via ducto torácico (sistema linfático) (WANG, 2007; CHARLTON-MENYS e DURRINGTON, 2008; PASSARELLI, 2011).

As micelas são pequenos agregados de moléculas anfipáticas com diâmetro em torno de 4 a 8 nm, as quais são formadas por sais biliares, fosfolípídeos, ácidos graxos, além do colesterol (advindo da dieta e da secreção hepática). Sua região hidrofóbica projeta-se para o interior, enquanto a porção hidrofílica faz contato com o meio aquoso adjacente aumentando a sua solubilidade e permitindo a sua captação pela borda em escova do enterócito (WANG, 2007; CHARLTON-MENYS e DURRINGTON, 2008; PASSARELLI, 2011).

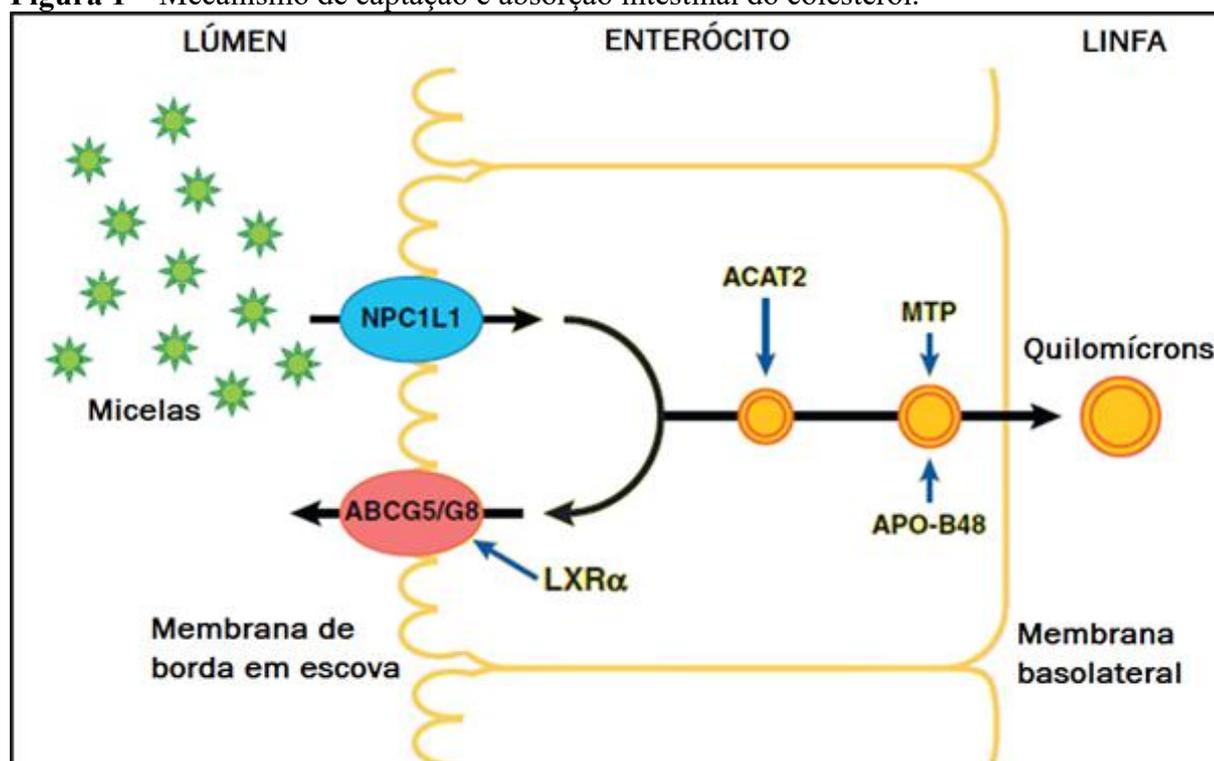
A absorção de colesterol é um processo de múltiplos passos, tanto de degradação quanto de síntese, regulados por múltiplos genes a nível de enterócitos. A eficiência da absorção de colesterol pode ser determinada pelo efeito entre o influxo e o efluxo de moléculas de colesterol intraluminal que atravessam a membrana de borda em escova do enterócito (WANG, 2007).

É importante diferenciar dois termos: a captação e a absorção intestinal do colesterol. Conceitualmente, o primeiro termo refere-se à entrada do colesterol do lúmen para as células absorptivas intestinais; o segundo termo, por sua vez, refere-se à transferência do colesterol intraluminal para o ducto linfático torácico ou intestinal. Embora todo o comprimento do intestino delgado seja capaz de absorver o colesterol do lúmen, os principais locais de absorção estão na parte superior do intestino delgado, isto é, o duodeno e o jejuno proximal. O colesterol e os ácidos biliares que não são reabsorvidos no intestino são excretados nas fezes (WANG, 2007). O mecanismo de captação e absorção intestinal do colesterol pode ser observado em detalhes na Figura 1.

O acúmulo de colesterol em excesso no sangue pode levar às dislipidemias e à aterosclerose. Portanto, a regulação adequada da remoção do colesterol da parede endotelial pode auxiliar na proteção do sistema cardiovascular contra a aterosclerose. Os transportadores de membrana celular possuem papel chave na regulação do metabolismo lipídico, tanto no TRC, na inibição da absorção intestinal do colesterol da dieta, na absorção intestinal e na reabsorção do colesterol biliar, bem como na eliminação do colesterol da corrente sanguínea

(SABEVA et al., 2009; YU et al., 2014; DEMINA et al., 2016; PIRILLO et al., 2016; SANZ-BUENHOMBRE et al., 2016). Alguns transportadores moleculares são identificados como componentes essenciais dessas vias metabólicas (KIDAMBI e PATEL, 2008), como veremos a seguir.

**Figura 1** – Mecanismo de captação e absorção intestinal do colesterol.



O colesterol livre (CL) proveniente da dieta é captado pelos enterócitos após a incorporação nas micelas no lúmen intestinal e atinge o retículo endoplasmático, onde é reesterificado em grande parte pela ação da enzima acilcolesterol aciltransferase 2 (*acyl-CoA:cholesterol acyltransferase isoform 2* - ACAT2), específica para o colesterol. Os ésteres de colesterol formados sofrem a ação da proteína microsossomal de transferência (*microsomal triglyceride transfer protein* - MTP), que transfere triacilgliceróis (TAG) para os quilomícrons nascentes, tornando-os maduros. Colesterol, fosfolípidos e apolipoproteínas nascentes (apoB48) conjugados são transportados ricos em TAG do retículo endoplasmático ao aparelho de Golgi, na forma de estrutura macromolecular complexa, denominada quilomícron, e são secretados pelos enterócitos na linfa e atingem a circulação sanguínea via ducto torácico (sistema linfático). A proteína Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), um transportador de influxo de colesterol localizada na membrana apical do enterócito, pode facilitar ativamente a captação de colesterol, promovendo sua passagem através da membrana da borda em escova do enterócito. Em contraste, ABCG5 e ABCG8 promovem efluxo ativo de colesterol do enterócito para o lúmen intestinal para excreção. O receptor hepático X alfa (LXR alfa) pode regular de forma positiva os genes ABCG5 e ABCG8 em resposta ao colesterol dietético elevado. Fonte: WANG (2007), adaptado.

### 1.2.2 Transportadores de membrana celular

Os transportadores *ATP-binding cassette* A1 (ABCA1) e G1 (ABCG1) são proteínas chave no TRC, uma vez que são responsáveis pelo efluxo de colesterol livre dos macrófagos evitando a formação das células espumosas e transferindo estes para receptores extracelulares

como o HDL por meio da apolipoproteína A1 (ApoA1), facilitando a formação das partículas de HDL ricas em colesterol (YU et al., 2014; DEMINA et al., 2016).

A HDL recebe o colesterol livre via receptores ABCA1 de tecidos extra-hepáticos e do fígado e, após sua esterificação, transfere o colesterol esterificado para as VLDL e LDL retornando para o fígado via receptores LDL (CHARLTON-MENYS e DURRINGTON, 2008). A HDL também transporta o colesterol esterificado até o fígado, onde é captada pelos receptores SR-B1 (FALUDI et al., 2017).

Os transportadores ABC da subfamília G membro 5 (ABCG5) e membro 8 (ABCG8), por sua vez, também possuem papel muito importante no metabolismo lipídico. Eles funcionam como um heterodímero localizados na membrana apical da borda em escova do intestino delgado e inibem a absorção intestinal do colesterol da dieta por meio do efluxo deste esterol do enterócito para o lúmen intestinal; também se localizam no fígado, onde são capazes de promover a secreção do colesterol dos hepatócitos para a bile (KIDAMBI e PATEL, 2008; SABEVA et al., 2009; YU et al., 2014).

O ABCG5 e o ABCG8 purificados têm uma atividade de ATPase muito baixa e a expressão de uma dessas proteínas isoladamente produz transportadores não funcionais. No entanto, sua co-expressão resulta na estabilização de ambas as proteínas uma pela outra e no aumento da atividade da ATPase, mostrando que o dímero é a espécie ativa *in vivo* (KIDAMBI e PATEL, 2008). A disfunção ou a redução da expressão gênica destes transportadores ABC acelera o processo da aterogênese. Mutações no dímero ABCG5/ABCG8 estão associadas com o quadro de sitosterolemia, uma doença rara, hereditária, autossômica e recessiva do metabolismo lipídico, caracterizada pelo aumento da absorção intestinal do colesterol e redução da sua excreção biliar, levando ao aumento das concentrações séricas de LDL-c. Os indivíduos com sitosterolemia apresentam principalmente xantomas tendinosos e tuberosos e aterosclerose prematura (KIDAMBI e PATEL, 2008; DEMINA et al., 2016; TADA et al., 2018).

Em oposição aos transportadores ABCG5 e ABCG8, os transportadores *Niemann-Pick C1-Like 1* (NPC1L1) regulam a absorção intestinal do colesterol e a reabsorção do colesterol biliar. Localizados na membrana apical dos enterócitos do jejuno proximal, promovem a

captação e o subsequente transporte do colesterol através da borda em escova dos enterócitos, sendo determinante para seu conteúdo plasmático. O NPC1L1 também pode ser encontrado na membrana dos canalículos dos hepatócitos, onde é capaz de mediar a reabsorção hepática de colesterol livre proveniente dos ácidos biliares. A redução na função ou mutações no NPC1L1 estão associadas com baixos valores de LDL-c e risco reduzido de DCV (WANG, 2007; KIDAMBI e PATEL, 2008; YU et al., 2014; PIRILLO et al., 2016).

Identificado relativamente recente (2000), o NPC1L1 é uma proteína transmembrana considerada um alvo para a ezetimiba, uma droga utilizada para o tratamento da dislipidemia. A inibição da proteína NPC1L1, com consequente inibição seletiva da absorção intestinal do colesterol, tem sido reconhecida como importante alvo terapêutico no tratamento da hipercolesterolemia (KIDAMBI e PATEL, 2008; FALUDI et al., 2017).

Esteróis livres são o substrato preferido do NPC1L1, visto que esteróis esterificados não são absorvidos por células que expressam este transportador. Além disso, o transporte celular mostrou-se unidirecional e dependente de  $K^+$  intracelular. A expressão do mRNA do NPC1L1 é sensível à absorção intestinal de colesterol, com aumento da expressão pela depleção do colesterol. A depleção aguda de colesterol realoca NPC1L1 de organelas intracelulares ou endossomos para as microvilosidades da superfície dos enterócitos, resultando em um aumento da captação de colesterol através deste transportador (KIDAMBI e PATEL, 2008).

O receptor de LDL (LDLr), ou também chamados receptores B-E, por sua vez, é um polipetídeo transmembrana, descoberto por J. L. Goldstein e M. S. Brown em 1974, que reconhece moléculas de LDL (as partes apo B-100 e apo E), bem como quilomícrons remanescentes e VLDL remanescente. Uma vez que a partícula de LDL se liga ao receptor, o complexo sofre endocitose. Em adultos, o fígado é o maior órgão que expressa estes receptores e, portanto, o maior sítio de remoção de LDL da circulação, sendo um dos mecanismos por meio dos quais o colesterol é eliminado da corrente sanguínea (CHARLTON-MENYS e DURRINGTON, 2008; SANZ-BUENHOMBRE et al., 2016).

A expressão dos LDLr nos hepatócitos é a principal responsável manutenção da colesterolemia dentro de valores de normalidade e depende da atividade da enzima

hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima-chave para a síntese intracelular do colesterol hepático. A inibição da HMG-CoA redutase e, portanto, da síntese intracelular do colesterol é um importante alvo terapêutico no tratamento da hipercolesterolemia (FALUDI et al., 2017).

Quando a biossíntese de colesterol hepático e o fornecimento de colesterol intestinal ao fígado diminuem, a concentração de colesterol intra-hepático também reduzem, e neste momento, ocorre o aumento da expressão de LDLr nos hepatócitos e a maior captura de LDL e VLDL circulantes. O fígado, portanto, extrai mais LDL da circulação, diminuindo a sua concentração (CHARLTON-MENYS e DURRINGTON, 2008).

A homeostase do colesterol pode ser regulada, dentre outros fatores, pelo receptor hepático X (*liver X receptor* - LXR), um importante receptor nuclear que constitui uma espécie de sensor de colesterol, capaz de regular a expressão de transportadores como o NPC1L1, ABCG5 e ABCG8 (KIDAMBI e PATEL, 2008; GUO, LI e YIN, 2018).

### 1.2.3 Receptor hepático X (LXR)

Os receptores hepáticos X (*liver X receptor* - LXR) são receptores nucleares conhecidos como sensores de colesterol, sendo capazes de reduzir sua concentração via regulação de genes alvo associados com o TRC, com a conversão do colesterol em ácidos biliares e com a absorção intestinal do colesterol. O LXR tem dois subtipos ou isoformas: o LXR-alfa (NR1H3) e o LXR-beta (NR1H2). O LXR-alfa é abundantemente expresso no fígado, intestino delgado e tecidos adiposo, renal e adrenal, além de macrófagos. Eles se ligam aos receptores retinoides X (*retinoids X receptors* - RXR) formando um heterodímero (LXR/RXR), constituindo reguladores da homeostase do colesterol (DUVAL et al., 2006; ZHAO e DAHLMAN-WRIGHT, 2010; GUO, LI e YIN, 2018; HIEBL et al. 2020).

Quando ativados após ligação com seus agonistas, o LXR é capaz de inibir a captação do colesterol, promover o seu efluxo além de estimular o seu metabolismo, mantendo, desta forma, o equilíbrio do colesterol. Os agonistas do LXR podem ser de dois tipos: naturais e sintéticos. Os naturais constituem os oxisteróis, ou derivados oxidados do colesterol, como 22(R)-hidroxicolesterol, 24(S)-hidroxicolesterol, 24(S),25-epoxicolesterol (mais potente),

20(S)-hidroxicolesterol e 27-hidroxicolesterol. O colesterol, por si só, não constitui um ligante para o LXR. Por outro lado, existem poucos inibidores de LXR, como os ácidos graxos poli-insaturados (DUVAL et al., 2006; ZHAO e DAHLMAN-WRIGHT, 2010; GUO, LI e YIN, 2018).

Existem três principais fontes de oxisteróis: reações enzimáticas, estresse oxidativo e dieta; o metabolismo do colesterol proveniente destas fontes exerce um importante papel no processo de formação da aterosclerose. Quando os oxisteróis celulares (ligantes naturais do LXR) se acumulam como resultado do aumento das concentrações de colesterol, o LXR induz a transcrição de genes específicos ligando-se a sequências de DNA associadas a genes-alvo que protegem as células da sobrecarga de colesterol (ZHAO e DAHLMAN-WRIGHT, 2010; GUO, LI e YIN, 2018).

A ativação do LXR no intestino regula positivamente a expressão de diversos genes como os transportadores heterodímeros ABCG5/G8 localizados na membrana apical das células intestinais, levando ao aumento do efluxo de colesterol no lúmen intestinal. A ativação do LXR também regula negativamente a expressão da proteína NPC1L1, limitando assim a captação de colesterol (KIDAMBI e PATEL, 2008; ZHAO e DAHLMAN-WRIGHT, 2010; HIEBL et al. 2020).

Este fator transcricional, portanto, exerce uma função vital na regulação do metabolismo do colesterol, incluindo sua captação, absorção, efluxo, transporte e secreção. Evidências demonstram que os agonistas de LXR efetivamente bloqueiam a absorção intestinal de colesterol e que o LXR participa da regulação do metabolismo lipídico e da inflamação, exercendo um importante papel no controle da aterosclerose (GUO, LI e YIN, 2018).

#### 1.2.4 Metabolismo dos ácidos biliares

Os sais biliares (SB) são sintetizados no fígado a partir do colesterol e são liberados no duodeno por meio da bile, constituindo uma via de exportação do colesterol hepático (CHARLTON-MENYS e DURRINGTON, 2008; SORAN et al., 2018). A regulação desta via

se dá principalmente pela enzima colesterol 7-alfa-hidroxilase, que converte o colesterol em ácidos biliares primários (CHARLTON-MENYS e DURRINGTON, 2008).

Os ácidos biliares primários são o ácido cólico e o ácido quenodeoxicólico. Geralmente são conjugados com glicina ou taurina. No intestino delgado inferior e no cólon, após sofrerem a ação de bactérias anaeróbicas (principalmente as Bacteroides), eles sofrem uma variedade de transformações, incluindo a desconjugação e a conversão do ácido cólico em ácido deoxicólico e do ácido quenodeoxicólico em ácido litocólico, sendo estes os ácidos biliares secundários (CHARLTON-MENYS e DURRINGTON, 2008).

Os ácidos biliares primários e alguns dos secundários, o ácido deoxicólico em particular, são absorvidos através do íleo terminal. Os sais biliares emulsionam as gorduras em virtude dos seus grupos carboxila e hidroxila que são polares e hidrofílicos, e os seus anéis de hidrocarbonetos lipofílicos, que se ligam aos lipídios, facilitando a sua absorção. Eles são extraídos da circulação sanguínea pelo fígado, conjugados e secretados de volta à bile (CHARLTON-MENYS e DURRINGTON, 2008).

Os ácidos biliares facilitam a absorção da gordura dietética e de vitaminas lipossolúveis e sofre o processo denominado de recirculação enterohepática, com 95 % sendo reabsorvidos no íleo distal e cerca de 5 % excretados nas fezes, diariamente. Este 5 % é repostado via hepática por biossíntese *de novo* a partir do colesterol (HEIDKER et al., 2016).

A restrição de calorias, colesterol e gordura saturada provenientes da dieta tem sido recomendada como intervenção terapêutica primária para o tratamento de pacientes com dislipidemia. No entanto, a restrição do colesterol dietético não tem sido associada a uma redução significativa da concentração plasmática de LDL-c circulante (WANG, 2007).

Muitos estudos intervencionais, *in vitro* e epidemiológicos demonstram o papel dos polifenóis contra o desenvolvimento de doenças crônicas, como a redução na disfunção endotelial, da pressão arterial e do colesterol (WILLIAMSON, 2017). Neste contexto, torna-se importante citar os compostos fenólicos como substâncias que podem auxiliar a regular estes mecanismos e reduzir a concentração plasmática de colesterol.

### 1.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são substâncias originadas do metabolismo secundário das plantas, chamadas fitoquímicos, não essenciais para humanos, que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas (-OH) ligados, formando o grupo fenol; são representados quimicamente como  $C_6H_5OH$ . São importantes constituintes dos alimentos, contribuindo para o sabor, cor e propriedades nutricionais dos mesmos, porém sem conteúdo energético. Podem ser classificados como fenóis simples ou polifenóis, de acordo com o número de grupo fenol na molécula. Dentre os polifenóis, destacam-se os flavonoides, compostos largamente distribuídos na natureza encontrados geralmente em todo o reino vegetal, presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta, com grande potencial antioxidante (ANGELO e JORGE, 2007; DEL RIO et al., 2013; BOHN, 2014; BENTO-SILVA et al., 2020; QUERO et al., 2020; SWALLAH et al., 2020).

Os flavonoides possuem dois anéis aromáticos (A e B) unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico (C), apresentando uma cadeia de carbono  $C_6:C_3:C_6$ . Variações em substituição a este terceiro anel C resultam em seis importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (catequinas), antocianidinas e isoflavonas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides. Estas variações estruturais entre subgrupos dão origem à sua diversidade funcional (ANGELO e JORGE, 2007; DEL RIO et al., 2013; SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015; KU et al., 2020). A classificação dos compostos fenólicos e dos flavonoides pode ser observada na Figura 2.

Diferente de outros flavonoides, os flavanóis não apresentam uma dupla ligação entre os carbonos C2 e C3 e nem o grupo cetona na posição 4 do anel C. Devido à presença de um grupo hidroxila na posição 3 deste mesmo anel C, este grupo é conhecido também como flavan-3-ol, sendo representado pelas catequinas. As principais catequinas presentes em alimentos são: a epicatequina (EC), a epicatequina galato (ECG), a epigalocatequina (EGC) e a epigalocatequina galato (EGCG) (KOO e NOH, 2007; KOBAYASHI et al., 2014; KU et al., 2020).

**Figura 2** – Classificação dos compostos fenólicos e flavonoides.

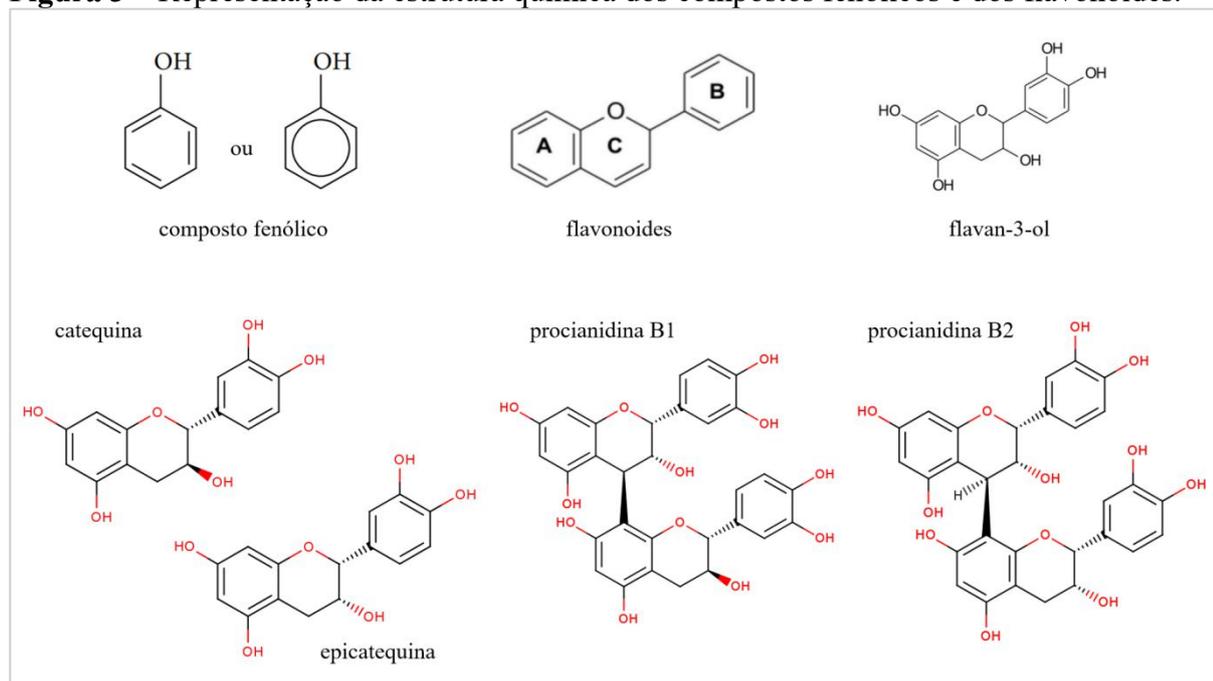


Os compostos fenólicos podem ser classificados como fenóis simples ou polifenóis. Dentre os polifenóis, além dos compostos não flavonoides e dos ácidos fenólicos, destacam-se os flavonoides, os quais subdividem-se em seis importantes classes: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (catequinas), antocianidinas e isoflavonas. Fonte: ANGELO e JORGE (2007), DEL RIO et al. (2013) e KU et al. (2020), adaptado.

Além das catequinas, os flavan-3-óis também compreendem as procianidinas, uma classe de proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados. As procianidinas são oligômeros formados por unidades de flavan-3-ol (monômeros de catequinas e epicatequinas) representadas principalmente pelas procianidinas A e B. Dímeros de procianidinas do tipo B consistem exclusivamente de unidades de catequina e epicatequina (ORTEGA et al., 2009; DE CAMARGO et al., 2014; DA SILVA et al., 2017). A estrutura química dos flavonoides pode ser observada na Figura 3.

Os compostos fenólicos constituem antioxidantes sem atividade enzimática, apresentando efeitos protetores contra espécies reativas de oxigênio (ERO), produzidas como subprodutos do metabolismo normal ou induzidas por estímulos extracelulares, sendo consumidos durante reações de oxidação. As ERO exercem um importante papel na homeostase do funcionamento normal da célula. No entanto, uma superprodução e acumulação de ERO em condições anormais, conhecido como estresse oxidativo, representa um desbalanço entre as substâncias oxidantes e antioxidantes (ANGELO e JORGE, 2007; KU et al., 2020).

**Figura 3** – Representação da estrutura química dos compostos fenólicos e dos flavonoides.



O composto fenólico possui pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas (-OH) ligados, formando o grupo fenol. Os flavonoides possuem dois anéis aromáticos (A e B) unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico (C). Variações em substituição ao anel C resultam nas diferentes classes de flavonoides. Os flavanóis, devido à presença de um grupo hidroxila na posição 3 do anel C, é um grupo conhecido também como flavan-3-ol, sendo representado pelas catequinas, sendo a epicatequina (EC) uma das principais. As procianidinas são oligômeros formados por unidades de flavan-3-ol (monômeros de catequinas e epicatequinas) representadas principalmente pelas procianidinas B1 e B2. Fonte: ANGELO e JORGE (2007), ROTHWELL et al. (2013) e SWALLAH et al. (2020), adaptado.

O estresse oxidativo leva a modificações indesejáveis nas macromoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos na célula, estando associadas a diversas condições patológicas como o diabetes, dano hepatocelular, aterosclerose e câncer. Este mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento das doenças supracitadas (ANGELO e JORGE, 2007; KU et al., 2020).

Devido à atividade doadora de elétrons ou de átomos de hidrogênio apresentada pelos flavonoides, sua interação com os radicais livres gera compostos radicalares com menor reatividade. A capacidade dos compostos fenólicos de ter a função antioxidante se dá por conta da sua estrutura, especialmente o anel benzeno, além do número e da posição do grupo OH. Além desta atividade antioxidante não enzimática, os flavonoides podem promover a expressão de enzimas antioxidantes como a catalase, a superóxido dismutase, a glutatona peroxidase e a heme-oxigenase em diferentes tipos celulares. Desta forma, os flavonoides

ajudam a restaurar o balanço oxidativo intracelular tanto pela inativação de radicais livres quanto pela modulação de antioxidantes enzimáticos (KU et al., 2020; QUERO et al., 2020; ZEB, 2020).

Os potenciais efeitos benéfico na saúde dos componentes bioativos dos alimentos dependem da sua bioacessibilidade e biodisponibilidade que estão relacionados, por sua vez, com a liberação de sua matriz alimentar, modificações durante a digestão, captação e absorção, transporte, metabolismo, modificação, biodistribuição e excreção, além de fatores inerentes à dose e ao hospedeiro. Isto quer dizer que esses compostos devem estar biodisponíveis antes de exercer sua bioatividade (CILLA et al., 2018; SHAHIDI e PENG, 2018).

A absorção e o metabolismo dos polifenóis têm sido amplamente estudados e as vias bioquímicas relacionadas à sua biodisponibilidade são bem elucidadas para a maioria das classes; estudos mostram que a maioria dos polifenóis é bem absorvida e que os enterócitos absorvem e metabolizam os diversos tipos. Alguns polifenóis atingem o cólon, onde sofrem ação da microbiota, que apresenta um importante papel na absorção destes compostos (WILLIAMSON, 2017). Segundo QUERO et al. (2020), menos de 25 % do total de fenólicos ingeridos são absorvidos no intestino.

O transporte dos flavonoides ocorre em diversas espécies de plantas por meio dos transportadores de membrana *ATP-binding cassette* (ABC) que são caracterizados como proteínas que permitem o movimento dos compostos através das membranas celulares. Estes transportadores estão envolvidos com dois mecanismos relacionados à permeabilidade, a captação e o efluxo; estes dois mecanismos levam ao acúmulo ou secreção dos flavonoides nas plantas, determinando, desta forma, o conteúdo nutricional da parte comestível da planta destinada ao consumo humano (REIN et al., 2013; KU et al., 2020).

### 1.3.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos em amostras vegetais

Os compostos fenólicos diferem nas plantas tanto em quantidade quanto na sua forma (classificação) e o perfil de fenólicos depende das condições ambientais; portanto, para determinar e quantificar o total destes fenólicos nos alimentos, existem diversos métodos analíticos. Primeiramente, deve-se determinar os métodos de preparo de amostras e extração

dos compostos conforme a natureza dos mesmos; estes processos iniciais, apesar de ainda não haver disponível um método padronizado para preparação de amostra e extração, são considerados determinantes para a obtenção de resultados adequados. Vários fatores influenciam a extração fenólica, sendo necessário considerar o tempo de extração, a razão soluto/solvente e o tamanho das partículas da amostra (ANGELO e JORGE, 2007; QUERO et al., 2020; SWALLAH et al., 2020).

Amostras frescas, embora sejam o requisito ideal para a extração de polifenóis, nem sempre apresentam melhores resultados, devido à perecibilidade, prazo de validade, qualidade e período sazonal. Para um preparo e extração eficientes são necessárias secagem ao ar, sombra ou forno, liofilização e pulverização de nitrogênio, uma vez que estes processos envolvem o tipo de meio e a composição orgânica das amostras. A liofilização é um método bastante utilizado na remoção de água de materiais como alimentos e amostras orgânicas, sendo considerada uma das melhores técnicas para prolongar a vida útil e a estabilidade do produto (SWALLAH et al., 2020).

Após os processos de preparo e extração dos compostos de interesse, existem diversos métodos para a determinação e quantificação, sendo os mais utilizados a espectrofotometria, a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; em inglês: *High performance liquid chromatography*, HPLC). Os resultados podem variar conforme a polaridade, estrutura molecular, concentração, grupos hidroxila, número de anéis aromáticos envolvidos, variação genética e a fatores tecnológicos e ambientais e, devido à natureza estrutural dos compostos fenólicos, é difícil definir um método ideal de determinação de compostos em amostras vegetais. É necessário identificar plantas ricas em polifenóis, para aprimorar os métodos de cultivo e minimizar as perdas durante o cozimento e o processamento industrial (SWALLAH et al., 2020). Como as metodologias utilizadas para análise de fenólicos não são totalmente padronizadas, ANGELO e JORGE (2007) afirmam que é de extrema importância o desenvolvimento e divulgação de métodos por órgãos oficiais.

Apesar da extensa evidência científica sobre os efeitos benéficos dos polifenóis na saúde, alguns mecanismos ainda não foram totalmente elucidados. Os efeitos biológicos envolvem interações bioquímicas detalhadas, com vias moleculares que dependem tanto da biodisponibilidade quanto de alvos celulares moleculares (WILLIAMSON, 2017).

### 1.3.2 Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos

Os polifenóis são considerados compostos não essenciais para a manutenção da vida, porém podem potencialmente contribuir para a manutenção da saúde, sendo capazes de modular diversos processos metabólicos, com inúmeros efeitos benéficos. Para exercer estes efeitos no organismo, os compostos bioativos presentes nos alimentos precisam ser biodisponíveis. A biodisponibilidade é um processo complexo que envolve várias etapas diferentes, como liberação da matriz alimentar, absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (REIN et al., 2013; CARBONELL-CAPELLA et al., 2014).

Muitos fatores afetam a biodisponibilidade, como a bioacessibilidade, efeito da matriz alimentar (interações com outros macronutrientes, como fibras em alimentos e bebidas com baixo processamento ou proteínas e polissacarídeos em produtos alimentícios processados), transportadores celulares, enzimas, entre outros, e a bioeficácia pode ser melhorada através de uma biodisponibilidade aprimorada (REIN et al., 2013; BOHN, 2014; CARBONELL-CAPELLA et al., 2014).

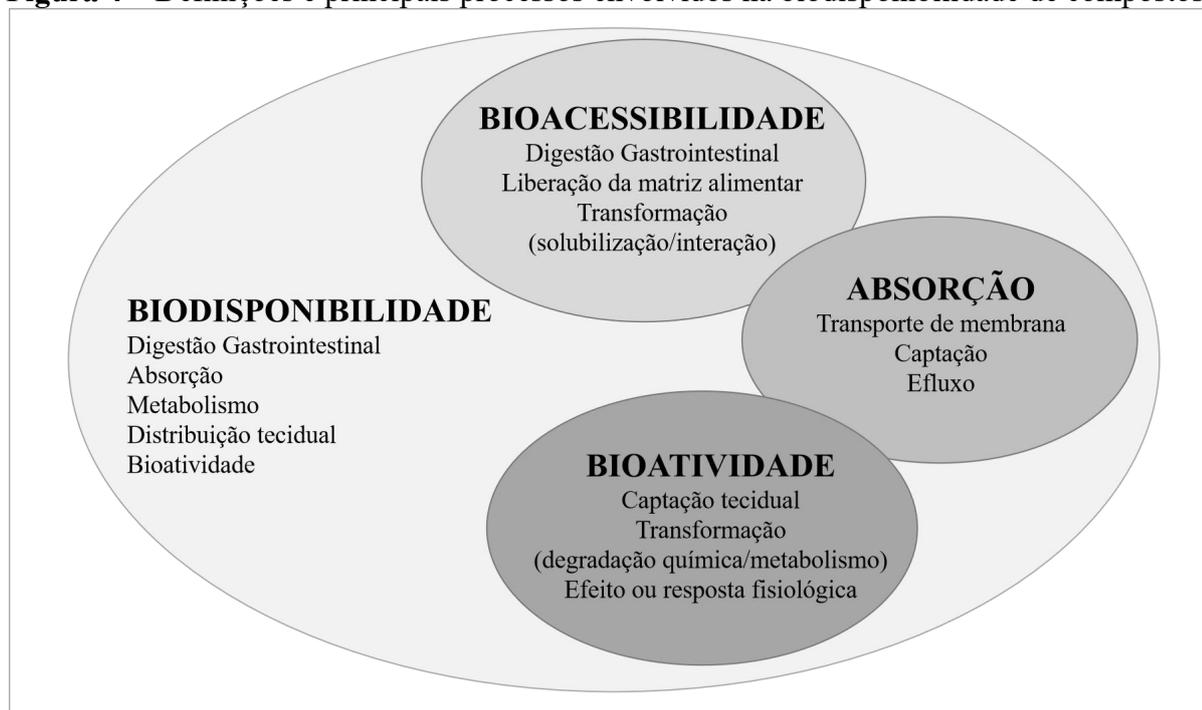
Primeiramente é necessário definir os termos bioacessibilidade, biodisponibilidade e bioatividade, diferenciando os mesmos. A bioacessibilidade refere-se à quantidade de compostos liberada da matriz alimentar no trato gastrointestinal humano após sofrer o processo de digestão e que está disponível e/ou acessível para a absorção intestinal; depende de alguns fatores como a concentração inicial do composto na matriz alimentar, a composição da matriz alimentar, as características físicoquímicas dos fluidos gastrointestinais (temperatura e pH) além da presença de enzimas digestivas (REIN et al., 2013; CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; CILLA et al., 2018; BARROS e MARÓSTICA JUNIOR, 2019; LORENZO et al. 2019; SANTOS et al. 2019).

A biodisponibilidade, por sua vez, significa a eficiência da absorção e da aplicação metabólica de um nutriente ingerido; corresponde à fração de compostos que após ser digerida e liberada da matriz alimentar, é absorvida pelas células epiteliais e atinge a circulação sanguínea humana, estando disponível para uso pelo metabolismo celular do hospedeiro; é determinada pela concentração plasmática após a administração do alimento ou do composto isolado e depende de fatores como a estabilidade digestiva, a liberação da matriz alimentar e a

eficiência da passagem transepitelial. Normalmente é expressa como a porcentagem da quantidade do constituinte liberado e absorvido em relação ao seu conteúdo total (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; CILLA et al., 2018; SHAHIDI e PENG, 2018; BARROS e MARÓSTICA JUNIOR, 2019; LORENZO et al. 2019; SANTOS et al. 2019).

A bioatividade, portanto, representa o efeito ou resposta fisiológica à exposição de um determinado componente que sofre captação tecidual alcançando a circulação sistêmica, interage com o metabolismo de biomoléculas dos tecidos, causando respostas fisiológicas e promovendo benefícios à saúde. O efeito benéfico efetivo, denominado bioeficácia, se dá se o composto alcançou o tecido alvo relevante e se a concentração foi suficiente para exercer o efeito biológico (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; CILLA et al., 2018; BARROS e MARÓSTICA JUNIOR, 2019; LORENZO et al. 2019; SANTOS et al. 2019). Estas definições e processos podem ser observados esquematicamente na Figura 4.

**Figura 4** – Definições e principais processos envolvidos na biodisponibilidade de compostos.



A bioacessibilidade refere-se à quantidade de compostos liberada da matriz alimentar no trato gastrointestinal humano após sofrer o processo de digestão e que está disponível e/ou acessível para a absorção intestinal; depende de alguns fatores como a concentração inicial do composto na matriz alimentar, a composição dessa matriz, as características físico-químicas dos fluidos gastrointestinais (temperatura e pH) além da presença de enzimas digestivas. A biodisponibilidade, por sua vez, significa a eficiência da absorção e da aplicação metabólica de um nutriente ingerido; corresponde à fração de compostos que após ser digerido e liberado da matriz alimentar, é absorvido pelas células epiteliais e atinge a circulação sanguínea humana, estando disponível para uso pelo metabolismo celular do hospedeiro; depende de fatores como a estabilidade digestiva, a liberação da matriz alimentar e a eficiência da passagem transepitelial. A bioatividade, portanto, representa o efeito ou resposta fisiológica à exposição de um determinado componente que sofre captação tecidual alcançando a

circulação sistêmica, interage com o metabolismo de biomoléculas dos tecidos, causando respostas fisiológicas e promovendo benefícios à saúde. Fonte: CARBONELL-CAPELLA et al. (2014) e DIMA et al. (2020), adaptado.

Os flavonoides são substâncias quimicamente instáveis que podem ser degradados pela microbiota intestinal após a ingestão em associação com secreções intestinais de diferentes pH, podendo sofrer uma série de modificações, como desglicosilação, metilação, glicuronidação e sulfatação ao longo do trato gastrointestinal e também do sistema circulatório. A biodisponibilidade de suas diferentes classes é variada; em geral, os flavonoides menos absorvidos são os de cadeias maiores, como as proantocianidinas e antocianinas, enquanto que os mais facilmente absorvidos são as isoflavonas, que apresentam baixo peso molecular (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; BENTO-SILVA et al. 2020; KU et al., 2020). Os flavanóis (flavan-3-ol), por sua vez, parecem ser absorvidos rapidamente no intestino delgado após o seu consumo, e apresentam uma concentração máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) entre 0,5 e 2 horas, seguida de metabolismo e excreção rápidos (REIN et al., 2013).

O acúmulo de flavonoides nas plantas bem como as modificações produzidas durante o processo de digestão e absorção no corpo humano são fatores determinantes que controlam a sua biodisponibilidade. Uma alta taxa de degradação resulta na produção de ácidos fenólicos, podendo reduzir a eficiência de absorção dos flavonoides pelo corpo humano (BENTO-SILVA et al. 2020; KU et al., 2020).

O *pool* de metabólitos circulantes pode estar relacionado a tempos de permanência mais curtos (metabólitos hepáticos) ou mais longos (metabólitos microbianos), e uma sinergia desses metabólitos pode causar efeitos na saúde. A biodisponibilidade desses compostos depende também da sua presença livre ou conjugada nas matrizes alimentares, que também são afetadas pelo processamento dos alimentos. As respostas à saúde dos fenólicos mostram uma considerável variação individual, que é afetada, além dos fatores supracitados, pelo estilo de vida diário, pela interação com outros nutrientes e compostos da dieta, pela ecologia da microbiota intestinal e por variações genéticas dos indivíduos (REIN et al., 2013; FERREIRA et al., 2017; BENTO-SILVA et al. 2020).

Também é interessante destacar que considerando a extrema riqueza das matrizes alimentares, a quantidade de fitoquímicos presentes pode atuar de forma sinérgica para

aumentar o potencial biológico final desses extratos e, então, maximizar suas potencialidades terapêuticas (FERREIRA et al., 2017).

Atualmente, o destino dos flavonoides após a ingestão e os possíveis papéis dos seus metabólitos na saúde humana permanecem parcialmente elucidados, sendo necessárias mais pesquisas *in vivo* e *in vitro* para entender completamente a eficácia dos compostos bioativos e os mecanismos envolvidos, a biodisponibilidade, os benefícios à saúde e definir recomendações (BENTO-SILVA et al. 2020; KU et al., 2020).

A determinação do conteúdo de compostos bioativos diretamente dos alimentos não é suficiente para prever os potenciais efeitos *in vivo*, pois os metabólitos que atingem o sistema sanguíneo podem ser diferentes dos compostos originais encontrado nos alimentos. Portanto, a quantificação dos compostos bioativos biodisponíveis é mais importante do que determinar a quantidade destes componentes nos alimentos. Apesar de sua ampla distribuição, os efeitos benéficos dos polifenóis dietéticos na saúde dependem de como eles são extraídos do alimento e da sua absorção intestinal, metabolismo e ação biológica nos tecidos alvo (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; BARROS e MARÓSTICA JUNIOR, 2019).

A bioatividade de nutrientes e compostos bioativos pode ser determinada utilizando diversos procedimentos com metodologias *in vitro* (simulação da digestão gastrointestinal, uso de membranas artificiais, cultura de células Caco-2), técnicas *ex vivo* (órgãos gastrointestinais mantidos em condições laboratoriais), ensaios *in situ* (perfusão intestinal em animais) e modelos *in vivo* (estudos em humanos e em animais). No entanto, entre todos os métodos disponíveis, é necessário estabelecer a melhor abordagem para a avaliação de compostos específicos, como no caso dos polifenóis (BOHN, 2014; CARBONELL-CAPELLA et al., 2014).

Ensaio de intervenção *in vivo* (humano ou animal) são considerados padrão de referência com elevado nível de evidência científica; porém, apresentam algumas desvantagens pois podem ser demorados, difíceis de realizar, dispendiosos, restritos ou não justificáveis por motivos éticos. Por outro lado, modelos *in vitro* são custo-efetivos, reprodutíveis e, em geral, métodos rápidos e simples. Por essas razões, foram desenvolvidos para simular a digestão de alimentos, para prever sua liberação a partir da matriz alimentar,

bem como sua bioacessibilidade e têm sido usados por muitas décadas. Estes diferentes modelos de digestão *in vitro* mimetizam as complexas condições físico-químicas e fisiológicas do trato gastrointestinal humano, simulando a digestão na cavidade oral, no estômago, no intestino delgado e, ocasionalmente, no intestino grosso (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; CILLA et al., 2018; SHAHIDI e PENG, 2018; BRODKORB et al., 2019; WOJTUNIK-KULESZA et al., 2020).

Para avaliar a captação de compostos, o modelo celular com a linhagem Caco-2 tem sido bastante utilizado e permite uma melhor simulação do transporte epitelial, podendo identificar a competição de nutrientes ou componentes alimentares no local de absorção (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; CILLA et al., 2018; BARROS e MARÓSTICA JUNIOR, 2019; WOJTUNIK-KULESZA et al., 2020). Características deste modelo experimental serão detalhadas a seguir.

### 1.3.3 Modelo experimental *in vitro* de avaliação de bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos em células Caco-2

Uma característica extremamente importante do epitélio intestinal é sua função como barreira física entre o meio ambiente e o ambiente interno de nosso corpo e, ao mesmo tempo, deve permitir a absorção de nutrientes importantes. Diversos fatores podem afetar o processo de absorção, como a motilidade intestinal, interações com outras moléculas da dieta e do processo digestivo, como os sais biliares e enzimas, e a solubilidade na camada de muco. Deste modo, modelos *in vitro* para estudar a absorção pelo epitélio intestinal e os efeitos das moléculas bioativas no epitélio, apesar das suas várias limitações, são considerados sistemas-modelo para medir a função de barreira e os efeitos nos processos de transporte (LEA, 2015a).

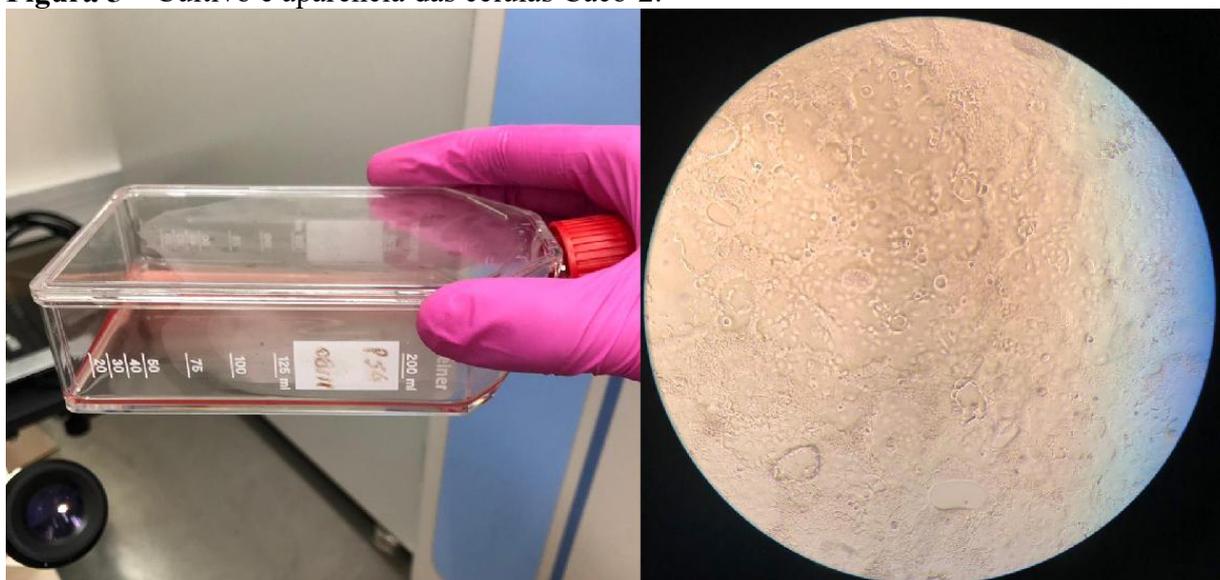
As culturas de células constituem sistemas de modelos experimentais úteis para o estudo de processos fisiológicos e bioquímicos normais nas células e podem até ser usados para fins de diagnóstico. A principal vantagem do uso de sistemas de cultura de células é a consistência e a reprodutibilidade dos dados (VERHOECKX et al., 2015).

A linhagem celular epitelial humana Caco-2 é originalmente derivada de um adenocarcinoma colorretal humano (*Cancer coli-2*) e tem sido amplamente utilizada como um

modelo *in vitro* de barreira epitelial intestinal para medir a interação, captação e transporte celular de drogas e componentes alimentares. Quando em cultura, as células Caco-2 possuem a capacidade de se diferenciar espontaneamente e de forma lenta em uma monocamada de células; estas expressam várias propriedades morfológicas e funcionais características do epitélio das vilosidades dos enterócitos do intestino delgado, sendo uma de suas propriedades mais vantajosas (HUBATSCH et al., 2007; LEA, 2015b; HIEBL et al. 2020; IFTIKHAR et al., 2020).

Após a confluência, as células Caco-2 começam a polarizar adquirindo um fenótipo diferenciado, com características da borda apical em escova com a presença de microvilosidades. Junções se formam entre células adjacentes, as chamadas *tight junctions* (TJ) e as atividades de muitos marcadores enzimáticos da borda em escova são expressas; sistemas de proteínas de transporte das células epiteliais primárias que mediam a captação ativa ou o efluxo de compostos típicas de enterócitos são funcionais nas células Caco-2. Marcadores de colonócitos também estão presentes nestas células (HUBATSCH et al., 2007; LEA, 2015a, 2015b; IFTIKHAR et al., 2020). A aparência geral das células Caco-2 cultivadas em garrafas pode ser observada na Figura 5.

**Figura 5** – Cultivo e aparência das células Caco-2.



Células Caco-2 (CCIAL 064) cultivadas em garrafa de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (esquerdo) e aparência das células (8<sup>o</sup> dia de cultivo; passagem 54) observadas em microscópio óptico invertido com aumento de 10x (direito). Fonte: arquivo pessoal.

Para mimetizar de forma mais próxima as condições no intestino *in vivo*, as células Caco-2 são cultivadas em suportes (insertos) de filtro permeáveis, sendo que este tipo de cultivo melhora sua diferenciação morfológica e funcional (LEA, 2015b). As células Caco-2 cultivadas em filtros permeáveis tornaram-se, portanto, o padrão-ouro para avaliar a capacidade de absorção intestinal de drogas e compostos alimentares e a atividade antioxidante, antiinflamatória e anticâncer de compostos *in vitro* (HUBATSCH et al., 2007; IFTIKHAR et al., 2020), mas também são adequadas para estudar a homeostase de lipídios e colesterol, incluindo os processos de captação, absorção e efluxo (HIEBL et al. 2020; YUAN et al., 2020).

A diferenciação das células Caco-2 parece seguir um cronograma na expressão das propriedades morfológicas e bioquímicas dos enterócitos. Devido à heterogeneidade da linhagem celular, o processo de diferenciação ocorre em um padrão de mosaico, com algumas áreas expressando células totalmente diferenciadas com microvilos após 12 a 14 dias, enquanto outras áreas contêm células menos diferenciadas. De acordo com protocolos descritos na literatura, a monocamada de células será diferenciada homogeneamente após 18 a 21 dias. Quando polarizada e confluenta, a camada celular forma uma barreira contínua entre os compartimentos superior e inferior (apical/mucosa e basolateral/serosa) (LEA, 2015b). O diagrama esquemático da diferenciação da monocamada de células Caco-2 em um suporte de filtro de permeação e o seu cultivo em placas de permeação (*transwell*) podem ser observados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

Modelos de células epiteliais intestinais, como o modelo Caco-2, apresentam muitas vantagens devido à sua simplicidade e reprodutibilidade, permitindo comparação interlaboratorial de resultados. Além disso, buscar um efeito de um alimento bioativo em um modelo de linhagem celular permite a elucidação de mecanismos moleculares que podem ser mais difíceis de estudar *in vivo* (LEA, 2015b).

Se cuidadosamente controladas, as monocamadas de células Caco-2 podem ter desempenho consistente em um único laboratório por décadas. No entanto, esta linhagem celular policlonal pode ser bastante instável e, sem um bom controle de qualidade, pode alterar seu desempenho ao longo do tempo. É importante destacar que a expressão de

marcadores de diferenciação típicos dos enterócitos muda, entre outros fatores, com o aumento do número de passagens (HUBATSCH et al., 2007; LEA, 2015b).

**Figura 6** – Diferenciação da monocamada de células Caco-2.

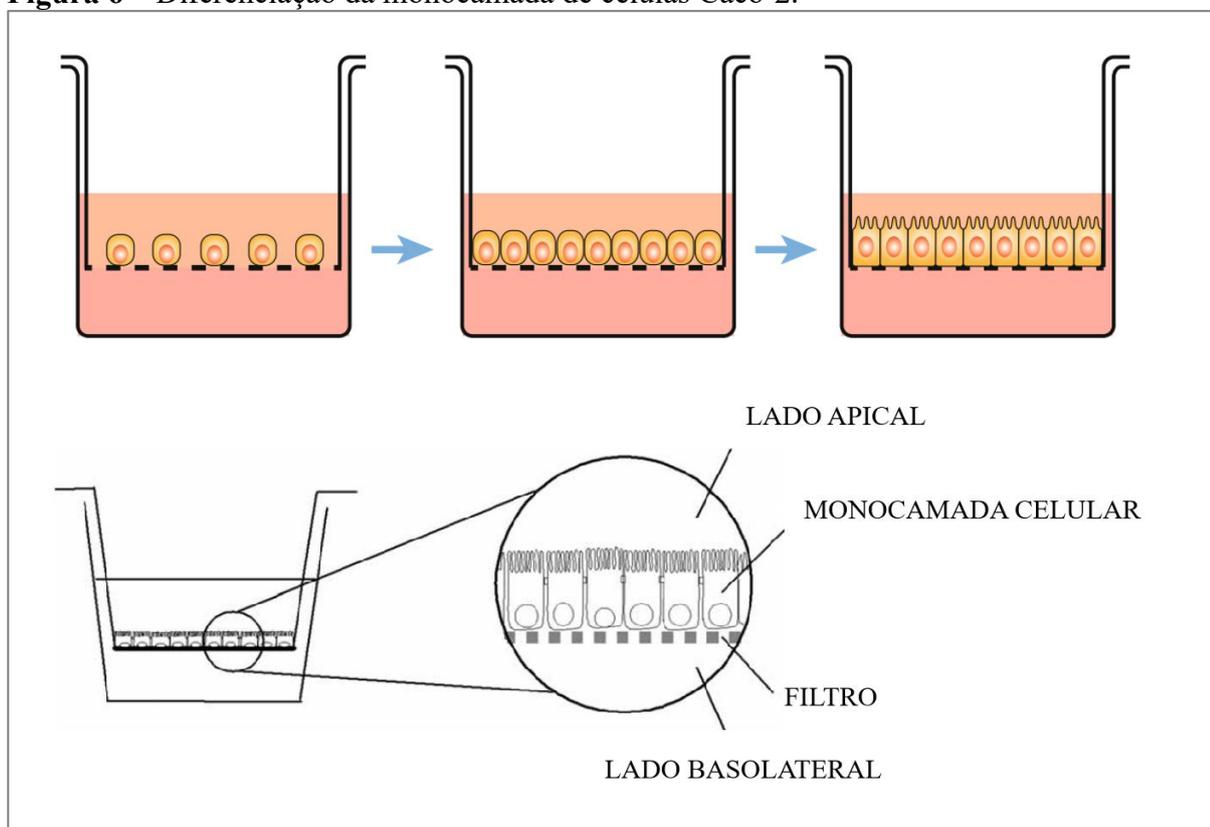


Diagrama da diferenciação da monocamada de células Caco-2 em um suporte de filtro de permeação, com o aparecimento de microvilosidades no lado apical semelhante aos enterócitos do intestino delgado após o período de aproximadamente 21 dias de cultivo (superior) e demonstração dos lados apical e basolateral da monocamada diferenciada sobre o filtro (inferior). Fonte: HUBATSCH et al. (2007) e LEA (2015b), adaptado.

HIDALGO et al. (1989) realizaram a caracterização morfológica de células Caco-2 cultivadas em filtro de membrana de policarbonato com propriedades similares às encontradas no enterócito normal; eles identificaram a formação de uma monocamada polarizada com *tight junctions* bem definidas e valores de resistência elétrica transepitelial (TEER) de 154  $\Omega$  e afirmaram que a mesma possui atributos para ser considerada um sistema modelo *in vitro* para investigar o transporte através do epitélio do intestino delgado.

A TEER é uma medida utilizada para controlar a integridade da monocamada celular antes da realização do experimento de transporte, sendo um processo não invasivo cujos valores toleráveis variam entre 200 e 1000  $\Omega$  por  $\text{cm}^2$ . Células Caco-2 polarizadas mostram

valores de TEER quatro vezes maiores em comparação com outras linhagens celulares, como a HT29 por exemplo, ou seja, mais semelhante às condições *in vivo* (IFTIKHAR et al., 2020).

**Figura 7** – Cultivo e troca de meio de cultura de células Caco-2.



Cultivo de células Caco-2 (CCIAL 064) em placa de poliestireno de 12 poços com suporte de filtro de permeação em membrana de policarbonato (0,4  $\mu\text{m}$ ; 12 mm) (esquerda); procedimento de troca de meio de cultura com auxílio de pipetador automático e pipeta sorológica de 10 mL. Fonte: Arquivo pessoal.

Desde então, este sistema tem sido amplamente utilizado para estudar diversos compostos como o transporte de soluções de fluidos intestinais (simulando condições em jejum e pós-prandial) para investigar a viabilidade do modelo *in vitro* de permeabilidade de drogas (PATEL et al., 2006), o transporte de drogas anti-helmínticas e antirretrovirais (KIGEN e EDWARDS, 2017), o transporte de peptídeos do feijão-caupi (MARQUES et al., 2018), a bioacessibilidade e captação de compostos fenólicos de morangos (KOSIŃSKA-CAGNAZZO et al., 2015), o transporte de flavan-3-ols (REDAN et al., 2016), o transporte transepitelial de curcumina por meio de solubilização micelar (FRANK et al., 2017), a ação de polifenóis e ácidos fenólicos do morango e da maçã na captação e transporte de glicose (MANZANO e WILLIAMSON, 2010), entre outros.

O modelo *in vitro* utilizando as células Caco-2 também tem sido amplamente utilizado para avaliar o efeito de diversos compostos nos mecanismos envolvidos na captação e absorção de colesterol, como hidrolisado proteico de soja (NAGAOKA et al., 1999), probióticos (HUANG e ZHENG, 2010), curcumina (FENG et al., 2010), bisfenol (FENG et

al., 2017), licopeno (ZOU e FENG, 2015), café (ONTAWONG et al., 2019), fitoesteróis com diferentes estruturas (YUAN et al., 2020), além de polifenóis como diversos tipos de flavonoides (CASASCHI et al., 2002; KIM et al., 2013, 2018; NEKOHASHI et al., 2014).

Sabe-se que a atividade biológica de compostos é significativamente diferente em condições *in vitro* e *in vivo* (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2020). Portanto, os estudos envolvendo os polifenóis na saúde e seus possíveis efeitos no contexto das doenças cardiovasculares e da hipercolesterolemia vêm sendo desenvolvidos, além dos modelos *in vitro* em cultura de células, por meio de diversos outros modelos experimentais, desde estudos animais até estudos intervencionais com humanos, com voluntários saudáveis ou sobre risco de doenças. Alguns destes estudos serão descritos a seguir.

#### 1.3.4 Efeitos benéficos dos polifenóis na saúde e sobre o metabolismo lipídico

A ingestão dietética de fenólicos é muito afetada pelos hábitos e preferências alimentares dos indivíduos. A ingestão média diária de polifenóis na dieta é de aproximadamente 1 g por pessoa, sendo as principais fontes frutas, verduras e legumes. Existe um interesse crescente em compostos como os fitoquímicos, presentes nestas frutas e vegetais, uma vez que o seu consumo e seu conteúdo no tecido corporal têm sido associados com diversos efeitos benéficos na saúde, especialmente em relação à prevenção de doenças crônicas como o diabetes, câncer, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas. Estudos têm demonstrado relação inversa do consumo de fitoquímicos e a incidência dessas doenças (ALMINGER et al., 2014; BOHN, 2014; SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015; QUERO et al., 2020).

Os efeitos benéficos exercidos por estes compostos estão relacionados com diversas atividades biológicas como ação antioxidante, antialergênica, antiinflamatória, antibacteriana, inibição ou indução de enzimas, controle da concentração de glicose, inibição da atividade de receptores de membrana, além de indução e inibição da expressão gênica. Os efeitos cardioprotetores dos compostos fenólicos estão correlacionados com outras propriedades bioativas, como funções antiaterogênica, antitrombótica, vasodilatadora, antiplaquetária e hipolipemiante (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015; FERREIRA et al., 2017; QUERO et al., 2020; WOJTUNIK-KULESZA et al., 2020).

Os compostos fenólicos também se revelaram promissores como agentes redutores do colesterol; estes compostos, presentes em uma variedade de alimentos, têm fortes propriedades hipolipemiantes. Um padrão alimentar adequado rico em vegetais pode estar relacionado a uma diminuição do risco de doenças cardiovasculares devido ao seu papel de prevenção e tratamento da hipercolesterolemia e aterosclerose. Intervenções dietéticas com diferentes alimentos ricos em polifenóis podem melhorar a função da HDL levando a um maior *clearance* de colesterol plasmático e prevenir a oxidação da LDL, reduzindo, desta forma, a razão das partículas aterogênicas de LDL-c/HDL-c em pacientes hipercolesterolêmicos (QUERO et al., 2020; ZEB, 2020).

Diversos estudos já demonstraram que as catequinas possuem elevada atividade antioxidante, inibem a oxidação da LDL e a peroxidação lipídica, e são capazes de reduzir a concentração plasmática de colesterol. A EGCG não é totalmente absorvida no intestino e parece ter uma boa viabilidade no lúmen intestinal e exerce um importante papel no processo envolvido na digestão e absorção de lipídeos (emulsificação, hidrólise e solubilização micelar). Estudos epidemiológicos demonstram uma relação inversa entre a ingestão de catequinas e a concentração de colesterol no sangue e estudos animais mostram que a EGCG afeta a absorção de gordura de forma dose-dependente, além de aumentar a excreção fecal de colesterol e lipídeos totais (RAEDERSTORFF et al., 2003; KOO e NOH, 2007).

O mecanismo de inibição da absorção do colesterol pelas catequinas parece envolver a inibição da solubilidade do colesterol nas micelas de ácido biliar no intestino delgado. As micelas são agregados moleculares formados por sais biliares, colesterol e fosfatidilcolina (FC) que agem como carreador e solubilizador de colesterol e outros lipídeos. O colesterol solubilizado é transferido das micelas para a membrana das células de borda em escova no intestino (RAEDERSTORFF et al., 2003; OGAWA et al., 2016). Segundo KOBAYASHI et al. (2014), a EGCG não se liga diretamente ao colesterol, porém reduz a solubilidade micelar do colesterol via interação específica desta catequina com a FC. No entanto, este mecanismo inibitório ainda não está completamente elucidado.

RAEDERSTORFF et al. (2003), ao investigarem o efeito da EGCG no metabolismo lipídico, verificaram que, além de reduzir a concentração de colesterol intramicelar e de colesterol plasmático de forma dose-dependente, esta catequina também alterou o tamanho

das micelas aumentando o seu tamanho médio e afetando assim, a solubilidade do colesterol e a afinidade destas pelas membranas celulares. Os dados sugerem que a atividade hipolipidêmica das epicatequinas é atribuída a um efeito luminal no intestino em vez de um efeito inibitório na síntese de colesterol.

Outro mecanismo que parece interferir na absorção de lipídeos no intestino pelas catequinas é a inibição da atividade da enzima lipase pancreática. Esta enzima é responsável pela hidrólise dos lipídeos no lúmen intestinal em ácidos graxos e monoacilgliceróis e pela absorção do colesterol por meio do processo de emulsificação. As catequinas parecem inibir esta lipase de forma dose-dependente, semelhante à ação do Orlistat, um inibidor da lipase pancreática clinicamente aprovado, promovendo aumento do tamanho das emulsões lipídicas e redução da área de superfície, dificultando, portanto, a absorção dessas gorduras (KOO e NOH, 2007; TRISAT et al., 2017).

Segundo KOO e NOH (2007), as catequinas são potentes inibidores da absorção de colesterol, uma vez que podem interferir na emulsificação, digestão e na solubilização micelar de lipídeos, etapas críticas envolvidas na absorção intestinal de colesterol e outros lipídeos. Além disso, são capazes de formar complexos com transportadores proteicos de membrana celular responsáveis pelo transporte de colesterol no lúmen intestinal, como *ATP-binding cassette* e *Niemann Pick C1-like 1*, e parecem alterar o processamento intracelular de lipídios após a absorção, a secreção de quilomícrons e a expressão de genes reguladores de todo este processo.

SANZ-BUENHOMBRE et al. (2016), após realizarem a digestão *in vitro* de extrato de uva, verificaram que os compostos fenólicos bioacessíveis exerceram efeito sobre biomarcadores responsáveis pelo metabolismo do colesterol, sendo capazes de modular a expressão de receptores NPC1L1 e LDLr, reduzindo o conteúdo de LDL-c no plasma. No que diz respeito ao transporte celular, os fitoesteróis utilizam uma via comum de absorção nos enterócitos intestinais (SABEVA et al., 2009).

Estudos intervencionais com outros produtos ricos em catequinas, como chocolate e chá verde (*Camellia sinensis*), confirmam os efeitos cardioprotetores desses compostos. Vários estudos têm demonstrado que os principais mecanismos de ação da ingestão da infusão

de *C. sinensis* para a manutenção do peso corporal estão relacionados com o aumento da termogênese e da oxidação lipídica (AMORIM et al., 2015).

Neste contexto, torna-se importante destacar a planta guaraná (*Paullinia cupana*), um produto originado no Brasil, especificamente típico da biota Amazônica. É um alimento rico em fitoquímicos, como os polifenóis, em particular os flavonóides, como as catequinas, epicatequinas e proantocianidinas que possuem importante ação antioxidante. O guaraná apresenta ainda propriedades estimulantes devido ao seu elevado conteúdo de cafeína e suas sementes também contêm teofilina, teobromina, derivados da xantina e taninos, que são compostos conhecidos por sua atividade antioxidante *in vitro* e associados a uma série de efeitos benéficos na saúde humana (KREWER et al., 2011; FONTES, TORRES e YONEKURA, 2014; YONEKURA et al., 2016).

Este efeito protetor contra desordens metabólicas torna-se importante uma vez que estas desordens estão relacionadas com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Os efeitos benéficos para a saúde humana relatados na literatura devem-se aos compostos bioativos (compostos fenólicos) presentes na bebida (KREWER et al., 2011; YONEKURA et al., 2016).

#### 1.4 GUARANÁ (*Paullinia cupana*)

O guaraná, cujo nome científico é *Paullinia cupana* H. B. K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, pertence à família *Spindaceae* e é conhecido por suas propriedades energéticas e medicinais, sendo utilizado há séculos pelas comunidades indígenas da Amazônia. É um fruto que cresce em cachos e é curiosamente parecido com o olho humano. Quando maduro, possui cor laranja avermelhada, mede de 2 a 2,5 cm de tamanho e abre-se parcialmente, deixando à mostra de uma a três sementes castanho-escuro, com a metade inferior recoberta por um arilo branco e espesso (mesocarpo). A colheita é realizada nesse estágio, para que as cápsulas (casca) não se abram totalmente, evitando a queda das sementes (HENMAN, 1982; LLERAS, 1983; SMITH e ATROCH, 2010; SCHIMPL et al., 2013; SEBRAE, 2018; SILVA et al., 2018a). As características do fruto podem ser observadas na Figura 8.

**Figura 8** – Características do fruto do guaraná (*Paullinia cupana*).



O guaraná é um fruto que cresce em cachos e, quando maduro, possui cor laranja avermelhada; mede de 2 a 2,5 cm de tamanho e abre-se parcialmente, deixando à mostra de uma a três sementes castanho-escuro, com a metade inferior recoberta por um arilo branco e espesso (mesocarpo), sendo curiosamente parecido com o olho humano. A colheita é realizada nesse estágio, para que as cápsulas (casca) não se abram totalmente, evitando a queda das sementes. Fonte: SCHIMPL et al. (2013) e SILVA et al. (2018a).

Também chamado de guaraná da Amazônia, é uma espécie nativa desta região, que teve sua origem, segundo a mitologia indígena, na plantação dos olhos de um indiozinho chamado Aguiri da tribo Sateré Mawé, localizada no município de Maués, no estado do Amazonas, após ser morto na floresta por Jurupari, o deus das trevas. O guaranazeiro é uma planta arbustiva e trepadeira de clima tropical quente e úmido, que produz o fruto do guaraná (HENMAN, 1982; LLERAS, 1983; SMITH e ATROCH, 2010; SCHIMPL et al., 2013; SILVA et al., 2018a).

A cultura do guaraná é descrita desde a época pré-colombiana por diversas tribos indígenas e pequenos agricultores na região amazônica, com técnicas tradicionais e processamento manual (HENMAN, 1982; LLERAS, 1983). Em meados do século XIX era cultivado em municípios amazonenses com destaque para Maués (no leste do estado do Amazonas), onde as sementes da planta vêm sendo consumidas há séculos pelas populações indígenas, com destaque para a tribo Sateré Mawé, que as utilizam principalmente no preparo de uma bebida energética. Atualmente, o guaraná é cultivado por produtores em pequenas e grandes propriedades, seja como monocultura ou junto com outras culturas, utilizando mão de obra familiar, localizados na área rural, ribeirinha e indígena de Maués, o maior produtor de guaraná da agricultura familiar no estado do Amazonas (LLERAS, 1983; SUFRAMA, 2003; SMITH e ATROCH, 2010; SILVA et al., 2018a).

O guaraná ainda é um produto exclusivamente brasileiro com produtividade média no Brasil de 298 kg/ha e sua origem amazônica não impediu que a concentração espacial de sua produção se transferisse desta região para outros estados, como o Mato Grosso e a Bahia, sendo este último o maior estado produtor do Brasil. O cenário atual indica o crescimento sustentado da produção e da produtividade de guaraná em sementes no Amazonas, com base na distribuição de mudas de guaraná resistentes a doenças e de alta produtividade pela EMBRAPA-AM e na implantação de projetos empresariais de cultivo que tendem a adotar padrões agrícolas tecnificados (SUFRAMA, 2003; SEBRAE, 2018; SILVA et al., 2018a).

De acordo com o Levantamento de Avaliação da Safra de Guaraná em Grãos de 2017, a área brasileira colhida estimada foi de 15.002 hectares, apresentando um acréscimo de 37,2 %, em relação à safra 2016, alcançando 3.288 toneladas. A Bahia permanece como líder

no ranking da produção brasileira com 2.340 toneladas. O Amazonas se coloca em segundo lugar, alcançando uma produção de 744 toneladas (IBGE, 2017).

Quando maduro, o fruto é colhido manualmente na estação seca e colocados em uma cesta, onde são armazenados por 2 a 5 dias para serem submetidos à fermentação natural. Posteriormente são removidas a casca vermelha e a polpa de forma mecânica ou manual. As sementes que foram separadas são lavadas e postas para secar antes de serem torradas (SMITH e ATROCH, 2010; DALONSO e PETKOWICZ, 2012; SILVA et al., 2018a).

As sementes secas são torradas por aproximadamente cinco a oito horas em grelhas com cerca de dois metros de diâmetro, feitas preferencialmente de argila para ter uma temperatura mais controlada, evitando assim que as sementes queimem. As sementes são torradas até atingirem um teor mínimo de umidade, próximo a 5 %, tornando-se um produto seco e homogêneo (SMITH e ATROCH, 2010; DALONSO e PETKOWICZ, 2012; SILVA et al., 2018a).

As sementes torradas são moídas para produzir o pó de guaraná, que pode ser utilizado em diversas formas, como diluído em água, cápsula, bastão, além de dar origem ao xarope. Para fabricar o bastão, as sementes são amassadas em um pilão de madeira, misturadas com água e depois moldadas em cilindros antes de serem secas ao sol. Estes bastões são então defumados por várias semanas para conferir um sabor característico (HENMAN, 1982). As plantas industriais moem os grãos torrados com maquinário semelhante ao usado para processar o café (SMITH e ATROCH, 2010).

A comercialização do guaraná é feita em ramas (sementes torradas), seja para exportação, seja para a sua agroindustrialização. Desta última pode-se obter o xarope (concentrado) para consumo direto como bebida energética (ao ser misturado à água) ou para a produção industrial de bebidas gaseificadas, o bastão para ralar e obter o pó para misturar à água e beber, ou o próprio pó já acondicionado em frascos, cápsulas gelatinosas ou sachês, também utilizado na preparação caseira de uma bebida energética. Estima-se que atualmente a produção de guaraná em rama (grãos torrados) no País é de cerca de 2.180 toneladas/ano. Estima-se que dessa produção, 70 % seja absorvido pelas indústrias de refrigerantes gaseificados, sob a forma de xarope, enquanto que os 30 % restantes são comercializados sob

a forma de xarope, pó, bastão, extrato para consumo interno e para a exportação (SUFRAMA, 2003; SILVA et al., 2018a). As principais formas comerciais do guaraná podem ser observadas na Figura 9.

**Figura 9** – Formas de comercialização do guaraná (*Paullinia cupana*).



Em sentido horário partindo do canto superior esquerdo, fruto fresco (casca vermelha, polpa branca e semente preta), semente seca, pó a granel e cápsula, pó em frascos, bastão, xarope e vitamina misturado com outros ingredientes. Fonte: SILVA et al., 2018a, adaptado.

A cultura do guaraná possui enorme importância social e econômica para a região de Maués, fazendo parte da cultura e identidade do município, seja com os dias festivos, como a anual festa do guaraná, ou nas manifestações culturais junto ao artesanato ou no mais recente e difundido vitaminado, comum no município com diversos outros ingredientes. Nas últimas duas décadas, carrinhos de guaraná começaram a aparecer em algumas feiras livres na Amazônia brasileira, como Belém e Manaus. Esses carrinhos vendem bebidas de guaraná preparadas no liquidificador com gelo picado. A fórmula do energético varia entre os fornecedores, mas geralmente contém castanhas, como castanha de caju, amendoim ou castanha do Pará, leite em pó, raízes ou cascas afrodisíacas e guaraná em pó ou xarope. Alguns adicionam frutas, como abacate ou ovos de codorna crus (SMITH e ATROCH, 2010; SILVA et al., 2018a).

Nos últimos anos, o consumo deste fruto tem aumentado ao redor do mundo, podendo ser facilmente encontrado em suplementos alimentares, especialmente naqueles com propósito de auxiliar a perda de peso (BOOZER et al., 2001). Até por volta de duas décadas

atrás, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura descreviam o guaraná como sendo uma bebida com propriedades estimulantes, energéticas e afrodisíacas (desde o século 19), normalmente em combinação com uma ou mais plantas (gingko biloba, ginseng e mate). Além disto, os seus subprodutos (principalmente o xarope) têm sido ao longo de décadas utilizados na indústria de refrigerantes (início do século 20 até dias atuais). Seu elevado teor de cafeína fez com que os efeitos da administração de elevadas doses de guaraná fossem investigados (SILVA et al., 2018a).

YONEKURA et al. (2016) caracterizaram a composição nutricional e fitoquímica do guaraná e identificaram um conteúdo de 151,8 mg/g ( $\pm 9,9$ ) de fenólicos totais, sendo que destes, 30,0 ( $\pm 0,1$ ) mg/g e 20,2 ( $\pm 0,3$ ) mg/g correspondem à catequina e à epicatequina, respectivamente. Estes mesmos autores identificaram um conteúdo de cafeína de 39,8 ( $\pm 0,2$ ) mg/g no guaraná. A composição proximal por 100 g do alimento pode ser observada na Tabela 1.

DA SILVA et al. (2017) ao analisarem a composição química de extratos de sementes de guaraná, identificaram 14 compostos fenólicos, dentre eles os monômeros catequina e epicatequina, além de oligômeros de procianidinas (proantocianidinas), como dímeros de procianidinas do tipo A e B (com destaque para os tipos B1 e B2) e trímeros de procianidinas do tipo A. As procianidinas foram detectadas com grau de polimerização variando de 2 a 4 unidades de (epi)catequina. Segundo os autores, este baixo grau de polimerização encontrado pode resultar da decomposição causada pela fermentação das sementes. As estruturas químicas dos principais compostos fenólicos do guaraná estão representados na Figura 3 (pág. 34).

Na última década, inúmeros estudos vêm sendo realizados em diferentes modelos experimentais demonstrando diversos efeitos benéficos do guaraná e de seus compostos na saúde humana e no controle de doenças ou de efeitos colaterais decorrentes do tratamento destas. Devido a suas inúmeras propriedades como estimulante, afrodisíaco, diurético, febrífugo, tônico cardiovascular, entre outras pesquisadas e comprovadas, o guaraná tem atraído cada vez mais o interesse da indústria farmacêutica (SILVA et al., 2018a).

**Tabela 1** – Composição nutricional e fitoquímica do guaraná (*Paullinia cupana*) em pó.  
*Composição proximal (g/100g)*

Proteínas	12,8 ± 0,1
Gorduras	2,8 ± 0,2
Carboidratos	78,4 ± 0,4
Cinzas	1,6 ± 0,1
Umidade	4,3 ± 0,2
Energia (kcal)	376 ± 3
<i>Polifenóis (mg/g)</i>	
Fenólicos totais <sup>a)</sup>	151 ± 9,9
(+)-Catequinas	30,0 ± 0,1
(-)-Epicatequinas	20,2 ± 0,3
Proantocianidinas B1	3,72 ± 0,07
Proantocianidinas B2	3,37 ± 0,07
<i>Metilxantinas (mg/g)</i>	
Cafeína	39,8 ± 0,2
Teobromina	0,17 ± 0,01

Os resultados são expressos na forma de média ± DP, n = 3. <sup>a)</sup> Como equivalente de ácido gálico, extraído com 35 % de acetona, v/v. Fonte: YONEKURA et al. (2016).

#### 1.4.1 Efeitos benéficos do guaraná (*Paullinia cupana*) na saúde

A primeira descrição escrita do guaraná data do século XVII, quando em 1669 missionários jesuítas observaram o hábito que os índios na Amazônia tinham de ingerir o guaraná como bebida diária, bem como o relato de suas propriedades diuréticas, antidiarreicas, contra dores de cabeça, febre e cólicas. Existia uma crença generalizada de que o consumo de uma dose diária de guaraná (de manhã em jejum) poderia agir como afrodisíaco e proteger contra malária e outras doenças parasitárias, o que levava a um elevado consumo desta bebida na Amazônia (HENMAN, 1982).

As primeiras investigações científicas sobre as propriedades do guaraná datam de 1826, quando foi isolada uma substância cristalina denominada guaranina, que posteriormente

demonstrou-se tratar de uma metilxantina com estrutura semelhante à cafeína, presente em conjunto com elevadas quantidades de teobromina e teofilina (HENMAN, 1982).

Em 1872, Lathan relatou o uso do guaraná em pó, proveniente das sementes secas, para curar dor de cabeça e outros tipos de neuralgias, na quantidade de 10 a 15 g do pó uma ou mais vezes por dia. Este mesmo autor identificou a presença da guaranina, atribuindo ao guaraná os mesmos efeitos sobre o sistema nervoso central que o chá ou café, além de efeitos na diarreia e em acometimentos do sistema urinário. Neste mesmo ano, Wilks também correlacionou o uso do guaraná em pó e a cura rápida de dor de cabeça (LATHAN, 1872; WILKS, 1872). Desde então, diversos estudos vêm sendo realizados mostrando os efeitos benéficos do guaraná na saúde humana.

As propriedades funcionais do guaraná, que são potencialmente similares àquelas observadas no chá verde (*Camelia sinensis*), são relacionadas às desordens metabólicas, como obesidade, hipertensão, diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica. Estudos mostram efeitos positivos do consumo do guaraná neste tipo de desordens, bem como no metabolismo lipídico, perda de peso e aumento do metabolismo basal, observados tanto por meio de marcadores bioquímicos quanto por marcadores antropométricos. Além disso, dados sugerem que o guaraná possui um efeito antiobesidade e cardioprotetor (KREWER et al., 2011; PORTELLA et al., 2013), além de efeitos na modulação da resposta imune (CANICEIRO, 2012) e efeito protetor contra danos celulares oxidativos provocados por óxido nítrico (NO), com redução da mortalidade celular, da peroxidação lipídica, do dano ao DNA, bem como o aumento da enzima superóxido dismutase (SOD) (BITTENCOURT et al., 2013). Adicionalmente, FUKUMASU et al. (2006) identificaram propriedades antígenotóxicas e anticitotóxicas do guaraná.

#### 1.4.2 Efeitos benéficos do guaraná (*Paullinia cupana*) na saúde cardiovascular

Estudos realizados em diversos modelos experimentais, tanto em animais quanto em humanos, têm demonstrado efeitos cardioprotetores, quando usados em combinação com outras plantas medicinais ou de forma isolada. Também têm sido demonstrados outros efeitos relacionados com a saúde cardiovascular, como hipolipemiante, antiinflamatório e

antioxidante, que pode prevenir doenças crônicas causadas por alterações no perfil lipídico (ALONSO-CASTRO et al., 2019; BORTOLIN et al., 2019; RUCHEL et al., 2019).

Os efeitos benéficos do guaraná nas doenças cardíacas foram bem demonstrados na literatura na última década. RUCHEL et al. (2019) avaliaram o efeito do guaraná em pó no metabolismo das purinas e no perfil inflamatório em linfócitos e soro de ratos com hiperlipidemia induzida por Poloxamer-407. Segundo os autores, o guaraná (12,5, 25 e 50 mg/kg/dia) e a cafeína (0,2 mg/kg/dia) preveniram a elevação da concentração de INF-gama causados pela hiperlipidemia, diminuindo o processo inflamatório causado pela lipotoxicidade e promovendo um perfil anti-inflamatório.

Ainda em ratos, o guaraná em pó (12,5, 25 e 50 mg/kg/dia) foi capaz de reduzir a concentração de colesterol total e LDL-c para valores basais de maneira semelhante à sinvastatina após 30 dias de intervenção, reduzindo parcialmente os danos hepáticos causados pela hiperlipidemia, contribuindo para a redução do processo inflamatório (RUCHEL et al., 2016, 2017).

Para examinar os efeitos do guaraná sobre o metabolismo dos lipídios nos tecidos, LIMA et al. (2005) suplementaram ratos Wistar adultos machos, sedentários e treinados, com diferentes doses de extrato aquoso de guaraná (0,130 g/kg e 0,325 g/kg) por 14 dias. A suplementação de guaraná com a maior dose estudada levou à uma diminuição da ingestão total de alimentos e foi capaz de induzir alterações no metabolismo lipídico.

Estudos realizados em modelos humanos também demonstraram os benefícios do uso do guaraná no metabolismo lipídico, em marcadores de estresse oxidativo, oxidação da LDL (LDL-ox) e distúrbios metabólicos. Quando indivíduos saudáveis com sobrepeso completaram uma intervenção de 15 dias com uma ingestão diária de 3 g de pó de semente de guaraná contendo 90 mg (+)- catequina e 60 mg (-)- epicatequina, uma melhora foi observada nos marcadores de estresse oxidativo, como atividade antioxidante plasmática, proteção do DNA de eritrócitos (contra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), redução da oxidação da LDL e melhora da atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase, podendo confirmar a biodisponibilidade das catequinas presentes neste alimento (YONEKURA et al., 2016).

Os potenciais efeitos benéficos do consumo diário de guaraná foram descritos por KREWER et al. (2011) e PORTELLA et al. (2013) ao avaliarem uma população idosa residente na região ribeirinha do município de Maués (Amazonas, Brasil) que utilizam este alimento como parte da sua alimentação habitual. Eles identificaram melhora de distúrbios metabólicos como incidência reduzida de hipertensão arterial sistêmica (HAS), obesidade e síndrome metabólica (SM), menor circunferência da cintura, menor concentração de colesterol total e LDL-c, redução de produtos da oxidação avançada de proteínas (*advanced oxidation protein products* - AOPP), de LDL-ox, da peroxidação lipídica além de elevada atividade antioxidante.

Os efeitos do guaraná sobre a oxidação de LDL sérica provavelmente estão associados aos seus compostos bioativos, como catequinas, cafeína e outras xantinas semelhantes às encontradas em outros alimentos, como o chá verde; no entanto, o mecanismo de ação exato permanece obscuro. Os polifenóis do guaraná podem se incorporar ao LDL, tornando o soro de sujeitos menos suscetíveis à oxidação (KREWER et al., 2011; PORTELLA et al., 2013). Esses estudos sugerem que o pó de guaraná pode ser um composto promissor para uso como terapia complementar em benefício de pacientes com hiperlipidemia.

Considerando-se as diversas evidências científicas sobre os efeitos benéficos atribuídos ao consumo do guaraná na manutenção da saúde e na prevenção das DCNT, em especial as DCV, ressalta-se a importância de pesquisar o mecanismo de ação dos compostos deste alimento e seus respectivos efeitos nos processos de captação e absorção de colesterol sob condições *in vitro*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó sobre os mecanismos envolvidos com a absorção de colesterol em modelos *in vitro* e em células Caco-2.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

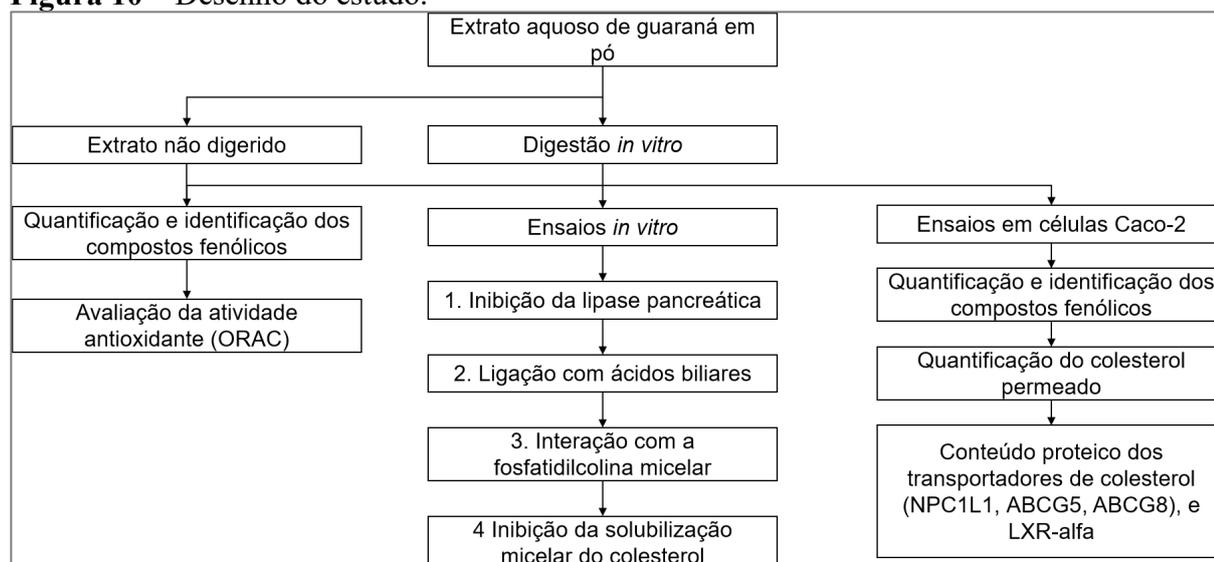
- Quantificar e identificar os polifenóis presentes no extrato aquoso e no produto da digestão *in vitro* do guaraná em pó;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de guaraná antes e após a digestão *in vitro*;
- Avaliar a capacidade do extrato do guaraná digerido de inibir a lipase pancreática e a solubilização micelar do colesterol *in vitro*;
- Avaliar a capacidade do extrato do guaraná digerido de ligação com os ácidos biliares e de interação com a fosfatidilcolina micelar *in vitro*;
- Verificar a bioacessibilidade e a captação dos polifenóis presentes no extrato aquoso digerido do guaraná em pó e investigar seu efeito na presença do colesterol sobre o conteúdo proteico dos genes *Npc111*, *Abcg5*, *Abcg8* e *LXR-alfa* em células intestinais Caco-2.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental composto por análises *in vitro* e em modelo de cultura celular utilizando a linhagem Caco-2. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Componentes Alimentares e Saúde (LACAS), no Laboratório de Bioquímica da Nutrição Aplicada às Doenças Crônicas (LABINAD) e no Laboratório de Genômica Nutricional e Inflamação (GENUIN) da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). O desenho do estudo pode ser observado na Figura 10.

**Figura 10** – Desenho do estudo.



#### 3.2 AMOSTRAS E PREPARO DOS EXTRATOS

As amostras de guaraná em pó foram adquiridas no comércio local e mantidas em suas embalagens originais, estocadas a 4 °C e protegidas de luz até o momento da análise. Todas as análises foram realizadas em triplicata. As amostras de guaraná (0,8 g) foram extraídas com 20 mL de água MilliQ e cada etapa de extração consistiu em homogeneização por Ultra-turrax por três min, a 14.000 rpm/min, seguidos por centrifugação a 18000 x g por 15 min em temperatura ambiente (24 °C) e coleta de sobrenadante. Este procedimento foi repetido por quatro vezes (quatro extrações) e todos os sobrenadantes foram filtrados e combinados e o

volume completado com água MilliQ para 100 mL. As amostras foram aliqüotadas e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização dos experimentos (SILVA et al. 2018b).

### 3.3 DETERMINAÇÃO DOS SÓLIDOS SOLÚVEIS

Para a quantificação dos sólidos totais, tubos de ensaio devidamente identificados foram colocados em estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  de 2 a 3 h e depois foram resfriados à temperatura ambiente dentro de um dessecador; os tubos foram pesados e tarados. Em seguida foi pipetado 1 mL do extrato aquoso do guaraná em cada tubo e estes foram colocados novamente na estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h, resfriados em temperatura ambiente dentro do dessecador e pesados. A diferença dos pesos é o peso dos sólidos solúveis, que correspondeu a 0,27 g/100 mL.

### 3.4 DIGESTÃO *IN VITRO* DO EXTRATO AQUOSO DO GUARANÁ EM PÓ

Para se avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos do guaraná foi desenvolvido um protocolo simulando a digestão *in vitro*. Os extratos aquosos de guaraná foram submetidos à digestão sucessiva oral, gástrica e intestinal de acordo com os modelos descritos por MINEKUS et al. (2014) e YONEKURA e NAGAO (2009), adaptados. Resumidamente, uma porção de 5 mL do extrato aquoso do guaraná foi utilizado e a fase oral foi iniciada com a adição de 3,5 mL de uma solução tampão e o pH ajustado para 7,0 com NaOH 1 M. Foi adicionado 0,5 mL de  $\alpha$ -amilase (1500 U/mL) e 1 mL de água MilliQ ou volume completado para 10 mL. Os tubos foram incubados à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min em banho com agitação (120 agitações/min).

A fase gástrica foi iniciada com a adição de 7,5 mL da solução tampão e o ajuste do pH para 2,0 com HCl 1 M. Em seguida, foram adicionados, 1,6 mL de pepsina (solução de 25000 U/mL) e 900  $\mu\text{L}$  de água MilliQ ou até completar o volume para 20 mL. Foi purgado nitrogênio e os tubos foram fechados hermeticamente e incubados  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 h em banho com agitação (120 agitações/min). Subsequentemente, a fase de digestão intestinal foi simulada com a adição de 11 mL da solução tampão, ajustando o pH para 7,0 com NaOH 1M, e foram adicionados, 5 mL de pancreatina (800 U/mL), 2,5 mL de extrato biliar (160 mM) e 1,5 mL de água MilliQ ou até completar o volume para 40 mL. Foi purgado nitrogênio e os

tubos foram fechados hermeticamente e incubados 37 °C durante 2 h em banho com agitação (120 agitações/min). A digestão foi interrompida em banho de gelo. Após a digestão *in vitro*, parte da fração bioacessível das bebidas foi alíquotada e armazenada em freezer a temperatura de – 80 °C e parte foi liofilizada e armazenada a – 20 °C para a realização das análises posteriores.

### 3.5 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO AQUOSO DE GUARANÁ EM PÓ ANTES E APÓS A DIGESTÃO *IN VITRO* E APÓS A PERMEAÇÃO EM CÉLULAS CACO-2

O teor de compostos fenólicos totais presentes no extrato do guaraná foi determinado de acordo com o método desenvolvido por SINGLETON e ROSSI (1965) com reagente Folin-Ciocalteu. Primeiramente, 120 µL de amostra não digerida e digerida foi diluída em água destilada e pipetada em microplaca de 96 poços. Posteriormente, 50 µL do reagente Folin-Ciocalteu foi adicionado e a microplaca agitada e incubada à temperatura ambiente (24 °C). Após 3 min, 30 µL de solução aquosa de carbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>; 200 g/L) foram adicionados e a microplaca agitada e incubada à 37 °C em incubadora por 1 h. A absorbância foi lida a 750 nm em leitor de placas (SpectraMax M5 – Molecular Devices) e o ácido gálico foi utilizado como padrão. As curvas padrão do ácido gálico podem ser observadas no Apêndice 1, Figuras 30 e 31. Cada medida foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos como equivalente a mg de ácido gálico por 1 g de amostra.

A identificação e quantificação de padrões e amostras foi realizada por HPLC, segundo método de YONEKURA e TAMURA (2019) com modificações, em cromatógrafo líquido da marca Shimadzu Modelo LC 20AD (Shimadzu Scientific Instruments-Inc-Japan) equipado com injetor automático SIL-20AC HT, controlador CBM 20A, forno de coluna CTO 20A e detector de arranjo de diodos SPD M20A. Foi empregada uma coluna cromatográfica C18 Shim Pack VP-ODS (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 µm - Shimadzu, Tokyo, Japan) precedida de pré-coluna C18 4 x 3,0 mm (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). O volume de injeção foi de 20 µL. A fase móvel foi constituída por acetonitrila/água 9:91 (v:v), com 0,1% de ácido fórmico, com fluxo isocrático de 1 mL/min e temperatura de forno de coluna de 35 °C. O tempo de corrida foi padronizado em 40 minutos, utilizando o detector de

arranjo de diodos (DAD) UV/VIS com varredura, com leitura no comprimento de onda de 210 nm.

A identificação foi realizada pela comparação do tempo de retenção dos cromatogramas de padrões individuais usando o *software LabSolutions* (Shimadzu, Tokyo, Japan). A quantificação foi realizada pelo cálculo da área do pico, correlacionada com as curvas de calibração dos padrões de procianidinas B1 (PB1) e B2 (PB2), catequina, epicatequina e cafeína (Apêndice 2, Figuras 32 a 36). Os padrões foram pesados e preparados em solução aquosa contendo 2 mM de ácido ascórbico, 0,05 mM de NaEDTA e 0,1% de ácido fórmico. Para as curvas de calibração, foram feitas diluições seriadas dos padrões com o solvente de injeção nas seguintes concentrações: 0,75, 1,25, 2,5, 5 e 10 µg/mL para PB1 e PB2, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL para epicatequina e 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL para catequina e cafeína, em triplicata. As amostras e padrões foram diluídos no solvente de injeção e filtrados em filtro de seringa de 0,45 µm em *vial* âmbar.

Para descartar a presença de picos interferentes de enzimas digestivas e metabolismo celular, foram analisadas amostras de controles da digestão *in vitro* e da permeação em células Caco-2 (branco da enzima) contendo apenas enzimas digestivas e sais de tampão, sem amostras. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos a partir da injeção da fase móvel (solvente de injeção; n = 6) e os valores obtidos foram multiplicados por 3 e por 10, respectivamente, e as concentrações foram estimadas a partir da proporcionalidade das curvas de calibração dos padrões.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DE GUARANÁ EM PÓ ANTES E APÓS A DIGESTÃO *IN VITRO*

A atividade antioxidante dos extratos de guaraná antes e após a digestão foi determinada pelo ensaio da capacidade de absorbância de radical oxigênio (*Oxygen Radical Absorbance Capacity* - ORAC) segundo método descrito por OU, HAMPSCH-WOODILL e PRIOR et al. (2001) e PRIOR et al. (2003). Primeiramente, 50 µL de amostra diluída em tampão fosfato (75 mmol/L; pH 7,4) foram pipetadas em microplaca Fluotrac preta de 96 cavidades. Posteriormente, 150 µL de uma solução de trabalho de fluoresceína (93,54 nmol/L)

diluída em tampão fosfato foram adicionados e a placa agitada em agitador de placas e incubada a 37 °C em incubadora por 15 min.

Após a incubação, 50 µL de uma solução do radical dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) (AAPH) (60 g/L) em tampão fosfato foram adicionados e a placa agitada no leitor de placas (SpectraMax M5 – Molecular Devices) e os valores de fluorescência foram lidos a uma excitação de 493 nm e emissão de 515 nm a cada minuto por 60 min com temperatura controlada de 37 °C. O tampão fosfato foi usado como branco e o Trolox foi utilizado como padrão em concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µM. A curva padrão do Trolox pode ser observada no Apêndice 3, Figura 37.

Para cada amostra, branco e padrão foram determinadas a área sob a curva (*Area under curve* – AUC) conforme a equação:  $AUC = ((F_1/F_0 + F_2/F_0 + F_2/F_0 + \dots + F_{59}/F_0 + F_{60}/F_0) + 0,5)$ , onde  $F_0$  = fluorescência inicial em 0 minutos e  $F_1$  = fluorescência no tempo. Para o cálculo do valor relativo de ORAC foi utilizada a seguinte fórmula:  $ORAC (\mu\text{mol Eq Trolox/L}) = [(AUC \text{ amostra} - AUC \text{ branco}) \times [ ] \text{ Trolox } (\mu\text{M}) \times \text{FD da amostra}] / (AUC \text{ Trolox} - AUC \text{ branco})$ , onde FD = fator diluição.

Os valores finais de ORAC foram calculados utilizando a equação de regressão entre as concentrações de Trolox e os valores de AUC do decaimento da fluoresceína. Cada medida foi realizada em triplicata e os resultados de ORAC relativos e finais foram expressos como µmol de equivalente de Trolox por litro ou por grama de amostra (µmol Eq Trolox/L ou µmol Eq Trolox/g), respectivamente.

### 3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA

O método utilizado para avaliação da ação dos extratos digeridos sobre a atividade da lipase pancreática foi descrito por KURIHARA et al. (2003) e NAKAI et al. (2005), adaptado, e consiste na mensuração da atividade da enzima utilizando o 4-metilumbeliferil oleato (4-MUO) como substrato. Em microplaca Fluotrac 200 com 96 cavidades (fundo plano, cor preta, Greiner BIO-one Brasil), as amostras do extrato previamente diluídas com água deionizada (25 µL) foram misturadas com 50 µL de uma solução de 4-MUO 0,1 mM em tampão Tris-HCl (13 mM, 150 mM NaCl, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0).

A mistura foi incubada com solução de lipase pancreática suína tipo II (50 U/mL) em tampão Tris-HCl (13 mM, pH 8,0) por 30 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de citrato de sódio 0,1 M (pH 4,2). Uma solução controle foi incubada nas mesmas condições, substituindo-se o extrato por água deionizada. O 4-metilumberiferona formado foi medido em leitor de microplacas (modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc.) por fluorescência com  $\lambda_{excitação} = 355 \text{ nm}$  e  $\lambda_{emissão} = 460 \text{ nm}$ .

Considerando possíveis compostos fluorescentes inerentes ao extrato do guaraná, utilizou-se um branco para cada diluição do extrato (25 µL da diluição do extrato, 50 µL de 4-MUO e 25 µL de tampão) e um branco para o controle (25 µL de água deionizada, 50 µL de 4-MUO e 25 µL de tampão), sendo a diferença utilizada para o cálculo do IC<sub>50</sub> (concentração do inibidor na qual a velocidade de formação do produto da reação da enzima é a metade da velocidade sem o inibidor). Todas as análises foram realizadas em triplicata e realizou-se uma curva com cinco diluições do extrato para o cálculo do IC<sub>50</sub> das amostras.

O Orlistat (Sigma-PHR1445; 1 mg/mL) foi utilizado como controle positivo da inibição da lipase pancreática, sendo diluído em metanol a 10 % (1,2 - 0,075 µg/mL) para o cálculo do IC<sub>50</sub>. O percentual de inibição da lipase foi calculado pela seguinte equação: % inibição =  $[1 - (\text{absorbância da amostra} / \text{absorbância do controle})] \times 100$ . O IC<sub>50</sub> foi calculado pela equação da curva logarítmica obtida a partir das concentrações das diluições do extrato *versus* o % de inibição da lipase pancreática. Os resultados foram expressos em µg de amostra por mL.

### 3.8 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO COM ÁCIDOS BILIARES

A interação do extrato do guaraná digerido com os ácidos biliares da estrutura micelar foi avaliada de acordo com YOSHIE-STARK e WÄSCHE (2004). As amostras liofilizadas foram diluídas em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,0) em diferentes concentrações (10 e 5 mg/mL). Foram transferidos 100 µL da suspensão da amostra para um microtubo e adicionados 900 µL de uma solução de taurocolato 6 mM em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,0) e incubado a 37° C em incubadora durante 2 h, chegando a concentrações finais de 1,0 e 0,5 mg/mL de amostra.

Após a incubação, cada amostra foi centrifugada (26.800 x g; 10 min; 22° C) e o sobrenadante reservado em um falcon de 15 mL; o precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de tampão fosfato (0,1 M; pH 7,0), misturado bem e centrifugado novamente; o sobrenadante foi coletado e combinado com o sobrenadante anterior; este procedimento foi repetido e o sobrenadante combinado aos sobrenadantes anteriores totalizando um volume final de aproximadamente 3 mL.

A resina colestiramina (SIGMA-ALDRICH), uma droga que se liga ao ácido biliar e reduz o colesterol, também foi avaliada quanto à sua capacidade de ligar ácidos biliares e utilizada como controle positivo, sendo submetida às mesmas condições que as amostras. A concentração de ácidos biliares foi quantificada espectrofotometricamente a 405 nm utilizando *Total Bile Acids Assay kit* (Diazyme, Poway, CA, USA) a partir de uma curva padrão de taurocolato de sódio (Apêndice 4, Figura 38). Este método é baseado na oxidação enzimática de primeira ordem dos ácidos biliares à 3-cetoesteróides com formação de Tio-NADH. A capacidade de ligação de ácidos biliares será dada como  $\mu\text{mol}$  de ácidos biliares ligado por grama de amostra (isto é, retida no precipitado após centrifugação).

### 3.9 PREPARO DE MICELAS DE COLESTEROL

As micelas mistas foram preparadas segundo ZHANG et al. (2012). A mistura lipídica (com concentrações finais de 0,5 mM de colesterol, 2,4 mM de fosfatidilcolina e 1 mM de ácido linoléico) foi combinada com tampão Hank's contendo 6,6 mM de taurocolato de sódio em pH 7,4. As suspensões foram sonicadas em banho com gelo, usando um sonicador Transsonic Digital S (Elma) a 100 % da potência máxima (140 W) por 15 min e incubadas por 1 h à 37 °C em incubadora. As soluções foram novamente sonicadas durante 2 min sem gelo e armazenadas sob refrigeração por 24 h antes do experimento.

### 3.10 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO COM A FOSFATIDILCOLINA MICELAR

Com o intuito de avaliar a capacidade dos extratos de interação com fosfatidilcolina micelar (KOBAYASHI et al., 2014), amostras de guaraná digeridas e liofilizadas foram adicionadas às soluções micelares previamente preparadas (ZHANG et al., 2012) em

diferentes concentrações (1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL). Após formação das micelas, a mistura foi incubada durante 1 h a 37 ° C e, em seguida, centrifugada a 25.000 x g durante 1 h a 20 °C. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de seringa Chromafil Pet-20/15 MS 0,20 µm (Macherey-Nagel, Duren, Germany) e os fosfolípidos do filtrado foram quantificados colorimetricamente com auxílio do kit *Phospholipid Assay Kit* (n° cat. MAK122, SIGMA-ALDRICH) de acordo com as recomendações do fabricante.

Em microplaca de 96 poços foram pipetados 20 µL das amostras, padrão e branco em triplicata e em seguida 80 µL do mix de reação. Após homogeneização, a placa foi incubada por 30 min em temperatura ambiente ao abrigo da luz. A absorbância foi medida a 570 nm em leitor de placas. Esse método baseia-se na hidrólise enzimática da fração colina presente nos fosfolípidos e na sua posterior detecção espectrofotométrica, em comparação ao percentual de fosfatidilcolina presente na micela padrão sem amostra. O produto da reação é diretamente proporcional à concentração de fosfolípido da amostra.

### 3.11 ENSAIO DA INIBIÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO MICELAR DO COLESTEROL *IN VITRO*

Com o intuito de avaliar a capacidade dos extratos de inibição da solubilização micelar do colesterol, amostras de guaraná digeridas e liofilizadas foram adicionadas às soluções micelares previamente preparadas (ZHANG et al., 2012) em diferentes concentrações (1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL). As soluções foram sonicadas durante 2 min e incubadas por 1 h à 37 °C. As suspensões foram centrifugadas a 1000 × g por 10 min a 20 °C para separar o colesterol insolúvel. Os sobrenadantes foram coletados e filtrados em filtros de seringa Chromafil Pet-20/15 MS 0,20 µm (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Foi preparado um controle de micelas sem amostras e as análises foram realizadas em triplicata (MARQUES et al., 2015).

As concentrações de colesterol foram determinadas utilizando o Kit de ensaio de colesterol do Amplex® Red (*Amplex® Red Cholesterol Assay Kit*, Catalog no. A12216, invitrogen, Paisley, Reino Unido), seguindo as recomendações do fabricante. Em microplaca preta de 96 poços foram pipetados 50 µL das amostras, padrões e controles diluídos e em seguida 50 µL do reagente de trabalho contendo 150 µM do reagente Amplex® Red, 1 U/mL de HRP (*horseradish peroxidase*), 1 U/mL de colesterol oxidase e 0,1 µM de colesterol

esterase. A microplaca foi incubada a 37 °C protegida da luz dentro do leitor de placas. A determinação foi realizada por meio de fluorescência (excitação em 544 nm e emissão em 590 nm) com auxílio de um leitor de placas SpectraMax M5 (molecular devices, Sunnyvale, CA, EUA). As concentrações de colesterol foram determinadas a partir da curva padrão de calibração de colesterol (Apêndice 5 - Figura 39) e a capacidade de inibição foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Capacidade de inibição(\%)} = \left[ \frac{C_0 - C_s}{C_0} \right] \times 100$$

Onde:  $C_0$  é a concentração de colesterol das micelas sem amostras e  $C_s$  é a concentração de colesterol das micelas com os extratos.

### 3.12 CULTIVO DE CÉLULAS CACO-2

As células Caco-2 foram obtidas do Instituto Adolfo Lutz e cultivadas segundo o protocolo de HUBATSCH et al. (2007) em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com 10 % de soro fetal bovino, 1 % de solução de aminoácidos não essenciais, glutamina 2 mM e antimicrobianos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL). As células foram utilizadas entre os repiques de passagem 48 a 73. O subcultivo foi realizado quando a cultura atingiu, no mínimo, 80 % de cobertura da garrafa, cerca de 7 dias, por tripsinização com 0,05 % de tripsina-EDTA e ressuspensa em meio. As culturas foram mantidas em incubadora sob temperatura de 37 °C, atmosfera constituída de 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 3.13 ENSAIO DA PERMEAÇÃO DO COLESTEROL EM CÉLULAS CACO-2

As células foram tripsinizadas e semeadas em placas *Transwell*® contendo 24 poços com suporte de policarbonato de 0,4 µm de poro, e área de 0,33 cm<sup>2</sup>, numa densidade de 6 x 10<sup>4</sup> cel/cm<sup>2</sup>, com 0,75 mL de meio no lado basolateral e 0,25 mL de meio no lado apical. As culturas foram mantidas em incubadora sob temperatura de 37 °C, atmosfera constituída de 5 % de CO<sub>2</sub> e 90 % de umidade relativa, até a formação da monocamada (18-21 dias após semeadura), com troca de meio três vezes por semana. A resistência elétrica transepitelial

(TEER) foi aferida para o controle da formação, integridade e uniformidade da monocamada e foram consideradas aptas para o início do experimento os insertos que apresentaram valores de TEER acima de  $300 \Omega \times \text{cm}^2$ .

Para o experimento de permeação, o meio foi removido e as células foram expostas a concentrações crescentes do extrato do guaraná (0,025, 0,050 e 0,075 mg/mL) segundo ensaio de citotoxicidade realizado por SILVA et al. (2018b). As amostras liofilizadas foram diluídas em tampão *Hank's* (HBSS) juntamente com as micelas de colesterol (130  $\mu\text{g/mL}$ ) previamente preparadas segundo método supracitado, filtradas em filtro de seringa de 0,22  $\mu\text{m}$  e 0,25 mL de cada concentração foram aplicadas no lado apical das monocamadas diferenciadas e 0,75 mL de HBSS foram adicionados no lado basolateral da monocamada celular. O experimento foi conduzido por 2 h e as amostras foram coletadas dos compartimentos apical e basolateral e armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  para posterior análises. A TEER foi aferida com 1 hora e após 2 horas de permeação, para garantir a viabilidade das células após o experimento. Uma mistura de padrão de catequina e epicatequina nas concentrações de 1,5 e 2,25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, foi utilizada como controle positivo.

### 3.14 QUANTIFICAÇÃO DO COLESTEROL NO PERMEADO DE CÉLULAS CACO-2

Para avaliar colesterol dos permeados oriundos das células Caco-2, as amostras foram submetidas a um processo de extração de colesterol das micelas conforme SALVIA-TRUJILLO et al. (2017) adaptado. As amostras provenientes dos meios apical e basolateral foram pipetadas em microtubos de 5 mL e em seguida 833 e 2500  $\mu\text{L}$  de hexano foram adicionados, respectivamente, seguido da adição de 250 e 750  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico 1 M, respectivamente. As amostras foram agitadas em vórtex, levadas ao banho ultrassônico por 10 min e em seguida centrifugadas a  $500 \times g$  por 5 min a  $20^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi coletado e armazenado em tubo falcon de 15 mL. Uma nova extração foi realizada com a adição de 500 e 1000  $\mu\text{L}$  de hexano nas amostras apical e basolateral, respectivamente, e novamente foram agitadas em vórtex, levadas ao banho ultrassônico por 2 minutos e centrifugadas a  $500 g$  por 5 minutos a  $20^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi novamente coletado e combinado com o anterior. Uma terceira extração, nas mesmas condições da segunda, foi realizada e o sobrenadante combinado com os anteriores. Em seguida, as amostras foram evaporadas em concentrador de

vácuo (centrivap) por cerca de 30 min até a secagem total, ressuspendidas em 1000  $\mu$ L de hexano grau HPLC, agitadas em vórtex, levadas ao banho ultrassônico por 2 min e filtradas em filtro de seringa de 0,45  $\mu$ m em *vial*.

As amostras foram injetadas para quantificação do colesterol por HPLC em equipamento da marca Shimadzu Modelo LC 20AD (Shimadzu Scientific Instruments-Inc-Japan) equipado com injetor automático SIL-20AC HT, controlador CBM 20A, forno de coluna CTO 20A e detector de arranjo de diodos SPD M20A, com coluna cromatográfica HyperClone (Phenomenex) 5  $\mu$  CN 120A, 250 x 4,60 mm 5 micron. O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L. A fase móvel foi constituída por n-hexano/isopropanol nas concentrações de 99,5:0,5 (v:v) e 99,2:0,8 (v:v) para as amostras apical e basolateral, respectivamente, com fluxo isocrático de 1 mL/min. O detector utilizado foi o DAD UV/VIS com varredura, com leitura no comprimento de onda de 206 nm. O tempo de retenção foi de 9 e 7 min, para as amostras apical e basolateral, respectivamente.

A quantificação foi realizada por padronização empregando-se curva de calibração de colesterol padrão (Sigma-USA) (Apêndice 6, Figura 40). A identificação foi realizada pela comparação do tempo de retenção de cada pico com o do padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata

### 3.15 EXTRAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DE CÉLULAS CACO-2 PARA DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DOS TRANSPORTADORES DE COLESTEROL POR *WESTERN BLOTTING*

As células foram tripsinizadas e cultivadas em placa de 12 poços de poliestireno de área de 3,8 cm<sup>2</sup>, com densidade de 5x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>, com 1 mL de meio. As culturas foram mantidas em incubadora sob temperatura de 37 °C, atmosfera constituída de 5 % de CO<sub>2</sub> e 90 % de umidade relativa, por um período de 20 dias, com troca de meio três vezes por semana. As células foram incubadas com filtrados proveniente da digestão *in vitro* do extrato do guaraná em três diferentes concentrações (0,025, 0,050 e 0,075 mg/mL) nos períodos de 2 e 16 h. Alíquotas das células Caco-2 incubadas com as amostras foram obtidas para extração do conteúdo proteico utilizando o tampão de lise celular RIPA (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), seguido de homogeneização, centrifugação e coleta do sobrenadante. As amostras foram congeladas a - 70 °C para posteriores análises.

### 3.16 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DOS EXTRATOS CELULARES

O conteúdo proteico das amostras foi determinado utilizando o *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, number 23227), cujo princípio é baseado no ácido bicinconínico (*bicinchoninic acid* - BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação de proteínas totais. O método combina a redução de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  por proteínas em meio alcalino com detecção do cátion cobre ( $\text{Cu}^{+1}$ ) após sua quelação com 2 moléculas de BCA. O produto de coloração roxa é formado exibindo uma forte absorbância a 562 nm, sendo linear com o aumento da concentração de proteína. Foi utilizado uma curva padrão de albumina (*bovine serum albumin* - BSA) para quantificação da proteína das amostras (Apêndice 7, Figuras 41 e 42). A concentração de proteína é dada em  $\mu\text{g/mL}$ .

Após a determinação do conteúdo proteico das amostras, foi calculado o volume correspondente a 15  $\mu\text{g}$  de proteína de cada amostra e completado o volume com tampão LAEMMLI para 30  $\mu\text{L}$  (volume pipetado em cada poço no gel de eletroforese).

### 3.17 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING

As proteínas dos extratos celulares foram separadas por eletroforese utilizando gel de poliacrilamida (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* - PAGE), TGX™ (*Tris-Glycine eXtended*) *FastCast™ Acrylamide Solutions*, 10% (Bio Rad, USA), utilizando equipamento tipo Mini-PROTEAN® *Tetra Handcast Systems* com cuba Mini-PROTEAN® *Tetra Vertical Electrophoresis Cell* (com capacidade para até quatro géis). A corrida de eletroforese foi feita utilizando a fonte *PowerPac™ HC High-Current Power Supply* a 100 v, amperagem de 0,06 A e 6 w para gel de 1,0 mm, por aproximadamente 90 minutos. Após a separação das proteínas por eletroforese, foi realizada a análise de *Western blotting* em membrana de nitrocelulose (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA).

A transferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada pelo método *Semi-Dry* utilizando o *Power Blotter System*® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) por 7 ou 10 min, dependendo do peso molecular da proteína de interesse. Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de *Ponceau* (0,1 % em ácido acético) para verificar a

eficácia da transferência. Para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio contendo albumina (*Bovine Serum Albumin* - BSA) a 5 % por duas h sob leve agitação em temperatura ambiente. Após o bloqueio, foi realizada a incubação da membrana com os anticorpos primários para as proteínas NPC1L1, ABCG5, ABCG8 e LXR-alfa, de acordo com a diluição recomendada pelo fabricante (Abcam, USA; Quadro 1) sob leve agitação, a 4 °C por 18 h (*overnight*).

Para visualizar o complexo proteína-anticorpo foi utilizado um anticorpo secundário anti o anticorpo-primário, com incubação por uma hora, sob leve agitação em temperatura ambiente. Como controle foi utilizada a proteína Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase* - GAPDH). As imagens foram capturadas com o auxílio do *software* ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) e a quantificação das proteínas foi realizada utilizando o *software* ImageQuant TL. Todos os resultados foram normalizados utilizando a proteína GAPDH, membrana por membrana.

**Quadro 1** – Especificação dos anticorpos primários e secundários\* utilizados e suas respectivas diluições.

Anti-corpo	Código	Descrição	Diluição
Primário ABCG5	ab87116	Rb pAb to ABCG5	1 µg/mL
Primário ABCG8	ab126493	Rb pAb to ABCG8	1:300
Primário NPC1L1	ab124801	Rb mAb to NPC1L1	1:1000
Primário LXR alpha	ab3585	Rb pAb to LXR alpha	1:300
Primário GAPDH	ab8245	Ms mAb to GAPDH	1:5000
Secundário anti-Rabbit	ab6721	Goat pAb to Rb IgG (HRP)	1:10.000
Secundário anti-Mouse	ab6728	Rb pAb to Ms IgG (HRP)	1:10.000

\*Fabricante : Abcam, USA.

### 3.18 ANÁLISE DOS DADOS

Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados são apresentados na forma de média ± desvio padrão e avaliados pela análise de variância (ANOVA) entre diferentes grupos e quando houve diferença foi aplicado o teste de *Tukey* ou teste *t* de *Student*. Para a aplicação dos testes estatísticos foi utilizado o *software* *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 20.0, adotando nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CONTEÚDO TOTAL DE FENÓLICOS DO EXTRATO AQUOSO DE GUARANÁ EM PÓ ANTES E APÓS A DIGESTÃO *IN VITRO* E APÓS A PERMEAÇÃO EM CÉLULAS CACO-2

O teor de fenólicos totais do extrato aquoso de guaraná foi de 104,36 ( $\pm$  3,62) mg EAG/g de guaraná em pó. Após o processo de digestão, este valor foi de 48,62 ( $\pm$  3,97) mg EAG/g ( $p < 0,05$ ). Isso demonstra que os polifenóis são bioacessíveis mesmo após a interação com enzimas digestivas, sendo uma importante fonte de antioxidantes dietéticos. O teor de fenólicos totais das amostras e após o experimento de permeação em células Caco-2 na presença de colesterol podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Conteúdo de fenólicos totais do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó não digerido, pós digestão *in vitro* e pós permeação em células Caco-2 na presença de colesterol.

Extratos	Concentração de guaraná (mg/mL)	Fenólicos Totais (mg EAG/g de guaraná em pó) *	
		Apical (mg EAG/mL)	Basolateral (mg EAG/mL)
Não digerido	8,0	104,36 $\pm$ 3,62 <sup>a</sup>	
Digerido	1,0	48,62 $\pm$ 3,97 <sup>b</sup>	
Permeado em Caco-2	0,025	0,014 $\pm$ 0,001 <sup>aA</sup>	0,010 $\pm$ 0,000 <sup>aB</sup>
	0,050	0,015 $\pm$ 0,000 <sup>abA</sup>	0,012 $\pm$ 0,000 <sup>bB</sup>
	0,075	0,016 $\pm$ 0,000 <sup>baA</sup>	0,012 $\pm$ 0,000 <sup>cbB</sup>

\*Dados expressos em média  $\pm$  DP. Todas as análises foram realizadas em triplicata. EAG = equivalente de ácido gálico. <sup>a, b, c</sup> = letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). <sup>A, B</sup> = letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

Após o ensaio da permeação de colesterol em células Caco-2, os valores diferiram entre os compartimentos apical e basolateral nas três diferentes concentrações de guaraná (0,025, 0,050 ou 0,075 mg/mL), demonstrando que de fato houve uma permeação destes compostos fenólicos. Quando comparamos os teores de fenólicos totais apenas no compartimento basolateral, observa-se que os valores foram diferentes de forma estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) de acordo com o aumento da concentração de guaraná utilizada, demonstrando que a utilização de maiores concentrações de guaraná reflete em um maior teor de compostos fenólicos absorvidos, confirmando a sua captação.

## 4.2 PERFIL DE FENÓLICOS DO EXTRATO AQUOSO DE GUARANÁ EM PÓ ANTES E APÓS A DIGESTÃO *IN VITRO* E APÓS A PERMEAÇÃO EM CÉLULAS CACO-2

O extrato aquoso de guaraná em pó antes e após a digestão *in vitro* e após a permeação em células Caco-2 na presença do colesterol foram analisados quanto ao seu perfil de compostos fenólicos e cafeína por CLAE (DAD UV/VIS) a 210 nm. As concentrações dos compostos identificados calculados a partir das curvas de calibração dos padrões e os seus respectivos tempos de retenção podem ser observados na Tabela 3.

**Tabela 3** – Quantificação de procianidinas, catequinas e cafeína do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó não digerido e bioacessibilidade pós digestão *in vitro*.\*

Compostos	Extrato não digerido	Extrato digerido	Tempo de retenção (min)
Concentração de guaraná (mg/mL)	8,0	1,0	
Procianidinas (mg/g)			
Procianidina B1	1,56 ± 0,04	NI	11,01
Procianidina B2	2,34 ± 0,06	NI	23,03
Catequinas (mg/g)			
Catequina	24,26 ± 0,63 <sup>a</sup>	43,95 ± 6,08 <sup>b</sup>	15,96
Epicatequina	20,39 ± 1,20 <sup>a</sup>	27,89 ± 7,86 <sup>b</sup>	31,36
Cafeína (mg/g)	34,93 ± 0,75 <sup>a</sup>	74,58 ± 7,37 <sup>b</sup>	16,92

\*Quantificação por HPLC-UV, método isocrático a 210 nm. Valores expressos em média ± DP (n=6). NI = Não identificado pelo método. <sup>a, b</sup> = letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ; teste *t* de Student para amostras pareadas).

Verificou-se uma elevada bioacessibilidade da catequina, epicatequina e cafeína, uma vez que as concentrações destes compostos obtidas após a digestão *in vitro* foram estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) quando comparadas com o extrato aquoso não digerido. Observa-se uma bioacessibilidade de 181,16 % para a catequina, 136,78 % para a epicatequina e 213,51 % para a cafeína, o que pode ser justificado pela liberação destes compostos da matriz alimentar após a ação de enzimas digestivas.

A maioria dos polifenóis parece ser liberada da matriz alimentar na fase gástrica. Já na fase intestinal ocorre a digestão de compostos mais apolares; polifenóis apolares como os flavonoides, são micelarizados por esta via devido ao aumento do pH intestinal e abertura do anel C (BOHN, 2014).

MENDES et al. (2019) também demonstraram elevada bioacessibilidade de catequinas de sementes de guaraná, utilizando método de identificação e quantificação semelhante, com concentrações de catequina e epicatequina variando entre 20 e 30 mg/g de amostra. Estes resultados similares aos encontrados no presente estudo, corroboram a evidência de que a ingestão de guaraná eleva as concentrações plasmáticas de catequinas, melhorando marcadores de estresse oxidativo em humanos, o que foi demonstrado por YONEKURA et al. (2016) em um estudo intervencional.

ORTEGA et al. (2009) ao avaliarem a digestibilidade e a bioacessibilidade de polifenóis de cacau após utilizar um modelo de digestão *in vitro*, verificaram um importante aumento nas concentrações de monômeros de procianidinas (catequina e epicatequina) tanto após a fase gástrica quanto após a fase intestinal (maior que 100 %), devido à hidrólise de oligômeros de elevado grau de polimerização.

A elevada bioacessibilidade da catequina também foi demonstrada por CHAIT et al. (2020). Após a digestão gastrointestinal *in vitro* de alfarroba, a catequina foi o flavonoide mais bioacessível, com um valor de 558,3% de bioacessibilidade. Este aumento pode estar relacionado à hidrólise de compostos complexos de suas formas glicosídicas para sua forma aglicona. NAGAR et al. (2021) também demonstrou o aumento da bioacessibilidade de compostos fenólicos, dentre eles a catequina, em extratos durante a fase intestinal do processo de digestão *in vitro*.

As procianidinas B1 e B2, por sua vez, não foram detectadas na fração bioacessível, demonstrando uma baixa bioacessibilidade destes compostos ou uma limitação do método utilizado. Da mesma forma, não foram detectados os compostos de interesse nos permeados (basolateral) de células Caco-2 após o ensaio da permeação do colesterol pelo método utilizado. Segundo REIN et al. (2013), as proantocianidinas possuem baixa biodisponibilidade por terem cadeias maiores em relação aos flavonoides monoméricos. SHAHIDI e PENG (2018) também relatam uma capacidade de absorção extremamente baixa de dímeros de procianidinas (cerca de 5 a 10 % em relação à epicatequina).

De acordo com QUERO et al. (2020), menos de 25% da ingestão total de polifenóis é absorvida no intestino, devido à baixa solubilidade destes compostos, à instabilidade no trato

gastrointestinal devido ao pH, enzimas e presença de outros nutrientes, tempo de permanência gástrica insuficiente e dificuldade em atravessar o bicamada lipídica das membranas, levando a baixa biodisponibilidade e má distribuição sistêmica de polifenóis.

Além de quebrar as matrizes alimentares e liberar compostos fenólicos (efeitos de pH e enzima), a digestão gastrointestinal também pode modificar o grupo hidroxila (principal grupo funcional com efeitos na atividade antioxidante) destes fenólicos liberados, o que levaria a uma diminuição ou aumento do conteúdo e da atividade destes compostos no fluido final da digestão *in vitro* (SHAHIDI e PENG, 2018).

A epigallocatequina galato (EGCG) não foi identificada nas amostras, o que coincide com o relatado na literatura. DA SILVA et al. (2017) também não identificaram EGCG ao analisarem amostras de guaraná em pó provenientes de diferentes regiões do Brasil.

A Tabela 4 identifica o tempo de retenção em minutos, o intervalo de linearidade e o seu respectivo coeficiente de calibração ou coeficiente angular ( $r^2$ ), e o limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos a partir da curva construída após a análise dos padrões de cada composto de interesse.

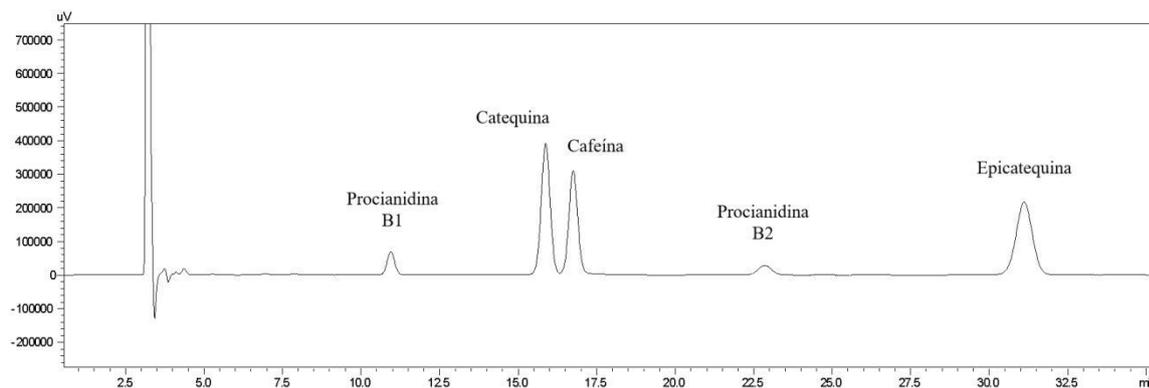
**Tabela 4** – Tempo de retenção, intervalo de linearidade, coeficiente de calibração, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de procianidinas, catequinas e cafeína por HPLC-UV, método isocrático a 210 nm.

Composto	Tempo de retenção (min)	Linearidade* (µg/mL)	Coeficiente de calibração $r^2$	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Procianidina B1	10,957	0,75 - 10	0,9998	0,080	0,267
Procianidina B2	22,920	0,75 - 10	0,9983	0,140	0,466
Catequina	15,860	3,125 - 200	0,9993	0,074	0,246
Epicatequina	31,237	3,125 - 100	0,9938	0,057	0,190
Cafeína	16,752	3,125 - 200	0,9924	0,041	0,136

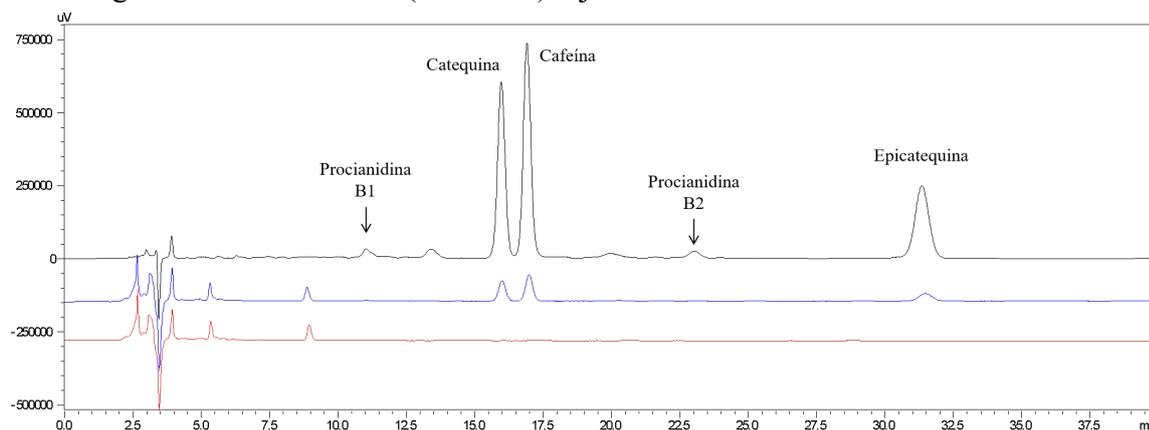
\*Curva construída a partir de injeções de 20 µL de 7 (catequina e cafeína), 6 (epicatequina) e 5 (PB1 e PB2) concentrações do padrão no intervalo especificado.

Os cromatogramas representativos obtidos para a mistura de padrões de fenólicos e para o extrato aquoso de guaraná em pó não digerido, fração bioacessível após digestão *in vitro* e branco de enzimas digestivas e sais biliares podem ser observados nas Figuras 11 e 12.

**Figura 11** – Cromatograma representativo da mistura de padrões de fenólicos injetados em HPLC-UV a 210 nm.



**Figura 12** – Cromatograma representativo do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó não digerido (preto), fração bioacessível após digestão *in vitro* (azul) e branco de enzimas digestivas e sais biliares (vermelho) injetados em HPLC-UV a 210 nm.



#### 4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DE GUARANÁ EM PÓ ANTES E APÓS A DIGESTÃO *IN VITRO*

A atividade antioxidante do extrato aquoso de guaraná em pó antes e após a digestão *in vitro* foi determinada pelo ensaio da capacidade de absorbância de radical oxigênio (do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity* - ORAC). Neste ensaio, a eficácia de um antioxidante é avaliada pela área sob a curva (*Area under curve* – AUC) da intensidade da fluoresceína *versus* tempo, permitindo a avaliação da capacidade antioxidante total de um extrato de um determinado alimento (BISBY, BROOKE e NAVARATNAM, 2008). O ensaio do ORAC é um método baseado na transferência do átomo de hidrogênio (*hydrogen atom transfer* - HAT) e depende do dano que os radicais livres exercem sobre um marcador fluorescente por meio da alteração na sua intensidade de fluorescência. Na presença dos

antioxidantes da amostra, a inibição dos danos dos radicais livres reflete na proteção contra a alteração da fluorescência, sendo uma medida de sua capacidade antioxidante contra esse radical livre (HUANG et al., 2002; SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015). Os valores de ORAC relativo e final das amostras podem ser observados na Tabela 5.

**Tabela 5** – Valores de ORAC relativo e ORAC final do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó não digerido e pós digestão *in vitro*.

Extratos	Concentração de guaraná (mg/mL)	ORAC relativo $\mu\text{mol}$ Eq Trolox/L	ORAC final $\mu\text{mol}$ Eq Trolox/g guaraná em pó
Não digerido	8,0	11333 $\pm$ 1108 <sup>a</sup>	2512 $\pm$ 399 <sup>a</sup>
Digerido	1,0	2951 $\pm$ 270 <sup>b</sup>	4321 $\pm$ 778 <sup>b</sup>

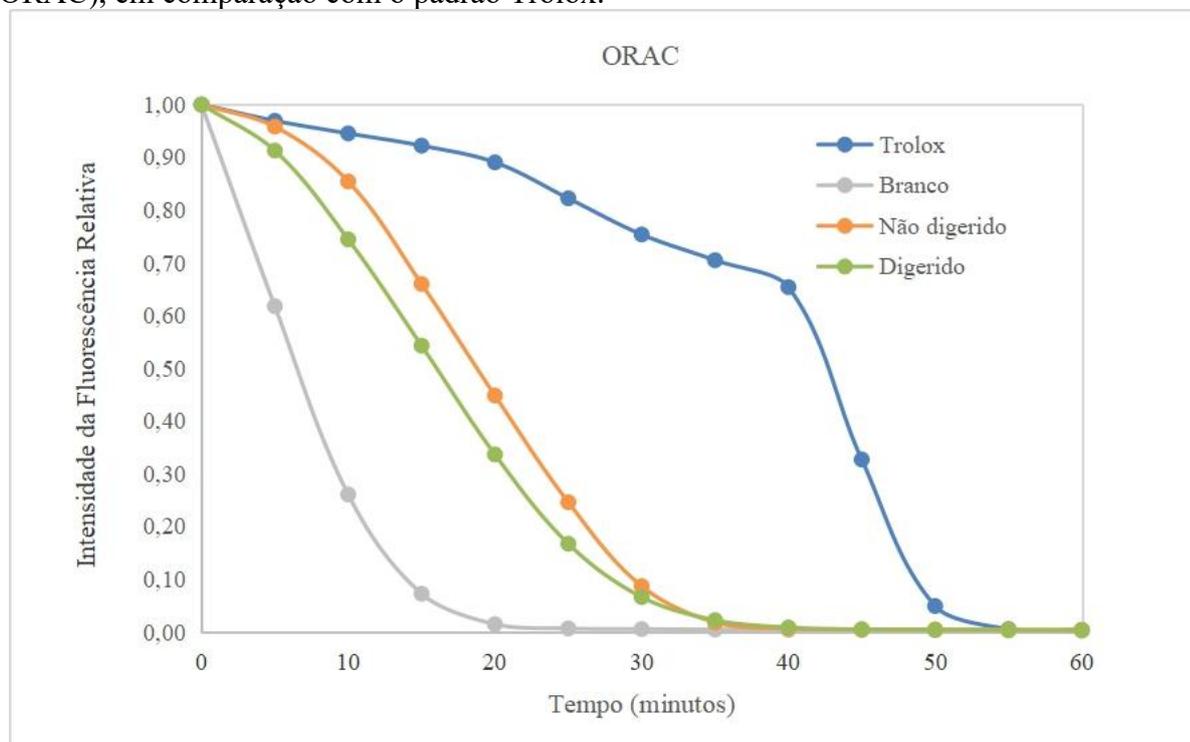
\*Dados são expressos em média  $\pm$  DP. Todas as análises foram realizadas em triplicata. <sup>a, b</sup> = letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

Os valores de ORAC do extrato aquoso do guaraná em pó confirmam sua atividade antioxidante já bem estabelecida na literatura. Após os extratos serem submetidos ao processo de digestão *in vitro*, estes valores foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) quando observamos os valores relativos, demonstrando que ainda existe atividade antioxidante mesmo após a interação com enzimas e fluidos digestivos, confirmando a bioacessibilidade dos compostos fenólicos presentes. Estes dados estão de acordo com os encontrados no teor de fenólicos totais (Tabela 2).

Quando consideramos os valores de ORAC finais por grama de amostra, observamos um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) após a digestão, o que coincide com o aumento da bioacessibilidade dos compostos fenólicos detectados no perfil (Tabela 3). Segundo NAGAR et al. (2021), as várias estruturas químicas dos polifenóis são responsáveis pela diferença na funcionalidade biológica, incluindo a atividade antioxidante. O comportamento do decaimento da fluoresceína representada pelo AUC das amostras não digeridas, digeridas, branco e padrão podem ser observados na Figura 13.

Uma vantagem do ORAC em relação a outros métodos de avaliação da capacidade antioxidante é o fato de este método utilizar radicais livres do tipo peroxil a partir do radical AAPH como reagente do potencial redox e o fato de o mecanismo da reação ser similar aos oxidantes fisiológicos, sendo realizado em um pH fisiológico também, simulando o que acontece no corpo humano (BISBY, BROOKE e NAVARATNAM, 2008).

**Figura 13** – Curva de decaimento da fluoresceína (Intensidade da Fluorescência relativa) *versus* tempo (minutos) induzida pelo radical AAPH na presença do extrato aquoso do guaraná (*Paullinia cupana*) em pó não digerido e pós digestão *in vitro* no ensaio da capacidade de absorvância de radical oxigênio (*Oxygen Radical Absorbance Capacity* - ORAC), em comparação com o padrão Trolox.

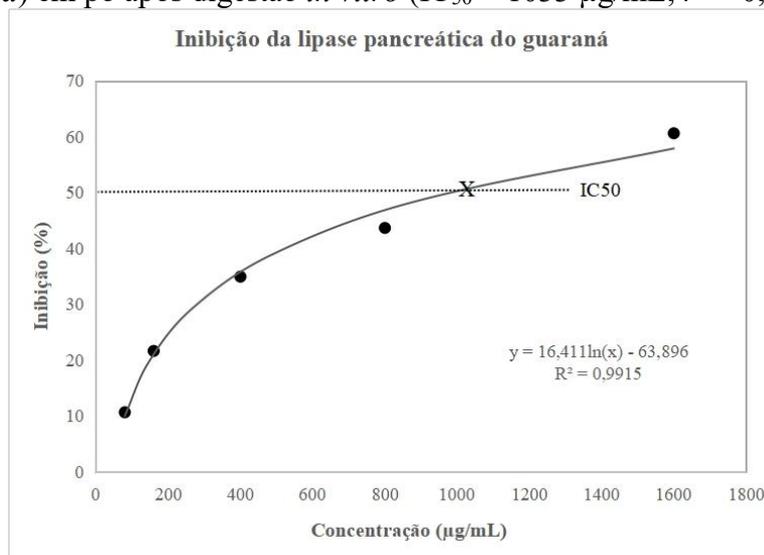


#### 4.4 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA

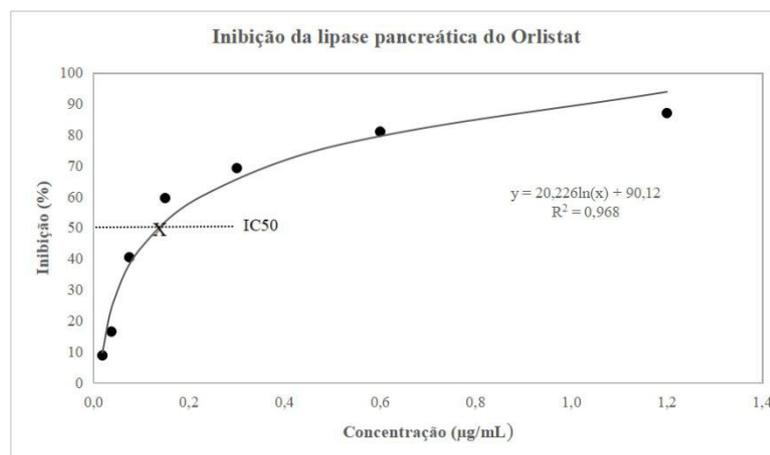
O extrato aquoso de guaraná em pó exibiu uma atividade inibitória da lipase pancreática que aumentou de acordo com a concentração do extrato, demonstrando ser uma atividade dose-dependente, com um valor de  $IC_{50}$  (a concentração necessária para inibir a atividade enzimática em 50 %) de aproximadamente 1033  $\mu\text{g/mL}$ . Em comparação, o valor de  $IC_{50}$  do Orlistat, inibidor da lipase pancreática utilizado como padrão, foi de 0,14  $\mu\text{g/mL}$  (Figuras 14 e 15).

Embora a atividade inibitória de lipase pancreática do extrato aquoso de guaraná em pó seja menor que a do Orlistat, esta pode ser uma maneira que pode ajudar a reduzir a absorção de lipídios no intestino e, conseqüentemente, a concentração de colesterol circulante no sangue, devido à presença de polifenóis que são liberados da matriz alimentar durante o processo digestivo.

**Figura 14** – Atividade inibitória da lipase pancreática do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro* ( $IC_{50} = 1033 \mu\text{g/mL}$ ;  $r^2 = 0,9915$ ).



**Figura 15** – Atividade inibitória da lipase pancreática do Orlistat ( $IC_{50} = 0,14 \mu\text{g/mL}$ ;  $r^2 = 0,968$ ).



A atividade inibitória da lipase do extrato do pó da semente de guaraná também foi demonstrada por SILVA et al. (2019) após o processo de microencapsulação; os valores de  $IC_{50}$  do Orlistat ( $571 \mu\text{g/mL}$ ) e do extrato de guaraná ( $521 \mu\text{g/mL}$ ) não diferiram estatisticamente. Esses resultados mostram pela primeira vez, segundo os autores, um possível potencial antiobesidade do guaraná, sugerindo que ele pode ser uma alternativa natural aos fármacos utilizados para este fim. O processo de microencapsulação promove uma elevada retenção do conteúdo de fenólicos totais e das catequinas, podendo justificar a elevada atividade inibitória da lipase observada.

Segundo NAKAI et al. (2005), a obesidade é causada pelo desequilíbrio entre a quantidade de energia ingerida e gasta e o excesso desta energia é armazenada nas células adiposas que aumentam de tamanho ou em número. KURIHARA et al. (2003) e RAHIM et al. (2015) afirmam que quantidades excessivas de triacilgliceróis na dieta também estão relacionadas com o aumento dos TAG séricos e com o desenvolvimento da obesidade. Esta condição é um elevado fator de risco para diversas doenças crônicas, dentre elas a dislipidemia e a aterosclerose, os principais fatores de risco cardiovascular. Este mesmos autores afirmam que uma das formas efetivas de prevenir a obesidade é inibindo a absorção de gordura intestinal, sendo a lipase pancreática uma enzima chave e considerada a mais importante enzima lipolítica no processo de absorção lipídica.

A gordura dietética sofre a ação da lipase pancreática sendo hidrolisada e absorvida na forma de ácidos graxos e monoacilglicerol; a absorção intestinal humana é um processo altamente eficiente, sendo que cerca de 95 % da gordura ingerida é absorvida. Portanto, inibir a ação desta enzima é uma forma efetiva de reduzir a absorção de gordura com consequente redução das concentrações plasmáticas de TAG (RAHIM et al., 2015; QIU e ZHANG, 2019).

O Orlistat é um inibidor específico da lipase pancreática e é clinicamente usado para prevenir a obesidade e a hiperlipidemia; porém, alguns efeitos colaterais gastrointestinais indesejáveis, como flatulências, esteatorreia e urgência fecal (BIRARI e BHUTANI, 2007). Por outro lado, inibidores de lipase derivados de produtos naturais têm sido estudados e reportados na literatura como promotores de perda de peso e de controle da obesidade por meio da supressão da absorção lipídica sem apresentar estes efeitos colaterais desagradáveis (KURIHARA et al., 2003; NAKAI et al., 2005; DE CAMARGO et al., 2017; QIU e ZHANG, 2019; NOOROLAHY et al., 2020).

É relatado na literatura os diversos efeitos benéficos na saúde de alimentos que contêm polifenóis, incluindo efeitos antioxidantes, antiobesidade e hipocolesterolêmico. NAKAI et al. (2005) avaliaram os efeitos inibitórios dos polifenóis isolados de folhas de chá oolong (*Camellia sinensis*) sobre a lipase pancreática *in vitro*. A epigallocatequina galato (EGCG) é o polifenol com maior destaque no chá verde, demonstrando uma inibição de lipase de IC<sub>50</sub> de 0,349 µM. Por sua vez, os flavanóis não esterificados como catequinas, epicatequinas (os quais estão presentes em maiores quantidades no guaraná), galocatequinas e

epigalocatequinas demonstraram atividades mais baixas contra a lipase pancreática ( $IC_{50} > 20 \mu M$ ). Estes dados sugerem que o grupo galoil é necessário para o aumento da inibição contra a lipase pancreática.

Os efeitos hipolipidêmicos do extrato da *Cyclocarya paliurus* (Batal), uma planta medicinal comestível de origem chinesa, foram investigados por KURIHARA et al. (2003), em ratos com hiperlipemia pós prandial. Uma única administração oral de 250 mg/kg do extrato foi realizada após 30 minutos da administração de 5 mL/kg de banha ou óleo de oliva; a administração do extrato foi capaz de reduzir o aumento das concentrações de TAG no plasma de forma estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle. Os autores relacionam este fato à uma supressão da absorção lipídica intestinal. Adicionalmente, este extrato demonstrou um efeito inibitório sobre a atividade da lipase pancreática *in vitro* de forma dose-dependente, com um  $IC_{50}$  de 9,1  $\mu g/mL$ , sendo um efeito menor que do controle utilizado, a galocatequina galato (GCG), com  $IC_{50}$  de 0,9  $\mu g/mL$ .

No estudo de RAHIM et al. (2015) foi analisado o potencial de inibição da lipase pancreática de diversos polifenóis, tanto flavonoides como não flavonoides; eles demonstraram que os compostos contendo o grupo galoil, como a epigalocatequina (EGC) e a epigalocatequina galato (EPCG) tiveram um maior potencial de inibição da lipase pancreática de forma dose-dependente ( $IC_{50}$  de 237,3 e 391,2  $\mu M$ , respectivamente), confirmando mais uma vez a importância do grupo galoil nesta atividade inibidora.

O mecanismo específico da atividade inibitória dos polifenóis sobre a lipase ainda é desconhecido. Porém, um possível mecanismo que correlaciona o efeito inibidor de lipase pancreática com o efeito antiobesidade seria que a inibição da lipase resulta em uma digestão incompleta de lipídios, os quais podem se ligar a outras partículas alimentares, como proteínas e carboidratos, interferindo na sua digestão (hidrólise) e consequente absorção (RAHIM et al., 2015; NOOROLAHY et al., 2020).

A atividade de inibição da lipase pancreática de compostos fenólicos provenientes do amendoim foi analisada por DE CAMARGO et al. (2017) e os autores verificaram uma inibição que variou de 8,4 a 94 % com  $IC_{50}$  de 21,3  $\mu g/mL$ , sendo maior que o do Orlistat (0,65  $\mu g/mL$ ) utilizado como controle positivo. Os autores conferem esse potencial inibidor à presença de polifenóis, compostos naturais sem efeitos colaterais comumente utilizados em

associação com fármacos. Estes mesmos autores afirmam ainda que as lipases exercem um importante papel na absorção de TAG, estando relacionada ao manejo do peso corporal e da obesidade, fatores de risco para a síndrome metabólica e doenças cardiovasculares.

QIU e ZHANG (2019) determinaram a atividade de inibição da lipase pancreática das folhas da *Sinobambusa tootsik* (Sieb.) Makino, uma espécie de bambu encontrada na China Japão e Vietnã, com um  $IC_{50}$  de 0,93 mg/mL, sendo mais fraco que o do Orlistat (74 ng/mL) utilizado como controle positivo. Esta atividade foi atribuída à presença de flavonoides encontrados no extrato, capazes de se ligar à enzima. Desta forma, é considerada como suplemento alimentar em potencial para controle da absorção da gordura dietética e, conseqüentemente, da obesidade.

O extrato da casca verde do pistache (*Ahmad aghaei*) avaliado pelo estudo de NOOROLAHY et al. (2020) exibiu uma atividade antilipase; a amostra inibiu a atividade da lipase pancreática entre 0,06 e 88,06 % utilizando concentrações entre 0,25 e 4 mg/mL, respectivamente; o valor do  $IC_{50}$  obtido foi de 2,26 mg/mL, enquanto que o  $IC_{50}$  do orlistat (usado como controle positivo) foi de 35,4 µg/ml. Os autores descrevem o pistache como um produto natural que pode ser consumido como coadjuvante no controle da obesidade, provavelmente devido à presença de polifenóis como o ácido gálico.

HUANG et al. (2020) avaliaram os extratos de cascas de oito diferentes frutas do gênero *Citrus* L. com relação à sua capacidade e mecanismos de inibição da lipase pancreática. Os autores observaram um efeito inibitório da enzima de forma dose-dependente ( $IC_{50} = 32$  mg/L) devido à presença de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, com destaque para a hisperidina, presente principalmente na casca da fruta.

A hisperidina pode interagir com a lipase pancreática por meio de associações hidrofóbicas ou formando ligações do tipo pontes de hidrogênio com grupos polares e de van der Waals, podendo alterar a configuração da enzima e afetar suas atividades, porém, sem alterar a estrutura secundária da enzima. Este efeito inibitório encontrado, teve uma correlação positiva significativa com o conteúdo de fenólicos totais; porém, nem todos os compostos fenólicos podem ser considerados potentes inibidores da lipase pancreática (HUANG et al., 2020).

Observa-se na literatura, portanto, uma extensa busca de produtos naturais ricos em compostos bioativos, principalmente os compostos fenólicos, capazes de reduzir ou inibir a ação da enzima lipase pancreática, na tentativa de encontrar alternativas alimentares para o manejo da dislipidemia e da obesidade, bem como de suas consequências.

#### 4.5 CAPACIDADE DE LIGAÇÃO COM ÁCIDOS BILIARES

Após a realização do ensaio de ligação com os ácidos biliares, o extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após a digestão *in vitro* demonstrou uma capacidade de ligação ao taurocolato de sódio de 45,63 ( $\pm$  8,50) % a uma concentração de 1,0 mg/mL e de 44,30 ( $\pm$  8,88) % quando sua concentração foi reduzida pela metade (0,5 mg/mL) (Figura 16). Estes valores correspondem a 71,78 ( $\pm$  13,36) % e 93,11 ( $\pm$  18,65) % da capacidade de ligação da colestiramina quando utilizada nas mesmas concentrações, respectivamente (Figura 17). Os valores de concentração de taurocolato de sódio (mM) ligado às amostras podem ser observados na Tabela 6.

**Tabela 6** – Valores de taurocolato de sódio ligado ao extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após a digestão *in vitro* e ligado à resina colestiramina.

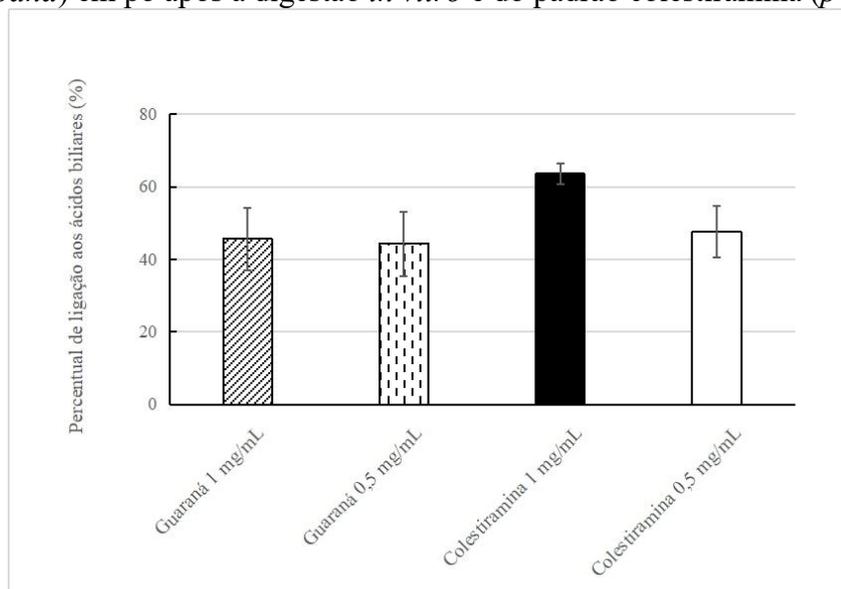
Amostra	Concentração (mg/mL)	Taurocolato ligado (mM)*	Taurocolato ligado (%)	Atividade relativa à colestiramina (%)
Guaraná	1,0	2,74 $\pm$ 0,51	45,63 $\pm$ 8,50	71,78 $\pm$ 13,36
Guaraná	0,5	2,66 $\pm$ 0,53	44,30 $\pm$ 8,88	93,11 $\pm$ 18,65
Colestiramina	1,0	3,81 $\pm$ 0,17	63,56 $\pm$ 2,89	100 $\pm$ 4,55
Colestiramina	0,5	2,85 $\pm$ 0,43	47,58 $\pm$ 7,16	100 $\pm$ 15,06

\*Dados expressos em média  $\pm$  DP (n = 3). Os valores não apresentaram diferença estatisticamente significante entre os grupos de taurocolato ligado (mM), com valor de  $p = 0,122$  para ANOVA.

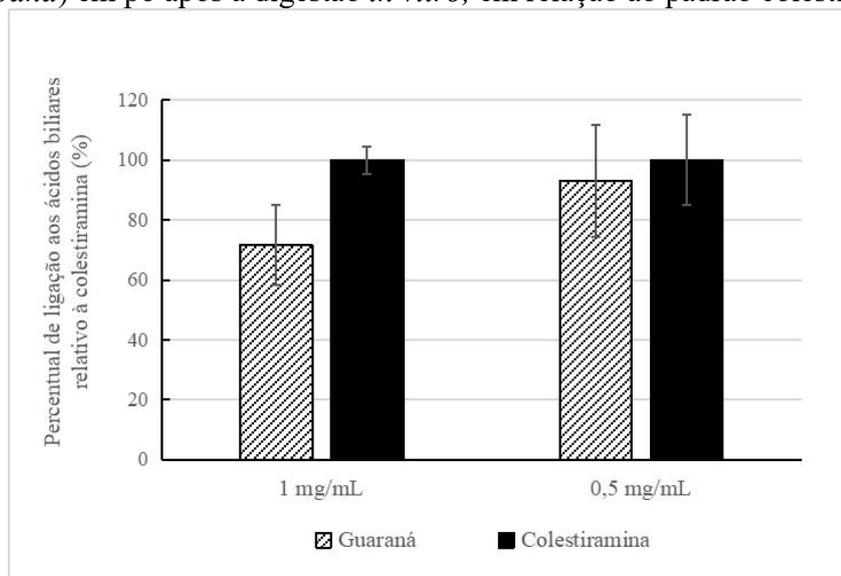
A resina colestiramina é um agente sequestrante de ácido biliar, um fármaco que se liga aos ácidos biliares, utilizado para reduzir a concentração plasmática de colesterol em pacientes com hipercolesterolemia. Foi utilizada como controle positivo, apresentando valores de ligação ao taurocolato de sódio de 63,56 ( $\pm$  2,89) % e de 47,58 ( $\pm$  7,16) % quando utilizada nas mesmas concentrações do guaraná, de 1,0 e 0,5 mg/mL, respectivamente (Tabela 6).

Quando comparamos a ligação do taurocolato de sódio ao guaraná e à colestiramina em duas concentrações diferentes, tanto em concentração de taurocolato de sódio ligado em mM, quanto em percentual de ligação, observa-se que não houve diferença entre os grupos.

**Figura 16** – Percentual de ligação ao taurocolato de sódio do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após a digestão *in vitro* e do padrão colestiramina ( $p$  valor = 0,122).



**Figura 17** – Percentual de ligação ao taurocolato de sódio do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após a digestão *in vitro*, em relação ao padrão colestiramina.



Apesar de observarmos uma capacidade de ligação ao taurocolato de sódio pelo guaraná discretamente menor quando comparado com a colestiramina, estes valores não foram estatisticamente diferentes. Isto demonstra que o guaraná possui uma capacidade de ligação aos ácidos biliares semelhante ao do fármaco utilizado como padrão, podendo ser considerado um importante alimento a ser utilizado como adjuvante no controle da hipercolesterolemia, quando inserido da alimentação regular do indivíduo e associado à uma alimentação saudável.

Os ácidos biliares são moléculas anfipáticas, constituindo produtos da decomposição do colesterol no fígado que são secretados no duodeno após conjugação com glicina ou taurina, e auxiliam a digestão de gorduras por meio da formação de micelas e atuando como emulsificantes. Os ligantes de ácidos biliares afetam essa digestão, promovendo um *feedback* negativo no ciclo enterohepático dos ácidos biliares (YOSHIE-STARK e WASCHE, 2004; KAHLON e SMITH, 2007a; YANG et al., 2017).

O mecanismo de ação dos agentes sequestrantes de ácidos biliares se dá pela ligação destes com os ácidos biliares no lúmen intestinal, impedindo a sua absorção; a reabsorção de ácidos biliares que normalmente acontece no íleo terminal fica reduzida e este complexo é então eliminado pelas fezes. Com o uso destes sequestrantes, a eliminação fecal de ácidos biliares aumenta consideravelmente (CHARLTON-MENYS e DURRINGTON, 2008; SORAN et al., 2018).

A redução da reabsorção dos ácidos biliares no íleo terminal aumenta a necessidade hepática de colesterol como precursor de ácidos biliares, sendo compensada por uma maior síntese hepática, por meio do aumento da atividade da enzima colesterol-7 $\alpha$ -hidroxilase; este colesterol, na tentativa de reabastecer o *pool* entero-hepático, é retirado da circulação sanguínea na forma de LDL-c, aumentando, portanto, o seu catabolismo hepático. Esta necessidade aumentada de colesterol hepático é mediada via receptor de LDL, expressos nas membranas dos hepatócitos. Estes receptores apresentam uma expressão aumentada em resposta à redução de colesterol intra-hepático consumido na síntese de sal biliar. A redução do LDL-c circulante constitui o objetivo final da terapia com sequestrantes de ácidos biliares, podendo conferir considerável proteção cardiovascular (CHARLTON-MENYS e DURRINGTON, 2008; SORAN et al., 2018).

Os sequestrantes de ácidos biliares podem ser usados como monoterapia ou em combinação com outros medicamentos, como as estatinas, associado a um estilo de vida saudável com bons hábitos alimentares. Neste contexto, é crescente o interesse em um possível papel de determinados compostos e dos chamados alimentos funcionais como adjuvante à terapia hipolipemiante, embora sua eficácia e segurança ainda sejam pouco conhecidas (CHARLTON-MENYS e DURRINGTON, 2008; SORAN et al., 2018).

KAHLON e SMITH (2007a, 2007b) determinaram a capacidade de ligação aos ácidos biliares *in vitro* de diversas frutas, como as frutas vermelhas e maçã, ricas em polifenóis e catequinas, além de banana, pêra, abacaxi entre outras, utilizando a colestiramina como controle positivo. Eles verificaram que a capacidade de ligação das *blueberries* foi significativamente maior dentre as frutas vermelhas testadas ( $7,1 \pm 0,2$  % em relação à atividade da colestiramina) e a da banana foi maior do que as demais frutas ( $8,8 \pm 0,4$  %), ambos valores com base no peso seco. A capacidade de ligação da colestiramina, por sua vez, foi significativamente maior do que a de todas as outras frutas testadas (93 %).

Segundo estes mesmos autores, a variabilidade na ligação aos ácidos biliares entre as frutas testadas pode estar relacionada aos seus fitonutrientes (antioxidantes, polifenóis, ácidos hidroxicinâmicos, flavonoides, antocianinas, flavonóis, proantocianidinas e catequinas), estrutura, hidrofobicidade, natureza iônica dos metabólitos produzidos durante digestão ou sua interação com sítios ativos de ligação.

A interação dos polifenóis (catequinas) do chá verde (*Camellia sinensis*) e micelas de colesterol foram avaliadas no estudo de OGAWA et al. (2016) e verificaram uma interação maior entre estas catequinas e os sais biliares presentes nas micelas, reduzindo desta forma a solubilização micelar do colesterol. Esta interação intermolecular entre as catequinas e o taurocolato de sódio parece ser mediada por ligações do tipo pontes de hidrogênio, devido à presença de três grupos hidroxilas neste ácido biliar, localizado na parte hidrofóbica das micelas; isto demonstra que existe uma relação entre estrutura química e atividade biológica dos polifenóis presentes no chá verde.

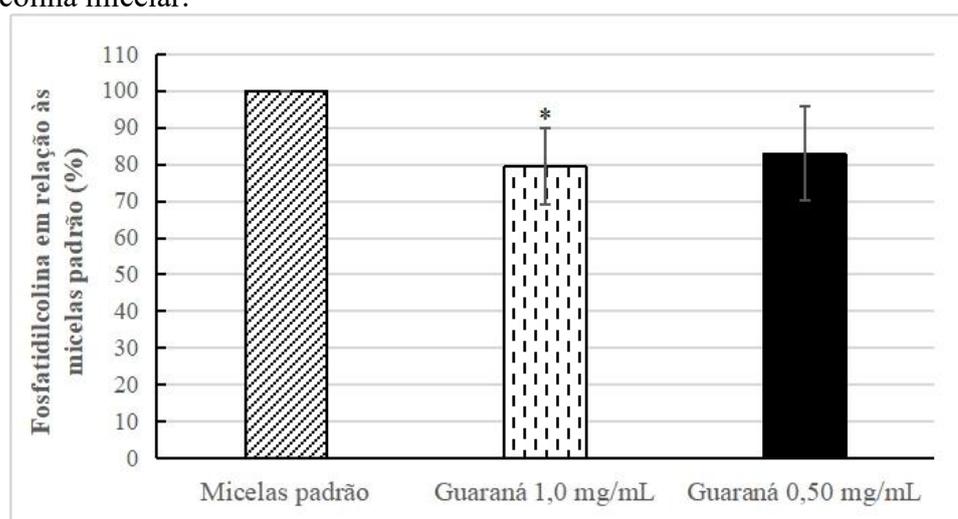
A capacidade de ligação aos ácidos biliares da alface roxa e outras crucíferas após o processo de digestão *in vitro* foi testada no trabalho de YANG et al. (2017). Verificou-se que, dentre os vegetais testados, as couves verde e roxa tiveram a maior capacidade de ligação aos ácidos biliares, com percentual de ligação de 87 e 90 %, respectivamente, e sem diferenças entre eles. A colestiramina apresentou uma capacidade de ligação semelhante, de 93,45 %. A diferença na ligação aos ácidos biliares entre os vários vegetais deve-se às suas diferentes composições químicas, incluindo o conteúdo de fenólicos, glicosinolatos, flavonoides, fibras alimentares (principalmente as solúveis, como a pectina) e outros metabólitos primários.

Segundo estes mesmos autores, a composição dos ácidos biliares varia entre os indivíduos com base nas diferentes condições de saúde e está intrinsecamente relacionada à sua fisiologia, dependendo de uma variedade de processos regulatórios e da variação da ecologia microbiana do intestino.

#### 4.6 INTERAÇÃO COM A FOSFATIDILCOLINA MICELAR

Após a realização do ensaio da capacidade de interação com a fosfatidilcolina (FC) micelar na presença do extrato aquoso do guaraná em pó digerido liofilizado observou-se uma redução de 20,47 ( $\pm$  10,24) % e 17,06 ( $\pm$  12,88) % na concentração da fosfatidilcolina micelar quando utilizado nas concentrações de 1,0 e 0,50 mg/mL, respectivamente, em comparação com a micela padrão sem amostra. Estes valores possuem diferença estatística somente na concentração de 1,0 mg/mL de amostra na redução deste fosfolípídeo, porém demonstram uma tendência de redução de forma dose-dependente, o que mostra a necessidade de realização desta análise utilizando concentrações mais elevadas de guaraná para confirmar o efeito investigado. Estes resultados podem ser observados na Figura 18.

**Figura 18** – Percentual de fosfatidilcolina em relação às micelas padrão após interação do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após a digestão *in vitro* com a fosfatidilcolina micelar.



\*  $p < 0,05$  em relação às micelas padrão (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Segundo KOBAYASHI et al. (2014), a epigallocatequina galato (EGCG) reduz a solubilização micelar do colesterol via interação específica com a fosfatidilcolina, e não pela interação direta com o colesterol micelar. Neste sentido, acredita-se que as catequinas

bioacessíveis presentes no extrato aquoso de guaraná em pó digerido possam se ligar à FC micelar, alterando a conformação desta micela, levando a uma precipitação do colesterol micelar e reduzindo, portanto, a solubilização deste colesterol, podendo ser esta uma via de aumento da excreção fecal de colesterol, demonstrando uma atividade hipocolesterolêmica.

#### 4.7 INIBIÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO MICELAR DO COLESTEROL *IN VITRO*

Após a realização do ensaio da capacidade de redução da solubilização micelar do colesterol, observou-se uma inibição da solubilização de 10,14 % pelo guaraná na concentração de 1 mg/mL em relação à micela padrão sem amostra de forma estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Quando o guaraná foi utilizado nas concentrações de 0,050 e 0,025 mg/mL, não foi observada inibição, o que demonstra que o efeito do guaraná se dá a partir da concentração de 1,0 mg/mL e, de forma semelhante ao ensaio da interação com a fosfatidilcolina micelar, torna-se necessário a realização desta análise com concentrações mais elevadas de guaraná para confirmar o efeito investigado. Os valores de concentração (no sobrenadante após centrifugação) e de inibição da solubilização do colesterol podem ser observados na Tabela 7.

**Tabela 7** – Percentual de inibição da solubilização micelar do colesterol na presença do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro*.

Amostra	Concentração de colesterol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inibição (%)
Micelas padrão (controle)	168,36 $\pm$ 6,31 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
Guaraná 1 mg/mL	151,28 $\pm$ 4,46 <sup>b</sup>	10,14 <sup>b</sup>
Guaraná 0,50 mg/mL	173,04 $\pm$ 4,85 <sup>a</sup>	-
Guaraná 0,25 mg/mL	175,17 $\pm$ 6,31 <sup>a</sup>	-

\*Valores expressos em média  $\pm$  DP (n = 3). a, b = letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para ANOVA.

MARQUES et al. (2015) investigaram a atividade inibitória de frações de peptídeos de feijão-caupi na solubilização micelar do colesterol. Ao calcular o percentual de atividade inibitória a partir da utilização do mesmo método que o presente estudo, foi verificado que peptídeos derivados do feijão cozido foram mais efetivos em inibir a solubilização do colesterol (39,8 %) quando comparado com a forma crua (5,2 %). Estes peptídeos são capazes de competir com o colesterol reorganizando a estrutura micelar.

O colesterol, triacilgliceróis e outros lipídios são insolúveis em água e precisam ser transportados por meio das micelas a fim de serem absorvidos pelo epitélio intestinal. Estas micelas se formam de forma espontânea quando concentrações ideais de sais biliares e fosfatidilcolina estão presentes, podendo acomodar uma quantidade limitada de colesterol e outros lipídios. Em condições normais, estas micelas são capazes de passar do conteúdo aquoso do lúmen intestinal para a membrana em escova, onde os componentes lipídicos alcançam o enterócito (JESH e CARR, 2006; ZHANG et al., 2012).

O mecanismo sugerido é que compostos bioativos são capazes de perturbar a conformação das micelas de colesterol por competição com as substâncias inerentes à esta estrutura, podendo reduzir, desta forma, a captação e absorção intestinal do colesterol, uma vez que o colesterol removido das micelas não consegue ser absorvido, sendo liberado para o cólon para ser eliminado pelas fezes (JESH e CARR, 2006; ZHANG et al., 2012; MARQUES et al., 2015).

RAEDERSTORFF et al. (2003), ao investigarem o efeito da EGCG no metabolismo lipídico, verificaram que esta, além de reduzir a concentração de colesterol intramicelar e de colesterol plasmático de forma dose-dependente, também alterou o tamanho das micelas aumentando o seu tamanho médio e afetando assim, a solubilidade do colesterol e a afinidade destas pelas membranas celulares. Os dados sugerem que a atividade hipolipidêmica das epicatequinas é atribuída a um efeito luminal no intestino ao invés de um efeito inibitório na síntese de colesterol.

Além disto, o processamento térmico pode alterar o percentual de grau de hidrólise do composto, facilitando a liberação dos compostos da matriz alimentar capazes de reduzir a solubilização do colesterol das micelas, podendo sugerir que um mecanismo semelhante ocorra no intestino, após a hidrólise sofrida por enzimas digestivas e consequente liberação dos compostos da matriz alimentar (MARQUES et al., 2015).

A absorção intestinal do colesterol é um importante fator determinante na homeostase do colesterol corporal e está diretamente correlacionado com a concentração plasmática de LDL-c. A redução da absorção do colesterol resulta em menores concentrações plasmáticas de LDL-c, o maior fator de risco para a doença aterosclerótica (JESH e CARR, 2006).

Estes resultados sugerem que, quando consumido como parte de uma dieta reduzida em colesterol, o guaraná, alimento rico em compostos bioativos como as catequinas, pode contribuir para redução da concentração de LDL-c de forma clinicamente significativa, podendo reduzir ainda a necessidade de terapia com fármacos.

Embora o guaraná tenha sido capaz de inibir cada um desses processos *in vitro* individualmente, podendo ter algum efeito na absorção de gordura e colesterol, seu efeito combinado e *in vivo* pode ter um grande impacto na saúde. É preciso considerar como os constituintes alimentares se comportam na complexa matriz intestinal composta por outros alimentos, secreções digestivas e microbiota imprevisível (TRISAT et al., 2017). A inclusão do guaraná em nossa dieta diária, assim como de outras frutas, consideradas promotoras da saúde, associada à uma alimentação saudável e variada, deve ser incentivada.

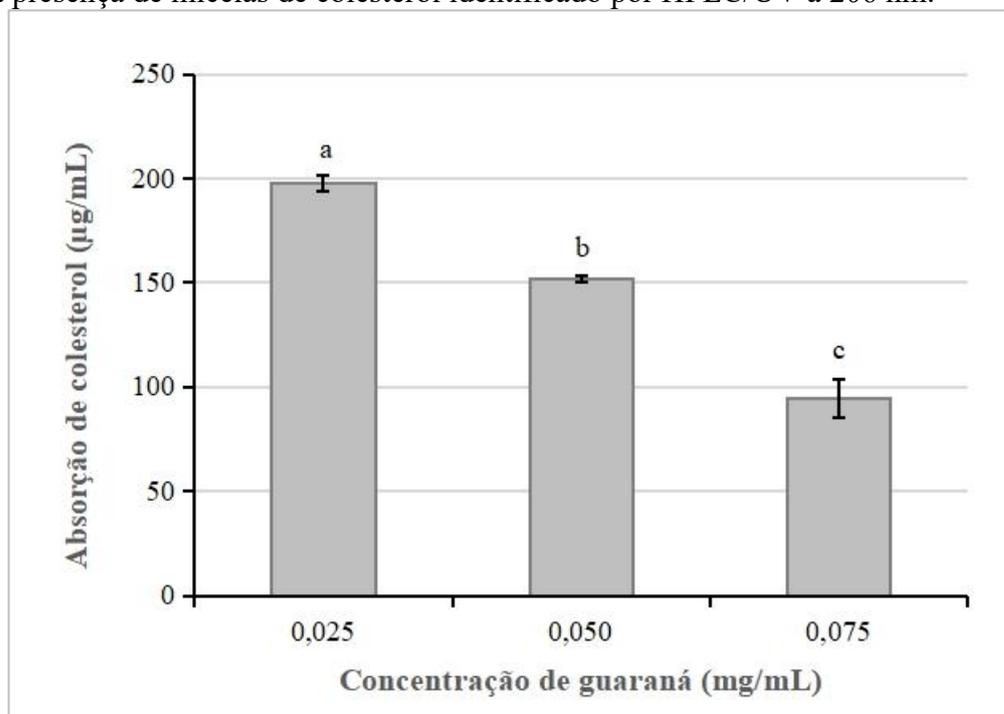
#### 4.8 PERMEAÇÃO DO COLESTEROL EM CÉLULAS CACO-2

Após o experimento de permeação em modelo de células Caco-2, as concentrações de colesterol no compartimento basolateral foram de 197,89 ( $\pm 3,95$ ), 151,76 ( $\pm 1,39$ ) e 94,51 ( $\pm 9,49$ )  $\mu\text{g/mL}$ , quando 0,025, 0,050 ou 0,075 mg/mL de guaraná foi usada, respectivamente. Estes valores demonstram uma redução de 23,31 % e 52,24 % na absorção do colesterol de forma estatisticamente significativa à medida que a concentração de guaraná utilizada aumentou, como observado na Figura 19.

Não foi identificado conteúdo de colesterol no compartimento apical pelo método utilizado, demonstrando que o conteúdo de colesterol adicionado foi absorvido em sua maioria (permanecendo no compartimento basolateral) ou mantido no conteúdo intracelular após o mecanismo de captação celular (mecanismo não investigado). Isto também pode demonstrar uma limitação do método em extrair e/ou identificar o colesterol investigado.

O cromatograma do padrão de colesterol utilizado para quantificar o colesterol pode ser observado na Figura 20. Os cromatogramas do colesterol do compartimento basolateral em células Caco-2 após a permeação do extrato de guaraná em pó digerido nas concentrações de 0,025, 0,050 e 0,075 mg/mL na presença de micelas de colesterol podem ser observados nas Figuras 21, 22 e 23, respectivamente.

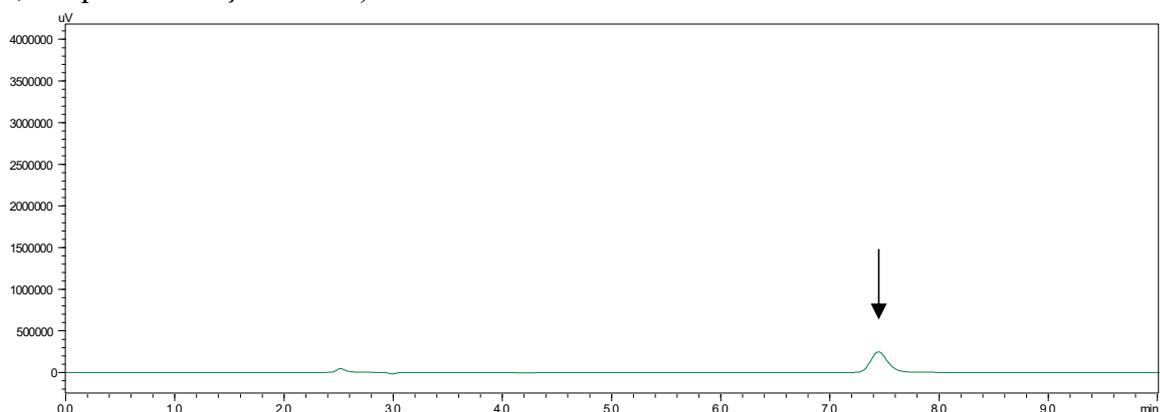
**Figura 19** – Concentração de colesterol do compartimento basolateral em células Caco-2 após a permeação do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro* na presença de micelas de colesterol identificado por HPLC/UV a 206 nm.



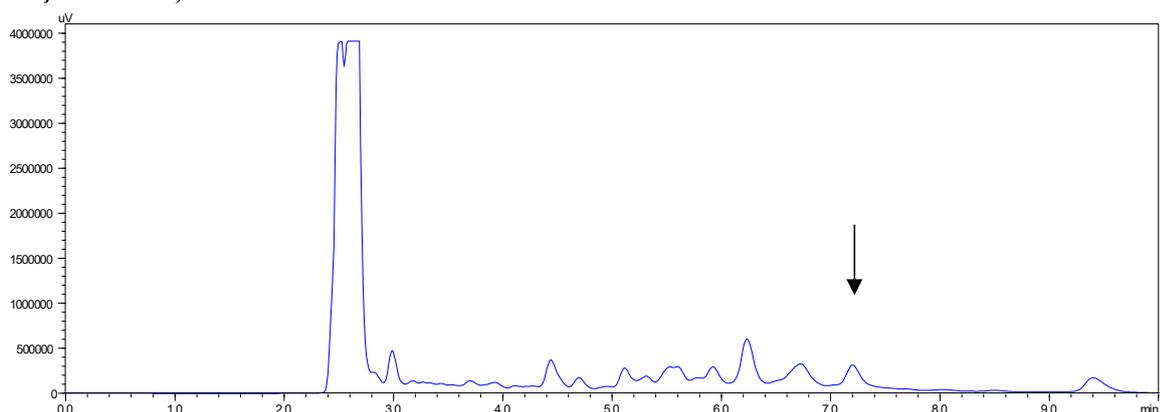
a, b, c = letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ) para ANOVA.

O mecanismo de redução da absorção de colesterol pelo guaraná parece envolver a inibição da solubilidade micelar do colesterol no intestino delgado de maneira dose-dependente pela presença de seus polifenóis, da mesma forma como foi demonstrado no experimento anterior realizado de forma *in vitro*. As micelas agem como carreadoras e solubilizadoras de colesterol e outros lipídeos e o colesterol solubilizado é transferido das micelas para a membrana das células de borda em escova no intestino (RAEDERSTORFF et al., 2003; OGAWA et al., 2016). Transportadores celulares de colesterol também parecem estar envolvidos neste mecanismo, como será discutido a seguir.

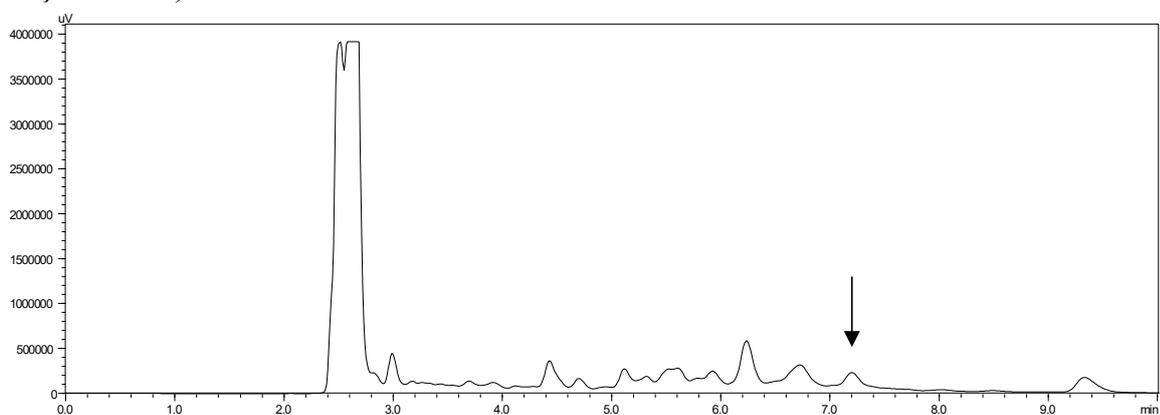
**Figura 20** – Cromatograma do padrão de colesterol utilizado para quantificar o colesterol no permeado de células Caco-2 (Concentração: 262,5  $\mu\text{g/mL}$ ; identificado por HPLC/UV a 206 nm; tempo de retenção: 7 min).



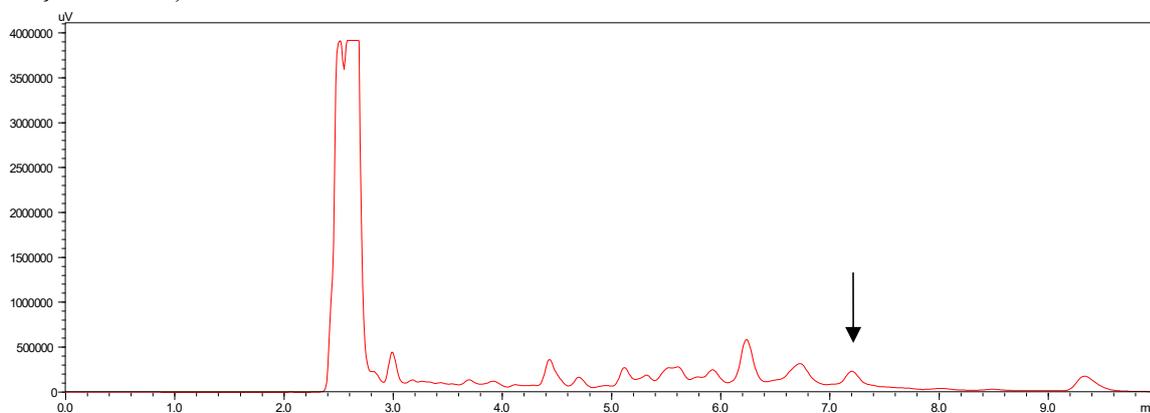
**Figura 21** – Cromatograma do colesterol do compartimento basolateral em células Caco-2 após a permeação do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó digerido (0,025 mg/mL) na presença de micelas de colesterol (identificado por HPLC/UV a 206 nm; tempo de retenção: 7 min).



**Figura 22** – Cromatograma do colesterol do compartimento basolateral em células Caco-2 após a permeação do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó digerido (0,050 mg/mL) na presença de micelas de colesterol (identificado por HPLC/UV a 206 nm; tempo de retenção: 7 min).



**Figura 23** – Cromatograma do colesterol do compartimento basolateral em células Caco-2 após a permeação do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó digerido (0,075 mg/mL) na presença de micelas de colesterol (identificado por HPLC/UV a 206 nm; tempo de retenção: 7 min).



#### 4.9 CONTEÚDO DE PROTEÍNAS DETERMINADO POR *WESTERN BLOTTING*

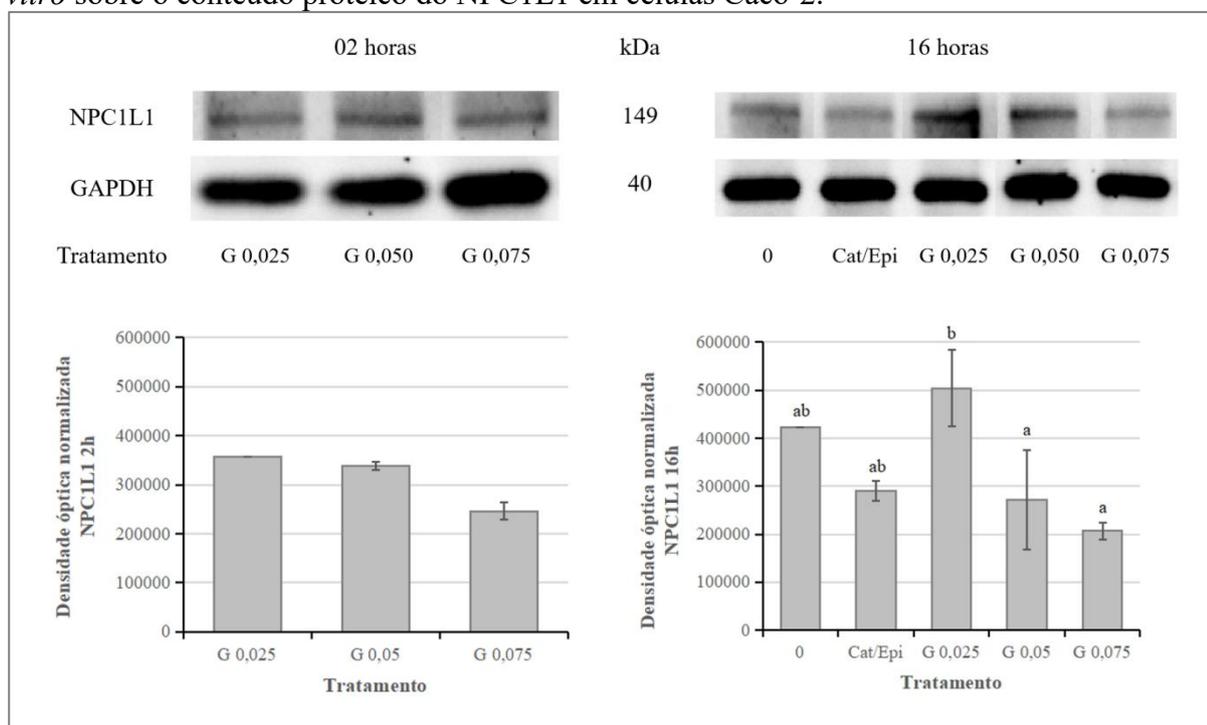
O transporte do colesterol no intestino é um processo complexo mediado por transportadores localizados na membrana dos enterócitos e são responsáveis tanto pela captação e absorção quanto pelo efluxo do enterócito para o lúmen. Para verificar o efeito do extrato aquoso de guaraná em pó digerido sobre estes transportadores, foi realizada a análise de *Western blotting* de lisados celulares totais de células Caco-2 tratadas com extrato aquoso de guaraná em pó digerido liofilizado em diferentes concentrações (0,025, 0,050 ou 0,075 mg/mL) pelo tempo de 02 e 16 horas.

O *Niemann–Pick C1 Like 1* (NPC1L1), transportador localizado na membrana apical dos enterócitos, regula a absorção intestinal e a reabsorção do colesterol biliar, promovendo a captação e o subsequente transporte do colesterol através da borda em escova dos enterócitos, sendo determinante no conteúdo plasmático de colesterol (PIRILLO et al., 2016). A Figura 24 mostra o efeito das amostras sobre o conteúdo do NPC1L1. Verifica-se que após 02 horas de incubação não foi observado diferença entre os tratamentos, porém percebe-se uma tendência de redução do conteúdo deste transportador com o aumento da concentração do guaraná.

Por outro lado, após 16 horas, pode-se observar uma redução estatisticamente significativa do NPC1L1 após incubação com guaraná nas concentrações de 0,050 e 0,075 mg/mL quando comparados com a concentração de 0,025 mg/mL de amostra, valores estes

que não foram diferentes estatisticamente do controle negativo e nem da mistura de padrões utilizado como controle positivo na concentração de 1,5 e 2,25  $\mu\text{g/mL}$  de catequina e epicatequina, respectivamente. Estas concentrações dos padrões foram determinadas com base na quantidade destes compostos presentes no guaraná relatadas na literatura, os quais também se aproximam das concentrações quantificadas nas amostras na determinação do perfil de fenólicos.

**Figura 24** – Efeito do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro* sobre o conteúdo proteico do NPC1L1 em células Caco-2.



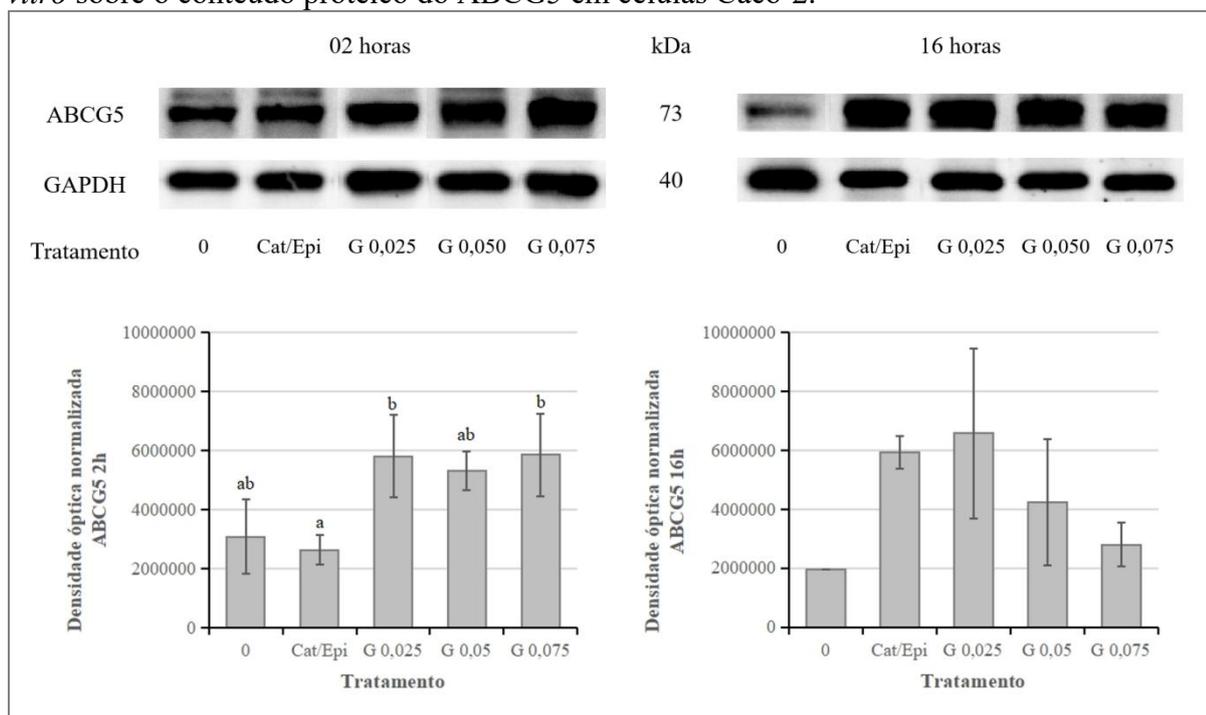
Nas imagens superiores as células Caco-2 foram tratadas com extrato aquoso de guaraná em pó digerido liofilizado em diferentes concentrações por 02 e 16 horas e os lisados celulares totais foram analisados por *western blotting*. Nas imagens inferiores resultados expressos em média  $\pm$  DP após normalização pelo GAPDH (*housekeeping*). a, b = letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p = 0,010$ ) para ANOVA entre os grupos. 0: Controle Negativo (Tampão *Hank's*). Cat/Epi: Controle de padrões de catequina e epicatequina (1,5 e 2,25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). G 0,025: guaraná 0,025 mg/mL. G 0,050: guaraná 0,050 mg/mL. G 0,075: guaraná 0,075 mg/mL.

Concentrações elevadas de colesterol plasmático representam um fator de risco para a aterosclerose e outras doenças cardiovasculares. A superexpressão do NPC1L1 aumenta a captação do colesterol nas células, enquanto que a redução na função ou mutações neste transportador estão associados com baixas concentrações de LDL-c e risco reduzido de DCV. A expressão do NPC1L1 é intimamente regulada pelo conteúdo celular de colesterol e é dependente de diversos fatores transcricionais, como o LXR-alfa (PIRILLO et al., 2016).

Ao contrário do NPC1L1, os transportadores *ATP-binding cassette* ABCG5 e ABCG8 funcionam como um heterodímero localizados na membrana apical das células intestinais promovendo o efluxo do colesterol do enterócito para o lúmen para ser excretado. Defeitos no sistema ABCG5/ABCG8 estão relacionados com a sitosterolemia, uma condição caracterizada por elevadas concentrações plasmáticas de esteróis dietéticos, acelerado processo de aterogênese e doença arterial coronariana precoce (PIRILLO et al., 2016).

Os efeitos do extrato aquoso do guaraná em pó sobre o conteúdo proteico do ABCG5 e do ABCG8 podem ser visualizados nas Figuras 25 e 26. Após 02 horas de incubação, observa-se um aumento estatisticamente significativo do conteúdo do ABCG5 nas concentrações de 0,025 e 0,075 mg/mL quando comparados à mistura de padrão de catequinas. Por outro lado, após o período de 16 horas, tal efeito não foi observado.

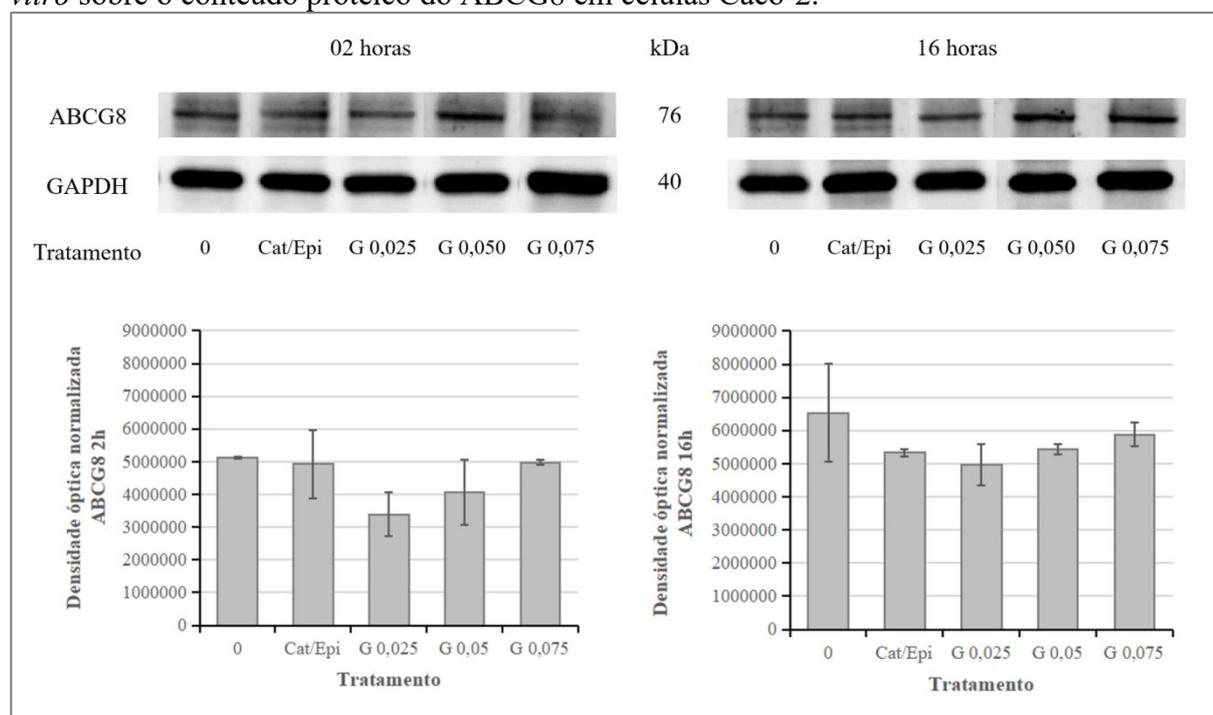
**Figura 25** – Efeito do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro* sobre o conteúdo proteico do ABCG5 em células Caco-2.



Nas imagens superiores as células Caco-2 foram tratadas com extrato aquoso de guaraná em pó digerido liofilizado em diferentes concentrações por 02 e 16 horas e os lisados celulares totais foram analisados por *western blotting*. Nas imagens inferiores resultados expressos em média  $\pm$  DP após normalização pelo GAPDH (*housekeeping*). a, b = letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p = 0,012$ ) para ANOVA entre os grupos. 0: Controle Negativo (Tampão *Hank's*). Cat/Epi: Controle de padrões de catequina e epicatequina (1,5 e 2,25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). G 0,025: guaraná 0,025 mg/mL. G 0,050: guaraná 0,050 mg/mL. G 0,075: guaraná 0,075 mg/mL.

Em relação ao conteúdo proteico do ABCG8, apesar da tendência de aumento de forma dose-dependente observada, estes aumentos não foram estatisticamente significantes e não apresentaram diferença em relação aos controles após 02 ou 16 horas.

**Figura 26** – Efeito do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro* sobre o conteúdo proteico do ABCG8 em células Caco-2.

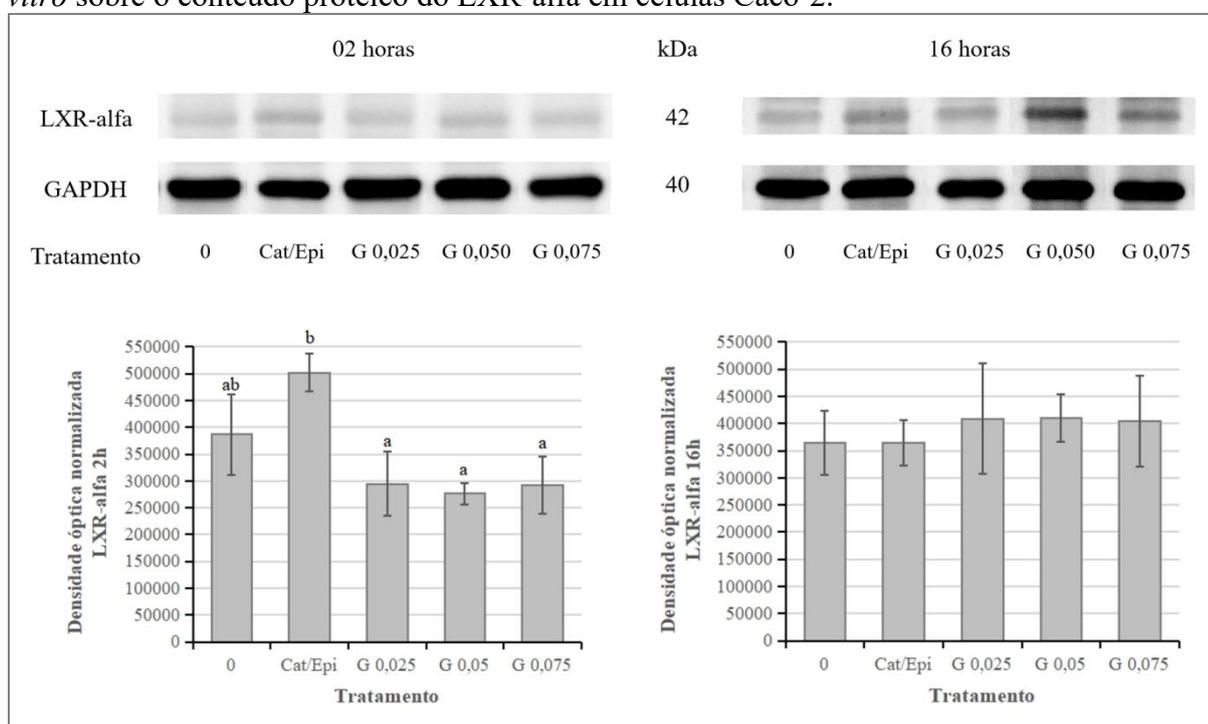


Nas imagens superiores as células Caco-2 foram tratadas com extrato aquoso de guaraná em pó digerido liofilizado em diferentes concentrações por 02 e 16 horas e os lisados celulares totais foram analisados por *western blotting*. Nas imagens inferiores resultados expressos em média  $\pm$  DP após normalização pelo GAPDH (*housekeeping*). 0: Controle Negativo (Tampão *Hank's*). Cat/Epi: Controle de padrões de catequina e epicatequina (1,5 e 2,25  $\mu$ g/mL, respectivamente). G 0,025: guaraná 0,025 mg/mL. G 0,050: guaraná 0,050 mg/mL. G 0,075: guaraná 0,075 mg/mL.

Os LXR são receptores nucleares (fatores transcricionais) ativados por óxidos de colesterol endógenos. Agem como sensores de colesterol: quando os oxisteróis celulares se acumulam como resultado de um aumento nas concentrações de colesterol, o LXR induz a transcrição de genes que protegem as células contra uma sobrecarga de colesterol. O colesterol por si só não é um ligante para o LXR. Porém, são reguladores cruciais na homeostase do colesterol, regulando positivamente a expressão gênica do ABCG5 e ABCG8, e regulando negativamente a expressão gênica do NPC1L1. A expressão do LXR se dá predominantemente em tecidos metabolicamente ativos, como o fígado, intestino delgado, rins, macrófagos e tecido adiposo (DUVAL et al., 2006; ZHAO e DAHLMAN-WRIGHT, 2010).

A sua isoforma LXR-alfa também foi analisada quanto a um possível efeito do extrato aquoso de guaraná em pó. Nos resultados ilustrados na Figura 27 podemos observar que no tempo de 02 horas o conteúdo do LXR-alfa foi estatisticamente menor que a mistura de padrões de catequinas, porém sem diferença estatística entre as três concentrações e entre o controle negativo. Já no tempo de 16 horas, não observamos diferença estatística entre as amostras. Estes resultados mostram que o guaraná não exerceu efeito sobre o conteúdo do LXR-alfa.

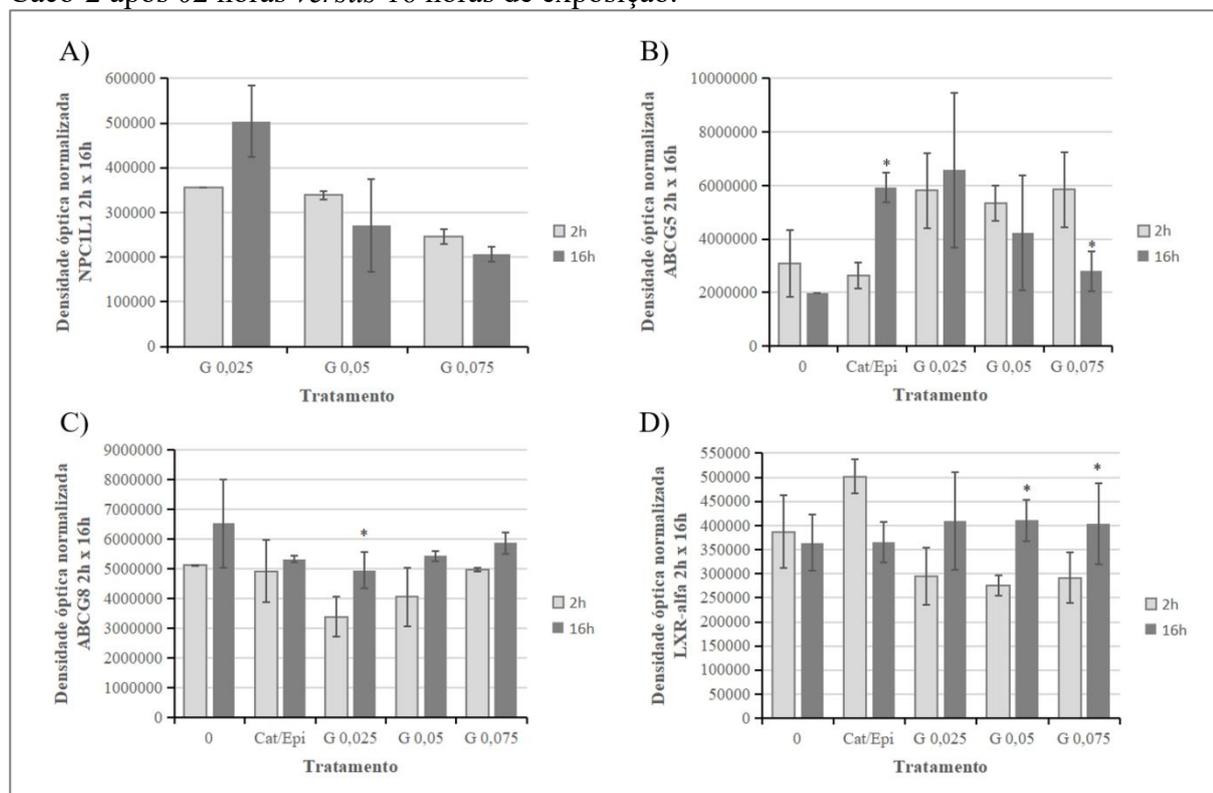
**Figura 27** – Efeito do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro* sobre o conteúdo proteico do LXR-alfa em células Caco-2.



Nas imagens superiores as células Caco-2 foram tratadas com extrato aquoso de guaraná em pó digerido liofilizado em diferentes concentrações por 02 e 16 horas e os lisados celulares totais foram analisados por *western blotting*. Nas imagens inferiores resultados expressos em média  $\pm$  DP após normalização pelo GAPDH (*housekeeping*). a, b = letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para ANOVA. 0: Controle Negativo (Tampão *Hank's*). Cat/Epi: Controle de padrões de catequina e epicatequina (1,5 e 2,25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). G 0,025: guaraná 0,025  $\text{mg/mL}$ . G 0,050: guaraná 0,050  $\text{mg/mL}$ . G 0,075: guaraná 0,075  $\text{mg/mL}$ .

Quando comparamos o efeito das amostras sobre o conteúdo proteico entre os tempos de 02 e 16 horas (Figura 28), observamos diferença estatística na concentração de 0,075  $\text{mg/dL}$  de guaraná e na mistura de padrões de catequinas para o ABCG5, na concentração de 0,025  $\text{mg/mL}$  de guaraná para ABCG8 e nas concentrações de 0,050 e 0,075  $\text{mg/mL}$  de guaraná para LXR-alfa. Para o NPC1L1, não houve diferença estatística entre as amostras nos tempos investigados.

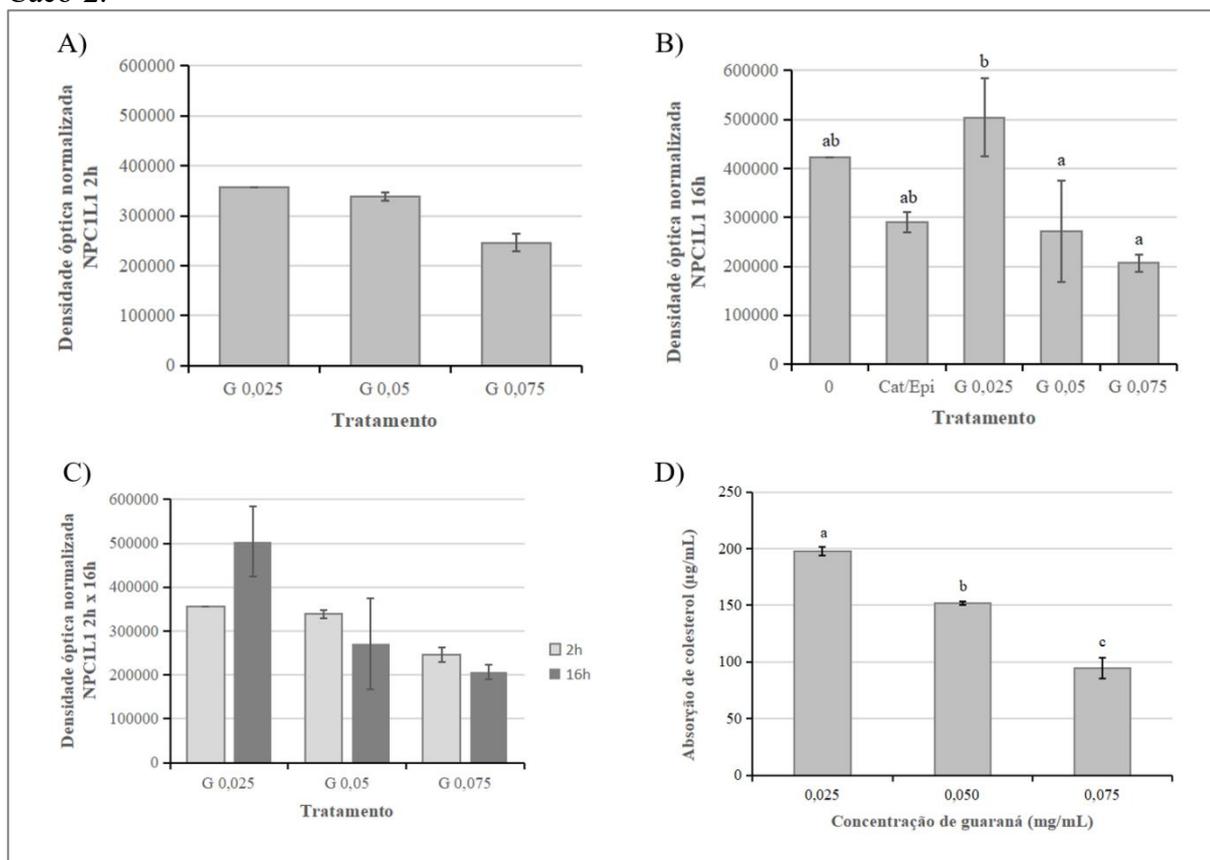
**Figura 28** – Comparação do efeito do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro* sobre o conteúdo proteico de transportadores de colesterol em células Caco-2 após 02 horas *versus* 16 horas de exposição.



A) NPC1L1. B) ABCG5. C) ABCG8. D) LXR-alfa. \*  $p < 0,05$  em comparação a 02 horas (teste *t* de Student). 0: Controle Negativo (Tampão *Hank's*). Cat/Epi: Controle de padrões de catequina e epicatequina (1,5 e 2,25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). G 0,025: guaraná 0,025 mg/mL. G 0,050: guaraná 0,050 mg/mL. G 0,075: guaraná 0,075 mg/mL. Resultados expressos em média  $\pm$  DP.

A Figura 29 mostra uma comparação entre o efeito do extrato aquoso do guaraná em pó sobre o conteúdo proteico do NPC1L1 nos tempos de 02 e 16 horas e o efeito sobre a absorção de colesterol em células Caco-2. Verificamos que a tendência de redução do conteúdo do NPC1L1 nos tempos de 02 horas e a redução no tempo de 16 horas observadas (A, B e C) coincidem com a redução da absorção de colesterol em células Caco-2 após a realização do experimento de permeação (D), demonstrando que além de exercer um efeito na inibição da solubilização micelar do colesterol, a amostra exerceu efeito sobre o conteúdo de transportadores de membrana celular responsáveis tanto pela absorção quanto pelo efluxo de colesterol dos enterócitos.

**Figura 29** – Efeito do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro* sobre o conteúdo de NPC1L1 e sobre a captação e absorção de colesterol em células Caco-2.



A) NPC1L1 2 horas. B) NPC1L1 16 horas. C) NPC1L1 2 horas *versus* 16 horas. D) Para o experimento de permeação, as células foram incubadas por um período de 02 horas com as amostras liofilizadas e diluídas em diferentes concentrações (0,025, 0,050 e 0,075 mg/mL) em tampão Hank's (HBSS), filtradas (0,22 µm) e aplicadas no lado apical das monocamadas diferenciadas, juntamente com as micelas de colesterol (130 µg/mL) previamente preparadas e 0,75 mL de HBSS foram adicionados no lado basolateral da monocamada celular. As amostras analisadas foram coletadas do compartimento basolateral e analisadas em HPLC a 206 nm. a, b, c = letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para ANOVA entre os grupos. 0: Controle Negativo (Tampão *Hank's*). Cat/Epi: Controle de padrões de catequina e epicatequina (1,5 e 2,25 µg/mL, respectivamente). G 0,025: guaraná 0,025 mg/mL. G 0,050: guaraná 0,050 mg/mL. G 0,075: guaraná 0,075 mg/mL. Resultados expressos em média ± DP. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Considerando que o conteúdo intracelular de colesterol e seus óxidos derivados é determinante para o conteúdo do NPC1L1, ABCG5/8 e do LXR-alfa, é provável que a redução do conteúdo de colesterol detectado no compartimento basolateral do experimento da permeação bem como o conteúdo reduzido do NPC1L1 após 16 horas de incubação com guaraná nas concentrações de 0,050 e 0,075 mg/mL sejam responsáveis pela ausência de efeito (ou não aumento) do conteúdo proteico do dímero ABCG5/8 e do LXR-alfa observada neste mesmo período. É importante considerar também que as amostras utilizadas para determinar o conteúdo proteico foram lisados celulares totais, não considerando o conteúdo citoplasmático *versus* conteúdo nuclear, o que pode ter refletido na ausência de efeito

observada sobre o LXR-alfa. Porém, mais estudos são necessários para confirmar estas hipóteses, com intervalos de tempo maiores de incubação e com extração de conteúdo proteico compartimentalizada.

Diversos estudos têm identificado compostos capazes de alterar a expressão do NPC1L1, ABCG5/ABCG8 e, conseqüentemente, reduzir ou aumentar seu conteúdo proteico na membrana dos enterócitos, sendo este um possível mecanismo de regulação da absorção do colesterol intestinal e de sua concentração plasmática.

No estudo de FENG et al. (2010) células Caco-2 foram tratadas com diferentes concentrações de curcumina, um polifenol com propriedades antioxidantes, antitumorais e antiinflamatórias. Após 24 horas, a curcumina foi capaz de inibir a captação de colesterol em células Caco-2 pela diminuição da expressão do NPC1L1 e significativa redução nos conteúdos proteicos deste transportador, com conseqüente redução na concentração de colesterol.

O licopeno, o maior carotenoide encontrado nos tomates e altamente consumido pela população, também apresentou efeitos sobre o metabolismo lipídico. ZOU e FENG (2015) investigaram se o licopeno afeta a absorção intestinal de colesterol em células Caco-2. Os resultados mostraram que o licopeno reduziu a absorção de colesterol de forma dose-dependente por meio da regulação negativa da expressão da proteína NPC1L1, sendo este efeito inibitório do licopeno mediado, em parte, pela regulação positiva do LXR-alfa observada também de forma dose-dependente.

O extrato do chokeberry preto (*Aronia melanocarpa*), rico em polifenóis, foi capaz de regular a expressão de genes importantes para o efluxo de colesterol em células Caco-2 no estudo de KIM et al. (2013), confirmando efeitos hipolipidêmicos. As células foram incubadas com diferentes concentrações do extrato pelo período de 24 horas e a análise de *western blotting* confirmou a inibição da expressão da proteína NPC1L1 e induziu de forma significativa o conteúdo das proteínas ABCG5/ABCG8. Os dados sugerem que o efeito do extrato se atribui a um aumento do efluxo apical do colesterol e a redução da formação de quilomícrons no intestino.

LIU et al. (2018) avaliaram o efeito hipocolesterolêmico do extrato da planta *Lonicera caerulea* rico em polifenóis como as catequinas em células Caco-2 (16 horas) e em ratos (12 semanas). Eles verificaram uma redução nas concentrações de colesterol total, triacilgliceróis e LDL-c, e aumento do HDL-c nos animais e uma redução na expressão proteica do NPC1L1 e aumento da expressão do ABCG5/ABCG8 tanto no modelo animal quanto no modelo celular, resultando no aumento da excreção de esteróis e na redução da absorção de colesterol. Estes dados sugerem que esta planta pode ser utilizada como um alimento funcional para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas à acumulação excessiva de colesterol.

Após o resultado de todos os mecanismos avaliados, podemos observar que a capacidade de reduzir a captação e absorção de colesterol verificada no experimento da permeação pode ter início durante o processo digestivo pela inibição da atividade da enzima lipase pancreática. Em seguida, este mecanismo parece estar envolvido com a ligação aos ácidos biliares (presentes na bile e como componente micelar) e interação com a fosfatidilcolina micelar, podendo desta forma alterar a conformação da micela, inibindo parcialmente a solubilização micelar do colesterol, como demonstrado nos experimentos *in vitro*; estes podem ser considerados mecanismos mais agudos de exposição aos compostos bioativos presentes no guaraná.

Em relação aos mecanismos moleculares, transportadores localizados na membrana dos enterócitos, responsáveis tanto pelo transporte do colesterol para dentro da célula quanto pelo seu efluxo para a luz intestinal, podem ter seu conteúdo proteico modulado como uma forma de exposição mais crônica aos mesmos compostos bioativos do guaraná. No primeiro momento, o tempo de 02 horas de exposição não foi suficiente para reduzir o conteúdo do NPC1L1 de forma significativa; deste modo, o aumento do conteúdo do ABCG5 observado neste mesmo tempo pode ser um mecanismo celular para manter a homeostase do conteúdo intracelular de colesterol. Já no segundo momento, com 16 horas de exposição, observamos a redução do conteúdo do NPC1L1 de forma significativa e o ABCG5, por sua vez, não foi alterado. Como o aumento da expressão do NPC1L1 pode diminuir a captação do colesterol, não houve necessidade do aumento da expressão das demais proteínas relacionadas à homeostase de colesterol como um mecanismo de compensação.

Segundo QUERO et al. (2020), a ingestão de um alimento rico em compostos bioativos como os compostos fenólicos pode ser mais eficaz do que ingerir seus principais componentes isolados, uma vez que a interação e sinergia entre os diferentes compostos, sua matriz alimentar e outros componentes biologicamente ativos como proteínas influenciam a biodisponibilidade dos polifenóis. Portanto, estudos com foco em alimentos ou seus extratos apresentam muitas vezes resultados mais precisos do que aqueles que usam compostos fenólicos isolados.

Estes resultados sugerem que, pensando no manejo clínico da hipercolesterolemia, da obesidade, das doenças cardiovasculares e de outras doenças crônicas, a ingestão do guaraná pode ser considerada uma maneira eficiente de reduzir a absorção de lipídios no intestino e, conseqüentemente, a concentração plasmática de colesterol, podendo ser utilizado como adjuvante no controle da hipercolesterolemia, quando inserido na alimentação regular do indivíduo e associado à uma alimentação saudável e variada. Portanto, a inclusão do guaraná em nossa dieta diária, assim como de outras frutas, consideradas promotoras da saúde, associada à uma alimentação saudável e variada, deve ser incentivada.

Os resultados obtidos neste trabalho nos conduzem a uma perspectiva para o desenvolvimento de novos estudos na área, utilizando concentrações maiores para análises *in vitro*, tempos de exposição mais longos em modelos celulares, bem como investigar vias complementares envolvidas na biodisponibilidade dos compostos do guaraná, como o metabolismo hepático que ocorre após a absorção, desenvolvido em outros modelos celulares, como por exemplo a HepG2 e com foco em outros marcadores celulares, como o LDL-r, HMGCoA redutase, ACAT2 e SREBP-1, por exemplo.

Outra área ainda pouco explorada no contexto do guaraná é o efeito de seus compostos sobre alterações e regulação da microbiota humana (crescimento e alteração de pH do lúmen intestinal), uma vez que o guaraná possui polifenóis extraíveis e de ligação insolúvel (não-extraíveis), que se acumulam no cólon e são metabolizados pela microbiota.

Por fim, é interessante também o desenho de outros modelos experimentais, como modelos animais e também humanos. Estes estudos tornam-se necessários para que seja possível confirmar *in vivo* os efeitos observados *in vitro*, elucidar mecanismos em condições mais fisiológicas, além de estabelecer as dosagens de guaraná que seriam aplicáveis e

recomendadas para humanos, avaliando a efetividade e a segurança do consumo habitual deste alimento.

## 5 CONCLUSÕES

Após a realização deste trabalho, podemos concluir que o guaraná é um alimento rico em compostos com propriedades antioxidantes e hipocolesterolêmicas, principalmente a catequina, a epicatequina e a cafeína, os quais apresentaram elevada bioacessibilidade, além das procianidinas B1 e B2.

O extrato aquoso de guaraná em pó digerido exibiu uma atividade inibitória da enzima lipase pancreática de forma dose-dependente e uma boa capacidade de ligação aos ácidos biliares; também demonstrou uma capacidade de interação com a fosfatidilcolina micelar e de inibição da solubilização micelar do colesterol de forma *in vitro*.

Em modelo celular, o extrato também foi capaz de regular negativamente o conteúdo proteico do NPC1L1 e positivamente o conteúdo proteico do ABCG5, podendo estar relacionado com a redução da captação de colesterol observada nas células Caco-2.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALMINGER, M. et al. *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 13, p. 413-436, 2014.
- ALONSO-CASTRO, A. J. et al. Self-treatment with herbal products for weight-loss among overweight and obese subjects from central Mexico. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 234, p. 21–26, 2019.
- AMORIM, R. et al. Efeito da administração de infusão de *Camellia sinensis* (chá verde) em diferentes fases do dia sobre aspectos metabólicos de camundongos submetidos a diferentes dietas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 36. Supl. 1, 2015.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ARNOLD, D.R.; KWITEROVICH JR, P.O. CHOLESTEROL | Absorption, Function, and Metabolism. In: TRUGO, L. C.; FINGLAS, P. M. (Editors) **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2. ed. Academic Press, 2003. p. 1226–1237.
- BARROS, H. D. F. Q.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. Phenolic Compound Bioavailability Using *In Vitro* and *In Vivo* Models. In: CAMPOS, M. R. S. **Bioactive Compounds**. Woodhead Publishing, 2019. p. 113-126.
- BASILE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of acetonc extract from *Paullinia cupana Mart.* seeds. **Natural product research**, Milton Park, v. 27, n. 22, p. 2084-2090, 2013.
- BENTO-SILVA, A. et al. Factors affecting intake, metabolism and health benefits of phenolic acids: do we understand individual variability? **European journal of nutrition**, Darmstadt, v. 59, n. 4, p. 1275-1293, 2020.
- BIRARI, R. B.; BHUTANI, K. K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug discovery today**, Kidlington, v. 12, n. 19-20, p. 879–889, 2007.
- BISBY, R. H.; BROOKE, R.; NAVARATNAM, S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. **Food Chemistry**, Barking, v. 108, n. 3, p. 1002-1007, 2008.
- BITTENCOURT, L. S. et al. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food and chemical toxicology**, Oxford, v. 53, p. 119-125, 2013.
- BOHN, T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. **Nutrition reviews**, Washington, v. 72, n. 7, p. 429–452, 2014.

- BOOZER, C. N. et al. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. **International journal of obesity**, Hampshire, v. 25, n. 3, p. 316-324, 2001.
- BORTOLIN, R. C. et al. Guarana supplementation attenuated obesity, insulin resistance, and adipokines dysregulation induced by a standardized human Western diet via brown adipose tissue activation. **Phytotherapy research**, London, v. 33, n. 5, p. 1394–1403, 2019.
- BRODKORB, A. et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature protocols**, London, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.
- DE CAMARGO, A. C., et al. Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 62, n. 50, p. 12159–12171, 2014.
- DE CAMARGO, A. C.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SHAHIDI, F. Phenolic Profile of Peanut By-products: Antioxidant Potential and Inhibition of Alpha-Glucosidase and Lipase Activities. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 94, p. 959–971, 2017.
- CANICEIRO, B. D. Efeitos da *Paullinia cupana* e de seus principais compostos ativos na modulação da resposta imune. [*Effects of Paullinia cupana and its main active principles on the immune response modulation*]. 2012. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- 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**, Chicago, v. 13, n. 2, p. 155–171, 2014.
- CARRIS, N.W., et al. Pleiotropic effects of metformin to rescue statin-induced muscle injury and insulin resistance: A proposed mechanism and potential clinical implications. **Medical Hypotheses**, Penrith, v. 107, p. 39-44, 2017.
- CASASCHI, A. et al. Intestinal apolipoprotein B secretion is inhibited by the flavonoid quercetin: potential role of microsomal triglyceride transfer protein and diacylglycerol acyltransferase. **Lipids**, Chicago, v. 37, n. 7, p. 647–652, 2002.
- CHARLTON-MENYS, V.; DURRINGTON, P.N. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 93, n. 1, p. 27-42, 2008.
- CHAIT, Y. A. et al. Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of carob polyphenols: Bioaccessibility and bioactivity. **LWT**, v. 117, 108623, 2020.
- CILLA, A. et al. Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds – A review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 68, p. 3-15, 2018.

- DALONSO, N.; PETKOWICZ, C. L. O. Guarana powder polysaccharides: Characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic fraction. **Food Chemistry**, Berlin, v. 134, p. 1804–1812, 2012.
- DEL RIO, D. et al. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & redox signaling**, Larchmont, v. 18, n. 14, p. 1818-1892, 2013.
- DEMINA, E. P.; MIROSHNIKOVA, V. V.; SCHWARZMAN, A. L. Role of the ABC transporters A1 and G1, key reverse cholesterol transport proteins, in atherosclerosis. **Molecular Biology**, Los Angeles, v. 50, n. 2, p. 223-230, 2016.
- DIMA, C. et al. Bioavailability of the nutraceuticals: Role of the food matrix, processing conditions, the gastrointestinal tract, and nanodelivery systems. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 19, n. 3, p. 954-994, 2020.
- DUVAL, C. et al. Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 340, n. 4, p. 1259–1263, 2006.
- FALUDI, A. A. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 109, n. 2, supl. 1, p. 1-76, 2017.
- FENG, D. et al. Curcumin inhibits cholesterol uptake in Caco-2 cells by down-regulation of NPC1L1 expression. **Lipids in health and disease**, London, v. 9, n. 40, 2010.
- FENG, D. et al. Bisphenol A promotes cholesterol absorption in Caco-2 cells by up-regulation of NPC1L1 expression. **Lipids in health and disease**, London, v. 16, n. 2, 2017.
- FERREIRA, I. C. F. R.; MARTINS, N.; BARROS, L. Phenolic Compounds and Its Bioavailability: *In Vitro* Bioactive Compounds or Health Promoters? In: TOLDRÁ, F. **Advances in Food and Nutrition Research**. Academic Press, 2017. v. 82, p. 1-44.
- FONTES, L. C. B.; TORRES, E. A. F. S.; YONEKURA, L. Optimization of the extraction of antioxidants from guarana (*Paullinia cupana*) and grape (*Vitis labrusca* var. *Izabel*) pomace using response surface methodology. **African Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 5, n. 2, p. 53-59, 2014.
- FRANK, J. et al. Transepithelial Transport of Curcumin in Caco-2 Cells Is significantly Enhanced by Micellar Solubilisation. **Plant foods for human nutrition**, Dordrecht, v. 72, n. 1, p. 48–53, 2017.
- FUKUMASU, H. et al. Protective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and chemical toxicology**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 862-867, 2006.
- GARCIA-CONESA, M. T. Dietary polyphenols against metabolic disorders: How far have we progressed in the understanding of the molecular mechanisms of action of these compounds? **Critical reviews in food science and nutrition**, London, v. 57, n. 9, p. 1769-1786, 2017.

- GENVIGIR, F. D. V. et al. Effects of lipid-lowering drugs on reverse cholesterol transport gene expressions in peripheral blood mononuclear and HepG2 cells. **Pharmacogenomics**, London, v. 11, n. 9, p. 1235-1246, 2010.
- GUO, S.; LI, L.; YIN, H. Cholesterol Homeostasis and Liver X Receptor (LXR) in Atherosclerosis. **Cardiovascular & hematological disorders drug targets**, Sharjah, v. 18, n. 1, p. 27–33, 2018.
- HEIDKER, R. M.; CAIOZZI, G.C.; RICKETTS M. L. Dietary procyanidins selectively modulate intestinal farnesoid X receptor-regulated gene expression to alter enterohepatic bile acid recirculation: elucidation of a novel mechanism to reduce triglyceridemia. **Molecular nutrition & food research**, Weinheim, v. 60, n. 4, p. 727-736, 2016.
- HENMAN, A. R. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 6, n. 3, p. 311-338, 1982.
- HIDALGO, I. J. et al. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 96, n. 3, p. 736–749, 1989.
- HIEBL, V. et al. Caco-2 Cells for Measuring Intestinal Cholesterol Transport - Possibilities and Limitations. **Biological procedures online**, Waterloo, v. 22, n. 7, 2020.
- HUANG, D. et al. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 16, p.4437-4444, 2002.
- HUANG, R. et al. Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory effects of flavonoids from different citrus peel extracts: an *in vitro* study. **Food Chemistry**, Barking, v. 326, 126785, 2020.
- HUANG, Y.; ZHENG, Y. The probiotic *Lactobacillus acidophilus* reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells. **The British journal of nutrition**, Cambridge, v. 103, n. 4, p. 473–478, 2010.
- HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nature protocols**, London, v. 2, n. 9, p. 2111-2119, 2007.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Companhia Nacional de Abastecimento. **Análise mensal. Guaraná: Julho de 2017.**– Brasília: Conab, 2017. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_08\\_22\\_17\\_16\\_07\\_guarana\\_2\\_-\\_julho\\_de\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_22_17_16_07_guarana_2_-_julho_de_2017.pdf)>. Acesso em: 03 abril 2018.
- IFTIKHAR, M. et al. Transport, metabolism and remedial potential of functional food extracts (FFE) in Caco-2 cells monolayer: A review. **Food research international**, Ottawa, v. 136:109240, 2020.

- JESCH, E. D.; CARR, T. P. Sitosterol reduces micellar cholesterol solubility in model bile. **Nutrition Research**, New York, v.26, n. 11, p. 579-584, 2006.
- KAHLON, T. S.; SMITH, G. E. *In vitro* binding of bile acids by blueberries (*Vaccinium* spp.), plums (*Prunus* spp.), prunes (*Prunus* spp.), strawberries (*Fragaria X ananassa*), cherries (*Malpighia punicifolia*), cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and apples (*Malus sylvestris*). **Food Chemistry**, Barking, v. 100, n. 3, p. 1182-1187, 2007a.
- KAHLON, T. S.; SMITH, G. E. *In vitro* binding of bile acids by bananas, peaches, pineapple, grapes, pears, apricots and nectarines. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, n. 3, p. 1046-1051, 2007b.
- KIDAMBI, S. e PATEL, S. B. Cholesterol and non-cholesterol sterol transporters: ABCG5, ABCG8 and NPC1L1: a review. **Xenobiotica**, London, v. 38, n. 7-8, p. 1119-1139, 2008.
- KIGEN, G.; EDWARDS, G. Drug-transporter mediated interactions between anthelmintic and antiretroviral drugs across the Caco-2 cell monolayers. **BMC pharmacology & toxicology**, London, v. 18, n. 20, 2017.
- KIM, B. et al. Polyphenol-rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extract regulates the expression of genes critical for intestinal cholesterol flux in Caco-2 cells. **The Journal of nutritional biochemistry**, Stoneham, v. 24, n. 9, p. 1564–1570, 2013.
- KIM, B. et al. Blackcurrant anthocyanins stimulated cholesterol transport via post-transcriptional induction of LDL receptor in Caco-2 cells. **European journal of nutrition**, Darmstadt, v. 57, n. 1, p. 405–415, 2018.
- KOBAYASHI, M. et al. Epigallocatechin gallate decreases the micellar solubility of cholesterol via specific interaction with phosphatidylcholine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, p. 2881-90, 2014.
- KOO, S. I.; NOH, S. K. Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 18, p. 179-183, 2007.
- KOSIŃSKA-CAGNAZZO, A. et al. Identification of bioaccessible and uptaken phenolic compounds from strawberry fruits in *in vitro* digestion/Caco-2 absorption model. **Food chemistry**, Barking, v. 170, p. 288–294, 2015.
- KREWER, C. C. et al. Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly Amazonian population. **Phytotherapy research**, London, v. 25, n. 9, p. 1367-74, 2011.
- KU, Y. S. et al. Understanding the Composition, Biosynthesis, Accumulation and Transport of Flavonoids in Crops for the Promotion of Crops as Healthy Sources of Flavonoids for Human Consumption. **Nutrients**, Basel, v. 12, n. 6, p. E1717, 2020.
- KURIHARA, H et al. Hypolipemic effect of *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinskaja in lipid-loaded mice. **Biological and pharmaceutical bulletin**, Tokyo, v. 26, n. 3, p. 383-385, 2003.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LATHAM, P. W. Guarana (*Paullinia*) Powder a Remedy for Sick-Headache. **British medical journal**, London, v. 1, n. 591, p. 446-447, 1872.
- LEA, T. Epithelial Cell Models; General Introduction. In: VERHOECKX, K. et al. **The Impact of Food Bioactives on Health**, Springer, Cham, 2015a. p. 95-102.
- LEA, T. Caco-2 Cell Line. In: VERHOECKX, K. et al. **The Impact of Food Bioactives on Health**. Springer, Cham, 2015b. p. 103-111.
- LIMA, W. P. et al. Lipid metabolism in trained rats: effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clinical nutrition**, Edinburgh, v. 24, n. 6, p. 1019–1028, 2005.
- LIMA, N. D. S. et al. Modulatory Effects of Guarana (*Paullinia cupana*) on Adipogenesis. **Nutrients**, Basel, v. 9, n. 6, 2017.
- LIU, S. et al. Wild *Lonicera caerulea* berry polyphenol extract reduces cholesterol accumulation and enhances antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Food research international**, Ottawa, v. 107, p. 73–83, 2018.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, 402-408, 2001.
- LLERAS, E. Considerações sobre distribuição geográfica e taxonomia do guaraná (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis*) e taxa afins na Amazônia. In: 1º SIMPÓSIO BRASILEIRO DO GUARANÁ, 1., 1983, Manaus. Anais do 1º SIMPÓSIO BRASILEIRO DO GUARANÁ. Manaus, AM: EMBRAPA-UEPAE de Manaus, 1983. p. 281-292.
- LORENZO, J. M. et al. Polyphenols: Bioaccessibility and bioavailability of bioactive components. In: BARBA, F. J. et al. **Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds**. Woodhead Publishing, 2019. p. 309- 332.
- MACHADO, A. K. et al. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. **Food Research International**, Ottawa, v. 67, p. 426–433, 2015.
- MALTA, D. C.; MORAIS NETO, O. L.; SILVA JUNIOR, J. B.; Apresentação do plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2011 a 2022. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Unico de Saúde do Brasil**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 425-438, 2011.
- MALTA, D. C.; SILVA JR, J. B. O Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil e a definição das metas globais para o enfrentamento dessas doenças até 2025: uma revisão. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Unico de Saúde do Brasil**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 151-164, 2013.

- MALTA, D. C. et al. A vigilância e o monitoramento das principais doenças crônicas não transmissíveis no Brasil - Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 18, supl. 2, p. 3-16, 2015 .
- MALTA, D. C. et al. A implantação do Sistema de Vigilância de Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil, 2003 a 2015: alcances e desafios. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 661-675, 2017.
- MANZANO, S.; WILLIAMSON, G. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. **Molecular nutrition & food research**, Weinheim, v. 54, n. 12, p. 1773–1780, 2010.
- MARQUES, M. R. et al. Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into micelles. **Food chemistry**, Barking, v. 168, p. 288–293, 2015.
- MARQUES, M. R. et al. Transport of cowpea bean derived peptides and their modulator effects on mRNA expression of cholesterol-related genes in Caco-2 and HepG2 cells. **Food research international**, Ottawa, v. 107, p. 165–171, 2018.
- MENDES, T. M. N. et al. Guaraná (*Paullinia cupana*) catechins and procyanidins: Gastrointestinal/colonic bioaccessibility, Caco-2 cell permeability and the impact of macronutrients. **Journal of Functional Foods**, London, v. 55, p. 352-361, 2019.
- MINEKUS, M. et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. **Food & Function**, Cambridge, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.
- NAGAOKA, S. et al. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and caco-2 cells. **The Journal of nutrition**, Springfield, v. 129, n. 9, p. 1725–1730, 1999.
- NAGAR, E. E. et al. The impact of chemical structure on polyphenol bioaccessibility, as a function of processing, cell wall material and pH: A model system. **Journal of Food Engineering**, London, v. 289, 110304, 2021.
- NAKAI, M. et al. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 11, p. 4593-4598, 2005.
- NEKOHASHI, M. et al. Luteolin and quercetin affect the cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter niemann-pick c1-like 1 in caco-2 cells and rats. **PLoS one**, San Francisco, v. 9, n. 5, e97901, 2014.
- NOOROLAH, Z. et al. Tannin fraction of pistachio green hull extract with pancreatic lipase inhibitory and antioxidant activity. **Journal of food biochemistry**, Westport, In Press, 2020.
- OGAWA, K. et al. Interaction between Tea Polyphenols and Bile Acid Inhibits Micellar Cholesterol Solubility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 64, n. 1, p. 204-209, 2016.

- OLIVEIRA, D. M. et al. Development and validation of methods for the extraction of phenolic acids from plasma, urine, and liver and analysis by UPLC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 25, p. 6113-6121, 2013.
- ONTAWONG, A. et al. Lipid-lowering effects of *Coffea arabica* pulp aqueous extract in Caco-2 cells and hypercholesterolemic rats. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, Stuttgart, v. 52, p. 187–197, 2019.
- ORTEGA, N. et al. Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an *in vitro* digestion model. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 57, n. 13, p. 5743–5749, 2009.
- OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.
- PASSARELLI, M. Lipoproteínas. In: QUINTÃO, E. C. R.; NAKANDAKARE, E. R.; PASSARELLI, M. **Lípides: do metabolismo à aterosclerose**. São Paulo: Sarvier, 2011, p. 1-88.
- PATEL, N. et al. Use of simulated intestinal fluids with Caco-2 cells and rat ileum. **Drug development and industrial pharmacy**, New York, v. 32, n. 2, p. 151–161, 2006.
- PIRILLO, A.; CATAPANO, A. L.; NORATA, G. D. Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) Inhibition and Cardiovascular Diseases. **Current medicinal chemistry**, Schiphol, v. 23, n. 10, p. 983-999, 2016.
- PORTELLA, R. L. et al. Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an *in vitro* and *in vivo* study. **Lipids in health and disease**, London, v.12, p.12, 2013.
- PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003.
- QIU, X. L.; ZHANG, Q. F. Chemical profile and pancreatic lipase inhibitory activity of *Sinobambusa tootsik* (Sieb.) Makino leaves. **PeerJ**, Corte Madera, v. 7:e7765, 2019.
- QUERO, J. et al. Insight into the potential application of polyphenol-rich dietary intervention in degenerative disease management. **Food & function**, Cambridge, v. 11, n. 4, p. 2805–2825, 2020.
- RAEDERSTORFF, D. G. et al. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, Stoneham, v. 14, n. 6, p. 326-332, 2003.
- RAHIM, A.; TAKAHASHI, Y.; YAMAKI, K. Mode of pancreatic lipase inhibition activity *in vitro* by some flavonoids and non-flavonoid polyphenols. **Food research international**, Ottawa, v. 75, p. 289-294, 2015.

- REDAN, B. W. et al. Differentiated Caco-2 cell monolayers exhibit adaptation in the transport and metabolism of flavan-3-ols with chronic exposure to both isolated flavan-3-ols and enriched extracts. **Food & function**, Cambridge, v. 8, n. 1, p. 111–121, 2016.
- REIN, M. J. et al. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **British journal of clinical pharmacology**, London, v. 75, n. 3, p. 588–602, 2013.
- ROTHWELL, J. A. et al. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content, 2013. Disponível em: <http://www.phenol-explorer.eu>. Acesso em: 15 de março de 2021.
- RUCHEL, J. B. et al. Hypercholesterolemia and Ecto-enzymes of Purinergic System: Effects of *Paullinia cupana*. **Phytotherapy research: PTR**, London, v. 30, n. 1, p. 49-57, 2016.
- RUCHEL, J. B. et al. Guarana (*Paullinia cupana*) ameliorates memory impairment and modulates acetylcholinesterase activity in Poloxamer-407-induced hyperlipidemia in rat brain. **Physiology & behavior**, Oxford, v. 168, p. 11–19, 2017.
- RUCHEL, J. B. et al. Lipotoxicity-associated inflammation is prevented by guarana (*Paullinia cupana*) in a model of hyperlipidemia. **Drug and chemical toxicology**, New York. p. 1–9, 2019.
- SABEVA, N. S.; LIU, J.; GRAF, G. A. The ABCG5 ABCG8 sterol transporter and phytosterols: implications for cardiometabolic disease. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, London, v. 16, n. 2, p. 172-177, 2009.
- SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Lipid digestion, micelle formation and carotenoid bioaccessibility kinetics: Influence of emulsion droplet size. **Food chemistry**, England, v. 229, p. 653-662, 2017.
- SANTOS, D. I. et al. Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. In: BARBA, F. J. et al. **Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds**. Woodhead Publishing, 2019. p. 23-54.
- SANZ-BUENHOMBRE, M. et al. Bioavailability and the mechanism of action of a grape extract rich in polyphenols in cholesterol homeostasis. **Journal of Functional Foods**, London, v. 21, p. 178-185, 2016.
- SCHIMPL, F. C. et al. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 150, n. 1, p. 14-31, 2013.
- SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. O cultivo e o mercado do guaraná. Disponível em: < <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-do-guarana,969a9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD>>. Acesso em: 04 abril 2018.

- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, London. v. 18, p. 820-897, 2015.
- SHAHIDI, F.; PENG, H. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. **Journal of Food Bioactives**, Newark. v. 4, p. 11–68, 2018.
- DA SILVA, G. S., et al. Chemical profiling of guarana seeds (*Paullinia cupana*) from different geographical origins using UPLC-QTOF-MS combined with chemometrics. **Food research international**, Ottawa, v. 102, p. 700–709, 2017.
- SILVA, A. C. B.; BROSLER, E. M.; ALMEIDA, L. B.; REIA, M. Y.; MORATO, R. W. A **cadeia de valor do guaraná de Maués**. Manaus: IDESAM, 2018a. 82 p.
- SILVA, C. P. et al. Polyphenols from guaraná after *in vitro* digestion: Evaluation of bioaccessibility and inhibition of activity of carbohydrate-hydrolyzing enzymes. **Food Chemistry**, Barking, v. 267, p. 405-409, 2018b.
- SILVA, M. P. et al. Production and characterization of solid lipid microparticles loaded with guaraná (*Paullinia cupana*) seed extract. **Food research international**, Ottawa, v. 123, p. 144–152, 2019.
- SIMÃO, A. F. et al. I Cardiovascular Prevention Guideline of the Brazilian Society of Cardiology - Executive Summary. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 102, n. 5, p. 420-431, 2014.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, p. 144-158, 1965.
- SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guaraná's Journey from Regional Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 279–282, 2010.
- SORAN, H. et al. Hypercholesterolaemia - practical information for non-specialists. **Archives of medical science: AMS**, Poznań, v. 14, n. 1, p. 1-21, 2018.
- SUFRAMA. Superintendência da Zona Franca de Manaus. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Potencialidades Regionais. Estudo de viabilidade econômica**. Vol. 6. Guaraná. 2003.
- SWALLAH, M. S. et al. Antioxidant Potential Overviews of Secondary Metabolites (Polyphenols) in Fruits. **International journal of food science**, New York, v. 2020, 9081686; 2020.
- TADA, H. et al. Sitosterolemia, Hypercholesterolemia, and Coronary Artery Disease. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, Tokyo, v. 25, n. 9, p. 783-789, 2018.
- TRISAT, K. et al. Vegetable Juices and Fibers Reduce Lipid Digestion or Absorption by Inhibiting Pancreatic Lipase, Cholesterol Solubility and Bile Acid Binding. **International Journal of Vegetable Science**, Philadelphia, v. 23, n. 3, p. 260-269, 2017.

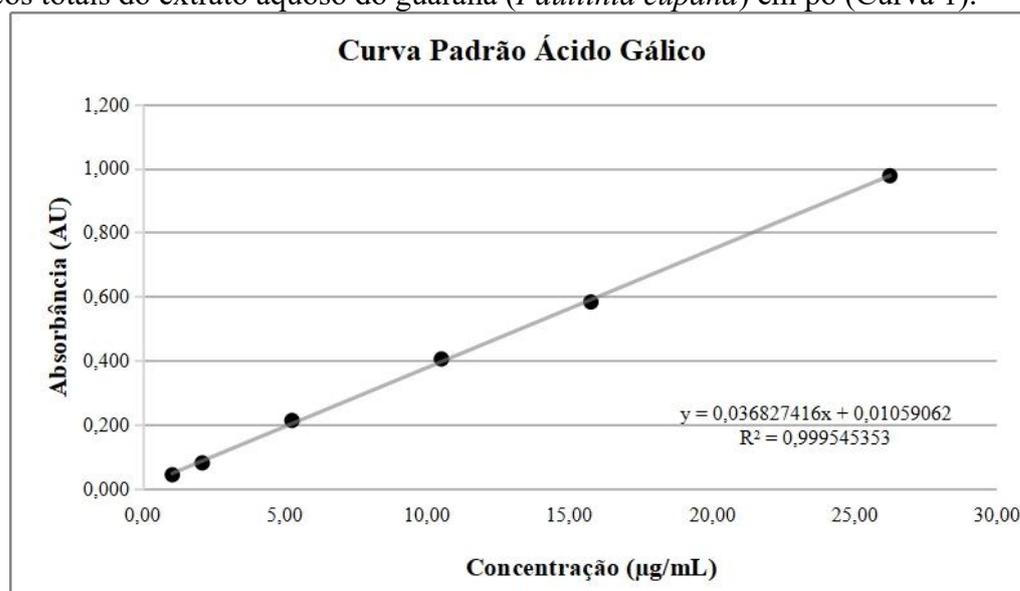
- VERHOECKX, K. et al. **The Impact of Food Bioactives on Health: *in vitro* and *ex vivo* models**. Springer, Cham, 2015.
- WANG, D. Q. H. Regulation of Intestinal Cholesterol Absorption. **Annual review of physiology**, Palo Alto, v. 69, p. 221-248, 2007.
- WHO. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva: World Health Organization, 2003 (WHO technical Report Series, 916).
- WHO. WORLD Health Organization. Geneva, c2020a. Disponível em: <<https://www.who.int/gho/ncd/en/>>. Acesso em: 01 jun. 2020.
- WHO. **World health statistics 2020: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. Geneva: World Health Organization; 2020b. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO. WORLD Health Organization. Geneva, c2020c. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1)>. Acesso em: 02 jun. 2020.
- WHO. WORLD Health Organization. Geneva, c2020d. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 02 jun. 2020.
- WILLIAMSON, G. The role of polyphenols in modern nutrition. **Nutrition Bulletin**, London, v. 42, n. 3, p. 226-235, 2017.
- WILKS, S. Guarana a Remedy for Sick-Headache. **British medical journal**, London, v. 1, n. 590, p. 421,1872.
- WOJTUNIK-KULESZA, K. et al. Influence of *In Vitro* Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols-A Non-Systematic Review. **Nutrients**, Basel, v. 12, n. 5, p. 1401, 2020.
- XAVIER, H. T. et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 101, n. 4, supl. 1, p. 1-20, 2013.
- YANG, I. F.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. *In Vitro* Bile Acid Binding Capacities of Red Leaf Lettuce and Cruciferous Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 65, n. 36, p. 8054-8062, 2017.
- YONEKURA, L.; NAGAO, A. Soluble fibers inhibit carotenoid micellization *in vitro* and uptake by Caco-2 cells. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Tokyo, v. 73, n. 1, p. 196-199, 2009.
- YONEKURA, L. et al. Bioavailability of catechins from guarana (*Paullinia cupana*) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects. **Food & function**, Cambridge, v. 7, n. 7, p. 2970-2978, 2016.
- YONEKURA, L.; TAMURA, H. A fast and sensitive isocratic high performance liquid chromatography method for determination of guaraná (*Paullinia cupana*) flavan-3-ols. **MethodsX**, Amsterdam, v. 6, p. 850-855, 2019.

- YOSHIE-STARK, Y.; WÄSCHE, A. *In vitro* binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. **Food Chemistry**, Berlin, v. 88, n. 2, p. 179-184, 2004.
- YU, X. H. et al. ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, Amsterdam, v. 428, p. 82-88, 2014.
- YUAN, L. et al. Differences between phytosterols with different structures in regulating cholesterol synthesis, transport and metabolism in Caco-2 cells. **Journal of Functional Foods**, London, v. 65:103715, 2020.
- YUKAWA, G. S. et al. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. **Biochemistry**, New York, v. 69, n. 1, p. 70-74, 2004.
- ZEB, A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. **Journal of food biochemistry**, Westport, v. 44, n. 9, e13394, 2020.
- ZHANG, H.; YOKOYAMA, W. H.; ZHANG; H. Concentration-dependent displacement of cholesterol in micelles by hydrophobic rice bran protein hydrolysates. **Journal of the science of food and agriculture**, London, v. 92, n. 7, p. 1395-1401, 2012.
- ZHAO, C.; DAHLMAN-WRIGHT, K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. **The Journal of endocrinology**, Bristol, v. 204, n. 3, p. 233–240, 2010.
- ZOU, J.; FENG, D. Lycopene reduces cholesterol absorption through the downregulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells. **Molecular nutrition & food research**, Weinheim, v. 59, n. 11, p. 2225–2230, 2015.

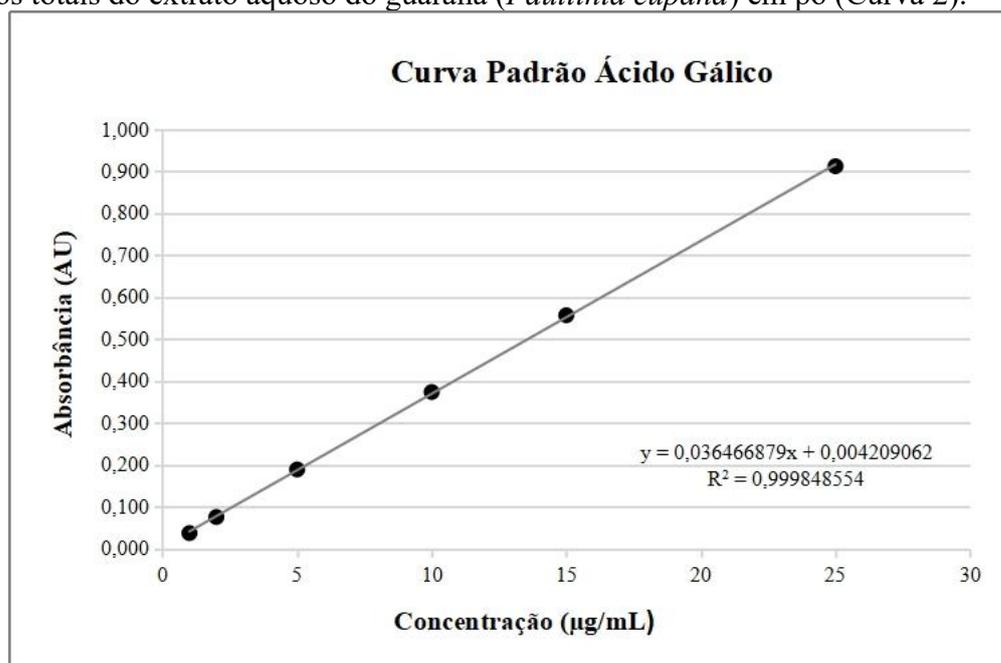
## APÊNDICES

## Apêndice 1 - Curvas padrão do ácido gálico

**Figura 30** – Curva de calibração de ácido gálico do método de determinação do conteúdo de fenólicos totais do extrato aquoso do guaraná (*Paullinia cupana*) em pó (Curva 1).

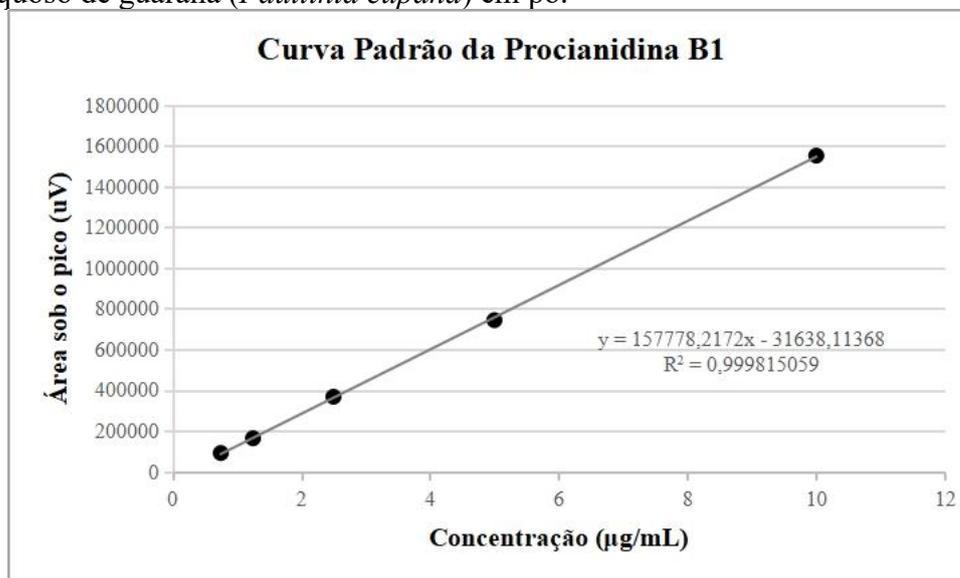


**Figura 31** – Curva de calibração de ácido gálico do método de determinação do conteúdo de fenólicos totais do extrato aquoso do guaraná (*Paullinia cupana*) em pó (Curva 2).

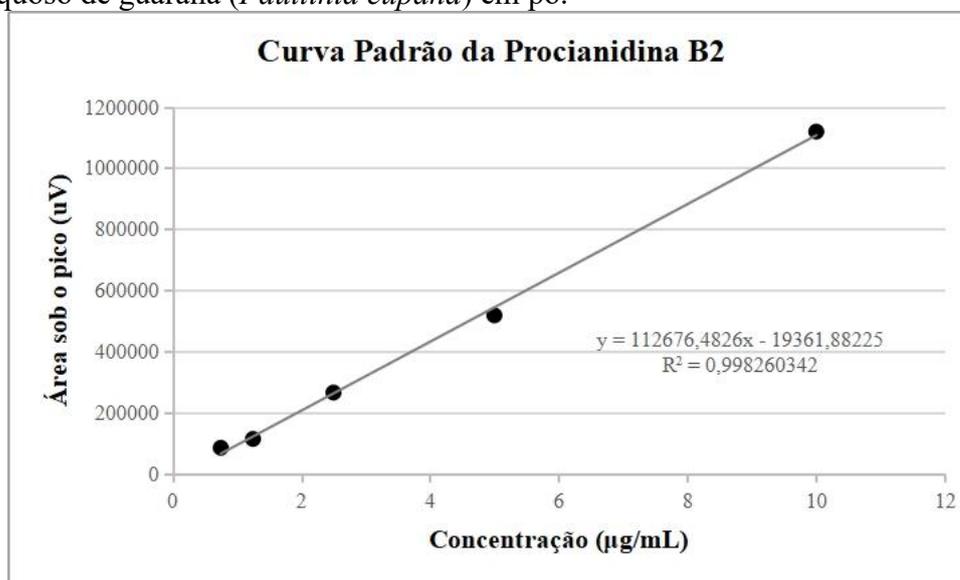


## Apêndice 2 - Curvas de calibração dos padrões de fenólicos

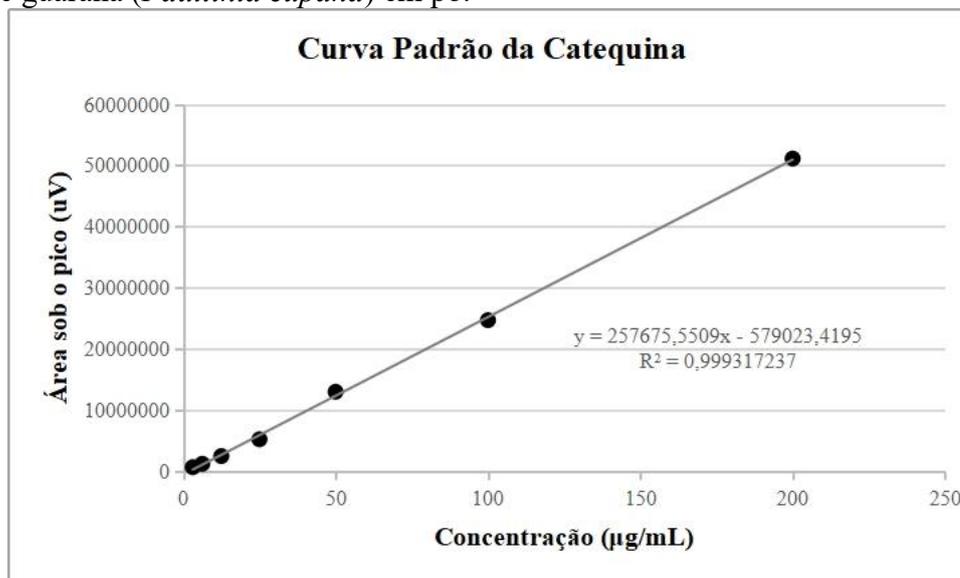
**Figura 32** – Curva padrão da Procianidina B1 para a determinação do perfil de fenólicos do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó.



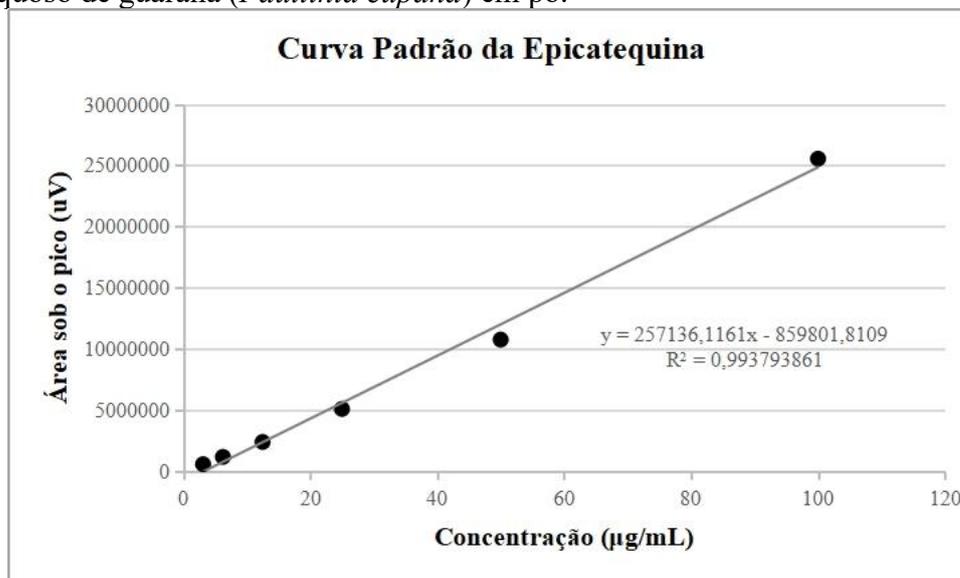
**Figura 33** – Curva padrão da Procianidina B2 para a determinação do perfil de fenólicos do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó.



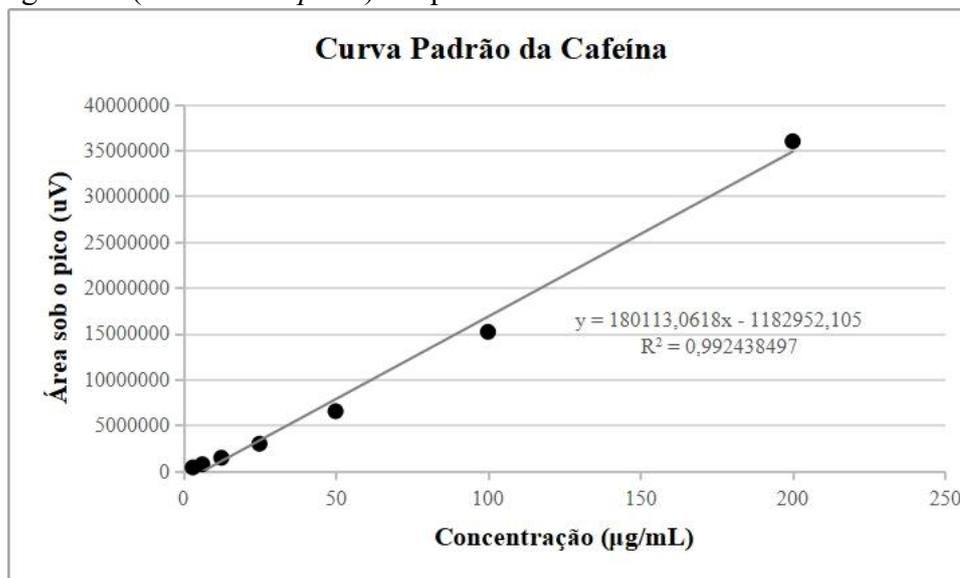
**Figura 34** – Curva padrão da Catequina para a determinação do perfil de fenólicos do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó.



**Figura 35** – Curva padrão da Epicatequina para a determinação do perfil de fenólicos do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó.

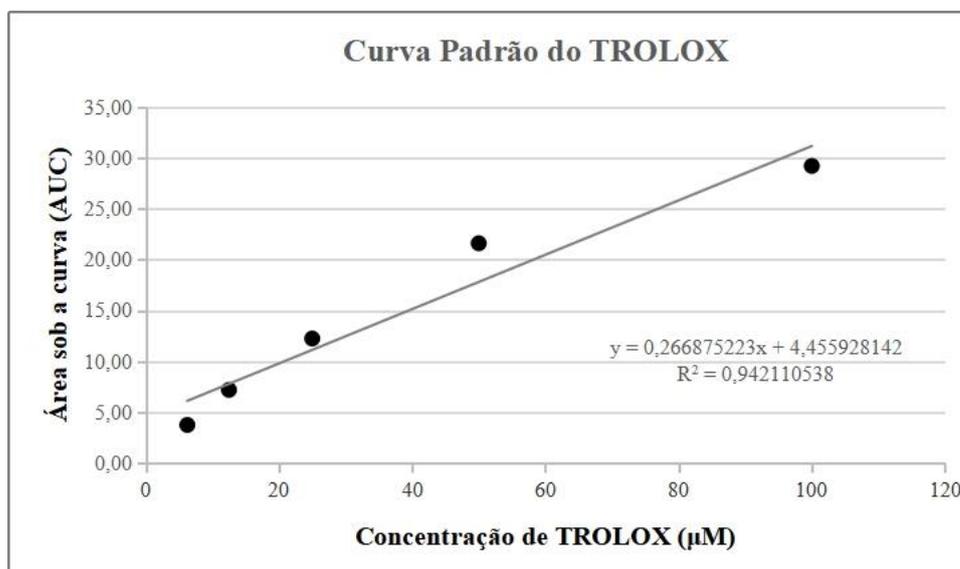


**Figura 36** – Curva padrão da Cafeína para a determinação do perfil de fenólicos do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó.



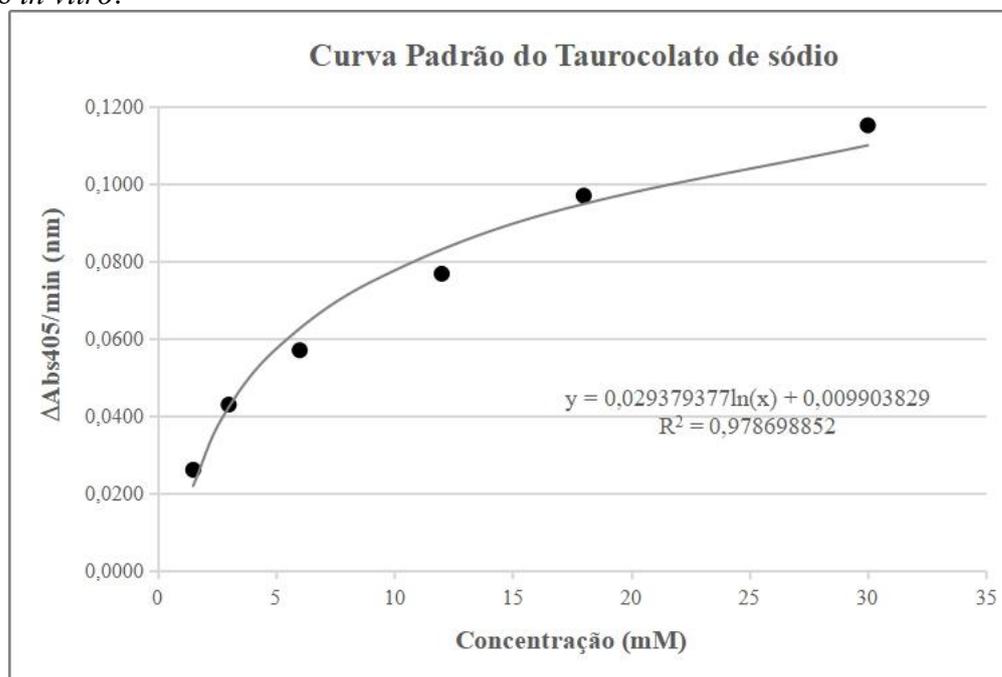
### Apêndice 3 - Curva padrão do trolox

**Figura 37** – Curva de calibração de TROLOX do método de determinação da atividade antioxidante pelo ensaio da capacidade de absorvância de radical oxigênio (do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity* – ORAC) do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó.



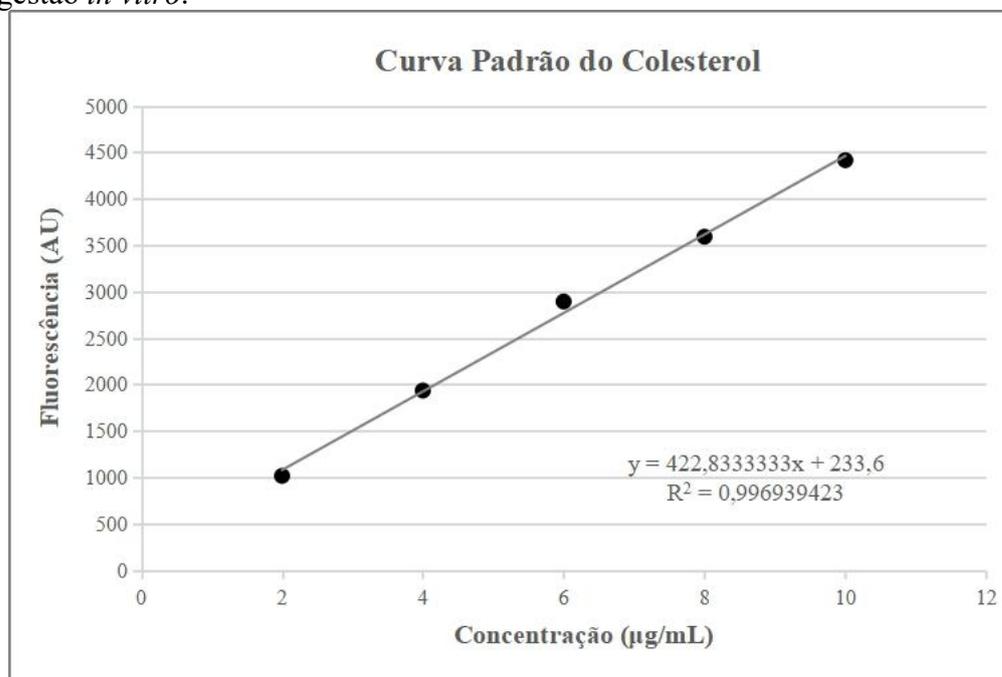
#### Apêndice 4 - Curva padrão do taurocolato de sódio

**Figura 38** – Curva padrão do taurocolato de sódio para a determinação da capacidade de ligação aos ácidos biliares do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro*.



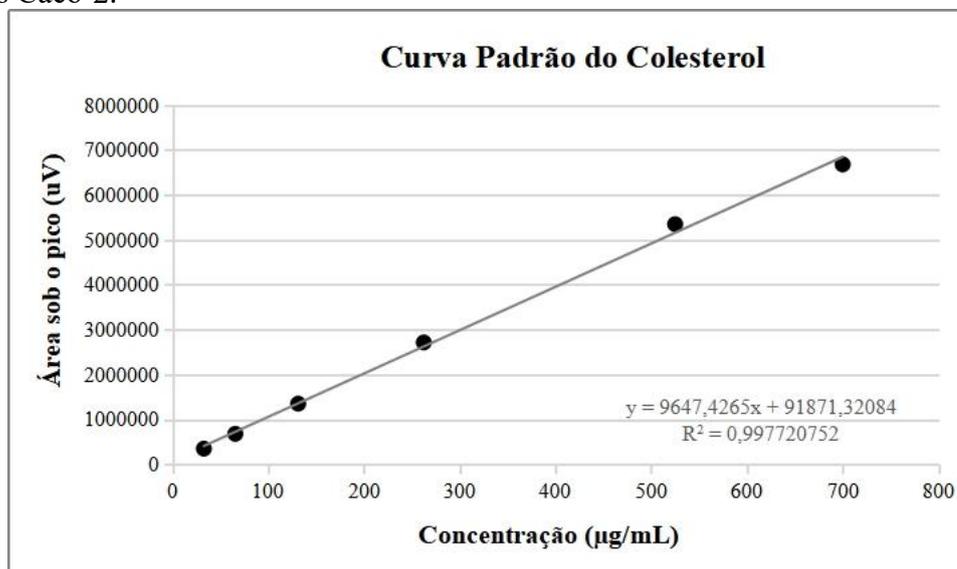
## Apêndice 5 - Curva padrão do colesterol micelar

**Figura 39** – Curva padrão do colesterol para determinação da capacidade de inibição da solubilização micelar do colesterol do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) em pó após digestão *in vitro*.



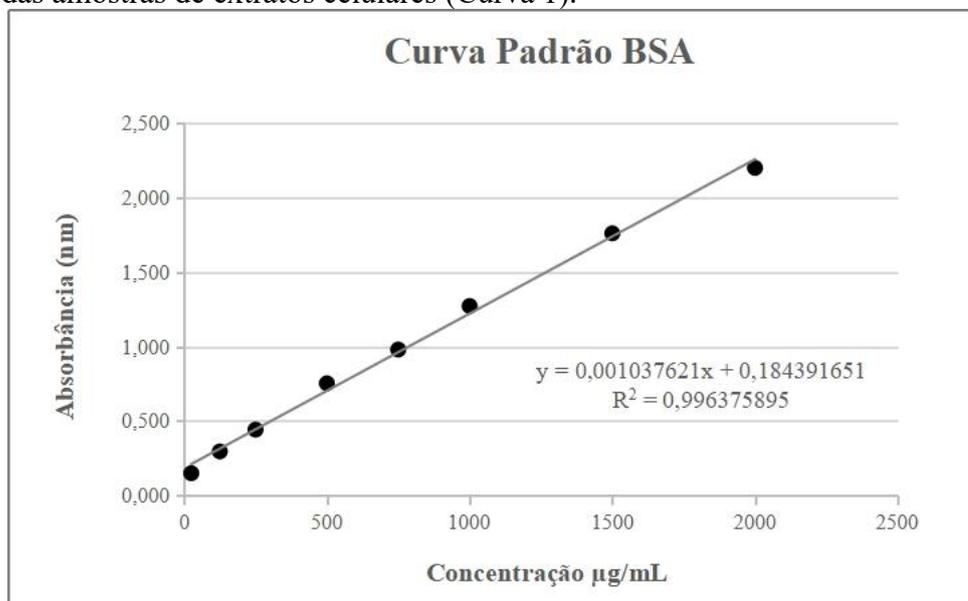
## Apêndice 6 - Curva padrão do colesterol no permeado de células Caco-2

**Figura 40** – Curva padrão do colesterol utilizada na quantificação de colesterol no permeado de células Caco-2.

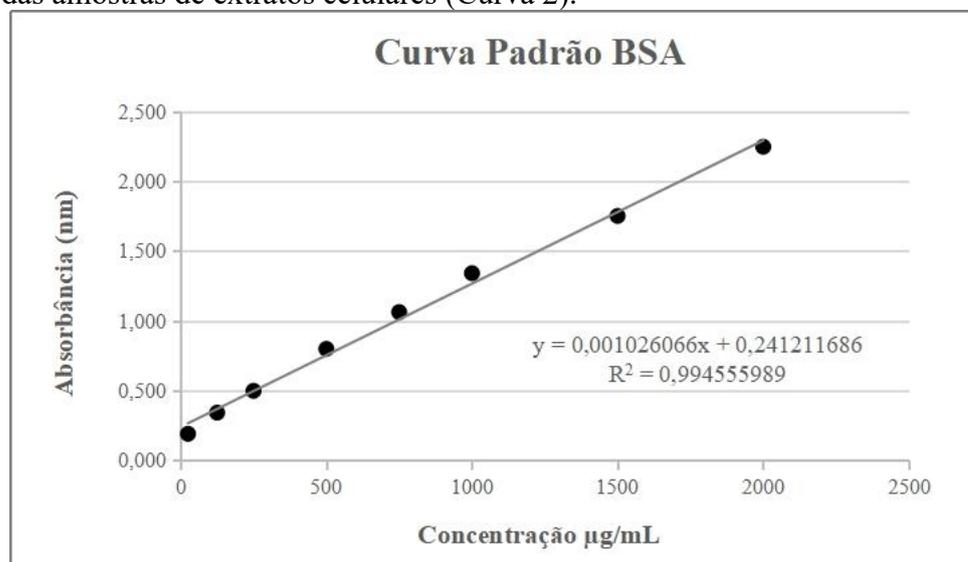


## Apêndice 7 - Curvas padrão de albumina (*bovine serum albumin* - BSA)

**Figura 41** – Curva padrão de albumina (*bovine serum albumin* - BSA) para quantificação da proteína das amostras de extratos celulares (Curva 1).



**Figura 42** – Curva padrão de albumina (*bovine serum albumin* - BSA) para quantificação da proteína das amostras de extratos celulares (Curva 2).



## CURRÍCULO LATTES



### Marcela de Souza Figueira

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4055241448632899>

ID Lattes: 405524 144863 2899

Última atualização do currículo em 24/10/2021

Graduação em Nutrição pela Universidade Federal do Pará (2007). Especialização em Nutrição Clínica pela Universidade Gama Filho-RJ (2012). Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários pelo Instituto de Ciências Biológicas da UFPA (2011). Doutora em Ciências pelo Programa de Pós Graduação em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (PPGNSP-FSP-USP) na área de Alimentos e Antioxidantes. Professora Efetiva Adjunto III da Faculdade de Nutrição da UFPA. Atua na área de Nutrição Clínica. Docente do Programa de Residência Multiprofissional em Atenção ao Paciente Crítico do Hospital Universitário João de Barros Barreto. **(Texto informado pelo autor)**

### Identificação

<b>Nome</b>	Marcela de Souza Figueira
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	FIGUEIRA, M. S.; Figueira, Marcela Souza
<b>Lattes iD</b>	<a href="http://lattes.cnpq.br/4055241448632899">http://lattes.cnpq.br/4055241448632899</a>
<b>Orcid iD</b>	<a href="https://orcid.org/0000-0002-3046-5242">https://orcid.org/0000-0002-3046-5242</a>

### Endereço

<b>Endereço Profissional</b>	Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde - ICS. Rua Augusto Corrêa, 01 - Faculdade de Nutrição - FANUT Guamá 66075-110 - Belém, PA - Brasil Telefone: (91) 32018452
------------------------------	---

### Formação acadêmica/titulação

<b>2017 - 2021</b>	Doutorado em Nutrição em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP-USP, Brasil. Título: Efeitos do extrato aquoso de guaraná ( <i>Paulinia cupana</i> ) em pó nos mecanismos envolvidos com a absorção de colesterol <i>in vitro</i> e em células Caco-2, Ano de obtenção: 2021. Orientador:  Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres. Palavras-chave: Guaraná; Polifenóis; Bioacessibilidade; Colesterol. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Bioquímica da Nutrição.
<b>2009 - 2011</b>	Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários (Conceito CAPES 6). Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil. Título: O efeito da suplementação nutricional de <i>Agaricus sylvaticus</i> sobre alterações oxidativas e da defesa antioxidante associadas à infecção pelo HIV em crianças e adolescentes, Ano de Obtenção: 2011. Orientador:  Sandro Percário. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: Estresse oxidativo; Antioxidantes; HIV; <i>Agaricus sylvaticus</i> ; Radicais livres. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Bioquímica Oxidativa.
<b>2011 - 2012</b>	Especialização em Nutrição Clínica. Universidade Gama Filho, UGF, Brasil. Título: Estresse oxidativo e defesa antioxidante de crianças e adolescentes portadores do HIV após a suplementação de nutrientes antioxidantes. Orientador: Renata Silvério; Vanessa Coutinho; Sandro Percário.

## CURRÍCULO LATTES DO ORIENTADOR



### Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9804923403746874>

ID Lattes: 9804923403746874

Última atualização do currículo em 23/10/2021

Engenheira Agrônoma com mestrado, doutorado e pós-doutorado na área de Ciência de Alimentos, Profa. Elizabeth completou seu doutorado sanduiche na Michigan State University (MI, USA). No último dia 10 de janeiro, completou 30 anos de carreira atuando no ensino para alunos de graduação em nutrição e em pós-graduação em nutrição e saúde pública, realizando pesquisas diretamente na área de ciência e tecnologia de alimentos, com destaque para alimentos funcionais, substâncias bioativas e doenças crônicas não-transmissíveis, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, modelos em células Caco-2, e alimento e humor (MoodFood), bem como na área de extensão universitária realizando dezenas de curso, eventos e treinamentos para a comunidade. Nestes 30 anos de atividade acadêmica, orientou 34 trabalhos de iniciação científica, 30 dissertações de mestrado e 19 teses de doutorado. Atualmente orienta um aluno de iniciação científica, um de mestrado, cinco de doutorado e dois de pós-doutorado. Publicou 158 artigos em periódicos especializados. Recebeu seis prêmios e homenagens. Recentemente teve trabalhos apresentados como capa das revistas Food & Function e Journal of Food Bioactives. Ganhou prêmio de terceiro lugar como melhor pôster na categoria internacional no IFT (New Orleans, USA). Publicou vários livros e um deles, Nutrição em Saúde Pública, foi indicado para prêmio Jabuti em 2018. É revisora de várias revistas científicas nacionais e internacionais. Também é Diretora Científica da Associação Brasileira de Nutrição em Saúde Mental (ABNSM). Atualmente coordena o projeto de pesquisa com auxílio intitulado "Efeito do guaraná em pó na modulação de biomarcadores inflamatórios e neurotróficos e em sintomas depressivos relacionados ao transtorno depressivo maior?". É membro da CRInt da Faculdade de Saúde Pública - Assuntos de Internacionalização. Possui várias parcerias nacionais e internacionais, UFRRJ, UNICAMP, Kagawa University, Memorial University, Universidade do Chile, Universidade de Deakin, dentre outras. Também é consultora do Conselho Científico (C3) ILSI Brasil. **(Texto informado pelo autor)**

### Identificação

<b>Nome</b>	Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	TORRES, E. A. F. S.;Torres, Elizabeth Aparecida Ferraz Da Silva;Torres, Elizabeth A. F. S.;Elizabeth Aparecida F.S. Torres;Torres, Elizabeth Aparecida F.S.;Elizabeth A. F. da S. Torres;TORRES, ELIZABETH A. F. DA S.;da Silva Torres EA;Da Silva Torres Elizabeth;DA SILVA TORRES, ELIZABETH;TORRES, E.A.F.S.;Da Silva Torres, Elizabeth AFS;Da Silva Torres, Elizabeth AF;DA SILVA TORRES, ELIZABETH A.F.;DA SILVA TORRES, ELIZABETH APARECIDA FERRAZ;APARECIDA FERRAZ DA SILVA TORRES, ELIZABETH;TORRES, E.;FERRAZ DA SILVA TORRES, ELIZABETH APARECIDA
<b>Lattes iD</b>	 <a href="http://lattes.cnpq.br/9804923403746874">http://lattes.cnpq.br/9804923403746874</a>
<b>Orcid iD</b>	 <a href="https://orcid.org/0000-0002-1012-1418">https://orcid.org/0000-0002-1012-1418</a>

### Endereço

<b>Endereço Profissional</b>	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. Faculdade de Saúde Pública Pacaembu 01246904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617857 Fax: (11) 30617130
------------------------------	--