

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**TESE**

**SIMULAÇÃO DE DIGESTÃO *IN VITRO* ACOPLADA A MODELOS  
DE TRANSPORTE GÁSTRICO E INTESTINAL PARA ESTIMAR A  
CAPTAÇÃO E ABSORÇÃO DE ANTOCIANINAS EM FRUTOS**

**FERNANDA MARQUES PEIXOTO**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**SIMULAÇÃO DE DIGESTÃO *IN VITRO* ACOPLADA A MODELOS  
DE TRANSPORTE GÁSTRICO E INTESTINAL PARA ESTIMAR A  
CAPTAÇÃO E ABSORÇÃO DE ANTOCIANINAS EM FRUTOS**

**FERNANDA MARQUES PEIXOTO**

*Sob Orientação do Professor*  
**D. Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy**

*e Coorientação da Professora*  
**D. Sc. Renata Galhardo Borguini**

Tese submetida como requisito parcial  
para a obtenção no grau de **Doutor em  
Ciências**, no Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Área de Concentração  
em Ciência de Alimentos

Seropédica, RJ  
Dezembro de 2016

664

P379s

T

Peixoto, Fernanda Marques, 1982-

Simulação de digestão *in vitro* acoplada a modelos de transporte gástrico e intestinal para estimular a captação e absorção de antocianinas em frutos / Fernanda Marques Peixoto - 2016.

122 f.: il.

Orientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 107-122.

1. Tecnologia de alimentos - Teses. 2. Antocianinas - Teses. 3. Fenóis - Teses. 4. Análise cromatográfica - Teses. 5. Espectrometria de massa - Teses. I. Godoy, Ronoel Luiz de Oliveira, 1951-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

FERNANDA MARQUES PEIXOTO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção no grau de Doutor em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

TESE APROVADA EM 08/12/16



Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (D.Sc.) Embrapa-CTAA  
(Orientador)



Edwin Elard García Rojas (D.Sc.) UFRRJ



Mirian Ribeiro Leite Moura (D.Sc.) FF/UFRJ



Catharina Eccard Fingolo (D.Sc.) UF/UEZO



Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago (D.Sc.) Embrapa-CTAA



## RESUMO

PEIXOTO, Fernanda Marques. **Simulação de digestão *in vitro* acoplada a modelos de transporte gástrico e intestinal para estimar a captação e absorção de antocianinas em frutos**. 2016. 122p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

O interesse pelo consumo das antocianinas aumentou após o surgimento da relação entre o seu consumo e a redução do risco de doenças crônicas. Apesar das evidências *in vitro* quanto a esses benefícios à saúde, ainda há uma lacuna que permanece sob investigação: o mecanismo de absorção das antocianinas pelo organismo humano. Sabe-se que a quantidade desses compostos, nos alimentos, não reflete a quantidade absorvida, metabolizada, distribuída e biologicamente ativa em humanos. Alguns modelos *in vitro* têm sido desenvolvidos para avaliar as etapas de digestão e transporte celular (absorção) de compostos dos alimentos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o transporte *in vitro* de antocianinas em alimentos utilizando modelos de digestão *in vitro* seguido do transporte em células intestinais Caco-2 e células gástricas MKN-28. Na 1ª etapa, oito frutos foram analisados quanto aos valores de bioacessibilidade (BCSS) fornecidos pelas antocianinas presentes, para posterior seleção para os ensaios de transporte. Os ensaios de BCSS foram realizados com um modelo de digestão *in vitro*, para simulação das fases oral, gástrica e intestinal humana. A quantificação e determinação do perfil de antocianinas foram realizadas por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com coluna Thermo® Scientific C<sub>18</sub> 2,4 (4,6 x 100mm). Na 2ª etapa, realizou-se os ensaios de BCSS, anteriormente aos ensaios de transporte, nos frutos potencialmente mais promissores. Para a avaliação do transporte gástrico, na sequência, o digerido gástrico foi aplicado sobre a monocamada de células MKN-28, com 2,5 x 10<sup>5</sup> células, em meio RPMI, em placa transwell® e, após 7 dias de cultivo, o permeado foi coletado nos tempos 30, 60, 120, 180 minutos. Para o transporte intestinal, sequencial, o digerido intestinal foi aplicado sobre a monocamada celular Caco-2, com 2,5 x 10<sup>5</sup> células, em meio DMEM, em placas transwell® e, após 21 dias de cultivo, o permeado foi coletado nos tempos 30, 60 e 120 minutos de transporte. Todas as análises foram realizadas por CLUE/detector de arranjo fotodiodo (Thermo® Scientific), a 520 nm. Os pós da casca da jabuticaba, jambo e jamelão foram as matrizes mais promissoras. A BCSS das antocianinas, após a digestão gástrica, foi de 13 % para jabuticaba, 45 % para jambo e 65 % para jamelão, enquanto a BCSS intestinal foi de 10% para jabuticaba, 15 % para jambo e 45 % para jamelão. Os ensaios de transporte (ET) com os modelos de célula MKN-28 resultaram em 19,7; 9,7 e 14,1 % de ET, respectivamente, para os pós do jambo, jabuticaba, e jamelão, enquanto que o modelo Caco-2, resultaram em 0,8, 0,2 e 0,3 % de ET, respectivamente. Estes resultados sugerem que as antocianinas são preferencialmente absorvidas pela mucosa gástrica.

**Palavras-chave:** Bioacessibilidade. Caco-2. MKN-28. Digestão *in vitro*



## ABSTRACT

PEIXOTO, Fernanda Marques. **Simulation of *in vitro* digestion coupled to gastric and intestinal transport models to estimate the uptake and absorption of anthocyanins in fruits.** 2016. 122p. Thesis (PhD in Food Science and Technology, Food Science). Institute of Technology, Department of Food Science and Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

A lot of interest in the consumption of anthocyanins increased after the association of their intake and reduced risk of chronic diseases. Despite of *in vitro* evidences of anthocyanins benefits to health, there is still a gap in the knowledge of the mechanisms of absorption of anthocyanins by the human body. It is known that concentration of food anthocyanins doesn't reflect the amount of these compounds which are absorbed, metabolized, distributed and biologically active in humans. Some *in vitro* models have been developed to evaluate the steps of cell release and transport (uptake) of these compounds from food. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* absorption of food anthocyanins using the *in vitro* digestion followed by uptake and transport in Caco-2 human intestinal cell line and MKN-28 human gastric cell line. Initially, anthocyanins bioaccessibility of diverse fruits was evaluated in order to select the better sources for transport assays. The bioaccessibility assays were performed using an *in vitro* digestion model, which mimics the human oral, gastric and intestinal stages. Quantification and characterization of anthocyanins profile were performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with Thermo Scientific® C<sub>18</sub> 2.4 (4.6 x 100mm) column. After selection of the most promising fruits, the bioaccessibility tests were followed by transport assays. To assess gastric absorption, the product from gastric digestion was applied on the MKN-28 cell monolayer, which was obtained after 7 days of culture of 2.5 x 10<sup>5</sup> MKN-28 cells seeded in RPMI culture media in transwell® plates. The permeate was collected after 30, 60, 120 and 180 minutes of transport. For evaluation of intestinal absorption after digestion, the digesta from the intestinal phase was applied on the Caco-2 cell monolayer, which was obtained after 21 days of culture of 2.5 x 10<sup>5</sup> Caco-2 cells seeded in DMEM culture media in TRANSWELL® plates. The permeate was collected after 30, 60 and 120 minutes of transport. All analyses were made by forming CLUE / photodiode array detector (Thermo® Scientific) at 520nm. Peel powder from jabuticaba, jambo and Jamelão were the most promising sources. The bioaccessibility of anthocyanins after gastric digestion was 13% for jabuticaba, 45 % for jambo and 65 % for jamelão. In addition, the intestinal bioaccessibility was 10 % for jabuticaba, 15 % for jambo and 45 % for jamelão. The transport assay with the MKN-28 gastric cell line, revealed 19.7%, 9.7 % and 14.1 % of transport efficiency, respectively, for jambo, jabuticaba and jamelão digestion products. While Caco-2 intestinal cell model showed 0.8 %, 0.2 % and 0.3 % of transport efficiency, respectively, for jambo, jabuticaba and jamelão. These results suggest food anthocyanins are preferentially absorbed by the human gastric mucosa and to a lesser extent by the human intestinal epithelium.

**Keywords:** Bioaccessibility. Caco-2. MKN-28. *In vitro* digestion

## DEDICATÓRIA

A uma força motriz do universo, por me ensinar que a vida é feita de muito trabalho e esforço e que nos mais sutis detalhes estão as grandes respostas.

Ao meu grande amigo e pai José Antonio, pelo exemplo de mestre, pensador, divagador, mas acima disto, de caráter, de retidão e honestidade. Além disso, por me apresentar a ciência como um lindo campo de flores, pronto a ser desbravado.

À minha querida mãe Edir, pelo amor e apoio incondicional, por ser o meu porto seguro e pela parceria reconfortante.

Às minhas filhas Isa e Sophia, por trazerem alegria a minha vida, por serem tão amáveis e compreensivas durante estes momentos. Por entenderem a minha ausência e confortarem meu coração como só as crianças sabem fazer. Amo vocês.

Ao Marcilio, pelo apoio e companheirismo ao longo destes anos.

Aos meus irmãos, Flávio e Rafa, que sempre foram e serão tão essenciais na minha vida. Que me mostram que ao sermos tão diferentes, somos tão parecidos. Vocês me ensinam sempre que o amor real, é incondicional.

As minhas cunhadas Paula e Alessandra por serem tão parceiras, amigas e pelas ótimas conversas.

À Sandra, cujo excelente trabalho e suporte durante esses anos, me garantiram a paz e tranquilidade necessárias para a realização deste trabalho. Meu enorme agradecimento.



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador D.Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy pela confiança, carinho, amizade, por acreditar e viabilizar a realização deste projeto.

À minha coorientadora D.Sc. Renata Galhardo Borguini, pelo exemplo de humanidade, parceria e comprometimento, que sempre me estimularam às boas ideias.

À equipe do Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da Embrapa Agroindústria de Alimentos- CTAA, pelas valiosas conversas e orientações, a Carol pela delicadeza e auxílio com o Espectrômetro de Massa, a Joana pela feliz surpresa em conhecer a pessoa amável e sensível que se mostrou.

À grande amiga Ana Cristina pelo carinho reconfortante, pela sincera amizade, pelas muitas conversas e dúvidas tiradas, sobre nossas belas “antocianinas” e por minha eterna gratidão por ser a pessoa linda que é.

À amiga Manuela, por seu constante incentivo e carinho, pela rapidez com que resolve todos os problemas e pelo exemplo constante do bom relacionamento.

A Professora Isabel Ferreira, da Universidade do Porto (Faculdade de Farmácia-Bromatologia), pelo dinamismo, entusiasmo e empenho em viabilizar tudo necessário a esta pesquisa no campo da cultura celular.

Aos Professores Nuno Mateus e Vitor Freitas, da Universidade do Porto (Faculdade de Ciências-Química) por permitirem a viabilização dos ensaios de transporte e análises cromatográficas.

A Professora Carmem Diniz e Ana Sofia, da Universidade do Porto (Faculdade de Farmácia-Farmacologia) pelo inestimável auxílio com os primeiros contatos com as linhagens celulares.

Ao investigador, Miguel Faria, por todas as trocas de informações e experiências, pela constante disponibilidade e por sua eterna gentileza.

À investigadora Iva Fernandes, que tão gentilmente cedeu parte do seu tempo e me entusiasmou ainda mais com a intrigante química das antocianinas.

À Capes pela bolsa de Doutorado-Sanduiche concedida.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACN</b>	Antocianinas
<b>APC</b>	Adenomatous poliposis coli
<b>BCSS</b>	Bioacessibilidade
<b>Caco-2</b>	Células de adenocarcinoma do epitélio colorretal humano
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CEUA</b>	Comissão de ética de Uso de Animais em Pesquisa
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
<b>CLUE</b>	Cromatografia Líquida de Ultra eficiência
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase- 2
<b>Cy</b>	Cianidina
<b>CYP3A</b>	Citocromo P3A
<b>DAD</b>	Detector de arranjo de fotodiodos
<b>DMEM</b>	Meio de cultura Dulbecco Eagle Modificado
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>Dp</b>	Delfinidina
<b>EM/Q-TOF</b>	Espectrometria de Massa com analisador de Quadrupolo e tempo de voo
<b>ESI</b>	Fonte de ionização- Eletrospray
<b>GLUT-1</b>	Transportador 1 de glicose
<b>GLUT-2</b>	Transportador 2 de glicose
<b>GLUT-3</b>	Transportador 3 de glicose
<b>HCT-15</b>	Células de adenocarcinoma coloretal humano
<b>HT29</b>	Células de adenocarcinoma coloretal humano
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>JB6</b>	Células epidérmicas de ratos
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baixa densidade
<b>MDCK</b>	Células de rim canino de Madin-Darby
<b>MNK-28</b>	Células de adenocarcinoma do epitélio gástrico
<b>Mv</b>	Malvidina



<b>NF-kB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>PAMPA</b>	Ensaio paralelo de permeabilidade com membrana artificial
<b>Pg</b>	Pelargonidina
<b>Pn</b>	Peonidina
<b>Pt</b>	Petunidina
<b>Rtq-PCR</b>	Real time quantitative polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase em Tempo real)
<b>SOD</b>	Superóxido desmutase
<b>TGI</b>	Trato gastrintestinal
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta- visível
<b>VEGF</b>	Fatores de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Estrutura básica dos flavonóides

**Figura 2-** Estruturas representativas das agliconas mais comuns da subclasse dos flavonoides

**Figura 3-** Estrutura das antocianinas, com diferentes substituições glicosídicas nas posições 3, acilações nos açucares e substituições no anel B

**Figura 4-** Esquema da inter conversão pH dependente das estruturas das antocianinas em solução aquosa

**Figura 5 –** Conversão das formas isoméricas *cis-trans* chalcona em pH 5-6.

**Figura 6 -** Consequência do ataque das espécies reativas de oxigênio sobre os lipídios, proteínas e DNA

**Figura 7-** Mecanismo proposto para interação cianidina-DNA que leva à formação do complexo de copigmentação cianidina-DNA

**Figura 8 –** Sistema digestivo humano, incluindo o trato gastrintestinal e órgãos anexos

**Figura 9-** Esquema do epitélio gástrico e suas camadas. A mucosa gástrica sofre invaginações dando origem às fossetas gástricas, que são semelhantes a um epitélio de absorção típico, composto por monocamada de células em repouso sobre uma membrana basal e em estreito contato com os vasos periféricos

**Figura 10-** Estruturas presentes na parede do Intestino delgado

**Figura 11-** Esquema representativo das diferentes formas que as antocianinas podem se apresentar durante um experimento de absorção/biodisponibilidade. As antocianinas que são transformadas durante a bioatividade, metabolismo ou excreção e são incapazes de retornar ao cátion flavílium após acidificação durante a preparação da amostra não serão detectadas pelos atuais métodos de análise por CLAE

**Figura 12 –** Esquema do transporte de glicose através de célula epitelial do intestino delgado e presença das junções oclusivas (*tight junctions*), que estabelecem uma barreira a passagem de macromoléculas entre as células, bem como as mantem unidas entre si

**Figura 13-** Esquema da célula epitelial humana. As setas indicam as quatro diferentes vias de transporte de substâncias: (1) transporte tranCelular; (2) tranporte paracelular;

(3) transporte transcelular mediado por carreadores de membrana e (4) transporte vesicular

**Figura 14-** Ensaio PAMPA permite medir a difusão passiva de um composto através de uma membrana hidrofóbica artificial

**Figura 15-** Estudos de transporte bidirecional utilizando células Caco-2 em placas transwell®

**Figura 16.** Efeito do pH no equilíbrio químico de antocianinas monoglicosiladas, não aciladas

**Figura 17-** Vias metabólicas propostas para as antocianinas

**Figura 18-** Imagens ao microscópio invertido da cultura celular Caco-2 na passagem 21 com confluência de 90% com objetivas de 10 X (esquerda) e de 20 X (direita).

**Figura 19-** Imagens ao microscópio invertido da cultura celular MKN-28 após um dia de plaqueamento (direita) e com confluência de 90%(esquerda), antes do congelamento, em objetiva de 10X

**Figura 20 –** Representação esquemática geral das etapas de simulação na digestão *in vitro* acoplada aos modelos de monocamada de celular para avaliação do transporte gástrico e intestinal das antocianinas da casca em pó da jabuticaba, jambo e jamelão (Etapas de execução da pesquisa)

**Figura 21-** Esquema de preparo da solução de saliva artificial da fase oral da Digestão *in vitro*

**Figura 22-** Fluxograma da metodologia de digestão *in vitro* para a determinação da bioacessibilidade de antocianinas na etapa de seleção dos frutos mais promissores

**Figura 23 -** Esquema das etapas da digestão *in vitro* até a fase intestinal

**Figura 24 -** Esquema das etapas da digestão *in vitro* até a fase gástrica

**Figura 25:** Minivoltmetro millicell ER da Millipore® (Millipore Co.,Bedford, MA), utilizado para medir a resistência elétrica transepitelial (RET)

**Figura 26-** Fotografia do Ensaio de Transporte com as células Caco-2 nos insertos transweel de 6 poços dos digeridos intestinais das antocianinas do pó das cascas da jabuticaba, jambo e jamelão

**Figura 27-** Fotografia do Ensaio de Transporte com as células MKN-28 nos insertos transweel de 6 poços dos digeridos gástricos das antocianinas do pó das cascas da jabuticaba, jambo e Jamelão

**Figura 28-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados no



morango antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520 nm caracterizam os seguintes picos: P1-cianidina,3-*O*-glicosídeo, P2-Pelargonidina-3-*O*-glicosídeo e P3- Pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo

**Figura 29-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade

**Figura 30-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados no tamarilho antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520 nm caracterizam os seguintes picos: P1- não identificado, Delfinidina-3-*O*-rutinosídeo (P2), Cianidina-3-*O*-rutinosídeo (P3) e Pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo (P4)

**Figura 31-** Percentual de bioacessibilidade de cada antocianina isoladamente: Não identificado (P1), Delfinidina-3-*O*-rutinosídeo (P2), Cianidina-3-*O*-rutinosídeo (P3) e Pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo (P4)

**Figura 32-** Espectro de massa com analisador por tempo de voo dos picos delfinidina-*O*-3-grutinosídeo (P2), Cianidina-3-*O*-rutinosídeo (P3) e Pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo (P4)

**Figura 33-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade

**Figura 34-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados na amora antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520 nm caracterizam os seguintes picos: Cianidina-3-*O*-glicosídeo (P1) e Cianidina-3-*O*-rutinosídeo (P2). Os picos P3, P4 e P5 não foram detectados após a digestão

**Figura 35-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade

**Figura 36-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados no jamelão antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520 nm caracterizam os seguintes picos: delfinidina-3,5-*O*-diglicosídeo (P1), Cianidina-3,5-*O*- diglicosídeo (P2), petunidina-3,5-*O*-diglicosídeo (P3) e malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo (P4)

**Figura 37-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade

**Figura 38-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados no guajiru antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520 nm caracterizam os seguintes picos: delfinidina-3-*O*-

glicosídeo (P1) e Cianidina-3-*O*-glicosídeo (P2)

**Figura 39-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade

**Figura 40-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados na jaboticaba antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520nm caracterizam os seguintes picos: delphinidina-3-*O*-glicosídeo (P1) e Cianidina-3-*O*-glicosídeo (P2)

**Figura 41-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade. (\*\*) Houve diferença significativa  $p < 0,05$

**Figura 42-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados no jambo antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520 nm caracterizam os seguintes picos: cianidina-3,5-*O*-diglicosídeo (P1), cianidina-3-*O*-glicosídeo (P2)

**Figura 43-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade. (\*\*) Houve diferença significativa  $p < 0,05$

**Figura 44-** Cromatogramas por CLAE do perfil de antocianinas do mirtilo antes (A) e após (B) a digestão *in vitro*. Os picos presentes em ambos os cromatogramas são: Delphinidina-3-*O*-galactosídeo (1), Delphinidina-3-*O*-glicosídeo (2), Cianidina-3-*O*-galactosídeo (3), Delphinidina-3-*O*-arabinosídeo (4), Cianidina-3-*O*-glicosídeo (5), Petunidina-3-*O*-galactosídeo (6), Cianidina-3-*O*-arabinosídeo (7), Petunidina-3-*O*-glicosídeo (8), Peonidina-3-*O*-galactosídeo (9), Petunidina-3-*O*-arabinosídeo (10), Peonidina-3-*O*-glicosídeo (11), Malvidina-3-*O*-galactosídeo (12), Peonidina-3-*O*-arabinosídeo (13), Malvidina-3-*O*-glicosídeo (14), Malvidina-3-*O*-arabinosídeo (15), Petunidina+ acetil + hexose (16), Não identificados (17,18, 19 and 21), malvidina + acetil+ hexose (20)

**Figura 45-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade

**Figura 46-** Espectros de ESI- EM/EM dos sete principais picos detectados após a digestão *in vitro* (picos de 3, 6, 7, 9, 11, 12 e 15)

**Figura 47-** Comparação dos valores de bioacessibilidade encontrados nos diferentes frutos analisados

**Figura 48-** Os cromatogramas de CLUE analítica de antocianinas antes da digestão *in vitro*

**Figura 49-** Valores de Resistência transepitelial (RET) medidos nas membranas de células MKN-28 ao tempo inicial (0 minuto) e após o ensaio de transporte ( $t = 180$



minutos) a 37°C em pH 5.0 (compartimento apical) e pH 7.4 (compartimento basolateral). Os valores expressos estão em  $\Omega.cm^2$  da média de três determinações. A barra indica o desvio padrão

**Figura 50**– Eficiência de transporte de 7  $\mu M$ , 9  $\mu M$  e 31  $\mu M$  de digerido gástrico de pó de jabuticaba, jambo e jamelão, respectivamente, através das células MKN-28 (apical  $\rightarrow$  basolateral) em pH 5.0 apical/pH 7.4 basolateral). Os resultados são apresentados como eficiência de transporte (%) (média  $\pm$  SEM). As diferenças significativas entre os transportes foram avaliadas com  $p < 0.05$

**Figura 51** - Retas de regressão linear das concentrações de ACN quantificadas na fração permeada dos pós dos três frutos após os tempos em monocamadas de MKN-28. (\*\*) Houve diferença estatística a nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ )

**Figura 52**- Valores percentuais de ACN totais quantificadas nos tempos 0 e 180 no compartimento apical do ensaio de transporte com células MKN-28. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os três frutos

**Figura 53**– Valores de eficiência de transporte das antocianinas presentes na jabuticaba entre os compartimentos apical-basolateral nas células MKN-28. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as duas antocininas

**Figura 54**- Percentuais de eficiência de transporte das antocianinas majoritárias presentes no pó do jamelão do compartimento apical-basolateral após 180 minutos

**Figura 55**- Percentual de eficiência de transporte das antocianinas majoritárias presentes no pó do jambo do compartimento apical-basolateral após 180 minutos em células MKN-28

**Figura 56**- Retas de regressão linear das concentrações de cianidina-3-glicosídeo quantificadas na fração permeada dos pós da jabuticaba e jambo após os tempos em monocamadas de MKN-28. Não houve diferença estatística a nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ )

**Figura 57**- Retas de regressão linear das concentrações de cianidina-3-glicosídeo quantificadas na fração permeada dos pós da jabuticaba e jambo após os tempos em monocamadas de MKN-28. Não houve diferença estatística a nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ )

**Figura 58**- Valores percentuais de ACN totais quantificadas nos tempos 0 e 120 no compartimento apical do ensaio de transporte com células Caco-2. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os três frutos

**Figura 59**– Eficiência de transporte de 9  $\mu M$ , 9  $\mu M$  e 34  $\mu M$  de digerido gástrico de pó de jabuticaba, jambo e jamelão, respectivamente, através das células Caco-2 (apical  $\rightarrow$  basolateral) em pH 7.4 apical/pH 7.4 basolateral). Os resultados são apresentados como

eficiência de transporte (%) (média  $\pm$  DV). As diferenças significativas entre os transportes foram avaliadas com  $p < 0.05$

**Figura 60**– Valores de eficiência de transporte das antocianinas presentes na jaboticaba entre os compartimentos apical-basolateral nas células Caco-2. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as duas antocininas

**Figura 61**- Percentual de eficiência de transporte das antocianinas majoritárias presentes no pó do jambo do compartimento apical-basolateral após 120 minutos nas células Caco-2

**Figura 62**- Percentuais de eficiência de transporte das antocianinas majoritárias presentes no pó do jamelão do compartimento apical-basolateral após 120 minutos em células Caco-2

**Figura 63** – Valores de Resistência transepitelial (RET) medidos nas membranas de células Caco-2 ao tempo inicial (0 minuto) e após o ensaio de transporte ( $t = 120$  minutos) a  $37^{\circ}\text{C}$  em pH 7.4 nos compartimentos apical e basolateral. Os valores expressos estão em  $\Omega.\text{cm}^2$  da média de três determinações. A barra indica o desvio padrão.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Concentração de Antocianinas monoméricas totais presentes em alimentos
- Tabela 2-** Estudos de biodisponibilidade de antocianinas em humanos
- Tabela 3-** Estudos de bioacessibilidade de compostos fenólicos e antocianinas
- Tabela 4-** Modelos de cultura celular mais utilizado para estimar o transporte de substâncias
- Tabela 5 –** Valores de pKa de hidratação de algumas antocianinas
- Tabela 6-** Estudos de eficiência de transporte com antocianinas em culturas celulares
- Tabela 7-** Informações gerais sobre os frutos utilizados para a seleção dos melhores frutos após estudo de bioacessibilidade
- Tabela 8-** Informações gerais sobre os frutos utilizados para o Estudo de transporte
- Tabela 9-** Valores de massa e volumes utilizados no preparo das soluções inorgânicas que constituem a solução de saliva da fase oral
- Tabela 10-** Identificação de antocianinas em extrato de mirtilo por ESI - MS/MS
- Tabela 11-** Valores de concentração das antocianinas totais antes e após a digestão *in vitro* e bioacessibilidade relativa
- Tabela 12-** As antocianinas nos frutos. Os resultados são expressos em mg de equivalentes de malvidina-3-*O*-glicosídeo 100 g<sup>-1</sup> em base seca
- Tabela 13-** Identificação das antocianinas no pó da casca do jamelão, jabuticaba e Jambo ntes de digestão *in vitro* por ESI-EM/EM e UV-Vis
- Tabela 14 –** Antocianinas utilizadas como padrão analítico com suas respectivas equações da reta e correlação
- Tabela 15-** Percentual de bioacessibilidade calculada a partir dos valores de ACN totais quantificados no compartimento apical (antes) do ensaio de transporte
- Tabela 16-** Composição antociânica presente no digerido gástrico dos três



frutos aplicado no compartimento apical

**Tabela 17** – Valores de concentração de antocianinas encontradas no compartimento basolateral em função dos diferentes tempos após ensaio de transporte em células MKN-28

**Tabela 18** – Valores percentuais da fração de ACN totais degradada ou metabolizada após contato com as células MKN-28

**Tabela 19-** Composição antociânica presente no digerido intestinal dos três frutos aplicado no compartimento apical

**Tabela 20** – Valores de concentração de antocianinas encontradas no compartimento basolateral em função dos diferentes tempos após ensaio de transporte em células Caco-2

**Tabela 21-** Percentual de bioacessibilidade e eficiência de transporte calculados a partir dos valores de ACN totais quantificados no pó antes da digestão *in vitro* e no compartimento apical (antes) do ensaio de transporte, respectivamente

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Compostos fenólicos: Antocianinas.....	3
2.2 Ocorrências das antocianinas na natureza.....	8
2.3 Efeitos biológicos atribuídos às antocianinas.....	9
2.3.1 Propriedades Antioxidantes.....	10
2.3.2 Evidências de propriedades anti-tumorais.....	12
2.3.3 Redução de LDL e prevenção de doenças cardiovasculares.....	13
2.3.4 Atividade anti-inflamatória.....	14
2.4 Trato Gastrintestinal (TGI).....	14
2.5 Biodisponibilidade e Bioacessibilidade.....	18
2.6 Biodisponibilidade das ACNs em animais e humanos.....	19
2.7 Bioacessibilidade: Metodologias de Digestão <i>in vitro</i> .....	23
2.8 Características das membranas que realizam transporte epitelial.....	26
2.9 Absorção de compostos.....	29
2.10 Vias de absorção.....	29
2.11 Métodos para estudo de permeabilidade.....	30
2.12 Locais de absorção das antocianinas.....	33
2.13 Fatores que afetam a absorção.....	35
2.14 Absorção e biodisponibilidade das antocianinas.....	37
2.15 Metabolismo das antocianinas.....	39
2.16 Cultura celular Caco-2.....	41
2.17 Ensaio de Transporte com células Caco-2 e MKN-28.....	42
2.18 Bioacessibilidade e transporte celular.....	43
2.19 Células MKN-28.....	44
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
3.1 Material.....	46



3.1.1 Amostras.....	46
3.1.1.1 Amostras da 1ª Etapa.....	46
3.1.1.2 Amostras da 2ª Etapa.....	46
3.1.2 Reagentes das análises cromatográficas e Espectrometria de massa.....	47
3.1.3 Solventes da digestão <i>in vitro</i> .....	47
3.1.4 Reagentes da Extração de antocianinas antes e após digestão <i>in vitro</i> .....	48
3.1.5 Equipamentos da Digestão <i>in vitro</i> , Extração, Análises cromatográfica e Espectrometria de Massa.....	48
3.1.6 Insumos para o cultivo celular, teste de viabilidade e ensaios de permeabilidade.	49
3.1.7 Equipamentos para o Cultivo celular, e Ensaios de Transporte.....	49
3.1.8 Culturas celulares.....	50
3.2 Métodos.....	50
3.2.1 Extração das antocianinas antes da digestão <i>in vitro</i> .....	51
3.2.2 Extração das antocianinas após digestão <i>in vitro</i> .....	51
3.2.3 Análise antocianinas por CLAE antes e após digestão e ensaio de transporte.....	51
3.2.4 Análise por Espectrometria de Massa.....	51
3.2.5 Preparo das soluções utilizadas na digestão <i>in vitro</i> .....	52
3.2.5.1 Soluções inorgânicas.....	52
3.2.5.2 Solução de uréia .....	52
3.2.5.3 Solução de Saliva Artificial.....	52
3.2.5.4 Solução salina A.....	53
3.2.5.5 Solução de pepsina.....	53
3.2.5.6 Solução de bile.....	53
3.2.5.7 Solução de pancreatina-lipase.....	53
3.2.6 Digestão <i>in vitro</i> .....	54
3.2.7 Análise das antocianinas monoméricas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência após o ensaio de Transporte (2ª Etapa).....	55
3.2.8 Digestão <i>in vitro</i> até fase Intestinal (Cultura Caco-2).....	56
3.2.9 Digestão <i>in vitro</i> até fase Gástrica (Cultura MKN-28).....	57
3.2.10 Cultivo celular da linhagem Caco-2.....	59
3.2.11 Semeadura da Caco-2 nas placas transwells.....	59
3.2.12 Cultivo da linhagem MKN-28.....	59
3.2.13 Semeadura da MKN-28 nas placas transwells.....	59

3.2.14 Ensaio de integridade de membranas de células Caco-2 por meio da resistência elétrica transepitelial (RET).....	59
3.2.15 Ensaio de absorção por células Caco-2.....	60
3.2.16 Ensaio de absorção por células MKN-28.....	61
3.2.17 Avaliação estatística da bioacessibilidade.....	63
3.2.18 Avaliação estatística do estudo de Transporte.....	63
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
4.1 Seleção dos frutos mais promissores, em termos de bioacessibilidade de antocianinas, para a realização dos estudos de transporte	64
4.1.1 Morango.....	64
4.1.2 Tamarilho.....	66
4.1.3 Amora.....	70
4.1.4 Jamelão.....	72
4.1.5 Guajiru.....	73
4.1.6 Jabuticaba.....	75
4.1.7 Jambo.....	76
4.1.8 Mirtilo.....	77
4.1.9 Comparação entre frutos.....	83
4.2 2ª Etapa- Estudos de bioacessibilidade seguido do transporte das antocianinas totais e majoritárias pelas células intestinais humanas Caco-2 e células epiteliais gástricas MKN-28 nos frutos selecionados.....	84
4.2.1 Identificação e quantificação das antocianinas.....	84
4.2.1.1 Elaboração das Curvas analíticas.....	88
4.2.2 Testes de bioacessibilidade para os Ensaios de Transporte.....	88
4.2.3 Ensaio de Transporte com MKN-28.....	89
4.2.3.1 Avaliação da integridade da monocamada MKN-28 através da medição da Resistência elétrica transepitelial (RET).....	89
4.2.3.2 Eficiência do transporte de antocianinas nas células MKN-28 dos três frutos	90
4.2.4 Ensaio de Transporte com Caco-2.....	99
4.2.4.1 Avaliação da integridade da monocamada Caco-2 através da medição da Resistência elétrica transepitelial (RET).....	104
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>107</b>

<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>120</b>
<b>A - Resumos publicados em Anais.....</b>	<b>121</b>
<b>B - Artigos publicados.....</b>	<b>122</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo consumo das antocianinas aumentou após a observação da relação entre o seu consumo e a redução do risco de doenças crônicas. Uma dieta rica em antocianinas está associada à redução do risco de doença cardíaca coronária, efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, atividade anti-carcinogênica e antimicrobiana, prevenção da obesidade. Apesar das evidências *in vitro* quanto a esses benefícios à saúde, ainda há uma lacuna que permanece sob investigação: o mecanismo de absorção das antocianinas pelo organismo humano.

Ao contrário de outros flavonoides, as antocianinas apresentam uma carga positiva (íon flavílio) em sua estrutura molecular. Ademais, apresentam um conjunto de ligações duplas que promovem a ressonância ao longo das suas estruturas e, dependendo do pH do meio, quantidades relativas de cinco formas estruturais diferentes podem ser encontradas em equilíbrio. Essas diferentes formas estão envolvidas nos processos: de liberação da matriz alimentícia, absorção, distribuição, metabolismo e bioatividade.

As células epiteliais do intestino têm sido relatadas como local preferencial de absorção da maior parte das drogas e nutrientes; no entanto, diversos estudos apontam que tal fato não pode ser observado para as antocianinas. Seus possíveis efeitos biológicos dependem de sua biodisponibilidade, a qual é dependente da sua estabilidade no trato gastrointestinal, liberação a partir da matriz alimentícia (bioacessibilidade), eficiência do transporte transepitelial (absorção), circulação sistêmica (distribuição no plasma) e entrega aos tecidos-alvos (bioatividade).

Particularmente, em pH intestinal (7,4), as antocianinas modificam sua estrutura para as formas quinoidal, hemiacetal e chalcona, dificultando sua identificação e quantificação, pois, na maioria dos estudos, as análises utilizam métodos espectrofotométricos UV-VIS com base na conversão completa de todas essas formas químicas ao cátion flavílio, colorido, após acidificação.

Devido a suas características hidrofílicas e sua elevada instabilidade em condições intestinais, o cátion flavílio nas antocianinas não é capaz de atravessar a membrana plasmática dos enterócitos (intestino delgado), por difusão passiva.

Estes fatos justificam sua aparente baixa biodisponibilidade. Além disso, existem outras características específicas relacionadas a sua absorção biológica, que devem ser consideradas, pois tornam seu estudo muito complexo, visto que: elas podem ser absorvidas intatas como glicosídeos; têm baixa biodisponibilidade aparente *in vivo*; e podem ser rapidamente absorvidas e eliminadas. Além disso, seu padrão estrutural altera a sua taxa de absorção, podem ser metabolizadas pela microbiota do cólon e seus metabólitos podem ser redistribuídos para outros tecidos.

Vários estudos têm indicado que as antocianinas podem ser eficazmente absorvidas pelas células epiteliais da mucosa gástrica e, em menor quantidade, pela mucosa epitelial intestinal humana. Nesse contexto, as metodologias de digestão *in vitro* e os modelos absorptivos de cultura celular imortalizada têm sido propostos como estratégias alternativas para estudo da estabilidade e absorção gastrointestinal de metabólitos secundários. Recentemente, um novo modelo celular de absorção gástrica (MKN-28) foi utilizado para o estudo de transporte das antocianinas. Um grande número de ensaios de transporte por culturas Caco-2 de células intestinais humanas já relatou seus baixos valores de transporte transepitelial.

Paralelamente, algumas espécies de frutos nativos e exóticos subexplorados podem ser potenciais matrizes para a produção de novos ingredientes, em pó, para a indústria alimentícia. Os pós desses frutos têm sido utilizados na indústria de bebidas como

suplementos para melhorar o valor nutricional de produtos alimentares ou como corantes alimentares (HORSZWALD *et al.*, 2013). Assim, os pós obtidos a partir das cascas dos frutos podem ser uma boa fonte de compostos bioativos. Alguns frutos, tais como jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba* (Vell.) O. Berg), jambo (*Syzygium malaccanese* (L.) Merrylet Ferry) e jamelão (*Syzygium cumini* L.Skeels), contêm elevadas quantidades de antocianinas em suas cascas, o que os tornam promissores para utilização na indústria alimentícia.

Este é o primeiro estudo, que compara dados a partir de dois modelos: os ensaios de digestão gástrica acoplados ao modelo de absorção MKN-28 e os ensaios de digestão intestinal acoplados ao modelo de absorção Caco-2, a fim de medir a eficiência do transporte de antocianinas.

O objetivo geral deste estudo foi:

- Estimar a absorção *in vitro* de antocianinas presentes em frutos, utilizando a digestão *in vitro* seguida da captação e transporte por células intestinais Caco-2 e células gástricas MKN-28.

Os objetivos específicos foram divididos em duas etapas:

#### 1ª Etapa

- Implementar a metodologia de digestão *in vitro*, pela simulação das etapas oral, gástrica e intestinal das antocianinas nas matrizes em estudo;
- Estudar a estabilidade das antocianinas em frutos sob condições gastro-intestinal e a sua liberação da sua matriz;
- Determinar a bioacessibilidade das antocianinas monoméricas totais e majoritárias em frutos por comparação das frações antes e após a digestão *in vitro*;
- Selecionar os frutos mais promissores em termos de bioacessibilidade de antocianinas para a realização dos Estudos de transporte.

#### 2ª Etapa

- Estabelecer as condições para o cultivo da célula Caco-2 visando obter membranas viáveis ao estudo da absorção *in vitro* de antocianinas.
- Estabelecer as condições para o cultivo das células epiteliais gástricas MKN-28 visando obter membranas viáveis ao estudo da absorção *in vitro* de antocianinas;
- Realizar o estudo do transporte das antocianinas totais e majoritárias pelas células intestinais (Caco-2) e célula gástricas (MKN-28) com os produtos selecionados nos pós da jabuticaba, jamelão e casca de jambo;
- Identificar e quantificar por CLUE/DAD as antocianinas após o estudo da permeação pelas células Caco-2 e MKN-28;
- Comparar e verificar o local preferencial de absorção para as antocianinas a partir dos modelos utilizados.



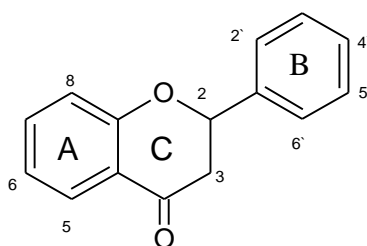
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Compostos fenólicos: Antocianinas

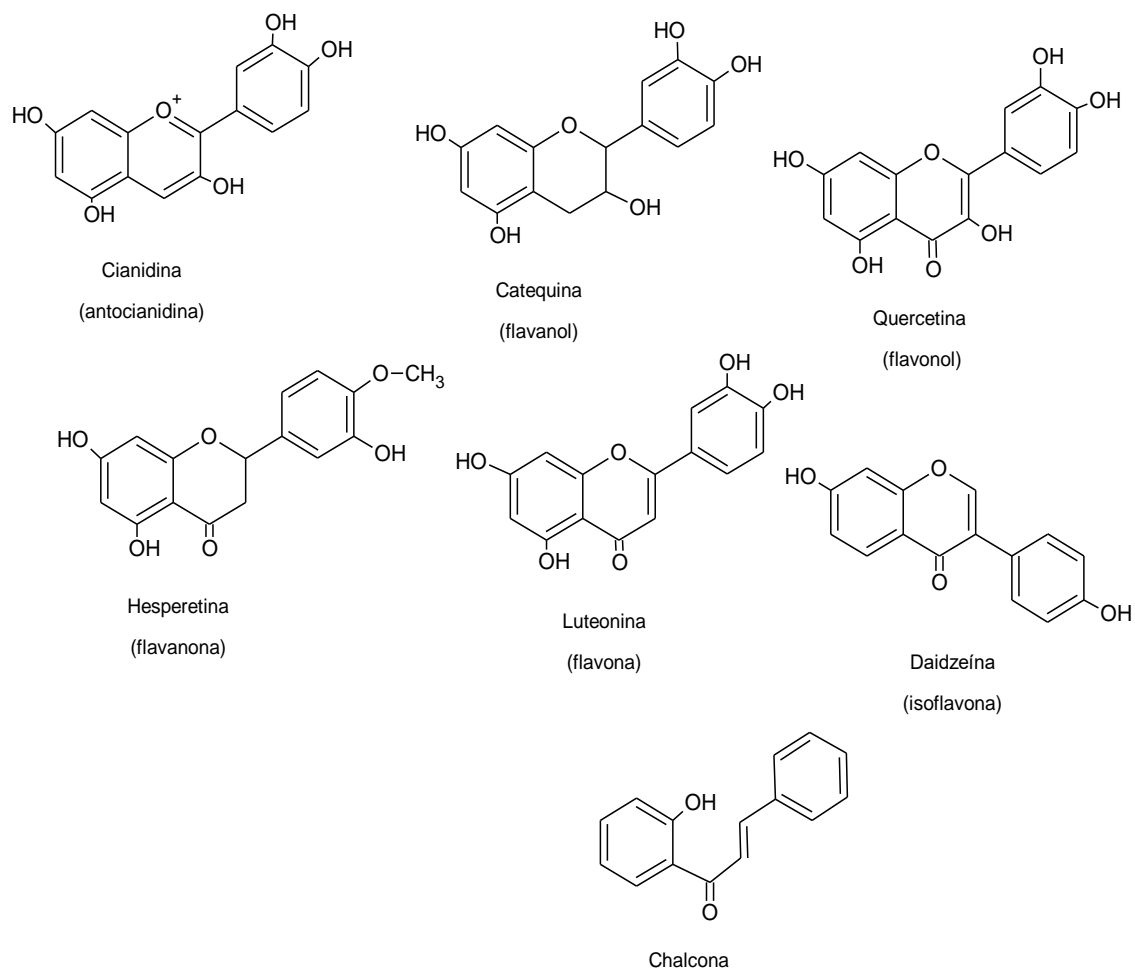
Os vegetais são vulneráveis a uma variedade de fatores ambientais, tais como: estresse causado por geada, seca, fungos, simbiose microbiana, composição de metais de solo, e mais em especial pela exposição à radiação UV. Como mecanismo de defesa, as plantas lançam mão de mecanismos para se protegerem. A produção de metabólitos secundários, em especial, os compostos fenólicos é um destes. Dentre estes mecanismos, inclui-se a fotoproteção, a atividade antioxidante, antifúngica e antimicrobiana (WALLACE, 2010). Desta forma, estes compostos são abundantes em frutas, flores e vegetais. Algumas evidências sugerem que os compostos fenólicos atuam por mecanismos que vão além da sua capacidade antioxidante, tais como modulação da atividade de enzimas como telomerase, lipoxigenase e cicloxigenase; interações com receptores e vias de transdução de sinais, regulação do ciclo celular, entre outros, eventos essenciais a manutenção da homeostase dos organismos vivos (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Os compostos fenólicos apresentam uma diversidade estrutural que deve-se à grande variedade de combinações que acontecem na biossíntese. Dentre estes compostos, são presentes os flavonóides. Os flavonóides apresentam uma estrutura comum C6-C3-C6, constituída por dois anéis aromáticos, denominados anéis A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 1). De acordo com o grau de oxidação e o padrão de substituição do anel C, as classes de flavonoides são determinadas e dentro destas o padrão de substituição nos anéis A e B definem os seus derivados (RHODES, 1996 apud SANTIAGO, 2014). Fazem parte desta subcategoria as antocianinas, flavonóis, flavanóis, flavanonas, flavonas e isoflavonas (Figura 2).

Os flavonóides podem ser encontrados sob a forma de glicosídeos e/ou derivados metilados e/ou acilados, sendo a presença ou ausência de ligações duplas e grupos carbonilas no anel C, as maiores diferenças entre as subclasses (HE; GUISTI, 2009).



**Figura 1.** Estrutura básica dos flavonoides



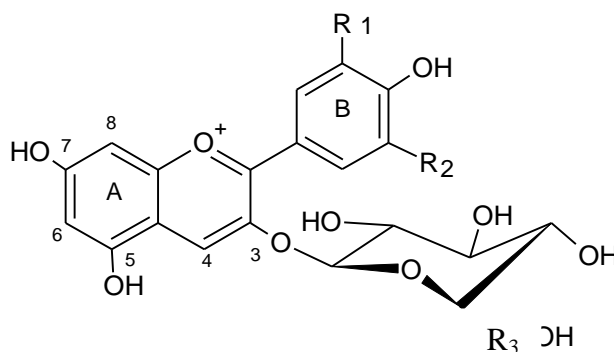
**Figura 2-** Estruturas representativas das agliconas mais comuns da subclasse dos flavonoides.

As antocianinas, subcategoria dos flavonóides, são o grupo mais importante de pigmentos solúveis em água do reino vegetal, sendo responsáveis pela coloração que varia do vermelho ao azul em frutas, flores e hortaliças (HARBORNE; GRAYER, 1988). Sua principal função é a sua capacidade de dar cor aos vegetais. Além disso, elas desempenham um papel definitivo na atração de animais para polinização e dispersão de sementes e na floração. Elas também atuam como antioxidantes, fitoalexinas ou como agentes antibacterianos (KONG *et al.*, 2003).

As antocianinas estão presentes na natureza sob a forma glicosilada, sendo sua fração aglicosilada chamada de antocianidina. A mesma apresenta em sua estrutura o cátion 2-fenilbenzopirílium, também chamado de flavílio. As antocianinas encontradas em alimentos são a proximadamente 95% derivadas de seis principais antocianidinas: cianidina (Cy), peonidina (Pn), pelargonidina (Pg), malvidina (Mv), delphinidina (Dp) e petunidina (Pt), que se diferem pelas diferentes substituições dos grupamentos R1 e R2 no anel B. Além disso, a molécula pode estar glicosilada nas posições C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>, mas é na posição C<sub>3</sub>, seguida da C<sub>5</sub>, que ela é mais frequente (Figura 3).

A glicose, raminose, xilose, galactose, arabinose e frutose são os açúcares mais comumente ligados às antocianidinas, ocorrendo como monoglicosídeos, diglicosídeos e triglicosídeos (glicosilados diretamente na antocianidina) (MALACRIDA; DA MOTTA, 2006). Além disso, estes açúcares, por sua vez, podem estar ligados a ácidos fenólicos, derivados do ácido benzóico ou do ácido cumárico. Devido ao longo cromóforo formado por

oito ligações duplas conjugadas, que deslocam uma carga positiva, as antocianinas são intensamente coloridas sob condições ácidas. Seu espectro de absorção apresenta duas bandas de máximo de absorção, uma na região do visível, que geralmente fica entre 465 nm e 550 nm, enquanto que a outra banda tem um máximo de absorção na faixa do UV entre 270 nm e 280 nm (EDER, 2000). A coloração varia entre as diferentes antocianidinas: quanto maior o número de grupos hidroxilas no anel B, mais próximo do espectro do azul e quanto mais grupos metoxilas mais próximo do vermelho (HE; GUISTI, 2009).



Antocianidina (estrutura do anel B)	Substituição Glicosídica (substituições nas posições 3 e 5)	Acilação (esterificação das hidroxilas dos açúcares)	
<b>R1 = R2 = H</b>	Pelargonidina	D-glicose	Ácidos cinâmicos
<b>R1 = OH; R2 = H</b>	Cianidina	D-galactose	p-cumárico
<b>R1 = R2 = OH</b>	Delfinidina	D-xilose	Ferúlico
<b>R1 = OCH<sub>3</sub>; R2 = H</b>	Peonidina	L-raminose	Cafeico
<b>R1 = OCH<sub>3</sub>; R2 = OH</b>	Petunidina	L-arabinose	
<b>R1 = R2 = OCH<sub>3</sub></b>	Malvidina	Rutinose	Ácidos alifáticos
		Soforose	Acéticos
		Sambubiose	Malônico
		Gentiobiose	Succínico

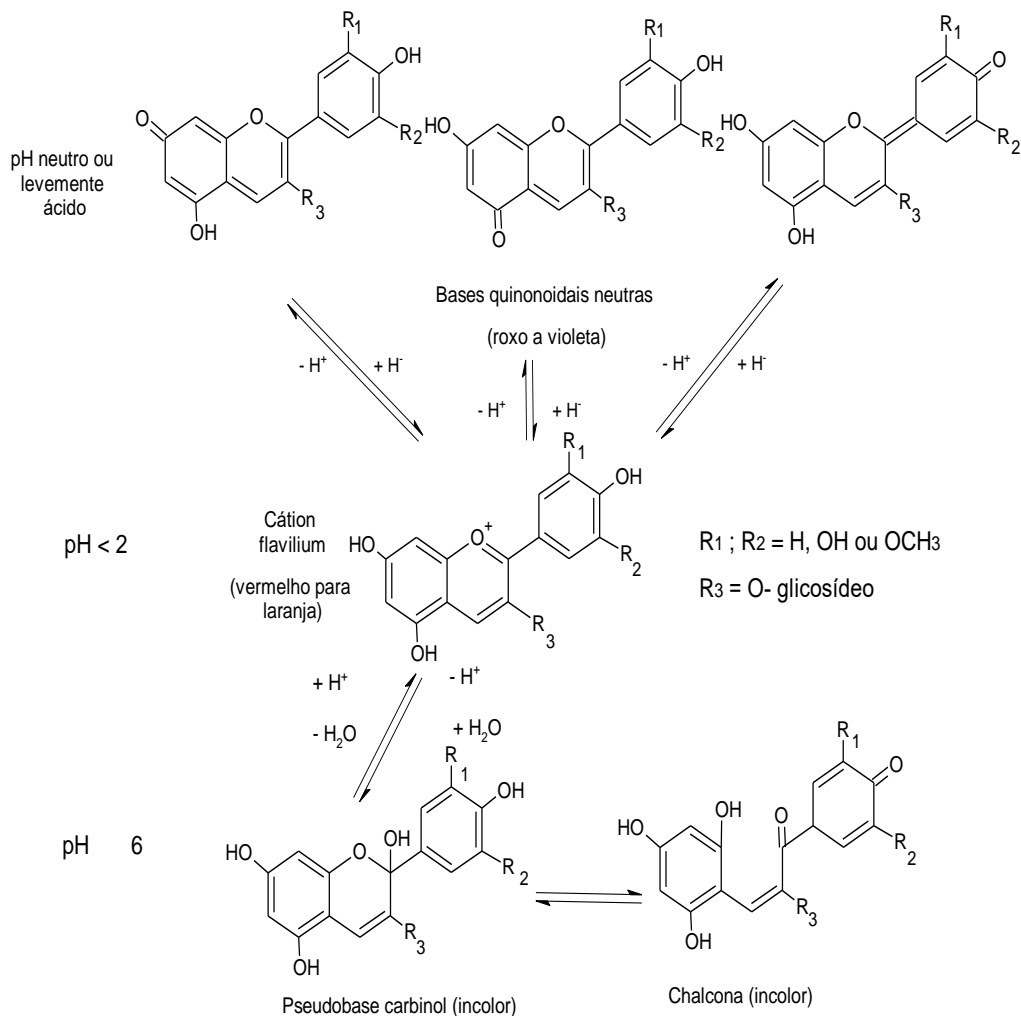
**Figura 3-** Estrutura das antocianinas, com diferentes substituições glicosídicas nas posições 3, acilações nos açúcares e substituições no anel B (Fonte: MALACRIDA; DA MOTTA, 2006).

Os grupos hidroxilas na antocianidina podem ser substituídos por porções glicosídicas (Figura 3). Tanta a glicosilação como a acilação afetam as propriedades físicas e químicas das antocianinas, pois modificam o seu tamanho molecular e polaridade. A glicosilação aumenta a solubilidade em água, enquanto que a acilação diminui a solubilidade em água. A glicosilação melhora a estabilidade das antocianinas formando uma rede de ligações de H intramolecular no interior da molécula de antocianina (BORKOWSKI *et al.*, 2005). Além disto, os resíduos de açúcares podem ocorrer acilados com derivados aromáticos dos ácidos benzóicos e cumarínico, tais como ácido *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, *p*-gálico, e com os ácidos alifáticos, tais como malônico, acético, málico, succínico ou ácido oxálico. Geralmente eles são ligados ao C<sub>3</sub>, esterificados na hidroxila (-OH), na posição 6 ou

menos frequentemente na hidroxila, na posição 4 dos açúcares. Muita informação pode ser obtida a partir das características do espectro de UV-Vis das ACNs.

Quando a molécula de antocianina é acilada por ácido hidroxicinâmico, o mesmo pode ser revelado pela presença das bandas de absorção na faixa de 310-360nm e a razão da absorvância máxima nesta faixa de absorção a absorvância no visível ( $\lambda_{\text{max}}$ ) fornece uma estimativa do número destes grupamentos aromáticos que foram acilados. Em contraste, a acilação com ácidos alifáticos foi muitas vezes esquecida no passado, devido a sua hidrólise em procedimentos de extração típicos com metanol acidificado e ao fato de que eles não têm uma banda característica de UV-Vis de absorção. (GUISTI; WROLSTAD, 2003)

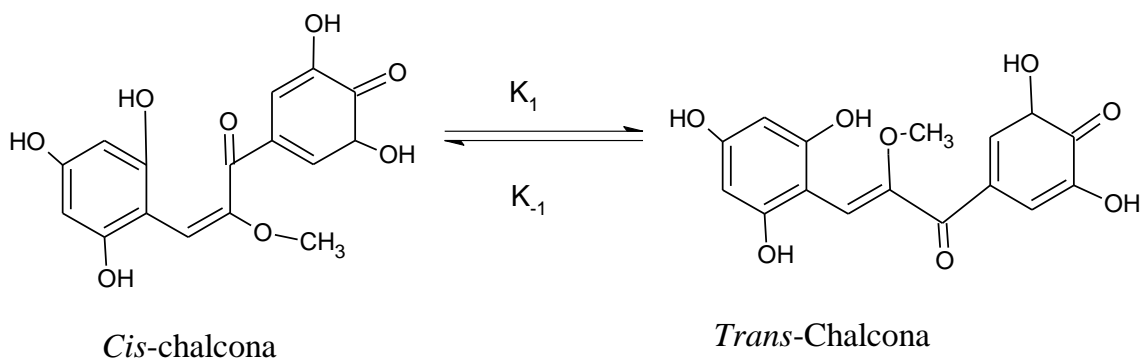
As antocianinas, em soluções aquosas, sofrem transformações estruturais reversíveis dependendo do pH. Em solução aquosa, as antocianinas podem ser encontradas comumente em uma mistura de cinco principais formas químicas em equilíbrio: cátion flavilium (vermelho), bases anidras quinoidais (azul), pseudobase carbitol (incolor) e *cis-trans* chalcona (incolor ou levemente amarela). As antocianinas, quando em soluções em pH abaixo de 2, apresentam-se na forma catiônica (cátion *flavilium*), com coloração vermelha, no entanto a medida que os valores de pH aumentam, ocorrem duas reações paralelas: 1) uma rápida desprotonação para formar a base quinoidal (azul) e 2) hidratação do cátion *flavilium* na posição 2, seguida por perda de prótons, formando o hemicetal (carbitol) e os isômeros (chalconas) (incolor)(Figura 4) (LOPES *et al.*, 2007).



**Figura 4-** Esquema da inter conversão pH dependente das estruturas das antocianinas em solução aquosa (Fonte: Adaptado de HOUBIERS *et al.*, 1998).

A transferência de prótons é mais rápida do que a hidratação, no entanto as outras espécies (carbinol e chalconas) no equilíbrio são mais estáveis que as bases. Isto significa que as bases quinoidais podem ser formadas como um produto cinético, e que depois podem desaparecer total ou parcialmente, restando o equilíbrio termodinâmico das demais formas. As chalconas se formam também por um processo tautomérico, que dá origem a *cis*-chalcona e *trans*-chalcona. As espécies que apresentam coloração são as bases quinoidais e o cátion flavílium, podendo aparecer como vermelho/roxo e azul em antocianinas comuns, respectivamente. A fotoquímica decorre da isomerização *trans-cis* e dependendo do pH conduz às formas quinoidais ou catiônica. Em equilíbrio, o sistema se comporta como um equilíbrio ácido-base entre a cátion flavílium e a base conjugada (Figura 5) (PINA *et al.*, 2012).





**Figura 5** – Conversão das formas isoméricas *cis-trans* chalcona em pH 5-6. (Adaptado de GAGO *et al.*, 2015)

## 2.2 Ocorrências das antocianinas na natureza

A presença das antocianinas pode ser observada numa variedade de frutas, vegetais, grãos e outros tecidos vegetais. As fontes comestíveis de antocianinas incluem frutas coloridas, como frutas vermelhas, cerejas, pêssegos, uvas, maçãs, ameixas e alguns vegetais de cor escura, como cebolas vermelhas, rabanetes vermelhos, feijão preto, berinjela, repolho roxo e batata doce roxa. De acordo com a composição genética, luz, temperatura e característica do solo, como seca, a mesma espécie pode apresentar conteúdo de antocianinas consideravelmente diferentes. Além disto, as antocianinas também se acumulam em grãos, tais como arroz preto, sorgo e milho púrpura (WATSON, PREEDY; ZIBADI, 2013). A distribuição de frequência das seis antocianidinas mais comuns nos vegetais comestíveis é a seguinte: Cy (50 %), Pg (12 %), Pn (12 %), Dp (12 %), Pt (7 %) e Mv (7 %) (KONG *et al.* 2003). As três antocianidinas não metiladas (Cy, Dp e Pg) são as mais difundidas nos alimentos. Enquanto alguns alimentos contêm um número limitado de antocianinas, outros podem conter uma mistura de mais de vinte antocianinas. A cianidina ocorre em aproximadamente 90 % dos frutos, sendo a antocianidina que surge com mais frequência. As antocianinas-3-*O*-glicosídeo são as mais frequentes, sendo a cianidina-3-*O*-glicosídeo (Cy-3-*O*-glc), aquela que surge mais comumente (KONG *et al.* 2003).

Alguns destes alimentos contêm apenas traços de antocianinas, outros podem ser considerados como boas fontes. Wu e colaboradores (2006) realizaram um levantamento de mais de 100 alimentos consumidos nos EUA e verificaram que 24 deles foram selecionados por conterem ACNs. As concentrações totais de ACNs variaram consideravelmente entre 7-1480 mg/100g de peso fresco, na groselha (variedade “Careless”) e no chokeberry, respectivamente (Tabela 1). Além disso, verificaram também que não somente as concentrações poderiam variar, mas que as antocianinas presentes nos alimentos são também bastante diferentes, podendo ser mono e diglicosiladas (com diferentes tipos de açúcares) e estas ainda estarem aciladas (GUISTI; WROLSTAD, 2003).

Kuhnau (1976) estimou que a ingestão diária de ACNs devesse ser de cerca de 180-250 mg por dia por pessoa, no entanto Wu e colaboradores (2006) acabaram por recalculá-los, tomando como base seu levantamento e concluíram que estes valores seriam de cerca de 12.5 mg por pessoa por dia. A avaliação correta do conteúdo de ACNs em alimentos e a ingestão diária são cruciais para a ciência dos alimentos, nutrição, e outros campos de pesquisa e representa a etapa preliminar para a avaliação da biodisponibilidade e bioatividade destes compostos.

**Tabela 1-** Concentração de Antocianinas monoméricas totais presentes em alimentos (Fonte: Adaptado de Wu e colaboradores, 2006)

<b>Alimento</b>	<b>ACN totais (mg 100g<sup>-1</sup> <i>in natura</i> ou como consumido)</b>	<b>ACN totais (mg em dose consumida)</b>
<b>Maça</b>		
Fugi (n=4)	1,37 ± 0,7	0,8
Gala (n=3)	2,4 ± 0,8	3,2
Red Delicious (n=4)	123 ± 1,9	17,0
<b>Amora preta (n=4)</b>	245±68,0	353
<b>Marion Amora (n=1)</b>	300,5	433
<b>Mirtilo</b>		
Cultivado n =7)	386,6±77,7	529
Selvagem (n=1)	486,5	705
<b>Cereja (n=4)</b>	122±21,3	177
<b>Chokeberry (n=1)</b>	1480	2147
<b>Cranberry (n=3)</b>	140±28,5	133
<b>Groselha (n=2)</b>	10,4±0,1	15,1
<b>Uva vermelha (n=5)</b>	26,7±10,9	42,7
<b>Nectarina (n=7)</b>	6,8±1,5	9,2
<b>Ameixa preta (n=2)</b>	124,5±21,6	82,2
<b>Morangos (n=8)</b>	21,2±3,3	35,0
<b>Tamarilho (n=3)</b>	19,51±0,03	-
<b>Guajiru (n=3)</b>	1,75±0,05	-
<b>Jabuticaba (n=3)</b>	326,22±15,08	-
<b>Jambo (n=3)</b>	219,46±6,75	-
<b>Jamelão (n=3)</b>	335,98±13,90	-
<b>Vegetais</b>		
<b>Feijão preto (n=1)</b>	44,5	23,1
<b>Berinjela (n=1)</b>	85,7	35,1
<b>Repolho vermelho (n=4)</b>	322±40,8	113
<b>Alface verm (n=8)</b>	2,2 ±1,5	1,5
<b>Rabanete (n=4)</b>	100,1±30,0	116

Os valores de “n” representam o número de amostras

Há na literatura uma grande variedade de dados disponíveis sobre as quantidades de ACNs em vegetais, no entanto não se pode esquecer, que estas variações podem estar relacionadas às condições de cultivo e também a técnica analítica utilizada, já que ainda não há métodos analíticos robustos para a quantificação de antocianinas (CLIFFORD 2000). Fernandes (2012) enfatizou a atenção que deve ser dada aos métodos de quantificação, uma vez que seus valores de absorvidade molar dependem do equilíbrio das diferentes formas estruturais, do valor de pH do meio, da presença de copigmentos, sendo, portanto requerido um considerável cuidado na quantificação destes compostos em alimentos ou na dieta alimentar para que os valores determinados sejam confiáveis.

### 2.3 Efeitos biológicos atribuídos às antocianinas

Na última década, os possíveis benefícios atribuídos à saúde têm despertado grande atenção no meio científico, pois se supõe que seus efeitos biológicos estejam direto ou indiretamente associados às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (WANG *et al.*, 1999; GARCIA-ALONSO *et al.*, 2009). Há vasta literatura sobre seus efeitos em sistemas *in vitro*, em animais, entretanto poucos relatos de estudos em humanos. Além disso, o que há em humanos são evidências epidemiológicas, sem comprovações de causa e efeito. Os relatos se estendem a um gama de efeitos benéficos, que vão desde a redução do risco de

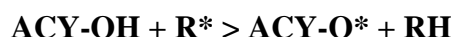
doenças cardiovasculares, diabetes, artrite, câncer (PRIOR; WU, 2006), processos inflamatórios (WANG *et al.*, 1999), inibição da oxidação do LDL, obesidade e outras doenças (Figura 6).

Os estudos epidemiológicos em humanos não são específicos, pois associam os benefícios que uma dieta rica em vegetais e frutas, incluídos as ACNs. Dentre estas doenças destacam-se: redução da incidência de cancer de mama, próstata e coloretal (ALMENDINGEN; HOFSTAD; VATN, 2004; COLDITZ *et al.*, 1985), e de doenças coronarianas (ADLERCREUTZ, 1998).

### 2.3.1 Propriedades Antioxidantes

A alta capacidade antioxidante destes compostos bioativos deve-se a sua característica de neutralização dos radicais livres, moléculas instáveis que são geradas pelo metabolismo de várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas (MACHLIN; BENDICH, 1987) e que estão ligadas ao aparecimento de um grande número de doenças crônicas não transmissíveis, como as doenças cardiovasculares e cânceres. As células e tecidos do organismo humano estão continuamente sofrendo agressões causadas pelos radicais livres e espécies reativas do oxigênio, no entanto o mesmo possui seu próprio mecanismo de combate a estes radicais, através de enzimas como superóxido desmutase, catalase e glutadiona peroxidase (VOLP *et al.*, 2008). No entanto, muitas vezes ocorre a produção excessiva destes radicais, podendo causar prejuízos ao metabolismo e danos oxidativos aos componentes celulares essenciais, tais como lipídios, DNA e proteínas ou mesmo morte celular. Os danos oxidativos ao DNA e a proteínas podem causar mutações e conseqüentemente aparecimento de câncer (Figura 6). De fato, o estresse oxidativo está relacionado ao aparecimento de um grande número de doenças crônicas não transmissíveis, como as doenças cardiovasculares, cânceres e doenças neurodegenerativas, tais como Mal de Alzheimer e doença de Parkinson (WALTON, 2006). Não estão completamente elucidados os mecanismos e a seqüência de eventos pelos quais os radicais livres interferem nas funções celulares, mas um dos mais importantes eventos parece ser a peroxidação lipídica, que resulta em dano da membrana celular e que pode eventualmente levar a morte celular. Desta forma, cabe ao homem por meio da alimentação, adquirir estas substâncias protetoras, como alternativa para minimizar maiores danos biológicos.

A elevada capacidade antioxidante das antocianinas está diretamente relacionada à deficiência de elétrons do cátion *flavílium* e à presença dos grupos hidroxilas livres, por exemplo, das delphinidinas e cianidinas (KUSKOSKI *et al.*, 2004). As antocianinas podem prevenir danos causados pelos radicais livres de várias formas. Uma delas é carrear diretamente o radical livre. O alto poder de reação do grupo hidroxil com o radical faz com que as antocianinas sejam oxidadas pelos radicais, resultando em um radical menos reativo e mais estável (GOUVÊA, 2010). A reação ocorre da seguinte forma:

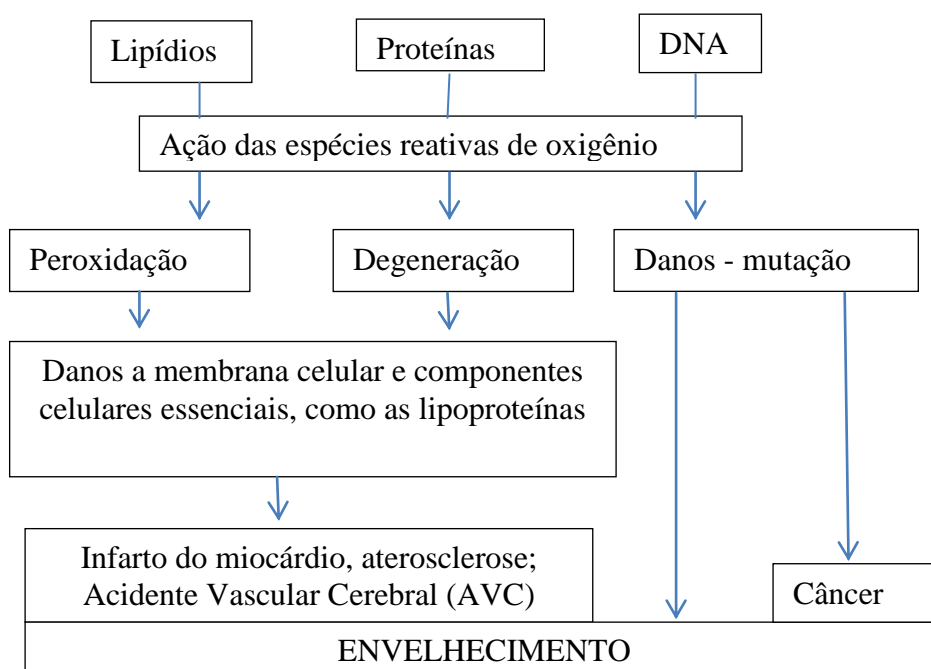


Onde: ACY= antocianina, R\*= radical livre e O\*= radical livre de antocianina

Além disso, Prior (2003) afirmou que a doação de elétrons ou transferência de átomos de hidrogênio das hidroxilas presentes nas moléculas de açúcares, para os radicais livres, também podem ser responsáveis pela estabilização de radicais livres. Em oposição, Fukumoto e Mazza (2000) demonstraram que a atividade antioxidante aumenta com o aumento do

número de grupos hidroxilas na molécula e diminui com a glicosilação das antocianidinas. Adicionalmente, Fernandes (2012) sugeriu que a glicosilação de antocianinas mostrou diminuir a capacidade de sequestrar radicais comparativamente com a respectiva aglicona, uma vez que reduz a capacidade do radical antociânico em deslocar elétrons.

Bors e colaboradores (1990) apresentaram as três características estruturais que determinam o potencial antioxidante de um flavonóide, incluindo as antocianinas: a) o grupo di-hidroxilado (catecol) no anel B; b) a ligação dupla C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> em conjugação com um grupo 4-oxo e c) a presença adicional dos grupos hidroxila nas posições C<sub>3</sub> e C<sub>5</sub>, sendo apenas as características dos itens a e c aplicáveis às antocianinas. Tsuda e colaboradores (1994) investigaram a atividade antioxidante dos pigmentos antociânicos cianidina-3-*O*-glicosídeo (Cy-3-*O*-Glc) e cianidina (Cy), através da auto-oxidação do ácido linoleico, utilizando lipossomas, membranas de eritrócitos de coelho e sistemas microssomais hepáticos de rato. Ambas apresentaram atividade antioxidante em todos os sistemas, no entanto a cianidina demonstrou maior atividade que a cianidina-3-glicosídeo e a mesma atividade que o  $\alpha$ -tocoferol em lipossomas e membranas de eritrócitos de coelho. No sistema microssomal de rato, a Cy e a Cy-3-*O*-Glc exibiram atividade superior ao  $\alpha$ -tocoferol. Estes dados sugerem que estes pigmentos podem ter um papel importante na prevenção da peroxidação lipídica das membranas celulares, induzida por radicais livres.

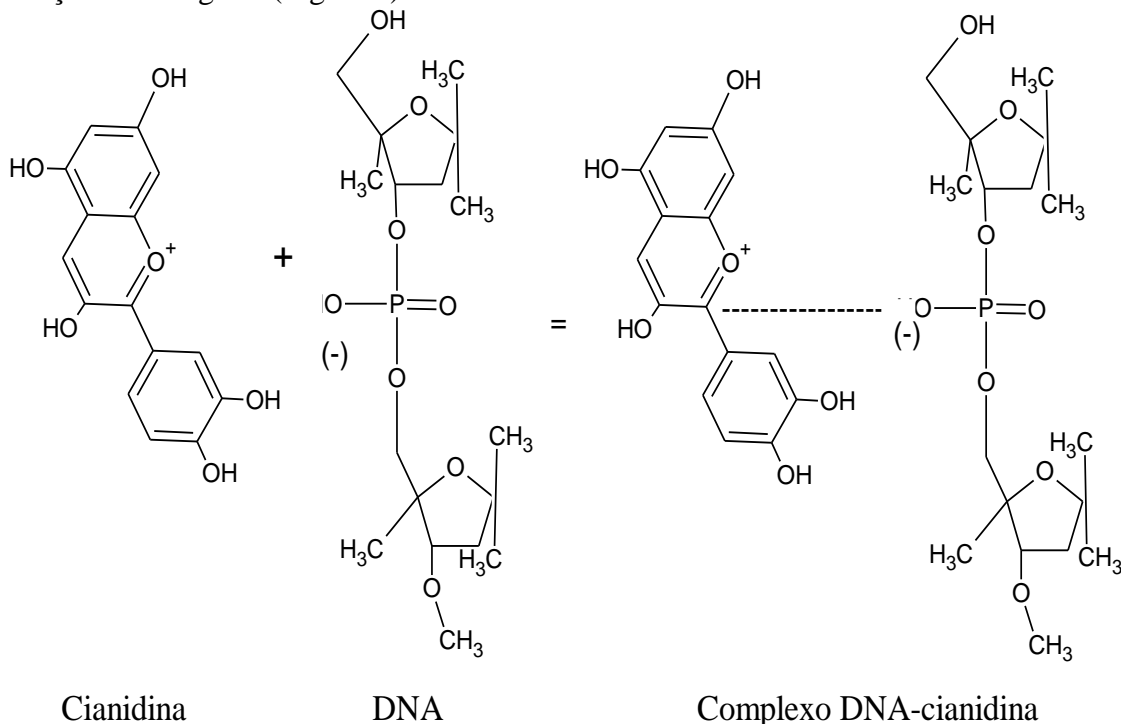


**Figura 6** - Consequência do ataque das espécies reativas de oxigênio sobre os lipídios, proteínas e DNA (Adaptado de WALTON, 2006)

Sarma e Sharma (1999) estudaram a interação das ACNs e do DNA do timo de vitela (tvDNA) e verificaram que ambos foram capazes de formar um complexo de copigmentação, DNA-cianidina, quando misturados. Verificaram ainda que a exposição de qualquer um: cianidina ou tvDNA individualmente ao radical hidroxila (OH) causava graves danos oxidativos. No entanto, a formação deste complexo de DNA-cianidina antes da exposição a estes radicais ( $^{\circ}$ OH), protegia tanto a cianidina como o tvDNA contra danos oxidativos. Com base destes resultados, os autores sugeriram que a copigmentação do DNA-



cianidina poderia ser um possível mecanismo de defesa contra o dano oxidativo do DNA em funções fisiológicas (Figura 7).



**Figura 7-** Mecanismo proposto para interação cianidina-DNA que leva a formação do complexo de copigmentação cianidina-DNA

### 2.3.2 Evidências de propriedades anti-tumorais

As antocianinas têm demonstrado exibir atividade anti-carcinogênica contra múltiplas células *in vitro* e *in vivo*. As antocianinas têm revelado potencial de atividade quimiopreventiva do câncer em estudos que incluem a atividade de eliminação radicalar, a estimulação da fase II enzimática de metabolismo, redução da proliferação celular, inflamação, redução da angiogênese e invasão, indução de apoptose<sup>1</sup> e diferenciação. Além disso, as antocianinas modulam a expressão e ativação de múltiplos genes associados com estas funções celulares (WANG; STONER, 2008).

Koide e colaboradores (1996) verificaram que o hidrolisado de ACNs da casca de uva e do arroz vermelho impactou no tempo da fase S<sup>2</sup>, através do salto desta fase para a fase

<sup>1</sup> NOTA: A apoptose ou morte celular programada desempenha um papel fundamental na regulação do desenvolvimento e crescimento de células normais, e é frequentemente desregulada em células cancerígenas. Alguns dos agentes quimioterápicos mais eficazes são fortes indutores de apoptose em células pré-malignas e malignas.

<sup>2</sup> NOTA: Em células eucarióticas, o ciclo celular é dividido em 3 fases principais: **Intérfase**, onde ocorre o crescimento da célula e preparo para a divisão celular propriamente dita; **Fase mitótica** (Fase M), na qual ocorrerá a separação dos cromossomos da célula-mãe; e a **Citocinese**, fase que ocorrerá o rompimento das membranas plasmáticas e a finalização do processo de divisão, dando origem a duas células-filhas. Por sua vez, a **Intérfase** também se divide em três fases: G1, S e G2. Na fase de crescimento, a G1, ocorre uma intensa síntese de RNA, enzimas e proteínas, e por consequência aumento do citoplasma e do número de organelas presentes na célula. Após esses eventos, ocorre a duplicação exata do material genético da célula, característica da fase S, que ocupa cerca da metade do tempo do ciclo celular. Segue-se à fase G2 que também sintetiza RNA e proteínas e

G2 em células HCT-15. Esse fato sugeriu que estas antocianidinas foram eficazes na supressão do crescimento celular. Um ano após, Koide e investigadores (1997) novamente relataram os efeitos anti-tumorais *in vitro* e *in vivo* de extratos de soja vermelha, que contiam principalmente cianidina-3-*O*- glicosídeo e cianidina-3-*O*-ramnosídeo. Em outro estudo, as antocianinas isoladas e extratos ricos em antocianinas, a partir de frutos e vegetais, inibiram a proliferação celular pela a capacidade que as mesmas têm para bloquear vários estágios do ciclo celular, através de seus efeitos regulatórios sobre algumas proteínas (por exemplo, P53, P21, P27, ciclina D1 e ciclina A). As antocianidinas parecem ser mais potentes inibidores da proliferação de células do que as antocianinas (ZANG; VARRED; NAIR, 2005).

Assim, alguns autores verificaram que extratos ricos em antocianina a partir de bagas de uvas, algumas antocianinas isoladas e antocianidinas exibiram efeitos pró-apoptóticos em vários tipos de células *in vitro* (AFAQ *et al.*, 2007; SEERAM *et al.*, 2006).

Os efeitos anti-angiogênicos das antocianinas foram investigados utilizando células endoteliais cultivadas, células de câncer oral e células epidérmicas JB6 de ratos. Os resultados demonstraram que as antocianinas foram capazes de suprimir a angiogênese<sup>3</sup> através de vários mecanismos, tais como: inibição do Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), redução do VEGF e da expressão do receptor VEGF em células endoteliais (BAGCHI *et al.*, 2004).

Muitos estudos em animais têm demonstrado dados bastante consistentes. Em um estudo comparativo em ratos APC, os animais receberam uma mistura de antocianinas a 800 mg/L e cianidina isolada a 200 mg/L, com a água potável ou cerejas adicionadas à dieta (200 g/kg de ração). Os valores correspondem as doses de aproximadamente 2,4 e 0,6 mg antocianinas/animal/dia ou 600 mg de cerejas/animal/dia, respectivamente, foram realizadas com base no consumo médio diário de dieta e água.

Nos ratos que receberam estas intervenções, o número de adenomas caecal foi reduzido em comparação com os animais, com a dieta controle ou aqueles que receberam fármacos anti-inflamatórios não-esteróides (KANG *et al.*, 2003).

### 2.3.3 Redução de LDL e prevenção de doenças cardiovasculares

Renaud e De Lorgeril (1992) publicaram sua pesquisa a partir da observação do famoso paradoxo francês. Eles verificaram que o alto consumo de vinho rico em antocianinas era a causa para a baixa incidência de doenças cardiovasculares, embora o consumo de gordura saturada fosse elevado na população francesa. Como a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) provoca a acúmulo de macrófagos nas células da parede arterial, a ruptura das placas oxidadas de colesterol leva a aterosclerose e a doenças cardiovasculares.

Assim, eles verificaram que os antioxidantes na dieta, incluindo antocianinas, têm o potencial de aumentar a capacidade antioxidante do plasma e assim proteger os endotélios contra a oxidação de LDL e prevenir doenças cardiovasculares. Enquanto isso, Satué-Garcia e colaboradores (1997) relataram que as antocianinas agem como antioxidantes da lipoproteína humana de baixa densidade (LDL) em sistemas lipossomais *in vitro* com lecitina. Neste

---

promove a condensação da cromatina. Esta fase é denominada também de fase de preparação para a divisão celular.

<sup>3</sup> NOTA: Outro processo envolvido na formação das neoplasias é a angiogênese. Este é o processo de formação de nova rede vascular, para a nutrição das novas células, representando um fator importante no crescimento de tumores e metástases. Assim, algumas das moléculas mais potentes de ativação de angiogênese são membros de uma família de Fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF). A expressão deste fator VEGF é frequentemente aumentada no desenvolvimento tumores.

trabalho, verificaram a inibição da oxidação com o aumento da concentração do antioxidante. No sistema de LDL, quando a oxidação foi catalisada com 10 mM de cobre, a malvidina foi o melhor inibidor de oxidação, seguida da delfinidina, cianidina e pelargonidina. Em um modelo de peroxidação lipídica induzida por radiação de luz UV, três antocianinas purificadas (Pg- 3-O-glc, Cy-3-O-glc e Pd-3-O-glc), bem como as suas antocianidinas, demonstraram uma forte inibição da peroxidação de lípidos e agiram como agentes de eliminação de radicais ativos de oxigênio (TSUDA *et al.*, 1996).

Abuja e colaboradores (1998) investigaram o pó do suco de sabugueiro obtido por spray-dry, que continha alto teor de antocianinas, e verificaram a relação da presença da antocininas e o efeito protetor sobre o LDL humano *in vitro*. Youdim e colaboradores (2000) verificaram a capacidade das células endoteliais em incorporar antocianinas e examinaram seus potenciais benefícios contra vários fatores de estresse oxidativo. Esta capacidade de penetrar nas células se mostra dependente da estrutura, com concentrações mais elevadas das ACNs monoglicosiladas e menor para as diglicosiladas em ambos os compartimentos. A presença das ACNs conferiu efeitos protetores significativos nas células contra os seguintes fatores de estresse oxidativo: radicais de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 2, 2' - azobis (2-amidinopropano) (AAPH)); e FeSO<sub>4</sub>/ácido ascórbico. Estes resultados podem ter implicações importantes sobre a preservação da função das células endoteliais ao impedir o início de alterações associadas a doenças vasculares.

### 2.3.4 Atividade anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta biológica complexa em resposta à lesão tecidual. Muitos tipos de câncer ocorrem nos locais de inflamação, porque as células inflamatórias proporcionam um microambiente favorável ao desenvolvimento de tumores, e, por conseguinte, a terapia anti-inflamatória tem o potencial para prevenção precoce da progressão neoplásica e transformação maligna (COUSSENS; WERB 2002). A regulação anormal de duas proteínas inflamatórias, fator nuclear kappa B (NF-kB) e ciclooxigenase- 2 (COX-2), ocorrem em muitos tipos de câncer, e os inibidores destas proteínas geralmente exibem potencial quimiopreventivo significativo (WANG; STONER, 2008). As ciclooxigenases (Cox) convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas que estimulam a inflamação, assim é altamente desejável um efeito inibidor sobre estas enzimas (SEERAM *et al.*, 2001).

## 2.4 Trato Gastrointestinal (TGI)

O trato digestivo é composto pelo tubo digestivo e por glândulas secretoras anexas. Ele tem a função de digestão e de barreira seletiva de proteção entre o meio externo e o meio interno. As glândulas secretoras são os anexos e produzem enzimas digestivas por quase toda a sua extensão, desde a boca até o íleo terminal. Essas enzimas têm a função de degradar as macromoléculas presentes nos alimentos ingeridos, transformando-as em moléculas mais simples, em tamanho e complexidade. Elas objetivam tornar as moléculas mais solúveis no meio intestinal, a fim de atingirem a mucosa intestinal, serem absorvidos, distribuídos e bioutilizados.

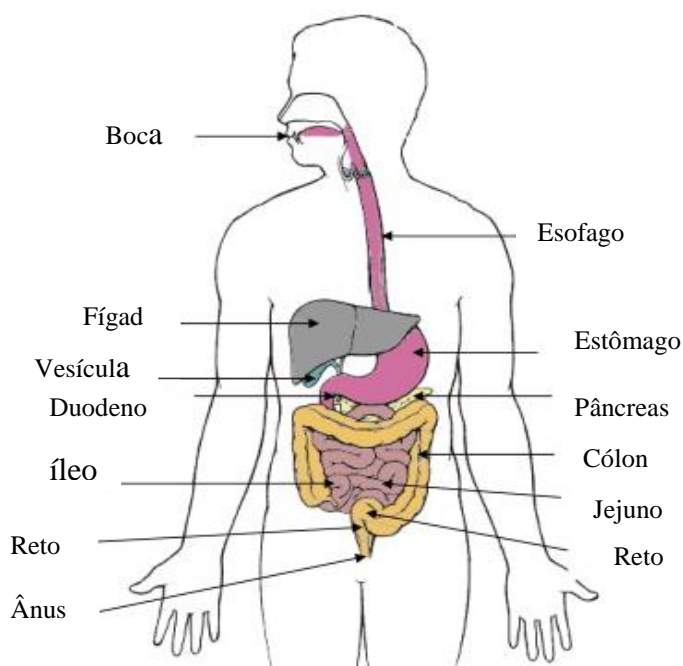
O início da degradação do alimento ocorre na cavidade oral (Figura 9), onde os dentes o trituram, transformando-o em pedaços menores, e a saliva o umedece, lubrifica e inicia a digestão através das enzimas como  $\alpha$ -amilase (ou ptialina) e lipase, que atuam sobre os carboidratos e os lipídios, respectivamente. A língua mistura e amassa esses fragmentos, resultando no bolo alimentar. Há pequenas glândulas salivares espalhadas no tecido conjuntivo da cavidade oral, inclusive na língua, mas secretam somente 5% da saliva. A maior

parte da saliva é produzida por três grandes pares de glândulas salivares: as parótidas, as submandibulares e as sublinguais. As glândulas parótidas possuem uma forma achatada e estão situadas abaixo e na frente da orelha, em cada lado da face. São responsáveis por 30% da saliva. As glândulas submandibulares são ovoides e estão logo abaixo da mandíbula, em ambos os lados do pescoço. Produzem 60% da saliva. As glândulas sublinguais possuem uma forma de amêndoa e estão no assoalho da boca, com os ductos abrindo-se próximos aos ductos das submandibulares. Secretam cerca de 5% da saliva. As glândulas salivares maiores estão envolvidas por uma cápsula de tecido conjuntivo denso e são divididas em porção secretora e porção condutora. A porção secretora pode conter células serosas e/ou mucosas.

As células serosas têm uma forma piramidal e apresentam um retículo endoplasmático rugoso desenvolvido para a síntese proteica. Essas células secretam uma solução aquosa com enzimas (amilase, lipase e lisozima), IgA e lactoferrina. A amilase e a lipase iniciam a digestão dos carboidratos e dos lipídios na cavidade oral, continuando-a no estômago. A lisozima, a IgA e a lactoferrina agem contra a ação das bactérias. As células mucosas contêm vesículas de glicoproteínas. Estas glicoproteínas constituem o muco que lubrifica o bolo alimentar. As glândulas parótidas são constituídas somente por células serosas. As glândulas submandibulares e sublinguais contêm células mucosas e serosas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

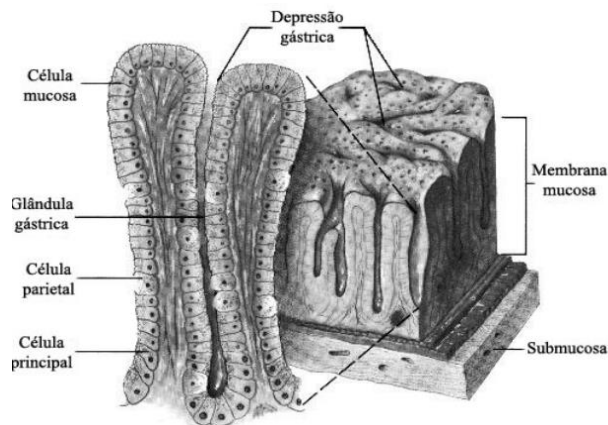
O estômago é o segmento mais dilatado do sistema digestivo, como os alimentos permanecerem nele por algum tempo, necessita ser um reservatório entre o esôfago e o intestino delgado. Ele está dividido em 4 áreas (regiões) principais: cárdia, fundo, corpo e piloro. Estas duas últimas microscopicamente são idênticas, portanto, em termos histológicos, apenas três regiões são consideradas. O cárdia é uma banda circular estreita, de músculo liso, com cerca de 1,5 a 3,0 cm de largura, na transição entre o esôfago e o estômago. O fundo e o corpo deste órgão estão preenchidos por glândulas, denominadas glândulas fúndicas, das quais três a sete se abrem no fundo de cada fosseta gástrica. O piloro está localizado entre o estômago e o duodeno e regula a passagem do quimo de um órgão para o outro, além de impedir seu refluxo. Estas regiões possuem algumas camadas, como: mucosa, submucosa e muscular, além de ser revestido por uma delgada camada serosa. As camadas, mucosa e submucosa repousam sobre dobras direcionadas longitudinalmente, quando o estômago não está distendido, caso contrário, estas dobras se achatam. O epitélio que reveste a mucosa gástrica sofre invaginação em direção à lâmina própria, dando origem às fossetas gástricas, sendo que nestas, desembocam as glândulas que secretam o suco gástrico. Já a camada submucosa é revestida por um tecido conjuntivo denso onde estão presentes vasos sanguíneos e linfáticos. No entanto, esta glândula é semelhante a um epitélio de absorção típico, uma vez que ele é composto por monocamada de células em repouso sobre uma membrana basal e em estreito contato com os vasos periféricos (Figura 8). A camada muscular é composta por fibras musculares lisas orientadas em três direções principais.





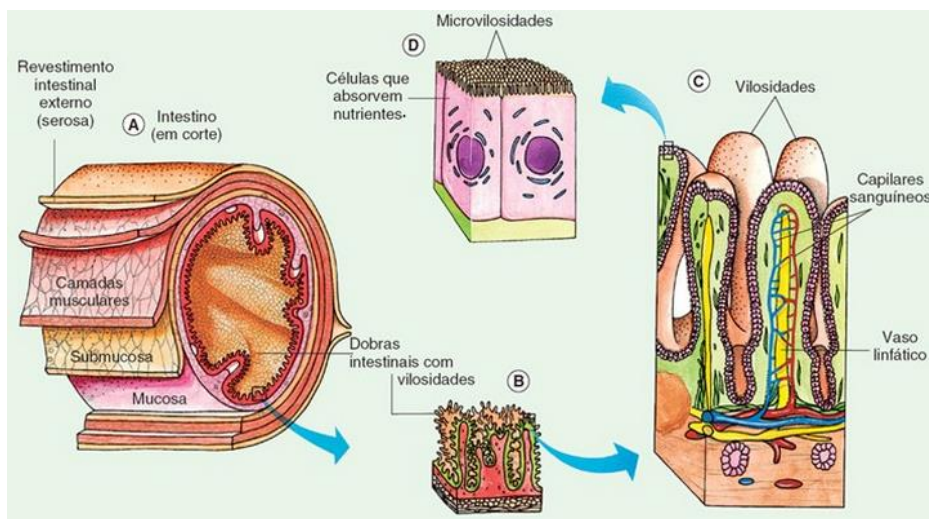
**Figura 8** – Sistema digestivo humano, incluindo o trato gastrointestinal e órgãos anexos (Fonte: DEAN; MA, 2007 apud GIORI, 2010)

O muco é produzido pelas glândulas pilóricas e cárdicas do estômago e lubrifica o bolo alimentar, além de proteger a parede do estômago contra a ação das enzimas gástricas e do ácido clorídrico (HCl). O HCl apresenta as seguintes funções: facilita a absorção de ferro; proporciona um pH ótimo para a digestão protéica; ativa o pepsinogênio à Pepsina; age contra os germes restringindo a fermentação microbiana (ação germicida). As enzimas do suco gástrico são: pepsina, lípase gástrica, amilase gástrica. A pepsina é uma enzima proteolítica muito importante (digere proteínas em peptídeos), atua num meio altamente ácido (pH = 2,0) e acima de pH = 5,0 apresenta pouca atividade proteolítica, tornando-se inativa. A lípase gástrica (tributirase) age sobre a tributirina (um tipo de gordura encontrado no leite e seus derivados), que apresenta baixa atividade lipolítica sobre as gorduras comuns. A amilase gástrica não desempenha papel importante na digestão do amido (GUYTON, 1988).



**Figura 9-** Esquema do epitélio gástrico e suas camadas. A mucosa gástrica sofre invaginações dando origem às fossetas gástricas, que são semelhantes a um epitélio de absorção típico, composto por monocamada de células em repouso sobre uma membrana basal e em estreito contato com os vasos periféricos (Fonte: Disponível em: <http://biologia.ifsc.usp.br/bio2/apostila/apost-fisiol-parte4.pdf>. Acesso em 10 de janeiro de 2015).

Dentre as regiões que compõem o tubo digestivo, o intestino delgado é o segmento mais longo, que mede cerca de 6-7 metros e ocupa quase toda a cavidade abdominal. É dividido em duodeno, jejuno e íleo. O duodeno é a primeira e a menor parte do intestino delgado, com cerca de 25 cm. O jejuno e o íleo são difíceis de diferenciar, pelo que podemos chamar jejuno-íleo ao seu conjunto, sendo o principal local absorptivo do corpo humano (Figura 10). Esta região dispõe de uma superfície celular, com várias pregas, vilosidades e microvilosidades, que aumentam em cerca de mil vezes a área superficial de mucosa, perfazendo um total de 250 metros quadrados. As células absorptivas ou enterócitos são as mais numerosas do epitélio intestinal e sua função primária é a absorção e transporte dos componentes absorvidos para a lâmina própria. São células altas, com núcleo basal e com abundantes microvilosidades recobertas por uma camada espessa de glicocálix e que apresentam no seu interior uma rede de capilares sanguíneos e um vaso linfático-vaso quilífero. Além disso, apresentam junções de oclusão (*gap junctions*), que impedem a passagem de material por entre as células e, portanto, as moléculas devem atravessar pelo menos duas membranas celulares (a interna e externa) para passar de um lado para o outro (Figura 10) (GARTNER; HIATT, 2003).



**Figura 10-** Estruturas presentes na parede do Intestino delgado (Fonte: Disponível em :<http://slideplayer.com.br/slide/1267621/>. Acesso 26 de dezembro de 2014)

O intestino grosso é a continuidade do intestino delgado e o local de absorção de água, tanto a ingerida quanto a das secreções digestivas. As glândulas da mucosa do intestino grosso secretam muco, que lubrifica as fezes, facilitando seu trânsito e eliminação pelo ânus. Mede cerca de 1,5 m de comprimento e divide-se em ceco, cólon ascendente, cólon transversal, cólon descendente, cólon sigmóide e reto. A saída do reto chama-se ânus e é fechada por um músculo que o rodeia, o esfíncter anal. Neste local há a presença de numerosas bactérias ou microbiota que vivem em mutualismo. Seu trabalho consiste em metabolizar os restos alimentares não assimiláveis, reforçar o movimento intestinal e proteger o organismo contra bactérias patogênicas, causadoras de doenças. As fibras vegetais, principalmente a celulose, não são digeridas nem absorvidas, contribuindo assim com percentual significativo da massa fecal. O intestino grosso não possui vilosidades, bem como não secreta sucos digestivos. Normalmente só absorve água e alguns compostos solúveis na mesma, em quantidade bastante consideráveis. Como o intestino grosso absorve muita água, o conteúdo intestinal se condensa até formar detritos inúteis, que são evacuados (GUYTON, 1988).

## 2.5 Biodisponibilidade e Bioacessibilidade

Os termos biodisponibilidade e bioacessibilidade são, com frequência, utilizados indistintamente. No entanto o conceito de biodisponibilidade engloba os eventos de bioacessibilidade e distribuição sistêmica. O termo biodisponibilidade recebe diferentes definições, podendo ser definida como a proporção da substância que passa para a circulação sistêmica após a administração oral, e atinge o local de ação biológico (RANG *et al.*, 2003; OOMEN *et al.*, 2003). Para os nutrientes, onde o metabolismo é comum e a rota de administração é a oral, sua definição é bastante simples, sendo a quantidade ou fração da dose ingerida que é absorvida (HEANEY; NORDIN, 2002). Outra interpretação seria apenas a biodisponibilidade como as concentrações plasmáticas (MASON, 2000). A definição comumente aceita de biodisponibilidade é a proporção do nutriente que é digerida, absorvida e metabolizada por vias normais. Por isso, é importante não só conhecermos quanto de um nutriente está presente em um alimento ou suplemento dietético; mas ainda mais importante é saber quanto do mesmo está biodisponível (SRINIVASAN, 2001). Para além deste conceito,

pode-se somar as etapas de liberação do composto da matriz alimentícia, a degradação metabólica local e o transporte até o tecido alvo ou distribuição.

Já a bioacessibilidade também recebe diferentes definições, dentre elas é a fração do composto potencialmente disponível para posterior captação e absorção (ALMINGER *et al.*, 2014). Atualmente, a definição mais aceita é a fração de um composto que é digerido e liberado de sua matriz no trato gastrointestinal e que, portanto, torna-se disponível para absorção intestinal, sendo apenas dependente do processo de digestão e liberação do composto da matriz do alimento. A Escola americana de nutrição agrega a este conceito os eventos de captação e metabolismo celular (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI; ISHIDA, 2007).

Além disso, para que uma substância alcance a circulação sistêmica, ela necessita, além de penetrar a mucosa intestinal, também atravessá-la (absorvida) e entrar nos vasos sanguíneos. Uma questão é o fato de que a biodisponibilidade não constitui uma característica exclusiva da substância: ela é afetada por variações na atividade enzimática da parede intestinal ou do fígado, no pH gástrico ou na motilidade intestinal, fatores relacionados ao estado nutricional, aspectos genéticos, característicos de cada indivíduo e interações com outras substâncias. Devido a isso, podemos somente falar sobre a biodisponibilidade de determinada substância, em um determinado indivíduo, numa determinada ocasião (RANG *et al.*, 2003). Portanto, a biodisponibilidade não pode ser avaliada utilizando modelos *in vitro*, pois está intrinsecamente relacionada a fatores fisiológicos e metabólicos.

O estudo da biodisponibilidade é bastante complexo e pode ser afetado por um grande número de fatores. Estes fatores incluem a natureza do composto, variação de polaridade, massa molecular, pH do meio, pKa do composto, a matriz do alimento (composição), a forma polimórfica do composto, quantidade ingerida, enzimas digestivas, estado nutricional, fatores genéticos, fatores relacionados a característica de cada indivíduo, interações com outras substâncias e tipo de transporte membranar.

## 2.6 Biodisponibilidade das ACNs em animais e humanos

A maioria das evidências que sustentam os efeitos preventivos ou terapêuticos das antocianinas é *in vitro* e ainda faltam evidências *in vivo* a partir de animais ou estudos de intervenção humana. No entanto, quaisquer efeitos biológicos são dependentes de níveis adequados de biodisponibilidade para que as antocianinas possam alcançar as células e globalmente, todo o organismo. O número de estudos em humanos que visam investigar a biodisponibilidade de antocianinas tem aumentado rapidamente ao longo das últimas décadas (Tabela 2).

Lapidot e colaboradores (1998) investigaram a biodisponibilidade de antocianinas em vinho tinto (218 mg de antocianinas/300 ml) após a ingestão de dois copos. Eles mediram a taxa de excreção urinária de 5% da dose ao longo de um período de 12 h; uma taxa muito maior do que em estudos mais recentes. Bub e colaboradores (2001) investigaram a biodisponibilidade da malvidina-3-glicosídeo em vinho tinto e suco de uva. Após a ingestão de vinho tinto (68 mg de malvidina-3-glicosídeo/500 ml) ou suco de uvas vermelhas (117 mg malvidina-3-glicosídeo/500 mL), a malvidina-3-glicosídeo foi encontrada no plasma ( $C_{max}$ : 1,4 nm a 20 min com vinho tinto; e  $C_{max}$ : 2,8 nm a 180 min com suco de uva vermelha) e na urina (< 0,03% da quantidade ingerida de vinho vermelho, suco de uva), respectivamente de voluntários humanos. Não foram encontradas agliconas nem conjugados de glucuronato ou sulfato em amostras de plasma e urina, indicando que a malvidina-3-O-glicosídeo é absorvida na sua forma glicosilada.



Estudo realizado em 15 participantes, avaliando a prevenção de doença coronária, mostrou que 4 horas após o consumo de 480 mL de suco de cranberry (94.47mg antocianinas) as concentrações plasmáticas de antocianinas individuais variaram entre 0,56 e 4,64 nmol/L, com concentrações máximas de antocianina detectadas entre 1 e 3 horas. A recuperação urinária de antocianina foi de  $0.79 \pm 0.90\%$  da dose administrada. Estes dados sugeriram que as antocianinas são pouco absorvidas e rapidamente removidas do plasma. As concentrações observadas no plasma são insuficientes para alterar a carga radical ou potencial redox, mas poderiam ser suficientes para afetar a transdução de sinal e/ou a expressão de genes (MILBURY; VITA; BLUMBERG, 2010).

Frank e colaboradores (2003) encontraram uma excreção urinária de antocianinas entre 0,18 e 0,23%, após a ingestão de única dose oral única de 400 ml suco de uvas vermelhas (283,5 mg de antocianinas totais), ou 400 ml de vinho tinto (279,6 mg de antocianinas totais). Matsumoto e colaboradores (2005) verificaram que as ACN encontradas na groselha foram diretamente absorvidas e distribuídas para o sangue e excretadas na urina nas formas glicosiladas em ratos e humanos. Em seu estudo humano, eles detectaram as antocianinas da groselha, tanto no plasma (0,120 nM) e o urina (0,11% da dose ingerida) como também a forma intacta, após a ingestão de dose única de concentrado de groselha (3,57 mg de cianidina-3-*O*-glicosídeo/kg de peso corporal). Estes resultados indicam que os glicosídeos de antocianinas podem ser absorvidos rapidamente dentro de 2 h após a ingestão e que são excretados na urina na sua forma intacta. A baixa biodisponibilidade das antocianinas também foi demonstrada num estudo humano por Murkovic e colaboradores (2001). Após a ingestão de 180 mg de antocianina (cápsulas de pó de suco de sabugueiro obtido por spray dry), a concentração plasmática máxima encontrada foi de 35 ng/mL. Assim, além da baixa biodisponibilidade, estes autores sugerem uma degradação rápida ou excreção dos compostos.

**Tabela 2-** Estudos de biodisponibilidade de antocianinas em humanos (Fonte: Adaptado de YANG *et al.*, 2011)

<b>Alimentos</b>	<b>ACN totais<sup>a</sup></b>	<b>C<sub>max</sub><sup>b</sup></b>	<b>T<sub>max</sub><sup>c</sup> (h)</b>	<b>Excreção urinária (%)<sup>d</sup></b>	<b>Referência</b>
Mirtilo pó (100g)	1200 mg	29nmol/L	4	-	Mazza e colaboradores, 2002
Sabu extrato (25g)	1500mg	100 nmol/L	0,5	-	Cao & Prior,1999
Sabu extrato (12g)	720mg	0,097 nmol/L	1,2	0.06 (24h)	Wu, Cao & Prior, 2002
Sabu (caps spray dried)	180 mg	35ng/mL	1		Murkovic e colaboradores, 2001)
Sabu (concentrado) (150mL)	33,0 mg/Kg p.c	5.0-73,4 nmol/L	1,25-1,75	0,11 (8h)	Matsumoto e colaboradores, 2001
Vinho tinto(300mL)	218 mg	-	-	5,10 (12h)	Lapidot e colab, 1998
Vinho tinto(400mL)	180 mg	43 nmol/L	1,5	0,23 (h)	Frank e colaboradores, 2003

<b>Vinho tinto(500mL)</b>	68 mg Mv-3-glic <sup>e</sup>	0,0014 µmol/L	0,8	0,02 (6h)	
<b>Vinho tinto sem álcool(400mL)</b>	56 mg Mv-3-glic <sup>e</sup>	0,0017 µmol/L	1,5	0,02 (6h)	
<b>Suco uva (500mL)</b>	117 mg Mv-3-glic <sup>e</sup>	0,0028 µmol/L	2,0	0,02 (6h)	Bub e colaboradores, 2001
<b>Suco uva (400mL)</b>	284 mg	100 ng/mL	0,5	0,18 (7h)	Frank e colaboradores, 2003
<b>Groselha</b>	236 mg	0,120 µmol/L	1,25-1,75	0,11 (8h)	Matsumoto e colaboradores, 2001
<b>Groselha suco</b>	1,24 g	53 nmol/L	0,75	0,07 (4h)	Nielsen e colaboradores, 2003
	0,72 g	16 nmol/L	0,75	0,05 (4h)	
	0,75 g	32 ng/mL	1,5	0,05 (4h)	
<b>Chokeberries extrato (7,1g)</b>	721 mg	0.096 µmol/L	2,8	0,15 (24)	Kay e colaboradores , 2004
<b>Morango (200g)</b>	77,3 mg	274 nmol/L	1,1h	1.0 (24h)	Mullen e colaboradores, 2008
<b>Suco cenoura roxa (50, 150 e 250mL)</b>	65, 194, 323 mg	2,5-9,6 nmol/L	1-2 h	-	Charron e colaboradores, 2009
<b>Suco de Cranberry (480 mL)</b>	94,47 mg	0,56-4,64 nmol/L	1-3h	0,79± 0,90 (4h)	Milbury e colaboradores, 2010

(<sup>a</sup>) Dose total de antocianinas por Kg de peso corpóreo

(<sup>b</sup>) Concentração plasmática máxima

(<sup>c</sup>) Tempo necessário para atingir o C<sub>max</sub>

(<sup>d</sup>) Percentual da dose ingerida

(<sup>e</sup>) Mv-3-glic = Malvidina-3-*O*-glicosídeo

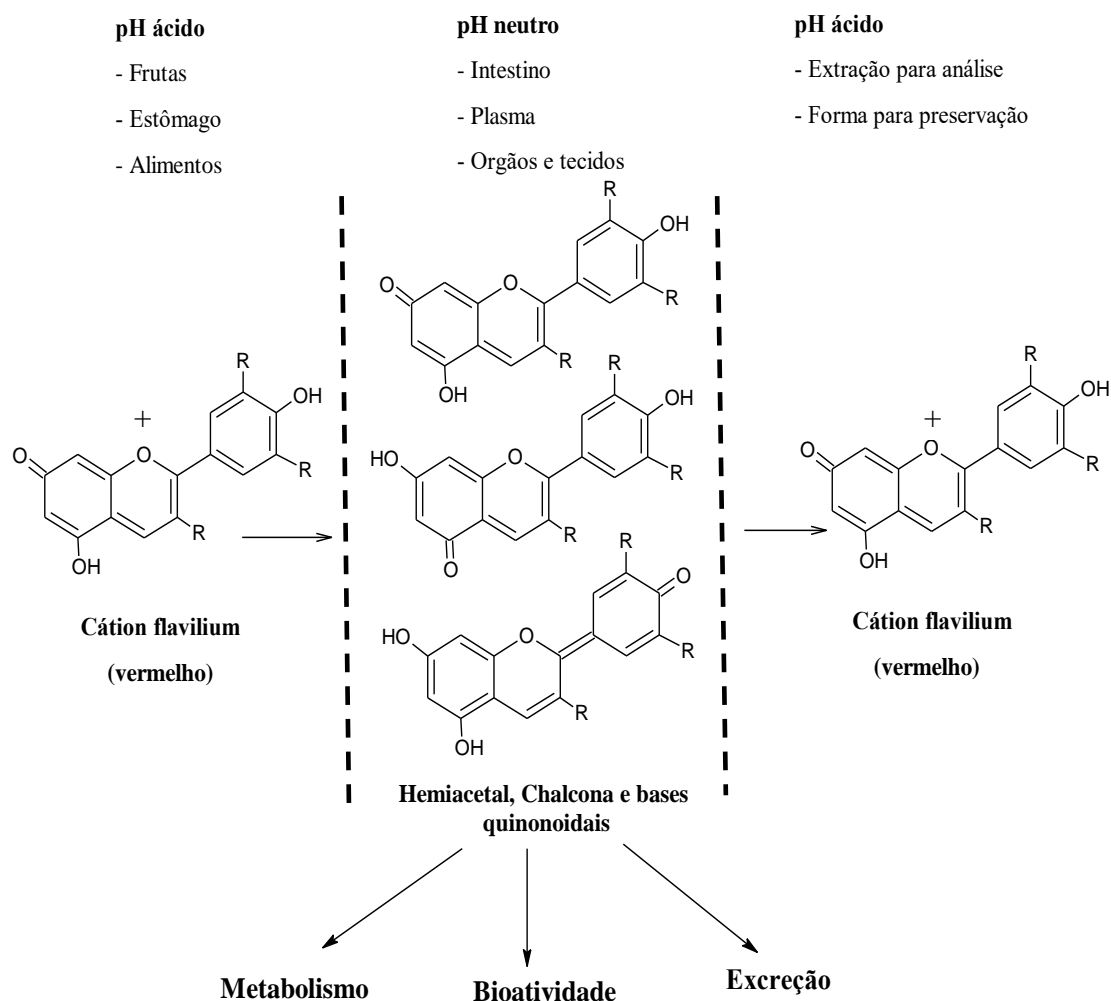
Os estudos em animais são os mais frequentemente realizados para o estudo da biodisponibilidade das ACNs. Grande parte destes estudos indica que as antocianinas são absorvidas majoritariamente na sua forma glicosídica intacta e alcança rapidamente a circulação sistêmica. Para estes estudos duas abordagens têm sido utilizadas: quantificação das ACNs e seus metabólitos no plasma e urina.

Morazzoni e colaboradores (1991) verificaram em ratos, após uma única administração oral [400 mg/kg de peso corporal] de ACNs de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), as concentrações plasmáticas máximas atingiram níveis de (2 – 3 µg/mL) após apenas 15 minutos e, em seguida, rapidamente diminuiu dentro de 2 horas. Além disso, Miyazawa e colaboradores (1999) também verificaram o rápido aparecimento das ACNs na forma intacta no plasma [C<sub>max</sub>: 3.8 µmol/L (1.8µg/ml) a 15 min] após a administração oral de antocianina de frutas vermelhas (320 mg cianidina-3-*O*-glicosídeo/kg de peso corporal) após sua encubação em estômago de ratos. Nesta pesquisa, nem as formas agliconas, nem as ACNs conjugados (metabólitos) estavam presentes no plasma de ratos, sugerindo que a estrutura do cátion flavílium é muito mais estável à hidrólise bacteriana do que outros flavonóides. Além disso, Tsuda e colaboradores (1999) também verificaram após a administração oral de cianidina-3-glicosídeo (400 mg/kg de peso corporal) a ratos, que a sua forma intacta apareceu rapidamente no plasma [C<sub>max</sub>: 0.31 µmol/L (0.14µg/ml) a 30 min], mas novamente a aglicona não foi detectada, sendo posteriormente detectada no jejuno. Além disso, os autores encontraram o ácido protocatequico no plasma, o qual sugeriram ter sido gerado pela degradação da cianidina, e a sua concentração foi de oito vezes mais elevada do que a da

cianidina-3-glucosídeo. Uma vez que uma concentração máxima de cianidina-3-*O*-glicosídeo foi encontrada apenas em 15 minutos no estômago após a administração, sugerindo que as ACNs podem ser absorvidas a partir deste órgão.

De uma forma geral a biodisponibilidade das ACNs difere dos outros flavonóides, tais como a quercetina (por exemplo, glicosídeos) em uma série de aspectos (TAGLIAZUCCHI *et al.*, 2010). Em primeiro lugar, a biodisponibilidade aparente é sempre muito baixa em todos os estudos com valores de menos de 0,1% da dose ingerida na urina. Em segundo lugar, a absorção ocorre rapidamente após o seu consumo. Os níveis de concentração plasmáticos máximo são atingidos em 15- 60 minutos com excreção completa dentro de 6-8 horas. Estas observações levam-nos a crer que as antocianinas são absorvidas primeiramente a partir do estômago. Em terceiro lugar, as ACN glicosiladas parecem ser absorvidas intactas, distribuídas pela circulação e excretadas na urina.

Os métodos de detecção utilizados para a maioria, se não todos, os estudos de biodisponibilidade das ACNs se baseiam na identificação da forma catiônica do íon flavílium por CLAE. Partindo do pressuposto anterior, devido ao seu curto tempo de detecção, fica evidente que a forma de cátion flavílio não é a forma mais provável que exista *in vivo*. Consequentemente, todas as avaliações têm medido indiretamente a biodisponibilidade das ACNs, pois provavelmente as formas hemicetal e chalcona sejam as mais prováveis de estarem envolvidas na absorção e reações de metabolismo. Com isto, as estruturas antociânicas que não forem capazes de regenerar o cátion flavílio, devido ao metabolismo ou modificações estruturais *in vivo*, não serão detectadas pelos métodos analíticos baseados na separação por CLAE e detecção a 520nm (Figura 11).



**Figura 11-** Esquema representativo das diferentes formas que as antocianinas podem se apresentar durante um experimento de absorção/biodisponibilidade. As antocianinas que são transformadas durante a bioatividade, metabolismo ou excreção e são incapazes de retornar ao cátion flavílium após acidificação durante a preparação da amostra não serão detectadas pelos atuais métodos de análise por CLAE (Fonte: Adaptado de MCGHIE; WALTON, 2007).

## 2.7 Bioacessibilidade: Metodologias de Digestão *in vitro*

Nas duas últimas décadas, diversos modelos de digestão *in vitro*, principalmente nas áreas Farmacêutica, toxicológica e ambiental foram desenvolvidos, com o intuito de melhor elucidar as etapas que envolvem a bioacessibilidade dos compostos (MILLER *et al.*, 1981; OOMEN *et al.*, 2002, BOSSO; ENZWEILLER, 2008). Todas estas metodologias *in vitro* baseiam-se na fisiologia do trato gastrointestinal e simulam as condições da digestão humana. A saliva e dos sucos gástrico e duodenal naturais, são substituídos por soluções artificiais que simulam o ambiente de cada um dos compartimentos digestivos (pH, temperatura, agitação etc). Estes modelos podem ser estáticos ou dinâmicos, dependendo da reprodução dos processos físicos que ocorrem *in vivo* (corte, mistura, hidratação, mudanças nas condições de tempo, peristaltismo etc). Os modelos dinâmicos são os mais promissores, de modo que consideram novas variáveis, tais como alterações na viscosidade do digerido, redução do tamanho das partículas, difusão e partilha de nutrientes (FERNANDEZ-GARCIA, CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009), no entanto são os mais onerosos.



A terminologia para a determinação da bioacessibilidade as vezes pode variar, podendo ser chamada também de Recuperação (%) (MCDOUGALL *et al.*, 2007) ou Estabilidade (%) (CORREA-BETANZO *et al.*, 2014). Estas variações podem ocorrer pois, alguns autores entendem que a bioacessibilidade tanto pode ser uma medição da recuperação de um composto numa dada matriz, como o percentual de composto que permaneceu estável ao longo de sua passagem pela TGI.

Um dos principais obstáculos para a interpretação da bioacessibilidade de compostos, tal como das antocianinas, é o grande número de modelos publicados desde a descrição do primeiro modelo desenvolvido para o estudo do ferro (MILLER *et al.*, 1981). A diversidade de modelos tem dificultado a comparação de resultados entre os estudos, e aumentou as chances de encontrar resultados contraditórios. Estes modelos diferem principalmente nos estágios de digestão (oral, gástrico, do intestino delgado, intestino grosso); pH; a natureza e concentração das enzimas digestivas envolvidos; e concentrações de eletrólitos e ácidos biliares etc. A maior parte dos modelos são operados no modo estático (isto é, com concentrações prefixadas e volumes de materiais digeridos, enzimas de sais, e assim por diante), mas há também um número limitado de modelos dinâmicos que imitam as mudanças contínuas das condições físico-químicas. Os componentes alimentares experimentam diferentes condições ambientes e físico-químicas que possam levar à modificação molecular. O TGI é caracterizado por regiões com diferentes pH e diferentes populações microbianas; ambos os recursos que podem modificar compostos de antocianina. O pH do estômago é baixo, próximo de 1 - 2, o qual deve garantir que as antocianinas estejam como cátion flavílium, o qual é a forma mais estável das antocianinas. A estabilidade das antocianinas em condições gástricas no estômago foi confirmada por estudos de digestão *in vitro* (MCDOUGALL *et al.*, 2005a.; MCDOUGALL *et al.*, 2005b.; TAGLIAZUCCHI *et al.*, 2010; BOUAYED, HOFFMANN; BOHN, 2011). Em contraste com o estômago, o ambiente do intestino delgado e grosso é em grande parte a pH neutro, onde as múltiplas formas moleculares das antocianinas estarão presentes e onde as antocianinas são muito menos estáveis.

O primeiro estudo que objetivava conhecer o comportamento das ACN no TGI, foi publicado em 1933, por Horwitt, no qual ele conclui que as antocianinas não são facilmente absorvidas a partir do intestino e que a fração que não passar para a circulação parece ser excretada pelo rim em sua forma glicosilada (inalterada). Hur e colaboradores (2011) fizeram um levantamento do número de publicação com diferentes metodologias de digestão *in vitro* para a análise de compostos, nutrientes e contaminantes e verificaram a existência de mais de 80 diferentes tipos de estudos nos últimos 10 anos. Além disto, esta revisão apresenta o Estado da Arte destes métodos e apresenta as diferentes formas de aplicação para cada composto.

Correa-Betanzo e colaboradores (2014) testaram uma metodologia de digestão *in vitro* que compreendia as etapas gástrica, intestinal e cólon, com o objetivo de investigar a quebra dos compostos fenólicos do mirtilo. Os resultados mostraram uma alta estabilidade do polifenóis e antocianinas totais durante a simulação da etapa de digestão gástrica com cerca de 93% e 99% de recuperação, respectivamente. A digestão intestinal diminuiu o conteúdo de polifenóis e antocianina de 49% e 15%, respectivamente, em comparação com amostras não digeridas. Durante a fermentação, que simula a digestão do cólon, a mistura de polifens complexos foi metabolizada, gerando um número limitado de compostos fenólicos, tais como os ácidos siringico, cinâmico, cafeico, e ácidos protocatecuico. Além disso, apenas as antocianinas acetiladas foram detectadas em pequenas quantidades após a fermentação.

Existem algumas variações para a determinação do percentual de bioacessibilidade dos compostos, mas a mais usual é dada pela seguinte equação:

$$\text{BIO}(\%) = \frac{[\text{C}_{\text{ACN}}]_{\text{f}}}{[\text{C}_{\text{ACN}}]_{\text{i}}} \times 100$$

Onde  $[\text{C}_{\text{ACN}}]_{\text{f}}$  é a concentração de antocianinas ao final das fases oral-gastro-hepato-pâncreas e  $[\text{C}_{\text{ACN}}]_{\text{i}}$  é a concentração do mesmo composto no alimento determinado após o processo de extração química.

A crescente preocupação da comunidade científica em homogeneizar as técnicas de estudo de digestão *in vitro*, tem gerando o surgimento de publicações de grandes grupos de pesquisa. Mais recentemente, Mineckus e colaboradores (2014) desenvolveram um modelo de digestão *in vitro* estático para análise de alimentos, cuja finalidade foi harmonizar as técnicas de estudo com o objetivo de ajudar a produção de dados mais comparáveis no futuro. Este estudo visou produzir um protocolo detalhado, orientações, recomendações e justificativas, mas também as possíveis limitações do modelo proposto. A Tabela 3 apresenta os estudos de bioacessibilidade de antocianinas mais recentes

**Tabela 3-** Estudos de bioacessibilidade de compostos fenólicos e antocianinas

<b>Biacessibilidade de e composto</b>	<b>Alimento</b>	<b>Fases da digestão</b>	<b>Composto</b>	<b>Bioacessibilidade (%)</b>	<b>Referência</b>
<b>Compostos fenólicos</b>	Mirtilo	G/I	Antocianinas totais	15%	Correa-Betanzo e colaboradores, 2014
<b>Compostos fenólicos e antocianinas</b>	Romã	G/I	Antocianinas totais	12%	Sengul, Surek & Nilufer-Erdil, 2014
<b>Compostos fenólicos</b>	Uvas	G/I	Flavonóides (incluído antocianinas) e não flavonoides	62%	Tagliazucchi e colaboradores, 2010
<b>Antocianinas</b>	Vinho tinto	G/I	Derivados 3- <i>O</i> -glicosídeos da Mv, Pn, Pt, dp e cy. Derivados Coumaroilados glicosídeos da Mv, Pt, Pn e Dp e glicosídeos acetilados da Pn, Pt e Mv	0,2-0,9%	McDougall e colaboradores, 2005

<b>Antocianinas e polifenóis</b>	Repolho roxo	G/I	Cy-3,5- <i>O</i> -diglicosídeo não cilada, monoacilada ou diacilada com ácidos p-coumarico, cafeico, ferulico e sinapico/ Pg-3- <i>O</i> -glicosídeo e as formas de cy-3- <i>O</i> -triglicosídeo-5- <i>O</i> -glicosídeo diacilada com ácido hidroxicinâmico	25%	McDougall e colaboradores 2007
<b>Polifenóis e antocianinas</b>	Morango	G/I	Cy-3- <i>O</i> -glicosídeo, Pg-3- <i>O</i> -glicosídeo e Pg-3- <i>O</i> -rutinosídeo		Gil-Izquierdo, Zafrilla & Tomás-Barberán, 2002
<b>Antocianinas</b>	Amora	G/I	Cy-3- <i>O</i> -glicosídeo/ cy-3- <i>O</i> -rutinosídeo	0.34% / 4.58%	Liang et al, 2012
<b>Compostos fenólicos/ antocianinas</b>	Morango	G/I	Ácido elágico/ Pg-3- <i>O</i> -glicosídeo/ Pg-3- <i>O</i> -malonilglicosídeo	50%/ 80%	Kosinska-Cagnazzo ecolab. 2015
<b>Antocianinas</b>	Repolho vermelho Maças	G/I	Antocianinas totais (equivalente em Cy-3-glc)	67,7 %	Podsedek e colab. 2014
<b>Antocianinas</b>	(Jonaprinz Jonagold, golden *, Mutzu *) Maça	G/I	Antocianinas totais 1,14 e 1,04 mg/100g (equivalente em Cy-3-glc)	Não detectado	Bouayed, Hoffmann e Bohn, 2011
<b>Compostos fenólicos</b>	(vermelha, pink lady, Fuji e Golden delicious)	O/G/I	Procianidinas/ rutina/floridzina	16.0%/ - 18,6%/6,6%	Tenore e colab, 2013

## 2.8 Características das membranas que realizam transporte epitelial

Todas as células apresentam suas membranas celulares. Elas se constituem de dupla camada fosfolípida com apenas 7,5 a 10 nm de espessura, constituída por lipídeos intercalados com proteínas que se comportam segundo o Modelo do Mosaico Fluido (SINGER; NICOLSON, 1972). Elas funcionam como barreiras de permeabilidade que permite à célula manter um meio químico apropriado para os seus processos metabólicos, regular o volume citoplasmático e transferir informação sob a forma de sinais químicos e elétricos. A difusão direta através da bicamada fosfolípida pela membrana é denominada de difusão simples. A lei de Difusão de Fick foi postulada para qualquer sistema onde haja difusão, no entanto, ela pode ser reorganizada para os processos de difusão através das membranas.

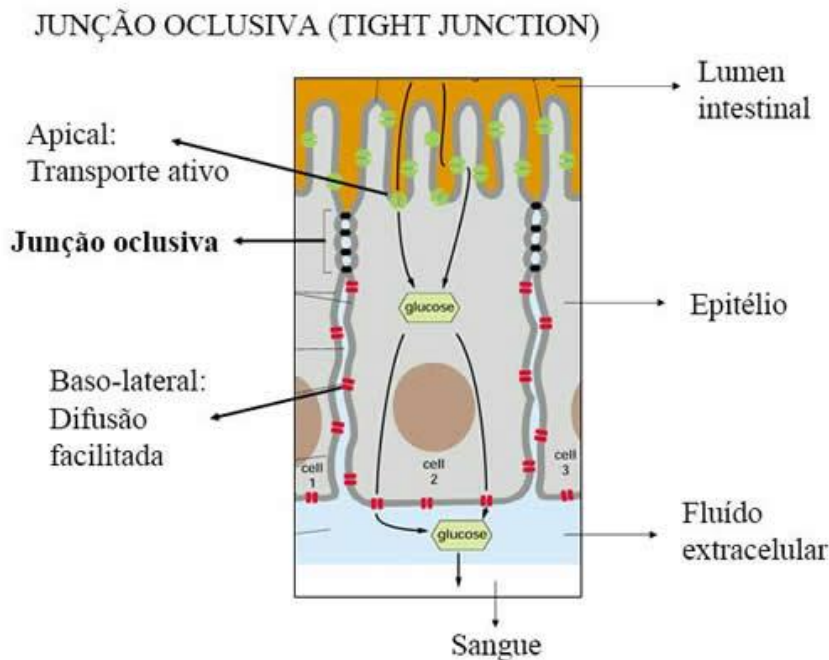
Segundo a Lei de Difusão de Fick, a taxa de difusão é controlada pelas características no núcleo hidrofóbico das membranas, que atuam como barreira, impedindo a passagem livre de substâncias hidrofílicas, além disso, ela é diretamente proporcional à área de superfície da membrana e inversamente proporcional a sua espessura (SILVERTHORN, 2010). Os mesmos princípios aplicam-se ao movimento de substâncias através das membranas plasmáticas com uma diferença: a substituição, na Lei de Fick, do coeficiente de difusão pelo Coeficiente de Permeabilidade membranar, uma vez que a espessura da membrana celular pode ser considerada uma constante:

$$\text{TAXA DE DIFUSÃO} \approx \frac{\text{ÁREA DA SUPERFÍCIE} \times \text{GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO} \times \text{PERMEABILIDADE DA MEMBRANA}}{\text{ESPESSURA DA MEMBRANA}}$$

A maior limitação para a permeabilidade das moléculas é a sua lipossolubilidade frente a membrana. As moléculas lipofílicas sem carga podem atravessar livremente a membrana pela bicamada fosfolipídica, como acontece com o oxigênio, o dióxido de carbono, os ácidos graxos e hormônios esteróides. Moléculas apolares como o oxigênio, dióxido de carbono, ácidos graxos e hormônios esteróides difundem rapidamente pela porção lipídica da membrana. As moléculas polares de pequenas dimensões e sem carga, como a uréia e o glicerol, atravessam a bicamada lipídica rapidamente. Moléculas polares ionizadas difundem muito lentamente ou não atravessam a membrana pela sua parte lipídica. Os íons como o Na<sup>+</sup>, o K<sup>+</sup>, o Cl<sup>-</sup> e o Ca<sup>+2</sup> difundem através da membrana plasmática muito mais rapidamente do que seria previsível pela sua reduzida lipossolubilidade, o que se explica pela presença de canais iônicos. Estes canais apresentam seletividade iônica, quer pelo diâmetro quer pela carga. Moléculas polares com carga, como os carboidratos e os aminoácidos, não podem atravessar a membrana celular por difusão simples. Fazem-no por intermédio de proteínas transportadoras. As substâncias hidrofílicas necessitam de proteínas especiais para poderem transpor a membrana. São exemplo a glicose e os íons. O tamanho e a solubilidade em lipídeos são as principais propriedades que influenciam o movimento das moléculas pelas membranas (SILVERTHORN, 2010).

O transporte membranar que ocorre em células epiteliais apresenta algumas particularidades, já que as substâncias devem atravessar completamente uma camada de células e não somente uma membrana celular. As células dos epitélios são unidas através de junções oclusivas, que são responsáveis por delimitar duas regiões bem definidas nas células: a região apical ou luminal, aquela voltada para o lúmen, onde as substâncias a serem transportadas estão em maior concentração (Figura 12). Nesta região situa-se as envaginações, que formam as vilosidades e microvilosidades, permitindo o aumento da área de superfície para o transporte. Abaixo das junções oclusivas e em contato com o líquido extracelular, se encontra a região basolateral.





**Figura 12** – Esquema do transporte de glicose através de célula epitelial do intestino delgado e presença das junções oclusivas (tight junctions), que estabelecem uma barreira a passagem de macromoléculas entre as células, bem como as mantêm unidas entre si. (Fonte: Disponível em <http://www.sobiologia.com.br/figuras/Histologia/juncoes2.jpg>. Acesso em: 10 de janeiro de 2015).

As células epiteliais são ditas polarizadas, pois as regiões apical e basolateral apresentam características muito diferentes. Enquanto certas proteínas de transporte, como o transportador simporte  $\text{Na}^+$ -glicose SGLT estão localizados apenas na membrana apical, proteínas de transporte como a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase se encontram apenas na membrana basolateral. Esta distribuição diferenciada de transportadores permite o movimento das moléculas em um único sentido através do epitélio (MANDARA; TRIER, 1994).

No que tange ao epitélio intestinal, a permeação ou permeabilidade dos compostos bioativos através das membranas é um processo que envolve um complexo mecanismo, influenciado por diversos fatores. Pode-se destacar alguns deles, tais como sua característica de solubilidade, que impacta na dissolução, composição e pH dos líquidos fisiológicos do trato gastrointestinal (TGI) (suco gástrico, sais biliares, pancreatina), degradação química ou bacteriana, metabolismo na parede do epitélio intestinal e diferentes rotas de absorção. Genericamente, define-se absorção como a transferência de substâncias do local de administração e entrada na corrente sanguínea. Já o fenômeno de transporte através de membranas celulares, que atuam como barreiras seletivas de substâncias do meio celular para o meio externo e vice e versa, é o que chamamos de permeabilidade.

Como a permeabilidade é uma etapa crítica no processo de absorção, uma variedade de técnicas tem sido desenvolvida e empregada para este estudo. O sucesso do modelo está relacionado ao quanto ele é capaz de simular as características das barreiras biológicas *in vitro*. Diversos modelos já são empregados, no entanto nenhum deles ainda é capaz de incorporar todos os mecanismos envolvidos. (BALIMANE; CHONG, 2005; GONÇALVES, 2009).

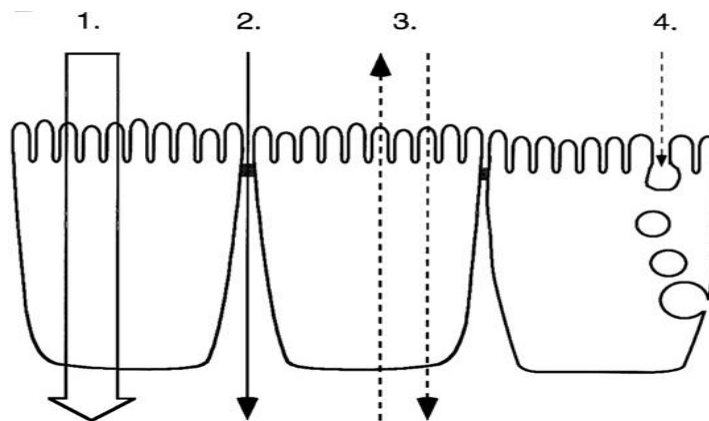
Além disso, os enterócitos apresentam em sua membrana apical sistemas enzimáticos como a glicoproteína P e o a CYP3A que são responsáveis pelo efluxo das substâncias para a fora da célula e por sua metabolização, respectivamente.

## 2.9 Absorção de compostos

A absorção é o processo pelo qual as substâncias atravessam as paredes do tubo digestivo (lúmen) para o meio extracelular (sangue ou linfa), sendo posteriormente distribuídos até às células, onde são utilizados pelo metabolismo celular. O principal local de absorção ocorre no intestino delgado, principalmente na zona do jejuno, exceto para algumas pequenas moléculas, como o álcool e a cafeína, cuja absorção ocorre logo na boca e estômago. No intestino grosso, ao nível do cólon, ocorre também absorção de determinadas substâncias, como alguns aminoácidos e vitaminas resultantes da ação das bactérias da flora intestinal. No entanto, nesta zona do intestino, os nutrientes absorvidos em maior quantidade são a água e os sais minerais.

## 2.10 Vias de absorção

Nos epitélios, as moléculas podem ser transportadas através das junções oclusivas (entre as células), pela via paracelular ou atravessando a membrana luminal, o citoplasma da célula e a membrana basolateral, pela via transcelular. No entanto, existem quatro mecanismos principais para atravessá-las: (1) transporte passivo transcelular; (2) transporte passivo paracelular; (3) transporte mediado por carreadores de membrana e (4) transporte vesicular (Figura 13)



**Figura 13-** Esquema da célula epitelial humana. As setas indicam as quatro diferentes vias de transporte de substâncias: (1) transporte transcelular; (2) transporte paracelular; (3) transporte transcelular mediado por carreadores de membrana e (4) transporte vesicular (Adaptado de ARTURSSON, PALM; LUTHMAN, 2012).

As moléculas que se movem pela via transcelular devem atravessar duas membranas celulares. Estas moléculas passam pela primeira membrana em direção ao interior da célula e cruzam a segunda quando deixam a célula para então entrarem no segundo compartimento. Este transporte utiliza uma combinação de mecanismos ativo e passivo (Figura 13). O transporte de glicose ocorre inicialmente com gasto energético (na entrada) e sem gasto na saída da célula. Além disso, devido às características estruturais de muitas moléculas, tais como, suficiente lipossolubilidade e moderado tamanho, a via transcelular, segundo estudos

tem demonstrado ser a via de opção para a maioria dos compostos completamente absorvidos. (STENBERG; LUTHMAN; ARTURSSON, 2000).

O transporte paracelular ocorre pela passagem de um soluto através dos espaços intercelulares, ou das junções oclusivas (STORPIRTIS *et al.*, 2009). Karlsson e colaboradores (1999) demonstraram em células Caco-2 e mucosa de íleo de ratos, que moléculas catiônicas foram transportadas por esta via em ambos os sentidos de absorção e secreção. Estes dados foram ainda reforçados pela diminuição da resistência transepitelial da monocamada.

As células também podem transportar macromoléculas através da sua membrana plasmática, através da formação de vesículas. Este processo é chamado de endocitose e permite a entrada de material para a célula sem atravessar a sua membrana celular que requer energia metabólica (ativo), uma vez que regiões da membrana plasmática se invaginam e formam vesículas intracelulares que encerram um pequeno volume de matriz extracelular. Este processo pode ocorrer de três formas: Fagocitose: com o englobamento de partículas grandes formando expansões citoplasmáticas ou pseudópodos; pinocitose: englobamento de pequenas vesículas endocíticas, que se fundem com lisossomas primários, constituindo os lisossomas secundários onde o conteúdo da vesícula é digerido (STORPIRTIS *et al.*, 2009). Além disso, temos a endocitose mediada por receptores, que é um tipo particular de endocitose que envolve regiões membranares com a proteína clatrina que permitem a formação de vesículas franjadas ou revestidas. A fagocitose ocorre apenas em células especializadas, como os macrófagos e os granulócitos envolve a digestão de partículas de grandes dimensões (ex.: vírus, bactérias, detritos celulares). A pinocitose é característica de todas as células e permite a captação de fluídos e dos seus constituintes (SILVERTHORN, 2010).

## 2.11 Métodos para estudo de permeabilidade

As primeiras técnicas para avaliar a permeabilidade de compostos foram aplicadas pelas ciências farmacêuticas, no desenvolvimento de novas moléculas que potencialmente se tornariam medicamentos. Para tal, diversos métodos vêm sendo desenvolvidos ao longo das duas últimas décadas, dentre eles: 1) Métodos *in vivo* que realizam estudos farmacocinéticos em animais e seres humanos; 2) Métodos *in vitro* baseados em sistemas artificiais compostos por lipídios, tal como o PAMPA (PARALLEL ARTIFICIAL MEMBRANE PERMEABILITY ASSAY); 3) Modelos *in vitro* baseados em culturas celulares, tais como segmentos de tecido animal e cultura de célula como a de rim canino (MDCK) e a de adenocarcinoma colorretal (Caco-2); 4) Métodos *in situ*, que consiste na perfusão do composto em um segmento do epitélio intestinal; 5) Métodos *in silico*, que empregam descritores moleculares em programas computacionais.

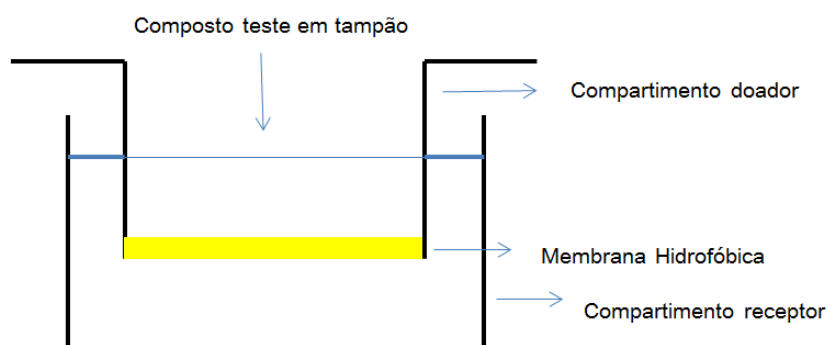
No entanto, os métodos *in vitro* têm recebido maior destaque, pois são mais rápidos, mais baratos e representam uma ferramenta inicial para o *screening* e triagem de compostos e matrizes com elevado potencial de absorção, já que não demandam discussões sobre os aspectos éticos, assim como os relacionados aos ensaios com humanos.

Os modelos *in vitro* que visam avaliar a biodisponibilidade, são apenas capazes de fornecer informações acerca da permeação, metabolismo e absorção dos compostos utilizando culturas celulares Caco-2 e HT29.

Os métodos *in vivo* são aqueles que realizam os estudos farmacocinéticos (biodisponibilidade) dos compostos em humanos e cobaias.

Já o modelo PAMPA (PARALLEL ARTIFICIAL MEMBRANE PERMEABILITY ASSAY) é um modelo *in vitro*, que foi primeiro introduzido por Kansy e colaboradores (1998), e que desde então têm sido amplamente utilizado como modelo como ferramenta de permeabilidade com elevada aplicabilidade para a triagem de compostos absorvidos via oral. Este modelo consiste em uma membrana (filtro) hidrófoba revestida com uma mistura de

lecitina/fosfolípidos dissolvida em um solvente orgânico inerte tal como dodecano, capaz de criar uma membrana lipídica artificial que imita o epitélio intestinal (BALTIMANE; HAN; CHONG, 2006). PAMPA é uma maneira rápida e simples para medir a permeabilidade passiva de compostos na ausência de transportadores ou sistemas de efluxo (CHEN *et al.*, 2008). A taxa de permeação através da barreira da membrana mostrou correlacionar-se bem com o grau de absorção do fármaco em seres humanos. Uma das limitações deste modelo é que PAMPA subestima a absorção de compostos que são ativamente absorvidos através de transportadores de fármacos. Apesar da limitação, PAMPA pode servir como uma ferramenta de triagem de permeabilidade primária durante o processo de descoberta de compostos bioativas. As células Caco-2 fornecem informações sobre a soma das permeabilidades dos transportes passivos e ativos que não podem ser dissociados facilmente sem as informações obtidas a partir do teste PAMPA do mesmo composto. Portanto, PAMPA e Caco-2 testes pode ser exames complementares para determinar tanto as permeabilidades passiva e ativa. PAMPA também tem sido usado para prever as permeabilidades passiva através da barreira hemato-encefálica (DI *et al.*, 2003).



**Figura 14-** Ensaio PAMPA permite medir a difusão passiva de um composto através de uma membrana hidrofóbica artificial

Existem também diversos modelos *in vitro* baseados tanto em culturas celulares, como em segmentos de tecido animal. Cada método *in vitro* tem as suas vantagens e inconvenientes. De acordo com o objetivo específico, um ou mais métodos podem ser utilizados como uma ferramenta para o estudo de compostos. Uma aplicação bem-sucedida depende de quão melhor é capaz de simular as características do epitélio intestinal *in vivo*, no entanto ainda não há um único sistema capaz de agrupar todas as características. No que tange aos modelos de cultura celular, existem diversas vantagens em introduzi-las como modelo experimental, dentre elas: o controle do ambiente, a homogeneidade da amostra, quando comparada ao uso de animais em experimentos, e a economia. Com a implantação das Comissões de ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA), a cultura de célula é o principal modelo alternativo para a substituição ao uso dos animais em experimentos de pesquisa. Os modelos em cultura celular podem ser facilmente cultivados em laboratórios e visam mimetizar o epitélio intestinal dos seres humanos. Ao contrário dos enterócitos, as células derivadas de carcinomas humanos são imortalizadas, crescem rapidamente e indefinidamente, atingindo a confluência mais rapidamente quando comparadas as células primárias. As diversas linhagens de células, após um determinado período de crescimento, em condições específicas, se diferenciam morfológica e funcionalmente em enterócitos (Tabela 4).



**Tabela 4-** Modelos de cultura celular mais utilizado para estimar o transporte de substâncias (Adaptado de BALIMANE, CHONG; MORRISON, 2000)

<b>Linhagem celular</b>	<b>Espécie/Tecido de origem</b>	<b>Tipo celular</b>
<b>Caco-2</b>	Humano/Cólon	Epitelial
<b>HT-29</b>	Humano/Cólon	Epitelial
<b>T-84</b>	Humano/Cólon	Epitelial
<b>MDCK</b>	Cão/Rim	Epitelial
<b>LLC-PK1</b>	Porco/Rim	Epitelial
<b>MKN-28</b>	Humano/gástrico	Epitelial

Os modelos baseados em segmentos de tecidos animais também têm sido usados desde a década de 1950 para estudar o mecanismo de absorção de nutrientes a partir do intestino. Em 1961, Quastel, publicou as primeiras evidências sobre a captação de glicose contra um gradiente de concentração, impulsionaram estudos sobre os mecanismos envolvendo tecidos extraídos de partir do intestino de animais (BALIMANE, CHONG; MORRISON, 2000).

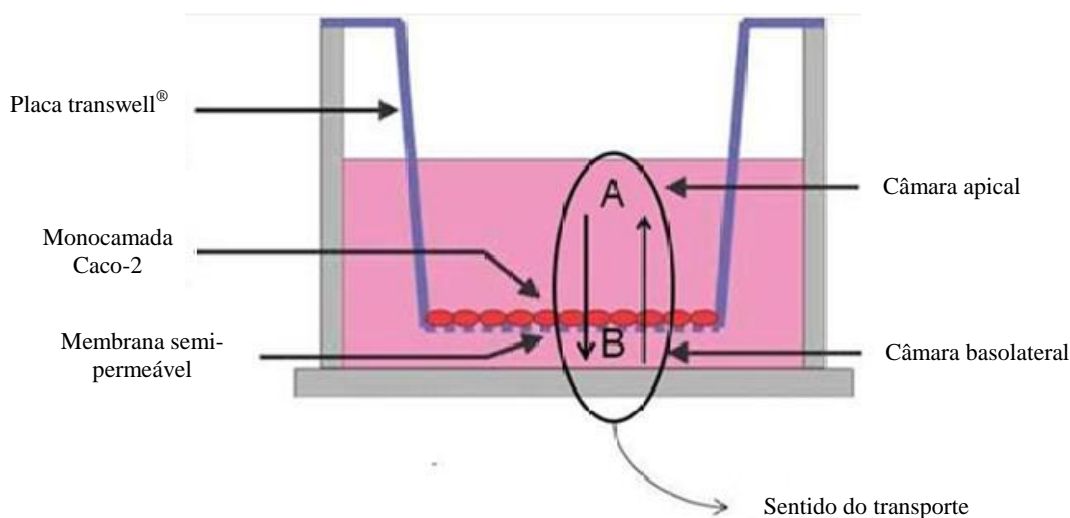
A obtenção de tecidos humanos viáveis para estudos de permeabilidade em uma base regular é muito raro. Por isto, o epitélio intestinal de diversas espécies de animais já foi testado, no entanto, o porco tem sido o animal mais utilizado, devido a suas similaridades anatômicas e biológicas ao intestino humano (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007). A viabilidade dos tecidos extraídos é bastante crítica, pois os mesmos são desprovidos de fornecimento de sangue direto e precisa de oxigenação constante.

Balimane e colaboradores (2000) descreveram a utilização de segmentos de intestino invertido para avaliação da absorção. Segundo eles, esta técnica foi descrita inicialmente na década de 50 para estudar o transporte de açúcares e aminoácidos da porção mucosa para a parte serosa do intestino. Este modelo é ideal para o estudo de mecanismos de transporte de fármacos, assim como, absorção passiva, transporte ativo, além da cinética de transporte na presença e ausência de glicoproteínas-P. Os segmentos intestinais invertidos são geralmente extraídos do intestino delgado de ratos e necessitam de cuidados durante a sua inversão, visando evitar danos morfológicos. Devido à ausência de sangue e nervos, estes tecidos apresentam reduzida viabilidade. Esta técnica, comparativamente aos modelos com células Caco-2, mostrou-se mais adequada aos estudos de transporte paracelular de fármacos (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

O uso de segmentos intestinais também é um método capaz de avaliar a absorção utilizando segmentos intestinais. Esta técnica consiste na determinação do fluxo do composto através de segmento intestinal animal de tamanho apropriado, isolado e contido em equipamento adequado. Lambert e colaboradores (1997) realizam experimento com 75 cm de intestino delgado proximal e confirmaram a utilização desta técnica como adequada ao estudo da absorção de compostos. Essa técnica é ideal para estudar a diferença na absorção de fármacos em várias regiões intestinais. Pode-se avaliar a permeabilidade utilizando tecido intestinal humano, ou tecido animal de diferentes espécies, efetuando as correções pertinentes. Como outros métodos que empregam tecidos, eles apresentam como desvantagens a falta de sangue e nervos, a restrita viabilidade dos tecidos, além da dificuldade de preparação que pode ocasionar danos morfológicos (BALIMANE *et al.*, 2000).

As células imortalizadas como as células Caco-2 são um bom modelo para a observação de transporte transcelular passivo e paracelular (BALIMANE; CHONG, 2005), no entanto existem algumas diferenças entre elas e as células epiteliais normais, por exemplo, na produção de citocinas e expressão de receptores de citocina (ALDHOUS *et al.*, 2001) (Figura 15). Além disso, as células Caco-2 subexpressam transportadores e enzimas do metabolismo em relação ao tecido *in vivo*, excluindo potencialmente alguns mecanismos cruciais para a absorção de algumas substâncias. Assim, devido às limitações das linhas celulares

imortalizadas intestinais, muitos estudos têm se concentrado no uso de células humanas epiteliais intestinais primárias (hInEpCs) como um modelo baseado em células mais fisiologicamente relevante (ALDHOUS *et al.*, 2001; LAHAR *et al.*, 2011). No entanto, as ações de manutenção dos estoques dessas células são bastante difíceis devido a carência de doadores e a limitação da baixa viabilidade em cultura. Recentemente, estas células primárias hInEpCs se tornaram disponíveis comercialmente, o que aumenta a conveniência de obtenção de reservas de células primárias. Os relatos sugerem que estas células hInEpCs primárias têm a capacidade de formar monocamadas com junções oclusivas e expressam marcadores epiteliais gerais, como citoqueratinas 8 e 18 (BOSCH *et al.*, 1988). No entanto, pouca caracterização tem sido feita em relação a expressão de marcadores específicos de cada tipo de célula ou da função de transporte intestinal. Além disso, outros esforços em possibilitar o aumento do tempo de vida das culturas primárias e melhorar as condições fisiológicas levaram ao desenvolvimento de modelos tridimensionais (3D) do epitélio intestinal, através da utilização de células-tronco intestinais primárias ou diferenciação dirigida de células-tronco pluripotentes. As células-tronco têm a capacidade de autorrenovação e diferenciarem em diversas linhagens de células que compõem o tecido específico desejado, tais como as células estaminais intestinais, que são responsáveis pela a auto- renovação do epitélio intestinal, e têm sido utilizadas no desenvolvimento de modelos 3D intestinais (SATO *et al.*, 2009).



**Figura 15-** Estudos de transporte bidirecional utilizando células Caco-2 em placas transwell® (Disponível em: <http://www.xenoblis.com/services/absorption/caco-2-permeability/>)

## 2.12 Locais de absorção das antocianinas

Há alguns relatos na literatura sobre o assunto, no entanto não existe ainda uma definição clara nos possíveis locais de absorção das antocianinas, somente hipóteses. Para 90% dos compostos o local preferencial de absorção é no epitélio intestinal. Diferente dos demais compostos as antocianinas tem características estruturais específicas que permitem que as mesmas possam ser encontradas em diferentes locais do organismo em diferentes formas estruturais (KALT *et al.*, 2008). Por esta razão, há relatos de sua presença e absorção e metabolismo nos epitélios da cavidade oral, do estômago e do intestino delgado. E ainda há trabalhos que sugerem a ocorrência de elevado processo de metabolização das mesmas pelas bactérias do cólon intestinal, e posterior absorção dos seus metabólitos e redistribuição.

Um estudo realizado em porcos alimentados com rações suplementadas com mirtilo por 4 semanas, verificou que apesar das antocianinas não terem sido detectadas no plasma ou urina dos animais em jejum, foram detectadas antocianinas intactas no fígado, olhos, córtex e cerebelo. Estes resultados sugeriram que as antocianinas podem acumular-se em tecidos, incluindo tecidos superiores e barreira hematoencefálica. (KALT *et al.*, 2008), comprovando que o pH do meio pode determinar sua permanência ou não nos compartimentos fisiológicos.

Em um estudo realizado por Mallery e colaboradores (2011) avaliou-se a presença de antocianinas e seus metabólitos na cavidade oral de 10 voluntários entre 19 e 61 anos, os quais foram submetidos a lavagens bucais com extrato de framboesa preta. Os resultados mostraram que foram detectados na saliva, o metabólito microbiano da Cy-3-O-glc, o ácido protocateico, e conjugados glicuronilados de antocianinas, sendo os resultados consistentes com a absorção celular e metabolismo de fase II ao nível da cavidade oral. No entanto, nesse estudo, os níveis sistêmicos destes compostos não foram determinados, não sendo possível a previsão do potencial direto de biodisponibilidade. Ademais, sabe-se que o alimento permanecer por um período de tempo reduzido nesta cavidade, diminuindo a probabilidade de ocorrência de absorção.

O estômago tem sido relatado como um possível local de absorção das antocianinas (PASSAMONTI *et al.*, 2003). Talavera e colaboradores (2003) estudaram a absorção gástrica de três formas glicosiladas da cianidina (glicose, galactose e rutinose) e da malvidina-3-O-glicosídeo, através da administração direta destes compostos no estômago de ratos, utilizando um modelo gástrico *in situ*. Os autores demonstraram que uma proporção superior a 20% das antocianinas monoglicosiladas foi absorvida rapidamente não importando a aglicona. Este estudo também demonstrou haver uma relação direta entre o tamanho do açúcar e sua absorção, já que a absorção da cianidina 3-O-rutinosídeo foi três vezes inferior à das demais formas. Além disso, Passamonti e colaboradores (2002) verificaram uma possível relação entre o transportador bilitranslocase, que é um transportador membranar de anion expresso no domínio sinusoidal do plasma de membrana do fígado e nas células epiteliais da mucosa gástrica. Os seus substratos encontrados foram: a sulfobromoftaleína, a bilirrubina, e o ácido nicotínico. Ademais, este estudo identificou uma nova classe de substratos para a bilitranslocase, ou seja, as antocianinas. Dezesete dos 20 compostos testados se comportaram como inibidores competitivos da atividade de transporte bilitranslocase (KI ¼1: 4-22IM). Sua relação estrutura-atividade revelou que as antocianinas mono e di-glicosiladas são melhores ligantes do que as agliconas correspondentes. Além disso, a primeira interação das antocianinas com o transportador ocorre através de unidades hidrofílicas, pela a fração 3-glicosídeo do anel B para as monoglicosiladas, e através da posição 5 do anel A para os diglicosídeos, e quer através do anel A e B para as agliconas. Estes achados sugeriram que o transportador bilitranslocase podem desempenhar um papel na biodisponibilidade de antocianinas.

Como relatos anteriores indicavam a presença destes transportadores no epitélio gástrico humano, Passamonti e colaboradores (2003), com o objetivo de verificar experimentalmente esta relação, realizaram experimentos com ratos wister que buscava verificar se as antocianinas seriam capazes de atravessar a mucosa gástrica. Esta hipótese foi confirmada, permitindo a detecção e quantificação de antocianinas tanto na circulação sistêmica quanto na veia porta. Estes dados foram na mesma ordem de grandeza que as relatadas em estudos com seres humanos que receberam quantidades comparáveis por kg de peso corpóreo, mas confirmam que a biodisponibilidade em antocianina em mamíferos é limitada.

Em outro estudo, He e colaboradores (2009) relataram que experimentos realizados com ratos indicaram a presença de antocianinas no tecido do estômago após a ingestão de

framboesa, indicando que o estômago seria o primeiro local de absorção, seguido do intestino delgado.

Faria e colaboradores (2009) investigaram a absorção de antocianinas em células Caco-2 e a relação da expressão dos transportadores de glicose 2 e 5 e transportador de glicose dependente de sódio (SGLT), por RTq-PCR. Verificaram que os transportadores de glicose GLUT2 revelaram um aumento (60%) de sua expressão em células Caco-2 pré-tratadas com as antocianinas em comparação com os controles.

Fernandes e colaboradores (2012) propuseram um modelo *in vitro* de células diferenciadas de adenocarcinoma do estômago (MKN-28), como barreira gástrica para o estudo do transporte de ACNs. Neste estudo, após 7 dias de cultivo em placas Transwell, as células foram avaliadas quanto a integridade da monocamada, através da medida da Resistência transepitelial e através de ensio de imunofluorescência para atestar a presença das ocludinas nas células, as quais estão associadas a manutenção da membrana. Os resultados demonstraram que as antocianinas foram capazes de atravessar as membranas apical e basolateral das células MKN-28 de forma tempo- dependente e provavelmente por mecanismo de transporte saturável. As células MKN -28 já havia sido proposta como modelo de barreira para estudar as drogas anti- inflamatórias não esteroidais e disfunção da barreira epitelial gástrica (OSHIMA; MIWA; JOHN, 2008).

Matuschek e colaboradores (2006) invetigaram a absorção de antocianinas utilizando segmentos intestinais de duodeno, jejuno, íleo e colon de ratos e verificaram que a maior absorção de ACNs ocorreu em câmaras com tecido de jejuno (taxa máxima de absorção de  $55.3 \pm 7.6$  %). A menor absorção ocorreu com tecido duodenal ( $10.4 \pm 7.6$  %) e sem absorção quando foram utilizados tecidos do íleo ou cólon. Este estudo demonstrou pela primeira vez que a absorção de ACN em ratos ocorre predominantemente no jejuno. Tsuda e colaboradores (1999) verificaram que quando os ratos foram tratados com dose oral de cianidina-3-*O*-glicosídeo, a forma glicosilada foi detectada rapidamente no plasma, enquanto a forma aglicona foi encontrada no jejuno, o que sugeriu ser o intestino delgado também um local de absorção. Outro estudo realizado por Miyazawa e colaboradores (1999) verificaram o aumento dos níveis plasmáticos de cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3,5-*O*-diglicosídeo após a ingestão de frutas vermelhas, em ratos e humanos, após 15 e 30 minutos respectivamente. Ademais, Tavalera e colaboradores (2004) realizaram estudo e demonstraram que os glicosídeos das antocianinas são rápido e eficientemente absorvidos a partir do intestino delgado. Além disso, que as antocianinas são rapidamente metabolizadas e excretadas para a bÍlis e urina como glicósídeos intactos, bem como as formas e derivados metilados glucuronidados.

Assim, há grandes evidências de que as antocianinas após sua ingestão possam sofrer algum tipo inicial de metabolização na mucoso oral (MALLERY *et al.*, 2011), no entanto, como o tempo de permanência do alimento (antocianinas) é bastante reduzido, pouco impacto terá na sua biodisponibilidade.

### **2.13 Fatores que afetam a absorção**

A biodisponibilidade e absorção das antocininas dependem tanto das características da matriz de alimentos, das condições fisiológicas encontradas nos vários compartimentos do trato GI (incluindo as concentrações de enzima e pH), das propriedades físico-químicas dos próprios compostos: equilíbrio hidrofílicidade/lipofílicidade, fundamental para promover sua solubilização na fase aquosa e transposição das membranas dos epitélios de absorção, bem como o grau de glicosilação e acetilação.

As características da matriz são de fundamental importância, mas quase sempre negligenciadas. Os principais componentes dos alimentos são proteínas, carboidratos, fibras e gordura, e suas interações com as antocianinas devem ser consideradas nos estudos de bioacessibilidade, já que podem ocorrer reações químicas (tais como oxidação/redução ou complexação), reações bioquímicas (interação enzima/substrato), ou restrições físicas (difusão).

Os compostos fenólicos podem apresentar forte afinidade com proteínas salivares humana, tais como a prolina e histidina, formando interações não covalentes e covalentes, dependendo do tamanho do composto fenólico (DE FREITAS; MATEUS, 2001). Os compostos fenólicos (tais como taninos) de peso molecular elevado podem também interagir fortemente com fibras e proteínas, mas a sua afinidade está relacionada com o seu tamanho e a sua solubilidade em água. Os taninos têm a capacidade de inibir enzimas ligadas ao metabolismo de carboidratos ( $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidases), de lípidos (lipase pancreática e gástrica) e de proteínas (tripsina e proteases diversas), podendo também complexar as proteínas da dieta que deixam de estar acessíveis às proteases (McDougall *et al.*, 2005b). No tocante as antocianinas, diversos componentes da dieta ou da matriz alimentar também pode desempenhar um papel na absorção de antocianinas.

O Álcool foi proposto como fator que impacta na absorção de flavonoides. Inicialmente, em estudo proposto com voluntários, os mesmos receberam vinho tinto e vinho tinto desalcoolidado com uma dose semelhante e os resultados indicaram não haver diferença na absorção aparente (BUB *et al.*, 2001). No entanto, outro estudo realizado utilizando uma dose oral única de antocianinas foi administrada a partir do vinho tinto e outra do suco de uva para seres humanos e verificou-se que a excreção urinária total de antocianina foi significativamente mais elevada com a ingestão do suco comparada a ingestão de vinho tinto (0,23 vs. 0,18%) (FRANK *et al.*, 2003).

Faria e colaboradores (2009) também observaram que a exposição crônica do epitélio intestinal a antocianinas favorece a sua absorção.

Podswdek e colaboradores (2014) estudaram a estabilidade das antocianinas durante a digestão gastrointestinal e verificaram que a estrutura e a matriz (repolho vermelho interno x extrato rico em antocianina) nas quais as antocianinas se encontram, determinaram a sua maior recuperação. Ademais, verificaram que as condições gástricas provocaram uma liberação significativa das antocianinas da matriz alimentícia. Em frutas e legumes, as antocianinas podem estar ligadas a hidratos de carbono, proteínas e paredes celulares ou outros compostos fenólicos por ligações covalentes, de hidrogênio ou interações hidrofóbicas e hidrofílicas, resultando num aumento da estabilidade das antocianinas durante a digestão.

O conceito de pH-partição é muito relevante para o estudo de bioacessibilidade e absorção oral, pois baseia-se no transporte das formas não ionizadas através das membranas das células epiteliais do TGI. A dissociação de um composto depende necessariamente dos seus valores de pKa e do pH do meio, visto estar diretamente relacionado a solubilidade do composto e portanto, com a sua dissolução no meio fisiológico (Tabela 5). Se o composto estiver em um pH acima do pKa para ácidos fracos e abaixo do pKa para bases fracas, sua solubilidade aumentará em um fator de 10 para cada unidade de pH (STORPIRTIS *et al.*, 2009). Desta forma, no que diz respeito às antocianinas, o conhecimento dos seus valores de pKa e do pH do meio determinam a forma estrutural, portanto como ela se apresentará. Este fato permitirá sua maior facilidade para entrar em solução e alcançar seu sítio de absorção. Pina e colaboradores relataram que as antocianinas monoglicosiladas e diglicosiladas apresentam valores de pKa de hidratação de aproximadamente 3 e 2, respectivamente. No entanto, no seu local de absorção, a forma estrutural deve ser preferencialmente não ionizada, em se tratando de transporte passivo pela membrana plasmática. No entanto, já há relatos de que as antocianinas poderiam ser absorvidas através de transportadores de glicose



(GLUT2)(FARIA *et al.*, 2009) e possivelmente o cotransportador de Na<sup>+</sup>/glicose (SGLT1)(HOLLMAN *et al.*, 1999), o que indicaria a possibilidade das mesmas serem absorvidas na sua forma ionizada (cátion flavílio).

**Tabela 5** – Valores de pKa de hidratação de algumas antocianinas

<b>Antocianinas</b>	<b>pKa</b>	<b>Referência</b>
<b>Cianidina 3-glicosídeo</b>	3.17	Pina e colaboradores, 2012
<b>Cianidina 3,5 diglicosídeo</b>	2.08	Pina e colaboradores, 2012
<b>Perlagoidina 3-glicosídeo</b>	2.98	Pina e colaboradores, 2012
<b>Malvidina 3-glicosídeo</b>	3.70	Pina e colaboradores, 2012

O maior desafio para a absorção das antocianinas no intestino delgado é o seu pH alcalino, pois nestas condições ocorre a transformação do íon flavílio a forma chalcona e pseudobase carbinol. Em valores de pH maior que 7, as antocianinas são degradadas em função da sua estrutura (CASTANEDA-OVANDO; PACHECO-HERNANDEZ; PAEZ-HERNANDEZ, 2009). Woodward e colaboradores (2009) relataram que a degradação de cianidina 3 - glicosídeo durante a incubação em tampão fisiológico (pH 7,4) ao longo de 24 h foi associada com a formação de protocatequina e aldeído floroglucinol, que respondeu por 12% e 3 % da concentração inicial, respectivamente. Por outro lado, Bermudez -Soto e colaboradores (2007) sugeriram que as interações com as enzimas digestivas não foram responsáveis por antocianinas perdas durante a digestão *in vitro*, ressaltando ainda mais a importância no pH do meio como fator determinante na degradação das antocianinas.

## 2.14 Absorção e biodisponibilidade das antocianinas

Na farmacologia a biodisponibilidade é definida como a proporção que determinada substância chega a circulação sanguínea, a fim de atingir o local de ação, na quantidade e velocidades adequadas de modo a assegurar sua eficácia (STORPIRTIS; 2009). Alguns autores afirmam que a definição farmacológica de biodisponibilidade não pode ser aplicada às antocianinas, porque a bioutilização e absorção dos nutrientes ocorrem em função do estado nutricional e do estado fisiológico do indivíduo. Por conseguinte, entende-se a biodisponibilidade como a proporção da substância administrada capaz de ser absorvida e ficar disponível para utilização ou armazenamento.

Como o organismo humano não apresenta mecanismos específicos para o acúmulo ou retenção dos compostos fenólicos, ao contrário do que acontece com algumas vitaminas e minerais, eles são reconhecidos e tratados da mesma forma que os xenobióticos<sup>4</sup>, sendo metabolizados para serem rapidamente excretados. Além disso, existem uma série de fatores capazes de influenciar nos resultados da determinação da biodisponibilidade de um composto. Estes fatores incluem a natureza do composto, as ligações moleculares existentes, a matriz do alimento, a quantidade ingerida, efeitos da absorção e bioconversão, estado nutricional, fatores genéticos, fatores relacionados a característica de cada indivíduo e interações com outras substâncias (GIORI, 2010).

<sup>4</sup> NOTA: **Xenobióticos** (do grego, *xenos* = estranho) são compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico. Podem ser encontrados num organismo, mas não são normalmente produzidos ou esperados existir nesse organismo. O termo é também aplicado a substâncias presentes em concentrações muito mais elevadas que os níveis normais.

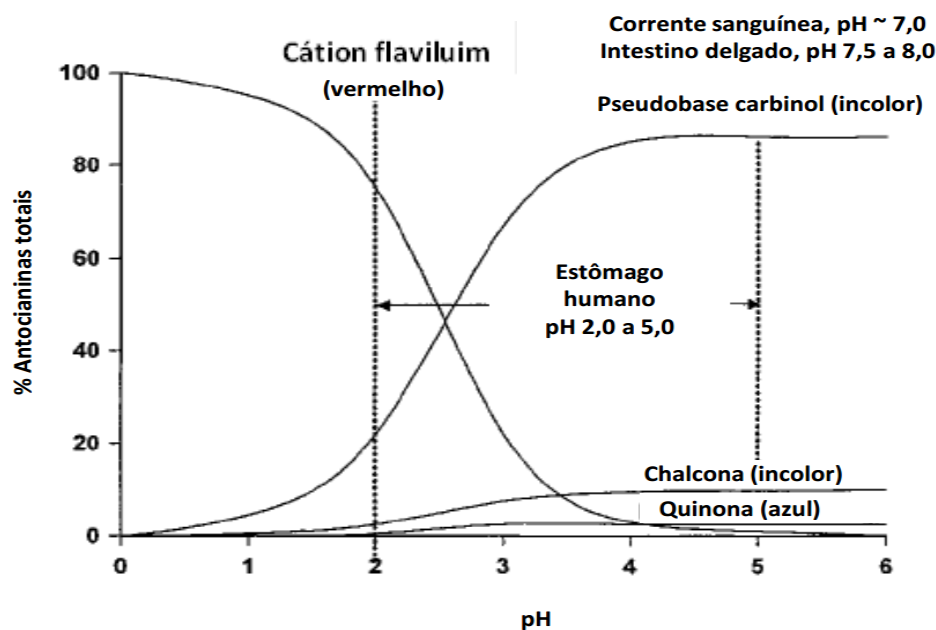
Os compostos fenólicos não podem ser absorvidos na sua forma nativa (aglicona + açúcar) e necessitam ser hidrolisados pelas enzimas intestinais ou pela microbiota do cólon antes da absorção. As antocianinas representam uma exceção, porque podem ser absorvidas intactas como glicosídeos e detectadas na circulação (NURMI *et al.*, 2009). A explicação para isso pode estar na instabilidade da forma de aglicona ou em alguns mecanismos específicos de absorção ou metabolismo de antocianinas, como muitos estudos tem sugerido (PASSAMONTI *et al.*, 2002).

Pesquisas recentes mostraram que antocianinas com diferentes agliconas e tipos de açúcares podem apresentar respostas muito diferentes em termos de sua biodisponibilidade e potenciais efeitos na saúde. As ACNs aciladas pode comportar-se de forma bastante diferente de ACNs não aciladas em termos da sua estabilidade e biodisponibilidade (FERNANDES *et al.*, 2012).

Entre os compostos fenólicos, Manach e colaboradores (2005) afirmaram, após a revisão de 97 estudos de biodisponibilidade destes compostos, que o ácido gálico e as isoflavonas foram os melhores absorvidos, seguidos pelas catequinas, flavanonas e glicosídeos de quercetina, mas com diferentes cinéticas. Os compostos menos absorvidos foram as proantocianidinas, as catequinas e as antocianinas. Desta forma, entre os compostos fenólicos, as antocianinas são compostos que apresentam baixa biodisponibilidade, embora estejam bastante abundantes na nossa dieta. A maioria dos estudos relataram valores baixos em relação a excreção urinária, variando entre 0,004% a 0,1% do consumo inicial (WU *et al.*, 2006). Assim, verifica-se que a biodisponibilidade é muito diferente entre os compostos fenólicos, de modo que os mais abundantes em nossa dieta não são necessariamente os que conduzem a maiores concentrações de metabólitos ativos nos tecidos alvo.

Embora a biodisponibilidade das antocianinas pareça baixa, ela pode estar sendo subestimada por 2 motivos principais, ou seja, os importantes metabólicos podem estar sendo ignorados ou os métodos utilizados podem não ser precisos para a análise dos metabólitos das antocianinas. Sabe-se que diferentes formas químicas das antocianinas estão presentes em equilíbrio, dependendo do pH. A maioria das metodologias de análises são realizadas, utilizando detecção de luz ultravioleta-visível, com base na conversão completa de todas as formas químicas de antocianinas em um cátion flavílium colorido após a acidificação. No entanto, é possível que algumas formas existentes em neutro pH não tenham sido convertidas a forma catiônica, devido a formação de outras ligações ou reações químicas com outros componentes do plasma ou urina. (MANACH *et al.*, 2005).

Os processos de absorção estão relacionados à permeação de compostos através de membranas biológicas sob influência das características físico-químicas de ambos. O transporte de substâncias para o interior da membrana intestinal é complexo e dinâmico. Em termos estruturais, as antocianinas não apresentam características favoráveis a sua passagem pelas membranas dos enterócitos, ou de qualquer outra membrana plasmática, a fim de serem absorvidas. Tanto a presença do íon *flavilium* como a de seus substituintes como os açúcares, conferem a estes compostos alta polaridade, característica que dificultada seu transporte passivo transcelular, o mais comum dos mecanismos de transporte. No entanto, cabe ressaltar que na fração aglicona, o cátion flavílium só se apresenta nesta forma, quando a antocianidina se encontra em pH ácido (< 2) e portanto protonada, característica fisiológica compatível com o ambiente ácido do estômago. Teoricamente, em pH neutro para básico, a molécula estaria hidratada e não ionizada, facilitando sua passagem pelas membranas, ambiente favorecido pelo pH intestinal (em torno de 6.5-7.0), no entanto não é o que se observa estruturalmente, pois neste pH ocorre a formação da base carbitol e chalcona (incolor) (Figura 16) (LOPES, *et al.*, 2007).



**Figura 16.** Efeito do pH no equilíbrio químico de antocianinas monoglicosiladas, não aciladas (Adaptado de FERNANDES *et al.*, 2012)

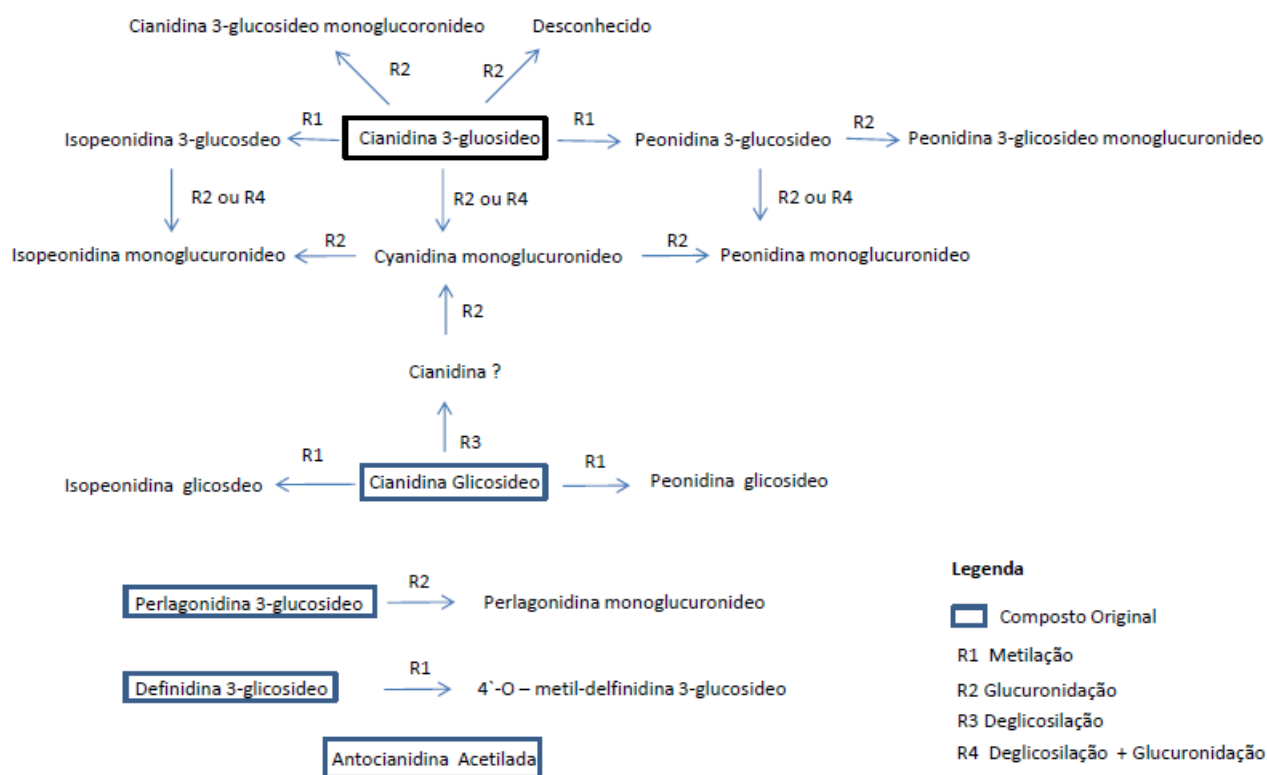
Além disso, estudos de biodisponibilidade mostraram que as antocianinas são detectadas no plasma cerca de 0,5-3 horas após a ingestão (BITSCH *et al.*, 2004; VITAGLIONE *et al.*, 2007; MILBURY *et al.*, 2010), o que sugere ser o epitélio gástrico o primeiro local de absorção das mesmas ou que as formas que apresentam atividade biológica, não são aquelas observadas na forma protonada, portanto não estão sendo identificadas corretamente e quantificadas.

## 2.15 Metabolismo das antocianinas

As reações de biotransformação frequentemente têm a função de aumentar a hidrofiliabilidade dos compostos para torná-los mais passíveis de excreção renal. As reações de biotransformação são classicamente divididas em dois tipos: as reações de oxidação/redução (fase I) e de conjugação/hidrólise (fase II). Tipicamente, as reações de oxidação transformam o composto em metabólitos mais hidrofílicos pela adição ou exposição de grupos funcionais polares, como grupos hidroxila (-OH), tiol (-SH) ou amina (-NH<sub>2</sub>). As reações de conjugação (fase II) modificam os compostos através da ligação de grupos hidrofílicos, como o ácido glicurônico, criando conjugados mais polares. É importante assinalar que essas reações de conjugação ocorrem independentemente das reações de oxidação/redução e que as enzimas envolvidas nas reações de oxidação/redução e de conjugação/hidrólise frequentemente competem pelos substratos. As reações de oxidação envolvem enzimas associadas a membranas, que são expressas no retículo endoplasmático (RE) dos hepatócitos e, em menor grau, das células de outros tecidos. As enzimas que catalisam essas reações de fase I são tipicamente oxidases; essas enzimas são, em sua maioria, hemoproteínas monooxigenases da classe do citocromo P450. As enzimas P450 (algumas vezes abreviadas por CYP) são também conhecidas como oxidases de função mista microsômicas. Essas enzimas estão envolvidas no metabolismo de cerca de 75% de todos os fármacos atualmente utilizados. As reações de conjugação e de hidrólise proporcionam um segundo conjunto de mecanismos destinados a modificar os compostos para sua excreção. Os substratos dessas reações incluem tanto

metabólitos de reações de oxidação (por exemplo, epóxidos) quanto compostos que já contêm grupos químicos apropriados para conjugação, como hidroxila (-OH), amina (-NH<sub>2</sub>) ou carboxila (-COOH). Esses substratos são acoplados a metabólitos endógenos (por exemplo, ácido glicurônico e seus derivados, ácido sulfúrico, ácido acético, aminoácidos e o tripeptídeo glutationa) por enzimas de transferência. As enzimas de conjugação e de hidrólise localizam-se tanto no citosol quanto no retículo endoplasmático dos hepatócitos (e de outros tecidos). Na maioria dos casos, o processo de conjugação torna o fármaco mais polar. Praticamente todos os produtos conjugados são farmacologicamente inativos, com algumas exceções importantes. (KATZUNG *et al.*, 2009).

O conhecimento acumulado nos últimos anos tem indicado que os principais metabólitos das antocianinas que são recuperados na urina são os glucuronados e/ou conjugados metilados (TIAN *et al.*, 2006). Além destes, os sulfatos conjugados, outra forma comum de metabólitos encontrados a partir de outros flavonóides, foram apenas relatados como metabólitos de antocianinas em outro estudo e em baixas concentrações (FELGINES *et al.*, 2003). As enzimas de biotransformação envolvidas incluem a UDP-glicuronil transferase (UDPGT), UDP-glicuronil desidrogenase e catecol-O-metiltransferase (COMT). Estas enzimas encontram-se no intestino delgado, fígado ou rim. Dependendo da estrutura química, as antocianinas podem existir como principalmente formas nativas ou seus metabólitos no sangue e na urina, enquanto que a maioria dos outros flavonóides é geralmente recuperado na forma de metabólitos. Os metabólitos glucuronidados foram descritos pela primeira vez por Wu e colaboradores, 2002, em estudo da absorção e metabolismo de antocianinas em sabugueiro em mulheres idosas. Foram detectados dos metabólitos Peonodina monoglicuronideo e cianidina 3- monoglicuronideo e a partir daí as reações de glicuronidação têm sido descritas como o principal mecanismo de metabolismo das antocianinas. Possíveis vias foram propostas para explicar a formação de monoglicuronideos da cianidina (Figura 17). A primeira possibilidade é que o glicuronídeo é formado diretamente a partir da Cianidina-3-glicosídeo pela ação da UDP-glicosil desidrogenase e a segunda requer a hidrólise da cianonidina 3-glicosídeos a cianidina. No entanto, as evidências mostram que a segunda possibilidade é a mais provavelmente, se não a única via (WU *et al.*, 2006).



**Figura 17-** Vias metabólicas propostas para as antocianinas (Adaptado de PRIOR & WU, 2006)

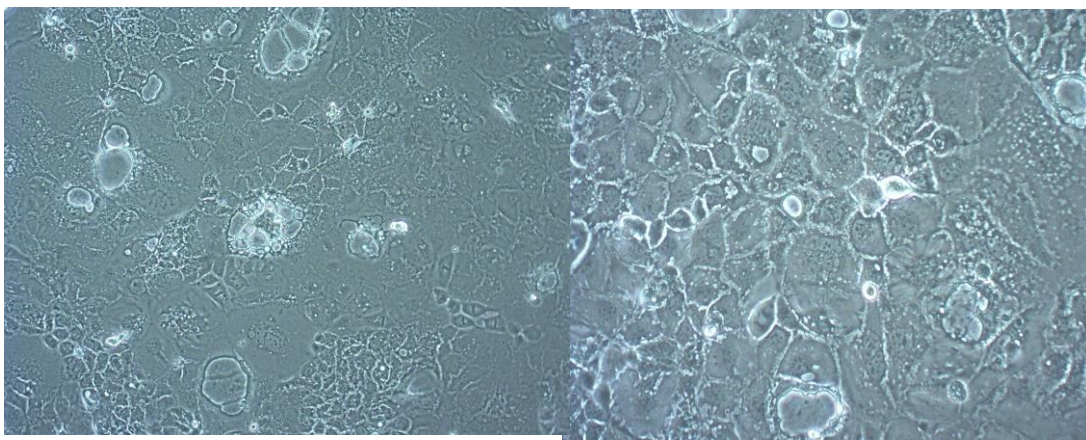
## 2.16 Cultura celular Caco-2

Na década de 70, foi criada uma coleção de células tumorais intestinais, com objetivo de estudar os mecanismos e terapias citostáticas deste tipo de câncer (Fogh *et al.*, 1977). No entanto, somente dez anos depois que a linhagem de células Caco-2 passou a ser utilizada para outras aplicações. Observou-se que este tipo celular apresentava uma diferenciação espontânea após longo período em cultura. Elas eram originalmente do epitélio colorretal de adenocarcinoma humana, entretanto, quando cultivadas sob condições específicas, se diferenciavam e adquiriam características morfológicas e bioquímicas, de modo que o seu fenótipo, morfológicamente e funcionalmente, se assemelhava aos enterócitos que revestem o intestino delgado (HIDALGO; RAUB; BORCHARDT, 1989). As células Caco-2 crescem em monocamada, apresentando uma morfologia cilíndrica polarizada, com microvilosidades do lado apical, expressam as *tight junctions* (junções oclusivas) entre as células adjacentes, expressam a atividade enzimática das hidrolases intestinais (sucralose-isomaltase, lactase, aminopeptidase N, dipeptidilpeptidase IV) (SAMBUI *et al.*, 2005), peptidases, esterases, a P-glicoproteína, os transportadores de captação para os aminoácidos, os ácidos biliares de ácidos carboxílicos, e glicose (SGL1, GLUT2 e GLUT%). Estas células estão comercialmente disponíveis através da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA).

Ao microscópio a cultura de células Caco-2 é heterogênea e mais comumente utilizadas não como células individuais, mas sim como uma monocamada confluenta em uma cultura de células de filtro de inserção (por exemplo, Transwell) (Figura 18). Quando cultivados neste formato, as células diferenciam-se para formar uma monocamada de células



epiteliais polarizadas que proporciona uma barreira física e bioquímica para a passagem de íons e pequenas moléculas. (ARTURSSON; BORCHARDT, 1997).



**Figura 18-** Imagens ao microscópio invertido da cultura celular Caco-2 na passagem 21 com confluência de 90% com objetivas de 10 X (esquerda) e de 20 X (direita).

### 2.17 Ensaios de Transporte com células Caco-2 e MKN-28

Yi e colaboradores (2006) avaliaram a absorção de antocianinas em mirtilo utilizando células intestinais humanas Caco-2 e os efeitos das diferentes agliconas, tipos de açúcares e estrutura química sobre a absorção *in vitro* de diferentes tipos de antocianinas. Este estudo verificou-se a possibilidade do transporte das antocianinas do mirtilo através das monocamadas de células Caco-2 embora a eficiência do transporte / absorção tenha sido relativamente baixo em comparação com outros polifenóis. A eficiência do transporte de antocianinas variou entre ~3-4 % (menos de 1% em delphinidina glicosídeo (Dp-3-O-glc). A Dp-3-O-glc apresentou a menor relação Eficiência de Transporte/Absorção e a malvidina 3-O-glicosídeo (Mv-3-O-glc) apresentou a maior relação Eficiência de transporte/absorção. Este estudo indicou que quanto maior o número de grupos hidroxilas livres e menor o número de grupamentos -OCH<sub>3</sub>, menor será a biodisponibilidade de antocianinas. Além disso, a cianidina-3-O-glicosídeo (Cy-3-O-glc) apresentou maior eficiência de transporte do que cianidina-3-O-galactosídeo (Cy-3-O-gal), e a peonidina-3-O-glicosídeo (Pn-3-O-glc) apresentou maior eficiência de transporte que a peonidina 3- galactosídeo ( Pn-3-O-gal ), indicando que as antocianinas baseadas em glicose ter maior biodisponibilidade do que as antocianinas baseadas em galactose.

Outro estudo realizado por Steinert e colaboradores (2008) investigou o potencial de absorção das antocianinas presentes na groselha preta (*Ribes nigrum* L.), através de ensaios de transporte com o sistema “Ussing Type Chambers” e verificaram o total desaparecimento das antocianinas no lado seroso, onde supostamente elas deveriam estar presentes após o transporte. Assim, os autores sugeriram que o transporte apical pode ocorrer a uma extensão muito maior do que a translocação através da membrana basolateral e que o metabolismo celular e a translocação através da membrana basolateral podem ser os principais determinantes da absorção e biodisponibilidade das ACNs.

Faria e colaboradores (2009) realizaram ensaio de transporte da malvidina 3-glicosídeo, isoladas de cascas de uva em Células Caco-2. Verificaram também que 1% de etanol pode impactar no seu transporte. Os resultados revelaram que o transporte deste composto representou valores de aproximadamente 1-2% para a ACN isolada e de 2-3% quando 1% de etanol estava associado a mesma. Outro achado importante neste trabalho, foi que os autores verificaram a expressão dos transportadores GLUT2, GLUT5 e SGLT1, no entanto somente o GLUT2 revelou aumento significativo comparado com o controle. Sua atividade foi então avaliada utilizando H<sup>3</sup>-2-deoxi-D- glicose (marcador radioativo), que reduziu sua afinidade pelo GLUT2 em presença da ACN. Este fato comprova haver competição entre a glicose e a ACN pelo receptor. Além disso, a exposição crônica (4 dias) das células Caco-2 a ACN produziu um aumento de 50% no transporte, quando comparado ao tratamento ao tempo de incubação de 2 horas (Tabela 6).

**Tabela 6-** Estudos de eficiência de transporte com antocianinas em culturas celulares

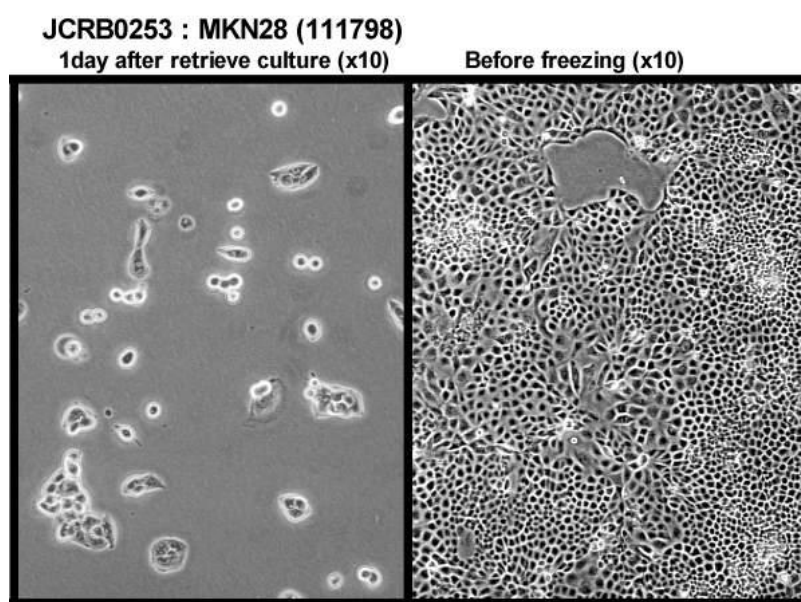
Ensaio de transporte	Fonte/ Alimento	Antocianinas	Valores	Referência
<b>Caco-2 em type chambers</b>	Groselha preta	Dp-3-O-glic.; Dp-3 rut.; Cy-3 glic.; Cy-3 rut	Não foram detectadas	Steinert e col. 2008
<b>Caco-2 (Transwell insert)</b>	Mirtilo	Dp,3 glic.; Cy-3 gal.; Cy 3-glic.; Pt-3 glic.; Pn-3 gal.; Pn-3 glic.; Mv 3 glic.	3-4% (del-3-glic.menor 1%)	Yi e colab. 2006
<b>Membrana semi-permeável de celulose Caco-2 C2BBel</b>	Maça (Jonaprinz, Jonagold, golden *, Mutzu *) morangos	Antocianinas totais Cy -3 glic.; Perl 3-glic.; perl 3 malonilglicose	Não foram detectadas Traços da perlag 3-glicosídeo	Bouayed, Hoffmann e Bohn, 2011 Kosinska-Cagnazzo ecolab. 2015
<b>Caco-2 (transwell insert)</b>	Antocianinas isoladas	Malvidina 3-glicosídeo (isolada de uvas) Delfinidina-3-glicosídeo, cianidina	1,77±0,36%	Faria e colaboradores, 2009
<b>MKN-28</b>	Antocianina isoladas	3-glicosídeo e malvidina 3-glicosídeo	Todas apresentaram 10(%)	Fernandes e colaboradores, 2012

## 2.18 Bioacessibilidade e transporte celular

Kosinska-Cagnazzo e colaboradores (2015) investigaram a bioacessibilidade e transporte em células Caco-2 de compostos fenólicos em morangos, entre estas antocianinas, através da simulação de digestão *in vitro* gástrica e pancreática e detectando apenas traços de antocianinas após o transporte, indicando que os valores após a absorção *in vitro* de antocianinas em matrizes alimentícias são ainda inferiores a 1% conforme relata Faria e colaboradores (2009).

## 2.19 Células MKN-28

As células MKN-28 são células de adenocarcinoma gástrico humano de uma mulher japonesa de 70 anos (Figura 19). Elas fazem parte de uma família de oito linhagens celulares (TMK-1, MKN-1, MKN-7, MKN-28, MKN-45, MKN-74, KATO-III e 39-HSC) de adenocarcinoma gástrico que têm sido caracterizadas morfológica e biologicamente no Japão, uma vez que este país apresenta alta incidência de câncer gástrico. As células MKN-1, MKN-7 e MKN-28 foram estabelecidos a partir de focos de metástases de gânglios. Já a células MKN-45 e MKN-74 são derivadas de metástases de fígado. Elas também se diferem por suas características histopatológicas, ou seja, do tipo intestinal (MKN-7, MKN-28 e MKN-74) e do tipo difuso (MKN-45, TMK-1, Kato- III and HSC-39). Podem ser adquiridas através da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA), no Banco de Células Japonês ou pela European Collection of Cell Cultures (ECACC), na Inglaterra.



**Figura 19-** Imagens ao microscópio invertido da cultura celular MKN-28 após um dia de plaqueamento (direita) e com confluência de 90%(esquerda), antes do congelamento, em objetiva de 10X. (Fonte: Disponível em: <http://cellbank.nibio.go.jp/legacy/celldata/jcrb0253.htm>. Acesso em: 10 de janeiro de 2015).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Amostras




##### 3.1.1.1 Amostras da 1ª etapa

Os frutos utilizados neste estudo foram: morango (*Fragaria vesca*) tamarilho (*Solanum betaceum*), framboesa (*Rubus idaeus*), amora (*Morus nigra*), Jamelão (*Syzygium cumini*), Guajiru (*Chrysobalanus ícaro*), Jabuticaba (*P. trunciflora*), Mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L e Jambo (*Syzygium malaccanese* (L.) Merryl et Ferry). As informações gerais sobre cada espécie, origem e parte utilizada na análise constam na tabela 7. Todas as análises antes e após a simulação de digestão *in vitro* foram realizadas em triplicata.

**Tabela 7-** Informações gerais sobre os frutos utilizados para a seleção dos melhores frutos após estudo de bioacessibilidade

FRUTOS	INFORMAÇÕES GERAIS
	Espécie (Nome científico): <i>Solanum betaceum</i> Nome popular: tamarilho Família Botânica: Solanaceae Origem: Andes (América do Sul) Procedência: Chile Local aquisição: Mercado varejista(Hortifruit) Parte usada: fruto interno
	Espécie (Nome científico): <i>Chrysobalanus ícaro</i> Nome popular: Guajuru, guajiru, abajiru, ajuru Família Botânica: Chrysobalanaceae Origem: Américas e África Ocidental Procedência: Região Norte Local aquisição: Embrapa Amazônia Oriental Parte usada: Casca
	Espécie (Nome científico): <i>Myrciaria jaboticaba</i> Nome popular: jabuticaba ou guapurú Família Botânica: Mirtaceae Origem: Nativa Mata Atlântica Procedência: Região sudeste Local aquisição: CEASA-RJ Parte usada: pó liofilizado da casca
	Espécie (Nome científico): <i>Fragaria vesca</i> Nome popular: morango Família Botânica: Rosaceae Origem: Europa e Américas Procedência: São Paulo Local aquisição: Mercado varejista(Hortifruit) Parte usada: fruto interno



FRUTOS	INFORMAÇÕES GERAIS
	<p>           Espécie (Nome científico): <i>Syzygium cumini</i> L.Skeels            Nome popular: jamelão            Família Botânica: Mirtaceae            Origem: Índia e Sri Lanka            Procedência: Rio de Janeiro            Local aquisição: CEASA-RJ            Parte usada: pó liofilizado da casca         </p>
	<p>           Espécie (Nome científico): <i>Vaccinium ashei</i>            Nome popular: mirtilo            Família Botânica: Ericaceae            Origem: Europa e América Norte            Procedência: Uruguai            Local aquisição: Mercado varejista (Hortifruit)            Parte usada: fruto inteiro         </p>
	<p>           Espécie (Nome científico): <i>Syzygium malaccanse</i> (L. Merryl et Ferry)            Nome popular: Jambo            Família Botânica: Mirtaceae            Origem: Ásia            Procedência: Região sudeste            Local aquisição: CEASA-RJ            Parte usada: pó liofilizado da casca         </p>
	<p>           Espécie (Nome científico): <i>Morus nigra</i>            Nome popular: amora            Família Botânica: Moráceas            Origem: Ásia            Procedência: México            Local aquisição: Mercado varejista (Hortifruit)            Parte usada: fruto interno         </p>

### 3.1.1.2 Amostras da 2ª etapa

Os pós foram obtidos das cascas dos frutos (Tabela 8) através do processo de secagem convectiva, utilizando um secador de camada convectiva desenvolvido pela Embrapa Agroindústria de Alimentos- RJ. As cascas das frutas foram separadas manualmente da polpa, colocadas em tabuleiros e submetidas a desidratação à temperatura de 60°C e velocidade do ar de 1m.s<sup>-1</sup> durante 22 horas. Após, as cascas secas foram desintegradas utilizando um moinho de bancada IKA e armazenadas em embalagens de alumínio e de polietileno à temperatura ambiente até a análise.



**Tabela 8-** Informações gerais sobre os frutos utilizados para o Estudo de transporte

FRUTOS	INFORMAÇÕES GERAIS
	<p>                     Espécie (Nome científico): <i>Myrciaria jaboticaba</i>                      Nome popular: jaboticaba ou guapuru                      Família Botânica: Mirtaceae                      Origem: Nativa Mata Atlântica                      Procedência: Região sudeste                      Local aquisição: CEASA-RJ                      Parte usada: pó obtido por secagem da casca                 </p>
	<p>                     Espécie (Nome científico): <i>Syzygium cumini</i> L.Skeels                      Nome popular: jamelão                      Família Botânica: Mirtaceae                      Origem: Índia e Sri Lanka                      Procedência: Rio de Janeiro                      Local aquisição: CEASA-RJ                      Parte usada: pó obtido por secagem da casca                 </p>
	<p>                     Espécie (Nome científico): <i>Syzygium malaccanese</i> (L. Merryl et Ferry)                      Nome popular: Jambo                      Família Botânica: Mirtaceae                      Origem: Ásia                      Procedência: Região sudeste                      Local aquisição: CEASA-RJ                      Parte usada: pó obtido por secagem da casca                 </p>

### 3.1.2 Reagentes das análises cromatográficas e Espectrometria de Massa

- Acetonitrila grau CLAE (TEDIA<sup>®</sup>)
- Metanol grau CLAE (TEDIA<sup>®</sup>)
- Ácido fórmico grau CLAE (TEDIA<sup>®</sup>, grau CLAE)
- Ar comprimido
- Água ultrapura (18,2MΩ – Milli-Q<sup>®</sup>)
- Padrão analítico de malvidina-3-O-glicosídeo (Extrasynthese- Genay, France)

### 3.1.3 Solventes da Digestão *in vitro*

- KCl sigmaultra Sigma-Aldrich<sup>®</sup>

- $\text{Na}_3\text{PO}_4$  sigmaultra Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- NaOH sigmaultra Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- Ureia sigmaultra Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- NaCl sigmaultra Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- $\text{CaCl}_2$  anidro Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- KSCN sigmaultra Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  sigmaultra Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- HCl suprapur Merk<sup>®</sup>
- Pepsina 1:10.000 Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- $\text{NaHCO}_3$  Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- $\alpha$ -amilase tipo VI-B Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- Mucina tipo II Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- Extrato de Bile Porcina Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- Pancreatina- Porcina Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- Lipase tipo II de pâncreas de suino Sigma-Aldrich<sup>®</sup>

### 3.1.4 Reagentes da Extração de antocianinas antes e após digestão *in vitro*

- Acetonitrila grau CLAE (TEDIA<sup>®</sup>)
- Metanol grau CLAE (TEDIA<sup>®</sup>)
- Ácido fórmico grau CLAE (TEDIA<sup>®</sup>, grau CLAE)
- Ar comprimido
- Água ultrapura (18,2 M $\Omega$ ) – Milli-Q<sup>®</sup>

### 3.1.5 Equipamentos da Digestão *in vitro*, Extração, Análises cromatográfica e Espectrometria de Massa

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) Waters<sup>®</sup> Alliance 2690/5 acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos (DAD) Waters<sup>®</sup> 2996
- Coluna  $\text{C}_{18}$  Symmetry<sup>®</sup> (100 mm x 4,6 mm; 2,4  $\mu\text{m}$ )
- UPLC (Sistema Dionex Ultimate 3000 Standard da Thermo Scientific<sup>®</sup> CA, USA)
- Coluna  $\text{C}_{18}$  LiChrospher<sup>™</sup> 100 RP-18, 5mm x 25 cm)
- Espectrômetro de Massa Synapt Waters<sup>™</sup> (Milford, MA, EUA) equipado com analisador Q-TOF (quadripolo com tempo de vôleo)
- Microcentrífuga Brandson modelo 2210
- Balança analítica BEL<sup>®</sup>
- Banho-maria com agitador orbital gyromax TM
- Moinho simples IKA<sup>®</sup> A11
- Pipetas automáticas Transferpette<sup>®</sup> 100-1000 $\mu\text{L}$ , 0,5-5 ml
- Sistema de purificação de água Milli-Q<sup>®</sup> A10 e Ellix<sup>®</sup>
- Pipetador automático com capacidade para 100 a 1000  $\mu\text{L}$  – Brand<sup>®</sup>
- Pipetador automático com capacidade para 0,5 a 5 mL – Brand<sup>®</sup>
- Balança analítica (0,1 mg) modelo 2104 – Bel Engineering<sup>®</sup>
- Agitador tipo vórtex modelo Genie 2 – Scientific Industries<sup>®</sup>
- Sistema de purificação de água modelo Ellix/Rios 5 e Milli-Q A10 – Millipore<sup>®</sup>

- Software de controle e aquisição de dados Empower<sup>®</sup> – Waters<sup>®</sup>
- Geladeira modelo DF45 - Eletrolux<sup>®</sup>
- pHmetro Bel<sup>®</sup>
- Banho ultrassônico Cleanears
- Unidade filtrante millex 0,22 µm da Millipore<sup>®</sup>

### 3.1.6 Insumos para o Cultivo celular e Ensaios de transporte

- Células CACO-2 - ATCC<sup>®</sup>
- Células MKN-28 (Cell Bank, Riken BioResource Center, Japão)
- Soro fetal bovino- Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- Meio básico de eagle modificado por dubelcco sem l-glutamina (Gibco)
- Tampão fosfato salino (PBS)
- Glutamax<sup>™</sup> 100x estéril (Gibco<sup>®</sup>) testado em cultura celular
- MEM, solução de aminoácidos não-essenciais (100x) m7145-100 ml
- Tripsina- EDTA 0,25% - Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- Solução salina balanceada Hank's (HBSS)- Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- Tris- HCl- Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- Ácido 2-morfolino etano sulfônico (MES) - Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- Solução antibiótico/ antimicótica (100 unidades/mL de penicilina, 100 g/mL de estreptomicina e 0,25 g/mL de anfotericina B)
- Corante azul de tripan testado em cultura celular- Sigma- Aldrich<sup>®</sup>
- Meio DMEM
- Meio RPMI 1640 Aqmedia - Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- Vermelho de fenol - Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- DMSO- reagentplus ≥ 99.5%- Sigma-Aldrich<sup>®</sup>

### 3.1.7 Equipamentos para o Cultivo celular e Ensaios de transporte

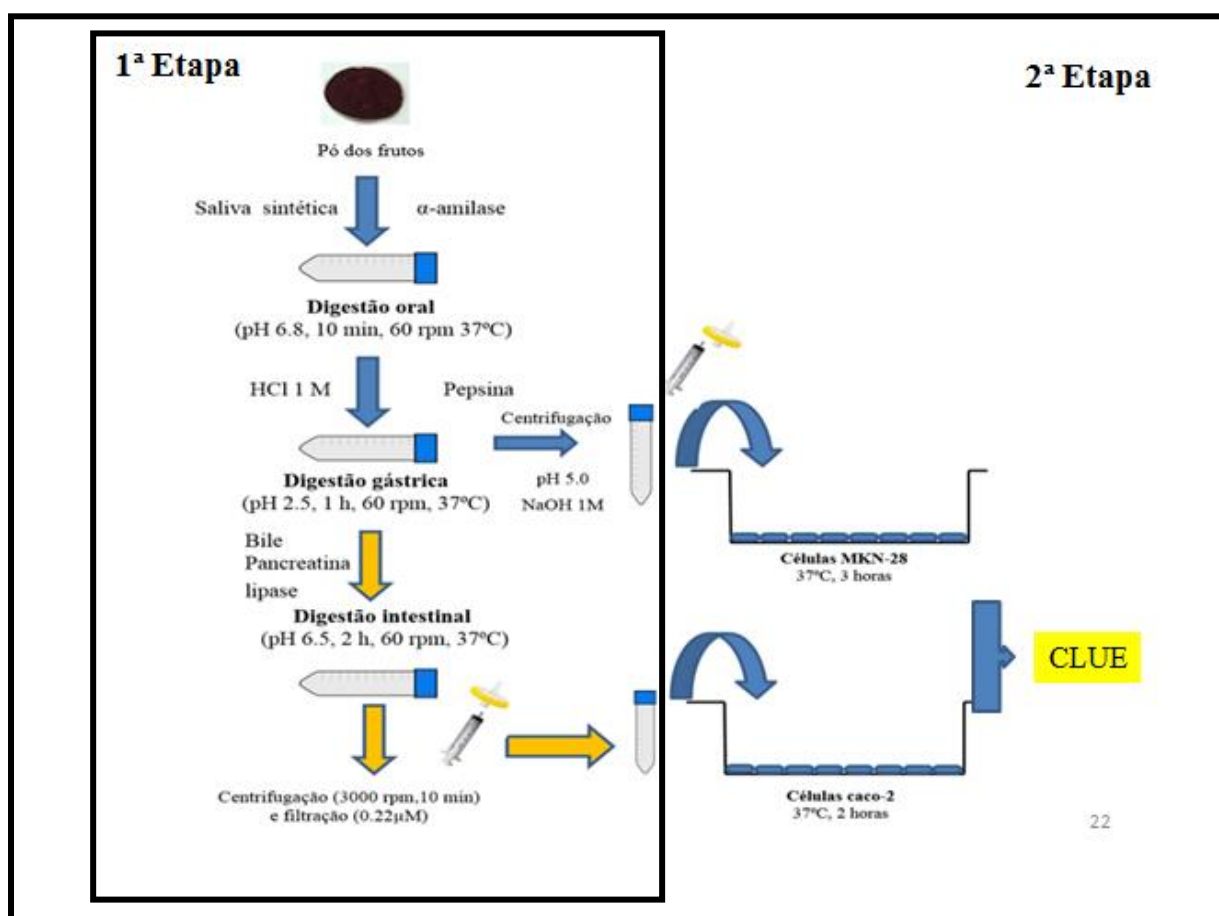
- Estufa para Incubação (c/jaqueta e controle de CO<sub>2</sub>)
- Cabines de Segurança Biológica BS Tec Classe II B2
- Microscópio invertido ótico Olympus CKX41
- Aparelho Millicell-ERS da Millipore<sup>®</sup>
- Insert Transwell<sup>®</sup> (policarbonato, 0,4µM de poro, 24mm de diâmetro, Corning Coster)
- Câmera de neubauer improvid espelhada
- Freezer – 80°C
- Nitrogênio líquido
- Autoclave vertical
- Estufa até 200°C para Esterilização
- Sistema de purificação de água – Millipore
- Banho- maria
- pHmetro Bel<sup>®</sup>
- Microcentrífuga Brandson modelo 2210
- Unidade filtrante millex 0,22 µm da Millipore<sup>®</sup>
- Sistema de vácuo Integra (vacuoboy)
- Pipetas sorológicas 5, 10 e 25 mL estéries (Corning<sup>®</sup>)
- Garrafas para cultura celular poliestireno 75 cm<sup>2</sup> estéril (Corning<sup>®</sup>)

### 3.1.8 As Culturas celulares

A linha celular tumoral MKN-28 originária de adenocarcinoma gástrico humano foi gentilmente cedida pelo Professor Doutor Nuno Mateus (Faculdade de Ciências - Universidade do Porto (Porto, Portugal) tendo sido adquirida à Cell Bank, Riken BioResource Center (JCRB0253, Ibaraki, Japão). Já a linhagem celular Caco-2 foi gentilmente cedida pela Dra Maria Paula Marques da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade de Coimbra. As células foram recebidas na passagem 17 e data de obtenção do Banco em 21/11/08. O transporte dos criotubos foi realizado em nitrogênio líquido e transferido para freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  na FFUP (Faculdade de Farmácia - Lab. Farmacologia- Universidade do Porto).

### 3.2 Métodos

A metodologia desta pesquisa foi dividida em duas etapas: 1ª etapa (análise e seleção dos frutos mais promissores quanto aos valores de bioacessibilidade das antocianinas) e 2ª etapa (realização dos Estudos de bioacessibilidade e transporte celular das antocianinas presentes nos frutos selecionados). (Figura 20)



**Figura 20** – Representação esquemática geral das etapas de simulação na digestão *in vitro* acoplada aos modelos de monocamada de celular para avaliação do transporte gástrico e intestinal das antocianinas da casca em pó da jabuticaba, jambo e jamelão (Etapas de execução da pesquisa)

### **3.2.1 Extração das antocianinas da matriz antes da digestão *in vitro***

Cerca de 1g de amostra foi pesado em tubo de rosca de polietileno. Adicionou-se 2 mL de solução ácido fórmico/metanol (10:90, v/v), os quais ficaram sob agitação por 1 minuto em vortex. Em seguida, a mistura foi submetida a uma etapa de sonificação por 10 minutos e posterior centrifugação a 6000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, e avolumado com a mesma solução de extração. Esta operação foi repetida até o sobrenadante perdesse a coloração. Após as extrações, alíquotas de 2 mL foram transferidas utilizando pipetador automático para ependorfes e levadas para centrifugação em microcentrífuga modelo Bransonic® na velocidade de 14.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, uma alíquota de 1 mL do extrato centrifugado foi evaporada sob fluxo de ar comprimido filtrado e ressuspensa em 200µL de solução metanol /ácido fórmico /água (10:10:80, v/v/v). O extrato foi transferido para um vial com redutor de volume e levado ao injetor do cromatógrafo para análise cromatográfica (SANTIAGO *et al.*, 2010).

### **3.2.2 Extração das antocianinas da matriz após a digestão *in vitro***

Cerca de 2 mL do digerido após a fase intestinal foi transferido para tubo falcon e 2mL de solução de metanol /ácido fórmico /água (10:10:80, v/v/v) foram adicionados e transferidos para sonificação por 10 minutos e posterior centrifugação a 3000g a 20°C por período de 10 minutos. A seguir, todo o sobrenadante foi filtrado com unidade filtrante millex 0,22 µm e transferido para balão volumetrico de 5 mL Após uma aliquota de 2mL foi tranferida direto para o vial e levado injetor do cromatógrafo para análise cromatográfica.

### **3.2.3 Análise das antocianinas monoméricas por Cromatografia Líquida de alta Eficiência antes e após a digestão *in vitro***

As análises cromatográficas foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos (DAD), coluna C<sub>18</sub> (100 mm x 4,6 mm; 2,4 µm), fluxo de 1,0 mL/min e modo de eluição gradiente com acetonitrila e solução aquosa de ácido fórmico 5 % , volume de injeção de 20 µL, temperatura da coluna 40 °C (GOUVÊA; GODOY, 2011).

### **3.2.4 Análises por Espectrometria de Massa**

Para esta análise, as antocianinas foram isoladas a partir do efluente do CLAE, segundo condições de Gouvêa e Godoy (2011) e injetadas diretamente na fonte do EM. A identificação de cada antocianina foi realizada em Espectrômetro de massa Waters Synapt (MS), utilizando a injeção direta, com bomba e seringa a uma taxa de fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Este sistema estava equipado com os analisadores de Quadrupolo e tempo de voo (Q-TOF), que possui precisão de massa de alta resolução. A fonte foi o eletrospray de modo íon positivo (ESI), e o instrumento operou com as seguintes condições: temperatura da fonte de 120 ° C; gás de secagem (N<sub>2</sub>) entregues em 25 LHR<sup>-1</sup> a 380 °C; tensão capilar definida em 3.0 kV; a transferência de energia de colisão foi de 4.0, 6.0 e 8.0 eV; cone de amostragem foi fixado em 25 V; e o cone de extração definido em 4V. A identificação das antocianinas foi realizada pela



análise do íon molecular de cada uma das substâncias, bem como a seu padrão de fragmentação MS/ MS, utilizando o software Maslynx 4.1 (Waters™).

### 3.2.5 Preparo das soluções utilizadas na Digestão *in vitro*

#### 3.2.5.1 Soluções inorgânicas

O preparo das soluções inorgânicas foi realizado para um volume final de 50 mL (Tabela 9).

**Tabela 9-** Valores de massa e volumes utilizados no preparo das soluções inorgânicas que constituem a solução de saliva da fase oral

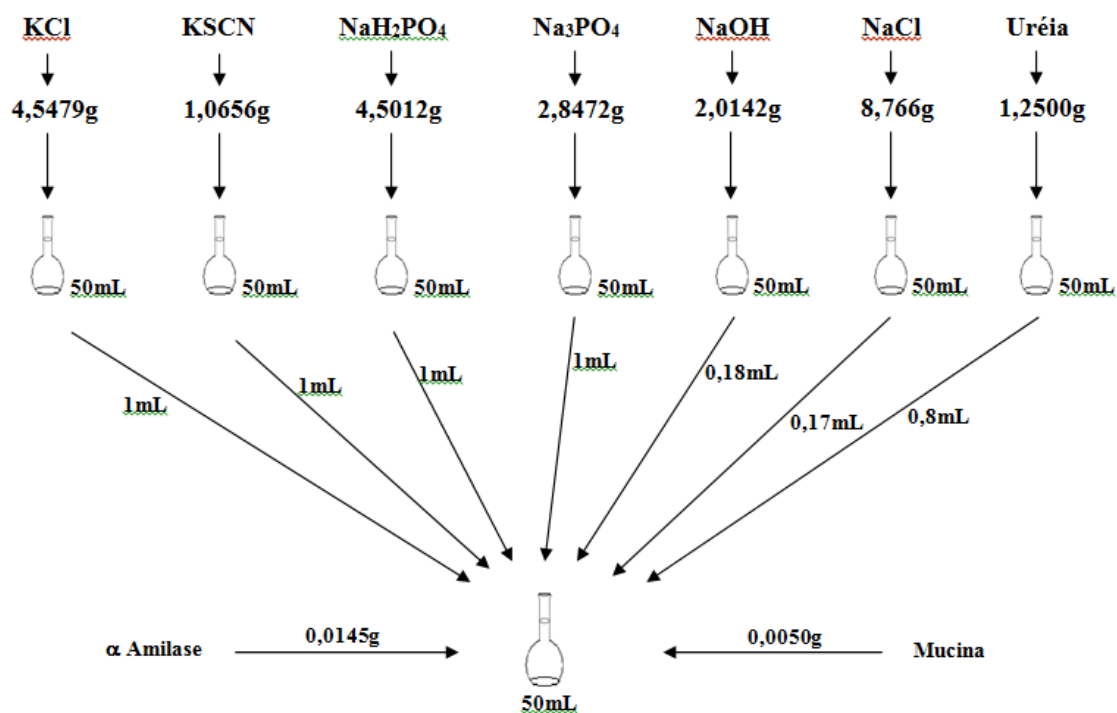
Reagente	Massa ou volume para 50mL de solução em água destilada
KCl 89,6 g/L	4,48 g
KSCN 20g/L	1 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88,8 g/L	4,44 g
NaCl 175,3 g/L	8,77g
NaOH 1M	2 g
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 57g/L	2,85 g
NaHCO <sub>3</sub> 1M	4,2 g
HCl 1M	4,3 mL (Ácido concentrado com pureza 37%)
NaHCO <sub>3</sub> 0,1M	5 mL (solução NaHCO <sub>3</sub> 1M)
HCl 0,1M	3 mL (solução HCl 1M)

#### 3.2.5.2 Solução de uréia 25 g/L

Foram pesados 0,25 g de uréia em um bécher e adicionado água ultrapura suficiente para solubilizar e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL, completou-se em seguida o volume do balão com água. Esta solução foi utilizada no máximo em até 24 horas após seu preparo.

#### 3.2.5.3 Solução de Saliva Artificial

Foram adicionados em um balão volumétrico de 50 mL os seguintes volumes das soluções previamente preparadas: 1 mL de KCl 89,6 g/L; 1 mL de KSCN 20 g/L, 1 mL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 88,8 g/L; 1 mL de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 57 g/L; 170 mL de NaCl 175,3 g/L; 180 mL de NaOH 1M; 800 µL de uréia 25 g/L. Após, completou-se o volume do balão com água (Figura 21). Foram pesados 0,014 g de  $\alpha$ -amilase e 0,005 g de mucina e adicionou-se quantidade suficiente da solução acima para solubilizá-los. Neste momento obteve-se a solução saliva, a qual foi utilizada em até 24 horas após seu preparo.



**Figura 21-** Esquema de preparo da solução de saliva artificial da fase oral da Digestão *in vitro*

### 3.2.5.4 Solução A

Foram pesados 1,3872 g de CaCl<sub>2</sub>; 14,084 g de NaCl e 0,7616 g de KCl em um bécher e adicionado água ultrapura suficiente para solubilizar e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 2 L, completou-se em seguida o volume do balão com água.

### 3.2.5.5 Solução de pepsina

Foram pesados 2 g de pepsina em bécher e adicionou-se solução HCl 0,1 M suficiente para solubilizar e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL, completou-se em seguida o volume do balão com HCl 0,1 M. Esta solução foi utilizada em até 24 horas após seu preparo.

### 3.2.5.6 Solução de bile

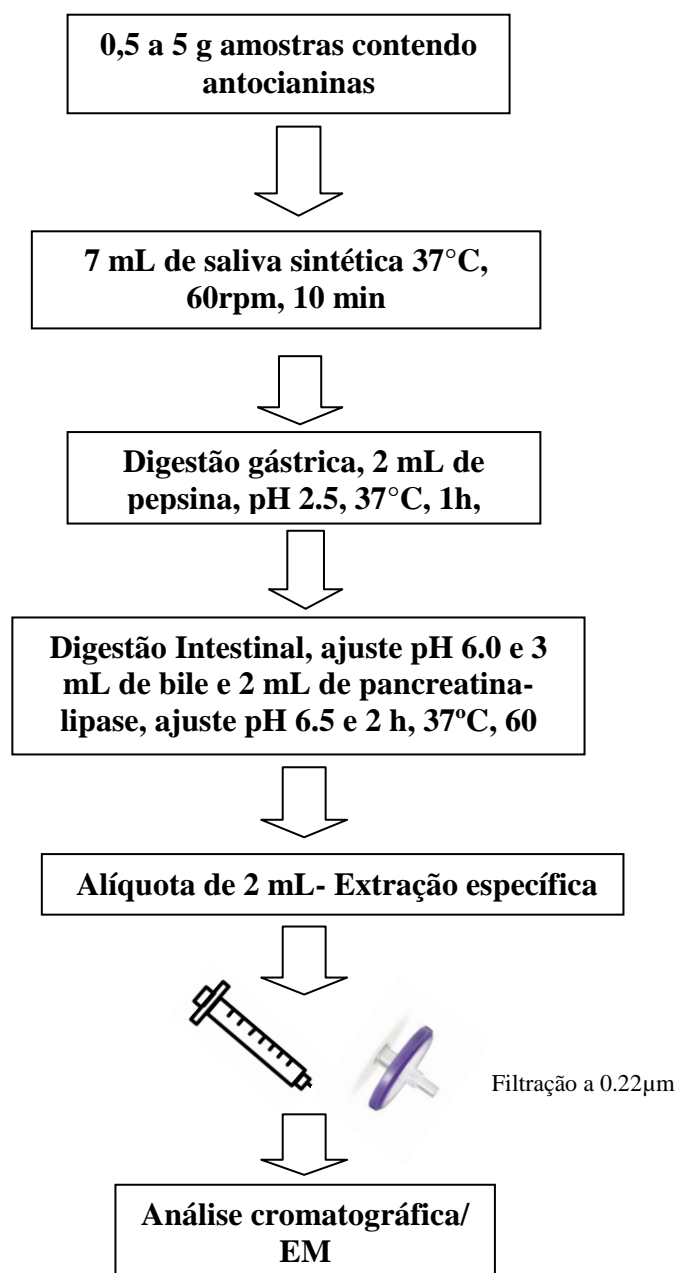
Foram pesados 2 g de bile e adicionou-se solução NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M suficiente para solubilizar e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL, completou-se em seguida o volume do balão com NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M. Para aumentar um pouco a solubilização do material, antes de se completar o volume do balão colocou-se o mesmo por 5 minutos no ultrassom. Mesmo com a utilização do ultrassom é comum que a bile não se solubilize totalmente, permanecendo a solução final com algumas partículas em suspensão. Esta solução foi preparada em até 24 horas após seu preparo.

### 3.2.5.7 Solução de pancreatina-lipase

Foram pesados 0,25 g de pancreatina e 0,125 g de lipase em bécher e adicionou-se solução  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M suficiente para solubilizar e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL, completando-se em seguida o volume do balão com  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M. Esta solução foi utilizada em até 24 horas após seu preparo.

### 3.2.6 Digestão *in vitro*

Para a fase oral foram pesados 0,5-5 g de amostra em tubo de 50 mL. Foram adicionados 7 mL de solução contendo  $\alpha$ -amilase, mucina e demais sais, como descrito por Oomen et al. (2003), em cada tubo. As amostras foram seladas, homogeneizadas e transferidas para o banho orbital por 37°C a 60 rpm por 10 minutos. Após, todos os tubos foram transferidos para uma cuba com gelo. Na fase gástrica, foram adicionados solução A (120 mM NaCl, 6 mM  $\text{CaCl}_2$  e 5 mM KCl) até atingir o volume de 30 mL, em seguida foram homogeneizadas em vórtex. A seguir, ajustou-se o pH para 2.5 +/- 0.1 utilizando HCl 1M. Após, foram adicionados 2 mL de solução de pepsina (40 mg/mL 100mM HCl) em cada tubo, e ajustou-se o volume para 40 mL com solução A, obtendo uma concentração final de pepsina de 2mg/mL. Os tubos foram selados e incubados no banho orbital por 1 h a 37°C a 60 rpm e após o término do período os tubos foram removidos do banho e colocados em gelo. A seguir a fase intestinal foi iniciada, adicionando-se 1 M de  $\text{NaHCO}_3$  para o ajuste do pH para 6.0 +/- 0.2 e em seguida foram adicionados 3 mL de solução de extrato de bile (40 mg extrato de bile/ mL 100 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) e 2 mL de solução de pancreatina-lipase (10 mg de pancreatina + 5 mg lipase/ mL 100 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) a cada tubo. O pH foi ajustado para 6.5 +/- 0.1 com 1 M NaOH e o volume final foi ajustado para 50 mL com a solução A. As amostras foram seladas e incubadas em banho orbital por 2 h a 37°C a 60 rpm. As concentrações finais de bile, pancreatina e lipase foram de 2,4; 0,4 e 0,2 mg/mL, respectivamente (Figura 22) (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI; ISHIDA, 2007 apud GIORI, 2010).



**Figura 22-** Fluxograma da metodologia de digestão *in vitro* para a determinação da bioacessibilidade de antocianinas na etapa de seleção dos frutos mais promissores

### 3.2.7 Análise das antocianinas monoméricas por Cromatografia Líquida de ultra Eficiência após o ensaio de Transporte (2ª Etapa)

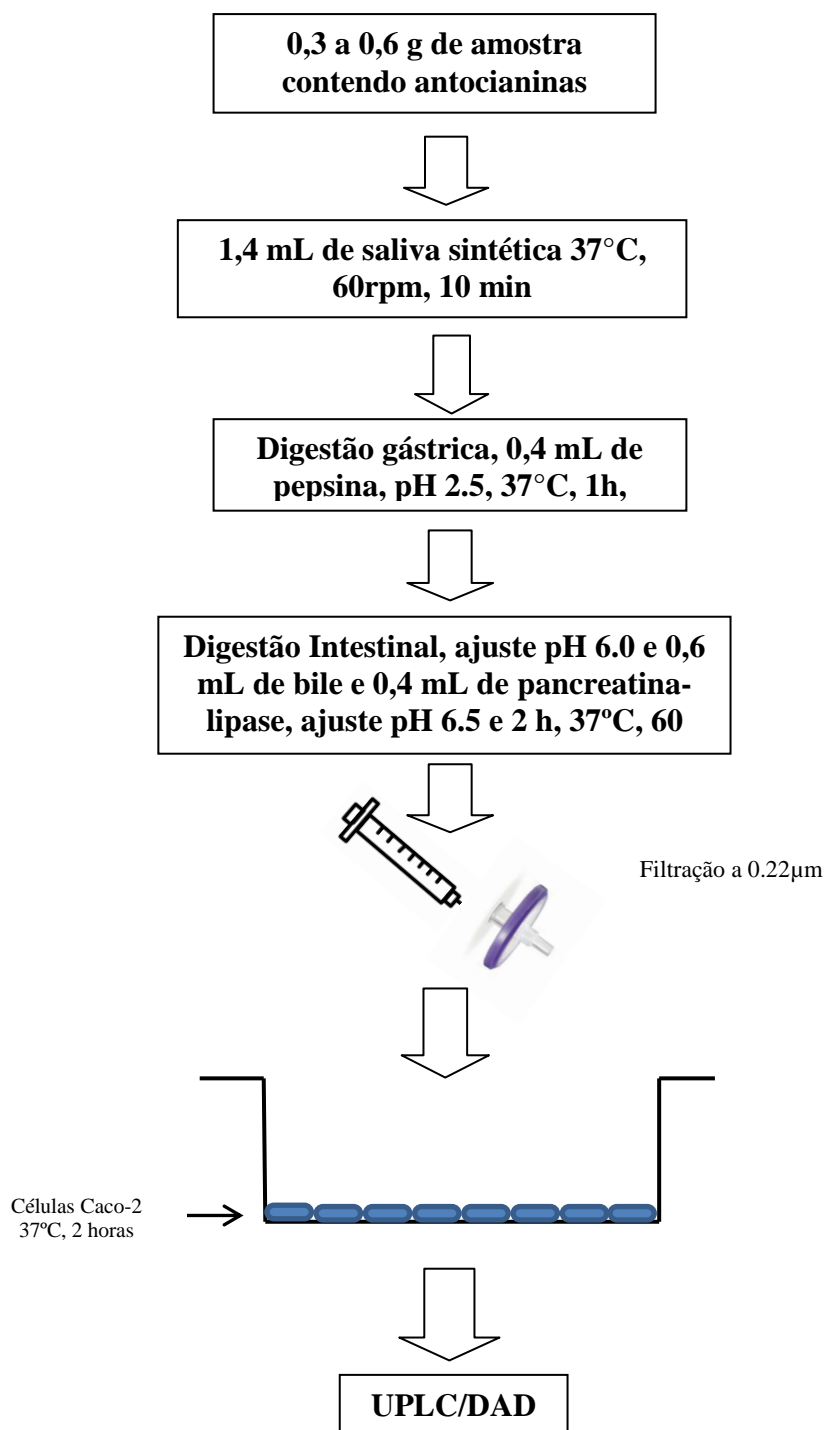
As análises de antocianinas, antes e após a digestão *in vitro* e depois de ensaio de transporte foram realizados em Cromatógrafo líquida de ultra performance (Dionex final Thermo Scientific™ Padrão 3000, Sunnyvale, CA, EUA), equipado com coluna C18 de fase inversa (LiChrospher™ 100 RP-18, 5 m, 25 cm) a 25 ° C, e coluna guarda de segurança, para separação das antocianinas. As antocianinas foram eluídas, com sistema gradiente, que consiste em água e ácido fórmico (9:1 v / v) como solvente A e água, ácido fórmico e acetonitrila(6: 1: 3, v / v) como solvente B, a uma taxa de fluxo de 1,0 mL.min.<sub>1</sub> e tempo de

corrida de 52 min. A coluna foi mantida a 25 ° C e o volume de injeção foi de 50 µL. O gradiente foi de 80% de solvente A e 20% de solvente B durante 42,5 min, 40% de solvente A e 60% de solvente B, entre 42,5-46,2 min, e 100% de solvente B entre 46,2-52 min. Depois de cada corrida, a coluna foi estabilizada com as condições iniciais (20% de solvente B e 80% de solvente A) durante 10 min (FERNANDES *et al.*, 2012). As análises quantitativas foram realizadas com curva de calibração externa e resultados foram expressos como equivalentes de malvidina-3-glucosídeo, a 520 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.2.8 Digestão *in vitro* até fase Intestinal (Cultura Caco-2)

Para a fase oral foram pesados 0,3-0,6g de amostra em tubo de 10 mL. Foram adicionados 0,7 mL de solução saliva contendo  $\alpha$ -amilase, mucina e demais sais, como descrito por Oomen *et al.*, (2003), em cada tubo. As amostras foram seladas, homogeneizadas e transferidas para o banho orbital por 37°C a 60 rpm por 10 minutos. Após, todos os tubos foram transferidos para uma cuba com gelo. Na fase gástrica, foram adicionados solução A (120 mM NaCl, 6 mM CaCl<sub>2</sub> e 5 mM KCl) até atingir o volume de 3 mL, em seguida foram homogeneizadas em vórtex. A seguir, ajustou-se o pH para 2.5 +/- 0.1 utilizando HCl 1M. Após, foram adicionados 0,2 mL de solução de pepsina (40 mg/mL 0,1M HCl) em cada tubo, e ajustou-se o volume para 4 mL com solução A, obtendo uma concentração final de pepsina de 2mg/mL. Os tubos foram selados e incubados no banho orbital por 1 h a 37°C a 60 rpm e após o término do período os tubos foram removidos do banho e colocados em gelo. A seguir a fase intestinal foi iniciada, adicionando-se 1 M de NaHCO<sub>3</sub> para o ajuste do pH para 6.0 +/- 0.2 e em seguida foram adicionados 0,3 mL de solução de extrato de bile (40 mg extrato de bile/ mL 100 mM NaHCO<sub>3</sub>) e 0,2 mL de solução de pancreatina-lipase (10 mg de pancreatina + 5 mg lipase/ mL 100 mM NaHCO<sub>3</sub>) a cada tubo. O pH foi ajustado para 6.5 +/- 0.1 com 1 M NaOH e o volume final foi ajustado para 5 mL com a solução A. As amostras foram seladas e incubadas em banho orbital por 2 h a 37°C a 60 rpm. As concentrações finais de bile, pancreatina e lipase foram de 2,4; 0,4 e 0,2 mg/mL, respectivamente (Figura 23) (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005 apud GIORI, 2010). O digerido foi então centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi congelado a -20°C. No dia do ensaio de transporte, o sobrenadante foi descongelado e filtrado com membrana de 0,22µM.



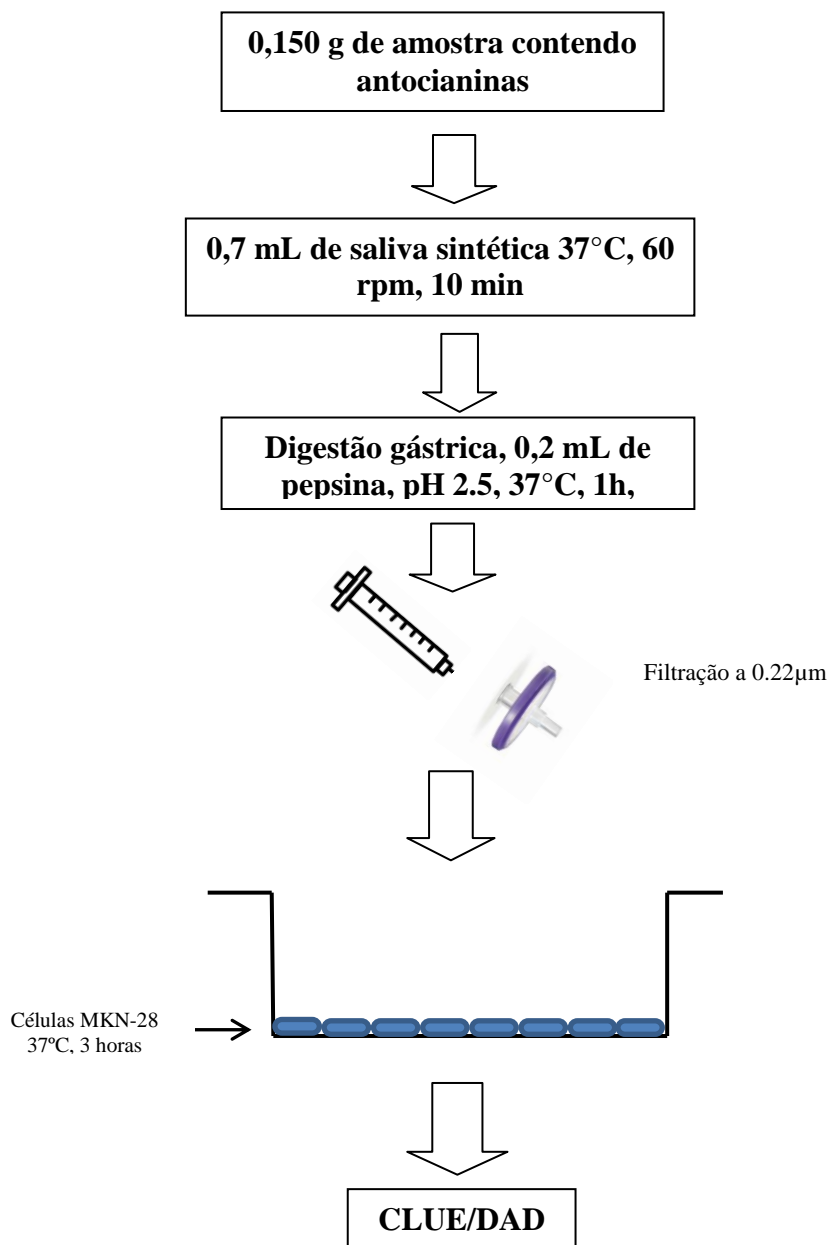


**Figura 23** - Esquema das etapas da digestão *in vitro* até a fase intestinal (Adaptado de GIORI, 2010)

### 3.2.9 Digestão *in vitro* até fase Gástrica (Cultura MKN-28)

Foram pesados 0,15 g de amostra em tubo de 10 mL. Foram adicionados 0,7 mL de solução contendo  $\alpha$ -amilase, mucina e demais sais, como descrito por Oomen *et al.*, (2003). As amostras foram seladas, homogeneizadas e transferidas para o banho orbital por 37°C a 60 rpm por 10 minutos e então todos os tubos foram transferidos para o gelo. Em seguida, na fase gástrica, foram adicionados solução A (120 mM NaCl, 6 mM CaCl<sub>2</sub> e 5 mM KCl) aos

tubos até atingir o volume de 3 mL, e homogeneizados em vórtex. A seguir, ajustou-se o pH para  $2.5 \pm 0.1$  utilizando HCl 1M e 0,2 mL de solução de pepsina (40 mg/mL 100 mM HCl) foram adicionados, ajustando-se o volume para 4 mL com solução A, obtendo uma concentração final de pepsina de 2 mg/mL. Os tubos foram selados e incubados em banho-maria por a 37°C por 1 h a 60 rpm e após o término do período os tubos foram removidos do banho e colocados em gelo. A seguir A seguir, ajustou-se o pH para  $5.0 \pm 0.2$  utilizando HCl 1M, centrifugou-se a 3500 rpm por 10 minutos, filtrou-se o digerido com seringa e filtro 0,22  $\mu\text{m}$  (TPP) e congelou-se a -20°C até análise (Figura 24).



**Figura 24** - Esquema das etapas da digestão *in vitro* até a fase gástrica

### **3.2.10 Cultivo celular da linhagem Caco-2**

As células estoque ( $5 \times 10^5$ ) foram semeadas em frascos T<sub>75</sub> e cultivadas em meio de cultura Dulbecco Eagle Modificado (DMEM) suplementada com 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 10% de soro fetal bovino (SFB), 4 mM de glutamax (glutamina), 100 U/mL de penicilina/estreptomicina e mantidas em incubação a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % UR. Após 6 dias, as células atingiram a confluência de 90 %, e foram destacadas utilizando tripsina 0,25 %/EDTA. As culturas foram subdivididas para estabelecer novos frascos e para plaqueamento da transwell. O meio foi renovado a cada 48 horas.

### **3.2.11 Semeadura da Caco-2 nas placas transwells**

A fração digerida proveniente da fase intestinal foi testada em células da linhagem Caco-2. Duas placas transwell de seis poços (policarbonato, 0,4 µm de poro, 24 mm de diâmetro, Corning Costar), foram semeadas com  $2,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> em meio DMEM entre as passagens 56 e 59. O tempo total de cultivo foi de 21 dias, tempo necessário para a sua diferenciação em células semelhantes ao epitélio intestinal. Um dia antes do teste de transporte, o meio foi trocado para meio sem soro fetal bovino.

### **3.2.12 Cultivo da linhagem MKN-28**

As células estoque ( $5 \times 10^5$ ) foram semeadas em placas de 22 cm<sup>2</sup> e cultivadas em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Aqmedia (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha) suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de antibiótico/antimicótico (100 units mL<sup>-1</sup> penicilina, 100 mg mL<sup>-1</sup> estreptomicina e 2.5 mg mL<sup>-1</sup> de anfotericina B) e mantidas em incubação a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % UR. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Após aproximadamente 6 dias, as células atingiram a confluência de 90%, as quais foram dissociadas, utilizando solução de tripsina 0,25 %/EDTA, e as culturas foram subdivididas para estabelecer novos frascos e para plaquear a placa transwell que foi utilizada no ensaio.

### **3.2.13 Semeadura da MKN-28 nas placas transwells**

Quando as células atingiram a confluência ao fim de 5-6 dias de cultura (75 %) em placas de petri com 21 cm<sup>2</sup> de área de crescimento (Corning Costar, Badhoevedorp, The Netherlands), estas foram dissociadas com 0,25 % de tripsina-EDTA. As células foram semeadas com  $2,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> em meio RPMI entre as passagens 17 e 19. O tempo total de cultivo foi de 7 dias, tempo necessário para a sua diferenciação em células semelhantes ao epitélio gástrico. Um dia antes do teste de transporte, o meio foi trocado para meio sem soro fetal bovino.

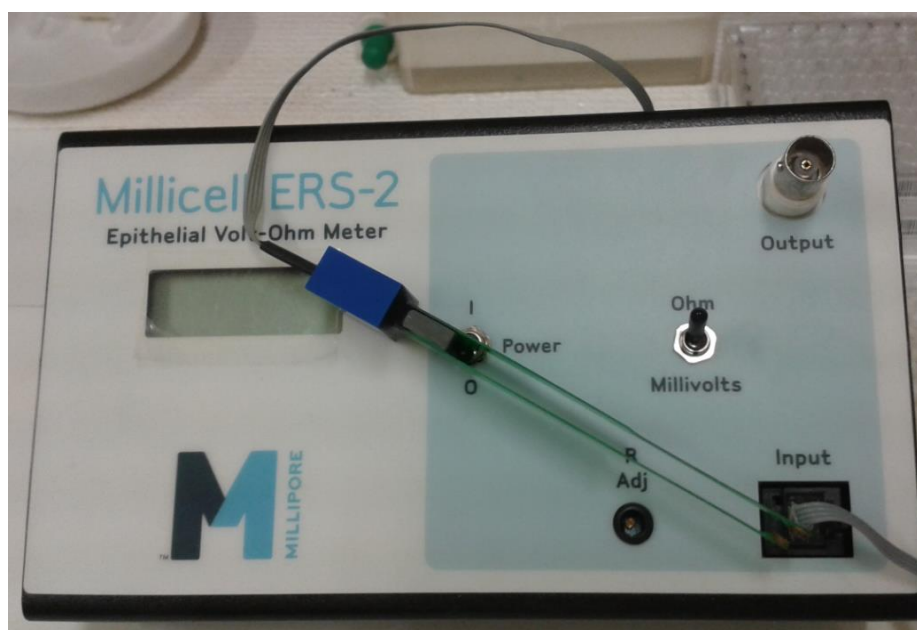
### **3.2.14 Ensaio de integridade de membranas de células Caco-2 por meio da resistência elétrica transepitelial (RET)**

Este ensaio teve o objetivo de verificar antes e após cada ensaio a integridade da monocamada celular após os 21 dias de permanência sobre a membrana semi-permeável na placa transwell. Para a realização das medições da resistência elétrica através a membrana das

células da monocamada foi utilizado um minivoltmetro millicell ER da Millipore® (Millipore Co., Bedford, MA). O ensaio foi realizado em poços cujas monocamadas apresentavam com  $RET > 230 \Omega \text{ cm}^2$  a  $37^\circ\text{C}$  (FARIA *et al.*, 2009). Estas medições foram realizadas através da colocação do mini eletrodo na câmara apical e outro na câmara basolateral, na presença de 1,5 mL e 2 mL de solução salina de Hank (HBSS) com 1mM de butirato de sódio, respectivamente (Figura 25). A determinação foi calculada de acordo com a equação:

$$RET (\Omega \text{ cm}^2) = R$$

Onde R é a resistência medida e A é a área de superfície do filtro (insert).



**Figura 25:** Minivoltmetro millicell ER da Millipore® (Millipore Co., Bedford, MA), utilizado para medir a resistência elétrica transepitelial (RET)

### 3.2.15 Ensaio de absorção por células Caco-2

Os estudos de transporte foram realizados conforme metodologia de Faria e colaboradores (2009). Um dia antes do ensaio (24h), a monocamada foi lavada com PBS duas vezes e substituiu-se o meio completo (DMEM) para meio sem soro fetal bovino. No dia do ensaio, o meio foi substituído pela solução tampão salina equilibrada de Hank (HBSS) contendo 1 mM de butirato de sódio, para a câmara apical e solução tampão salina equilibrada de Hank (HBSS) e butirato com 2% de soro fetal bovino para a câmara basolateral. Foi realizada a medição da RET (Resistência elétrica transepitelial) a fim de assegurar a integridade das monocamadas. Os digeridos obtidos após a digestão *in vitro*, foram filtrados ( $0,22 \mu\text{m}$ ) e diluídos (1:1) com tampão salino de Hank (HBSS) contendo 1 mM de butirato de sódio. A concentração de antocianinas totais testada dos três frutos variou entre 6 e  $35 \mu\text{M}$ . Os estudos de permeabilidade foram iniciados adicionando-se 1,0 mL de solução contendo o digerido teste e o tampão Hanks com butirato (1:1), no compartimento apical (transporte apical para basolateral; A para B) e 2,0 mL de tampão Hanks com butirato e 2% de SFB no basolateral (transporte basolateral para o apical; B para A) através da monocamada (Figura 7).

As monocamadas foram, em seguida, colocadas em banho-maria a 37 °C. As aliquotas de 150 µL foram tomadas a partir do compartimento basolateral ao final de cada período de incubação de 30, 60 e 120 minutos (2 horas). Em cada tempo, o volume de meio basolateral foi repostado com o mesmo volume retirado. Ao final do ensaio, retiraram-se os meios e lavou-se a monocamada com Hanks gelado (2 mL no compartimento Basolateral e 1,5 mL no compartimento apical) e mediu-se a resistência da monocamada em cada poço. Após ensaio, cada aliquota tomada foi acidificada com 1%(v/v) de HCl 6 M e congelada a -18°C, até a análise por CLUE (FERNANDES *et al.*, 2012; FARIA *et al.*, 2009) (Figura 26).

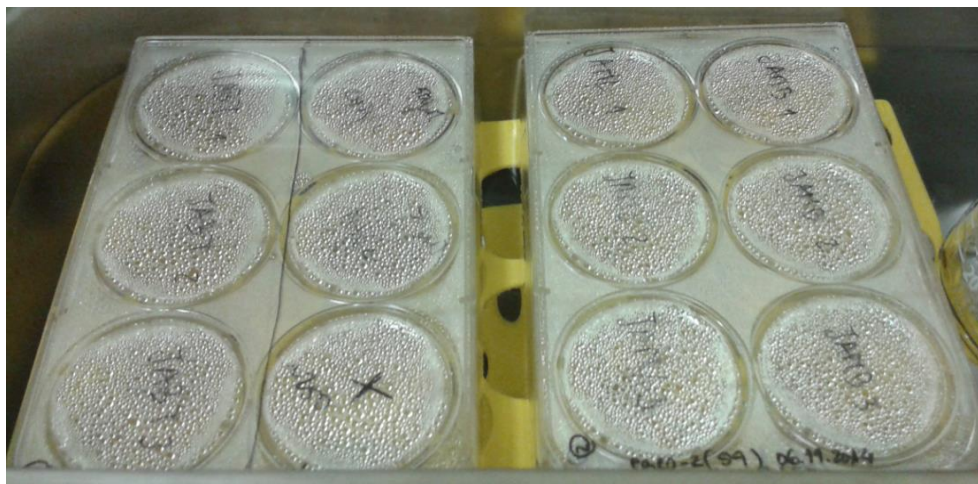
O Coeficiente de permeabilidade (Pc) pode ser calculado de acordo com a seguinte equação:

$$P_{app} \text{ (cm.s}^{-1}\text{)} = \frac{VR}{A \times CD_0} \times \frac{\Delta CR}{\Delta t}$$

Onde P<sub>app</sub> é o coeficiente de permeabilidade aparente; VR = volume basolateral (receptor) (cm<sup>3</sup>); A= área de superfície da membrana (cm<sup>2</sup>); CD<sub>0</sub> = concentração apical (doador) no início do experimento. Δ CR/Δt = variação de concentração do composto no compartimento receptor com o tempo. Os valores foram expressos em cm.s<sup>-1</sup>.

Além do coeficiente de permeabilidade, utiliza-se também o percentual de eficiência de transporte. Neste trabalho, utilizamos estes valores, os quais foram obtidos pela seguinte equação:

$$\text{Eficiência de transporte (\%)} = \frac{\text{[Concentração das ACNs totais no compartimento basolateral no tempo respectivo]}}{\text{[Concentração das ACNs no compartimento apical no tempo inicial]}} \times 100$$



**Figura 26-** Fotografia do Ensaio de Transporte com as células Caco-2 nos insertos transwell de 6 poços dos digeridos intestinais das antocianinas do pó das cascas da jabuticaba, jambo e jamelão.

### 3.2.16 Ensaio de absorção por células MKN-28

Os estudos de transporte foram realizados conforme metodologia de Fernandes e colaboradores (2012). A fração digerida proveniente da fase gástrica foi testada em células da linhagem gástrica MKN-28. As células MKN- 28 foram plaqueadas em duas placas de 6 poços Transwell (membrana de policarbonato, poro com 0,4  $\mu\text{m}$ , 24 mm de diâmetro, Corning Costar, Badhoevedorp, The Netherlands) a 75 % de confluência. As células MKN-28 cresceram e se diferenciaram por 7 dias. O meio celular foi substituído a cada 48 horas e 1 dia antes do ensaio substituiu-se o meio por outro meio de cultura sem soro fetal bovino (SFB). A resistência elétrica transepitelial (RET) da monocamada foi medida utilizando um voltímetro epitelial com eletrodos planos (MILLICELL-ERS, Millipore Co., Bedford, MA). O ensaio foi realizado em poços cujas monocamadas apresentavam com RET  $>150 \Omega \text{ cm}^2$  a 37°C (FERNANDES, *et al.*, 2012). Estas medições foram realizadas através da colocação do mini eletrodo na câmara apical, com 1,5 mL de solução salina de Hank (HBSS) pH 5.0 e outro na câmara basolateral, com 2 mL de solução salina de Hank (HBSS) pH 7.4. A concentração de antocianinas totais testada dos três frutos variou entre 9 e 35  $\mu\text{M}$ .

Os estudos de permeabilidade foram realizados de acordo com procedimento descrito por Fernandes e colaboradores (2012) e Faria e colaboradores (2009), adicionando-se 1,0 mL de digerido gástrico e o tampão Hanks pH 5.0 (1:1), no compartimento apical (transporte apical para basolateral; A para B) e 2,0 mL de tampão Hanks pH 7.4 com 2% de SFB no basolateral (transporte basolateral para o apical; B para A) através da monocamada. As monocamadas foram, em seguida, colocadas em banho-maria a 37 °C. Aliquotas de 150  $\mu\text{L}$  foram tomadas a partir do compartimento basolateral ao final de cada período de incubação (30, 60, 120 e 180 minutos (3 horas)). Em cada tempo, o volume de meio basolateral foi repostado com o mesmo volume retirado. Ao final do ensaio, retiraram-se os meios e lavou-se a monocamada com Hanks gelado pH 5.0 (2 mL no compartimento basolateral) e Hanks 7.4 se soro (1,5 mL no compartimento apical) e mediu-se a resistência da monocamada em cada poço. Após ensaio, cada alíquota tomada foi acidificada com 1 % (v/v) de HCl 6 M e congelada a -18 °C, até a análise por CLUE (Figura 27).



**Figura 27-** Fotografia do Ensaio de Transporte com as células MKN-28 nos insertos transwell de 6 poços dos digeridos gástricos das antocianinas do pó das cascas da jabuticaba, jambo e Jamelão



### **3.2.17 Avaliação estatística da bioacessibilidade**

As avaliações estatísticas realizadas neste trabalho foram feitas através da Análise de Variância (ANOVA one-way) seguida pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As avaliações foram realizadas em software GraphPad Prism 5, versão 5.1.

### **3.2.18 Avaliação estatística do estudo de Transporte**

Todos os valores foram expressos como médias aritméticas  $\pm$  SEM. Foram avaliadas as diferenças estatisticamente diferentes entre grupos através da Análise de Variância (two way ANOVA) seguida pela correção de múltipla comparação do teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . As avaliações foram realizadas em software GraphPad Prism 5, versão 5.1.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

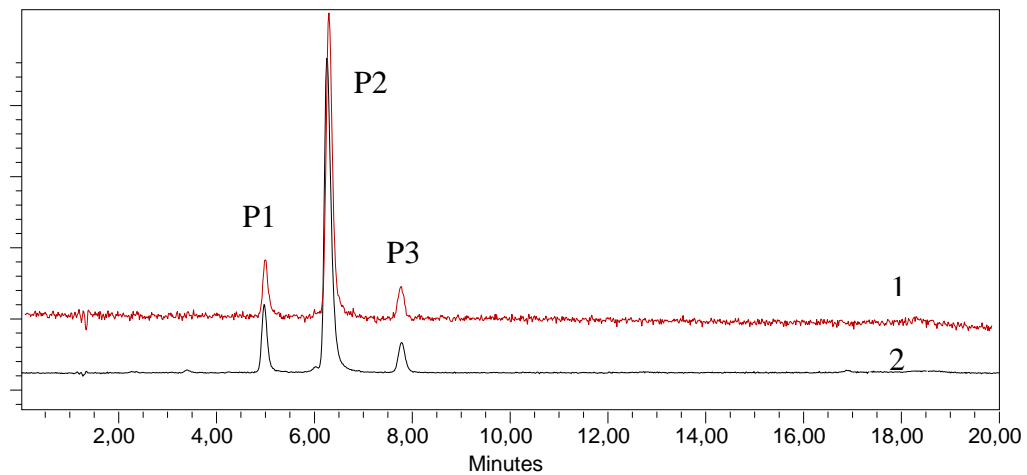
### 4.1 1ª Etapa- Seleção dos Frutos mais promissores, em termos de bioacessibilidade de antocianinas, para a realização dos estudos de transporte

Evidências na literatura apontam sobre a baixa biodisponibilidade das antocianinas a nível intestinal, resultando em valores  $< 1\%$  (FARIA, *et al.*, 2009) por esta razão, foram selecionadas para os estudos de permeação apenas as matrizes mais promissoras em termos de bioacessibilidade, ou seja, aquelas que resultaram em valores elevados, nas quais as antocianinas presentes se apresentavam mais disponíveis para captação celular. Assim, nesta etapa todos os frutos que constam na tabela 7, foram submetidos ao processo de digestão oral, gástrico e intestinal e tiveram suas concentrações determinadas antes e após estas etapas (Tabela 11). Além dos pós da casca de frutos pertencendo ao Projeto, outros frutos *in natura* também foram utilizados, a fim de estudarmos possíveis diferenças de comportamento das antocianinas, quando inseridas em matrizes secas ou frescas.

#### 4.1.1 Morango

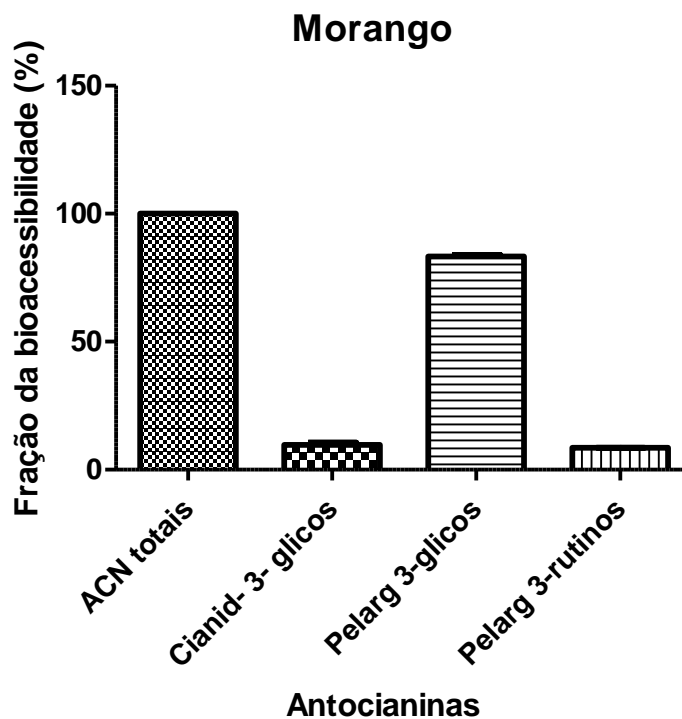
A avaliação das antocianinas monoméricas do morango resultou em valores de  $34,57 \pm 0,75 \text{ mg} \cdot 100^{-1} \text{ g}$  antes da digestão *in vitro*, sendo possível a identificação das seguintes ACNs majoritárias: cianidina-3-*O*-glicosídeo (14%) Pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (78%) e Pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo (7%) (Figura 28), as quais já foram relatadas previamente por outros autores (BAIAMONTE *et al.*, 2009). Após a digestão oral, gástrica e intestinal, ocorreu uma redução na recuperação destes compostos, onde foram detectadas aproximadamente  $4,48 \pm 0,08 \%$  da concentração inicial (Tabela 11), com a manutenção das três antocianinas, sendo a maior perda atribuída a cianidina-3-*O*-glicosídeo (97% de sua concentração inicial) e a menor a pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo (94%), no entanto, com elevadas perdas. Kosinska-Cagnazzo e colaboradores (2015) investigaram a bioacessibilidade de antocianinas em morangos e encontraram resultados em torno de 80% de bioacessibilidade, sendo a maior perda também atribuída a cianidina-3-*O*-glicosídeo, seguida pela a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo, resultados que corroboram para o presente trabalho. O elevado valor de bioacessibilidade encontrado pelos autores pode ser atribuído ao tratamento inicial do fruto, que após ser coletado, foi congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Este fato certamente favoreceu a formação de cristais de gelo e ao rompimento das células vegetais após seu descongelamento. A lise destas células facilita a disponibilização e liberação das antocianinas do fruto, resultado em elevados valores de bioacessibilidade.

Os tempos de retenção e os espectros de absorção a 520nm são característicos das antocianinas descritas. Em pH intestinal (6.5) ocorre uma elevada redução do seu conteúdo, o que deve-se à transformação do cátion flavílio a sua forma de chalcona incolor em pH intestinal (pH 6,5-7,0).



**Figura 28-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados no morango antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520 nm caracterizam os seguintes picos: P1- Cianidina-3-*O*-glicosídeo, P2- Pelargonidina-3-*O*-glicosídeo e P3- Pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo

A figura 29 apresenta os valores percentuais de bioacessibilidade de cada uma das ACN, relativos ao valor total encontrado. Estes dados demonstraram que dentre as três antocianinas, a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo apresenta maior percentual relativo. Este composto corresponda ao pico de maior concentração no cromatograma, sendo numericamente responsável pelo maior valor relativo de bioacessibilidade, apresentando elevadas concentrações antes e após a digestão.



**Figura 29-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade

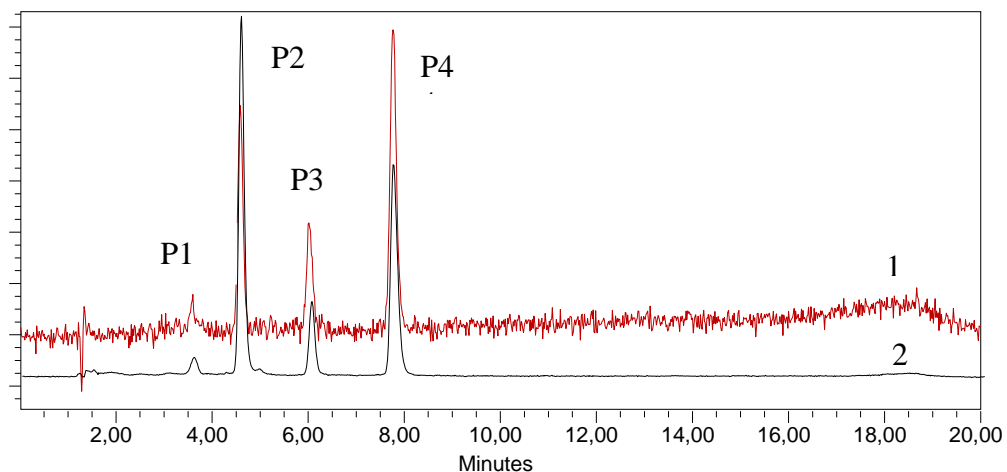
Outro fator que pode contribuir para a degradação das antocianinas é a presença de oxigênio, pois em experimentos realizados por Daravingas e Cain (1968) em suco de framboesa, eles demonstraram haver redução da degradação das antocianinas quando as mesmas foram analisadas sob atmosfera de nitrogênio, afirmando ser este o segundo fator de maior degradação, atrás apenas do pH. Segundo Manach e colaboradores (2005), os fatores que levam a degradação podem ter afetado de forma tão intensa as antocianinas, que ocasionaram a abertura do anel central e destruição do cromóforo e assim impedindo que o método analítico utilizado não fosse capaz de detectar os novos produtos gerados e desta forma subestimando os valores de bioacessibilidade. Esta explicação parece bem razoável, já que as formas monoglicosiladas são as mais instáveis, quando comparadas as formas di e triglicosiladas (HARBORNE, 1994). Pode-se também inferir sobre possibilidade destes compostos não terem sido liberados da matriz do fruto, já a que digestão é uma forma de “Extração Natural”. Muitas vezes os outros constituintes da matriz dificultam a sua saída, impedindo sua dissolução e portanto, sua disponibilidade para ser captada pelos enterócitos, embora as antocianinas sejam derivadas de antocianidinas polares, ligadas a mono e diglicosídeos, que aumentam a solubilidade em água.

Assim, estes resultados indicam que embora a perlagoidina-3-rutinosídeo esteja em baixa concentração inicial da matriz ela é a antocianinas que sofre menor degradação, resultando em valores maiores de bioacessibilidade. A estrutura volumosa da fração rutinosídeo (ramonise + glicose) deve ser responsável pela proteção dos grupamentos hidroxilas dos anéis B e C, tornando a molécula menos susceptível. Wu e colaboradores (2006) também observaram que cerca de 58 % de uma dose de antocianinas desaparecia a partir do trato gastrointestinal dentro de 4 h após uma refeição tal como determinado pela recuperação no duodeno, íleo, ceco e cólon. No entanto, eles verificaram também que o grau de desaparecimento variava consideravelmente dependendo da antocianina, sendo de 98 % para a cianidina- 3-glicosídeo e de apenas 22 % para a cianidina- 3-sambubiosídeo. Prior e Wu (2005) também já haviam verificado que em experimentos de excreção urinária, a cianidina-3-glicosídeo apresentou menores valores, quando comparada a cianidina-3-rutinosídeo, supondo que a estabilidade do derivado diglicosilado pode estar relacionada a proteção da sua molécula contra o meio alcalino e enzimas.

Assim, devido aos seus baixos valores de bioacessibilidade, este fruto não foi selecionado como uma fonte promissora para a realização dos estudos de transporte, já que sua quantificação posterior será dificultada, por sua baixa concentração inicial, bem como por seu baixo valor de bioacessibilidade.

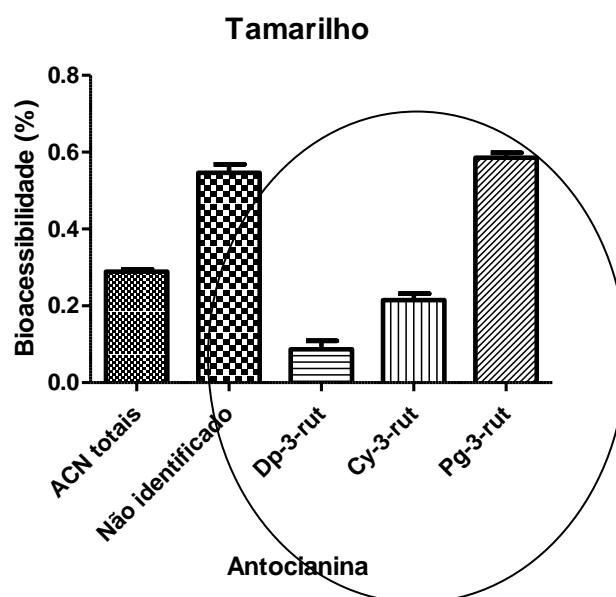
#### **4.1.2 Tamarilho**

A concentração total de antocianinas foi de  $19,51 \pm 0,03$  mg/100g antes da digestão *in vitro*, com a identificação à 520nm de quatro antocianinas. O pico 1 não foi identificado (P1), Delfinidina-3-O-rutinosídeo (P2), Cianidina-3-O-rutinosídeo (P3) e Pelargonidina-3-O-rutinosídeo (P4), sendo P2 a antocianina majoritária (Figura 30) .



**Figura 30-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados no tamarilho antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520 nm caracterizam os seguintes picos: P1- não identificado, Delfinidina-3-*O*-rutinosídeo (P2), Cianidina-3-*O*-rutinosídeo (P3) e Pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo (P4).

Além disso, a bioacessibilidade de cada antocianina foi calculada e os resultados estão apresentados na Figura 31, indicando que a pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo apresentou elevada concentração inicial antes da digestão e manteve um elevado valor de bioacessibilidade. Este fato confirma o comportamento estrutural desta antocianina também encontrada no morango. Além disso, este fruto nos permitiu comparar o comportamento das antocianidinas: delphinidina, cianidina e pelargonidina quando ligadas a mesma fração rutinosídica. Os valores indicam que quanto mais polar é a antocianidina, menor será sua estabilidade no TGI.



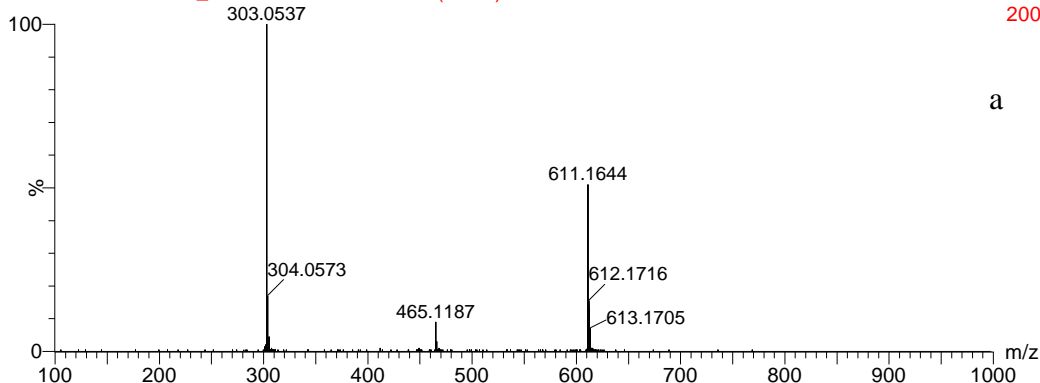
**Figura 31-** Percentual de bioacessibilidade de cada antocianina isoladamente: Não identificado (P1), Delfinidina-3-*O*-rutinosídeo (P2), Cianidina-3-*O*-rutinosídeo (P3) e Pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo (P4).

Como esta matriz não havia sido estudada anteriormente, procedeu-se a sua caracterização. Os tempos de retenção e os espectros de absorção sugeriram a presença das antocianidinas descritas acima. Além disso, os tempos de retenção sugeriam também não se tratar de antocianidinas (agliconas) devido a sua polaridade e por isto os tipos de açúcares e posições permaneceram duvidosos, sendo então necessária a confirmação por Espectrometria de massa. Todos os picos, representativos das antocianinas, foram isolados e concentrados utilizando uma válvula seletora de frações. O composto correspondente ao pico1 estava excessivamente diluído e por isto não foi possível fazer sua identificação. Embora não tenha sido identificada, ela também não foi detectada após a digestão, indicando se tratar de uma antocianina com características de instabilidade química, já que sua alta solubilidade em meio aquoso (indicativo de sua polaridade), possibilitaria sua liberação da matriz.

O espectro de MSMS de cada pico isolado com 15V de energia de transfer e 6V de trap geraram a fragmentação dos seguintes íons moleculares de  $m/z$  611,16; 465,11 e 595,16, respectivamente P2, P3 e P4. O íon molecular  $m/z$  611,16, após fragmentação, deu origem ao fragmento de  $m/z$  465.11, que indica a perda de uma molécula de uma raminose ( $m/z$  146) e depois de glicose ( $m/z$  162), gerando a aglicona ( $m/z$  303,05) que a  $m/z$  que corresponde a molécula da delphinidina, e por estas razões podemos supor que seria a delphinidina-3-*O*-rutinosídeo, já que quando há apenas uma substituição com glicosídeo, a posição 3 do anel central é a preferencial (HARBONE *et al.*, 1994), mais estável e frequente (Figura 32b). Além disso, observou-se que a utilização de energia de 15 V de tranfer, produziu fragmentações com intensidade maior do íon  $m/z$  465(que corresponde a perda de  $m/z$  146), no entanto com uma energia menor de 8 ou 10 V produziu fragmentos gerando a aglicona ( $m/z$  303,05) com maior intensidade, o que correspondia a perda da rutinose (raminose + glicose) completa. Desta forma, foi verificado que baixas energias tendem a gerar as fragmentações da rutinose, enquanto energias maiores tentem a produzir o fragmento com a perda da raminose.

PICO 2 TAMARILHO\_16072014 MSMS611 92 (1.581)

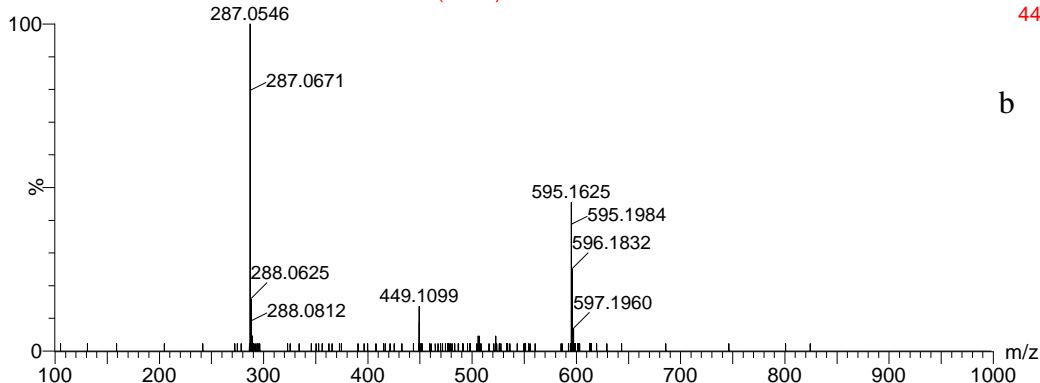
TOF MSMS 611.00ES+  
200



a

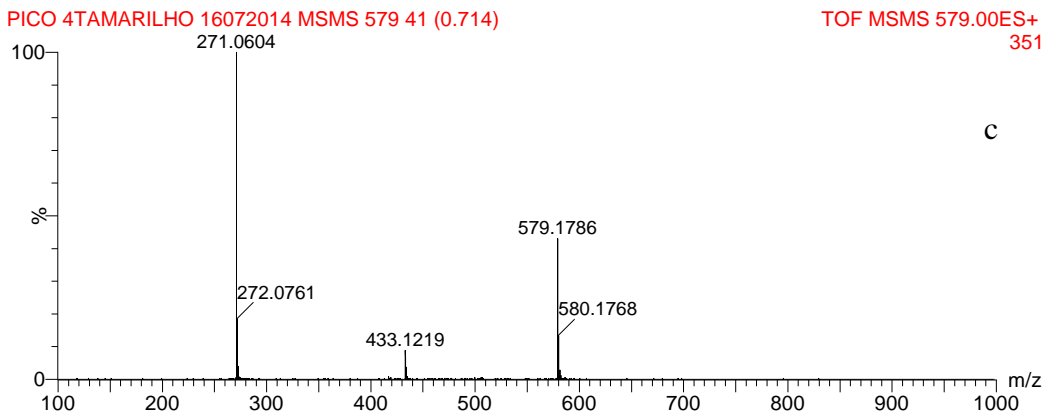
PICO 3 TAMARILHO 16072014 MSMS 595 20 (0.357)

TOF MSMS 595.00ES+  
44



b

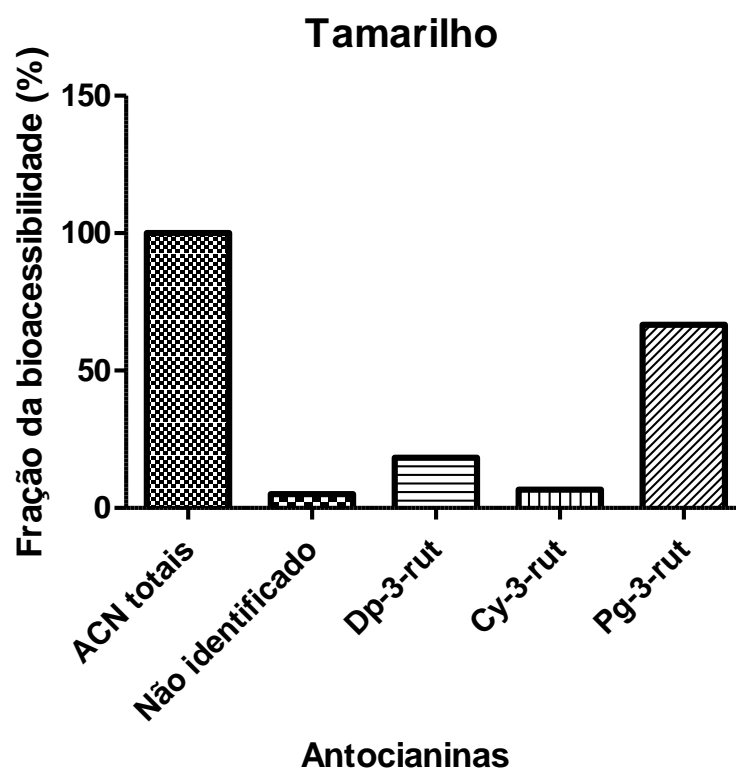




**Figura 32-** Espectro de massa com analisador por tempo de voo dos picos delphinidina-*O*-3-grutinosídeo (P2), Cianidina-3-*O*-rutinosídeo (P3) e Pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo (P4).

O espectro de MSMS do pico 3 isolado com 15V de energia de transfer e 6V de trap gerou a fragmentação do íon molecular de  $m/z$  595.16, com perda do fragmento de  $m/z$  146 (raminose), dando origem ao fragmento  $m/z$  449,10 e depois de glicose ( $m/z$  162), gerando a aglicona ( $m/z$  287,05) que a  $m/z$  corresponde a uma molécula de cianidica 3-*O*-rutinosídeo. O mesmo comportamento de perdas de fragmentos e energia utilizada foi observado durante a fragmentação da mesma. Já o espectro de MSMS do P4 produziu o íon molecular  $m/z$  579.17, com perda do fragmento de  $m/z$  146 (raminose), dando origem ao fragmento  $m/z$  433,12 e depois perda de glicose ( $m/z$  162), gerando a aglicona ( $m/z$  271,06) que a  $m/z$  corresponde a uma molécula de Pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo (Figura 32).

O perfil de antocianinas permaneceu constante, embora tenha ocorrido um grande redução nas concentrações finais após a digestão gastrointestinal, onde a bioacessibilidade foi de  $0,29 \pm 0,008(\%)$  (Tabela 11). A estabilidade das antocianinas é maior sob condições ácidas, já que é sabido que as antocianinas se apresentam na forma do cátion flavílium, capazes de atuar como compostos antioxidantes. A baixa recuperação das antocianinas pode ser parcialmente devido à transformação do cátion flavílio a sua forma de chalcona incolor em pH intestinal (pH 6,5-7,0), gerando a redução da sua atividade antioxidante. Este fruto não representa uma fonte promissora para a realização dos estudos de absorção, já que sua quantificação posterior será dificultada, por sua baixa concentração inicial, bem como por seu baixo valor de bioacessibilidade.

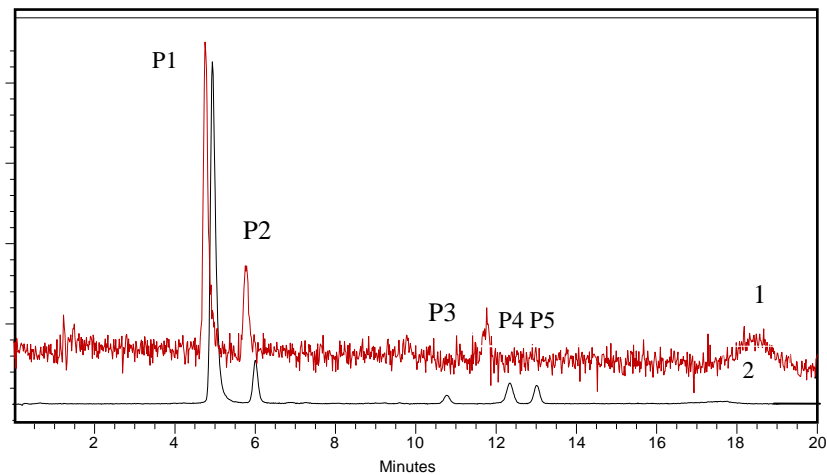


**Figura 33-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade

A figura apresenta o percentual de contribuição de cada antocianina e verificou-se que a pelargonidina 3-*O*-rutinosídeo apresentou maior contribuição, o que já era esperado pois a mesma estava em elevada concentração inicial, no entanto o que se observou também, que embora a cianidina-3-*O*-rutinosídeo apresentasse concentração inicial semelhante a ela, indicou valores quase três vezes inferior de contribuição na bioacessibilidade (Figura 33).

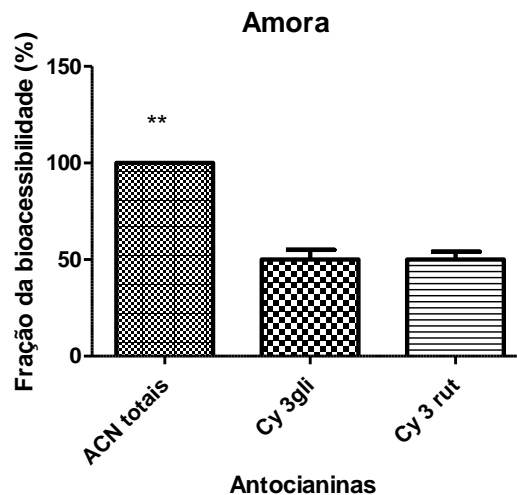
#### 4.1.3 Amora

A concentração total de antocianinas foi de  $32,60 \pm 4,20$  mg/100g antes da digestão *in vitro*, onde identificação do perfil cromatográfico extraído à 520nm indicou a presença de quatro antocianinas, Cianidina-3-*O*-glicosídeo (P1) e Cianidina-3-*O*-rutinosídeo (P2), (P3) e P4, sendo as P1 e P2 as antocianinas majoritárias (Figura 34). Os tempos de retenção e os espectros de absorção no UV-Vis a 520nm de cada pico são característicos das antocianinas descritas.



**Figura 34-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados na amora antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520 nm caracterizam os seguintes picos: Cianidina-3-*O*-glicosídeo (P1) e Cianidina-3-*O*-rutinosídeo (P2). Os picos P3, P4 e P5 não foram detectados após a digestão.

Após a digestão foi possível detectar os picos 1 e 2 que são os picos majoritários, no entanto os demais ficaram abaixo do limite de quantificação. Além disso, ocorreu uma grande redução nas concentrações finais após a digestão gastrointestinal, representando uma bioacessibilidade foi de  $1,78 \pm 0,11$  (Tabela 11).



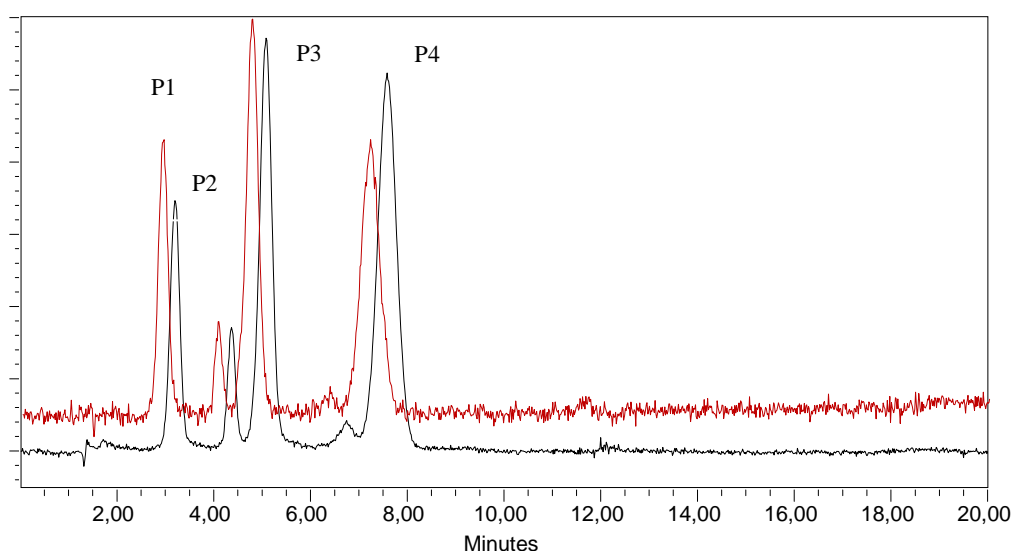
**Figura 35-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade.

Em valores, as duas antocianinas contribuíram de forma semelhante para o valor final de bioacessibilidade, no entanto, verificou-se que a concentração inicial de cianidina-3-*O*-glicosídeo foi três vezes superior a da cianidina-3-*O*-rutinosídeo, o que significou dizer que a cianidina-3-*O*-rutinosídeo foi três vezes mais estável que a primeira, mantendo sua estrutura em pH alcalino (Figura 35). Este fruto não representou uma fonte promissora para a

realização dos estudos de absorção, já que sua quantificação posterior será dificultada, por sua baixa concentração inicial, bem como por seu baixo valor de bioacessibilidade.

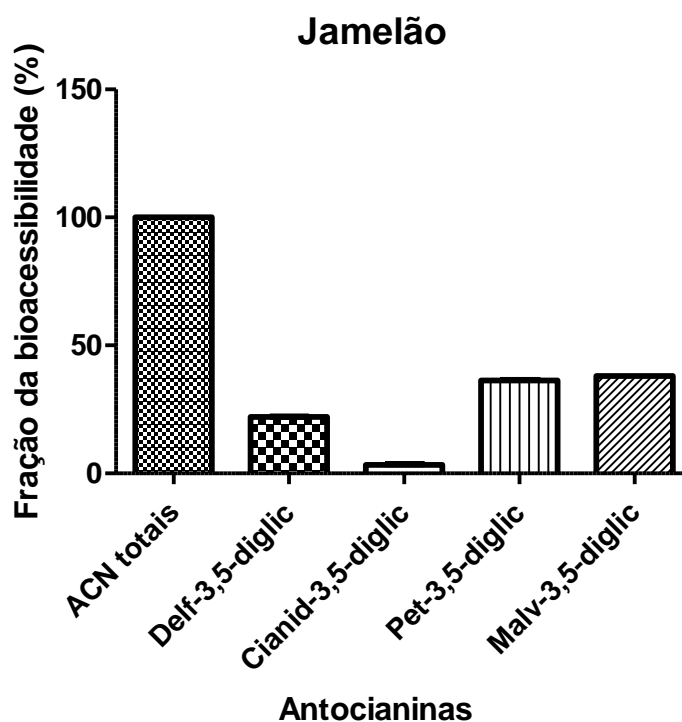
#### 4.1.4 Jamelão

A concentração total de antocianinas foi de  $335,98 \pm 13,90$  mg/100g antes da digestão *in vitro*, onde identificação do perfil cromatográfico extraído à 520nm indicou a presença de quatro antocianinas, delphinidina-3,5-*O*-diglicosídeo (P1), Cianidina-3,5- diglicosídeo (P2), petunidina 3,5-diglicosídeo (P3) e malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo (P4), sendo as P1 e P3 e P4 as antocianinas majoritárias (Figura 36). Os tempos de retenção e os espectros de absorção no UV-Vis a 520nm de cada pico são característicos das antocianinas descritas.



**Figura 36-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados no jamelão antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520 nm caracterizam os seguintes picos: delphinidina-3,5-*O*-diglicosídeo (P1), Cianidina-3,5-*O*- diglicosídeo (P2), petunidina-3,5-*O*-diglicosídeo (P3) e malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo (P4).

O perfil de antocianinas permaneceu constante, ocorrendo uma discreta redução nas concentrações finais após a digestão gastrointestinal, onde a bioacessibilidade calculada foi de  $76,99 \pm 1,55$  (%) (Tabela 11), quando comparada as demais matrizes. Este resultado indica que uma fração grande das antocianinas foi liberada da matriz, entrou em solução, por ser um composto altamente hidrofóbico, além de sofrer baixa degradação durante a digestão. Este fato pode ser explicado pela presença das três antocianinas diglicosiladas, já que segundo FRANCIS e colaboradores (1989) a estabilidade das antocianinas substituídas com di e/ou triglicosídeos é maior quando comparadas com suas correspondentes monoglicosiladas. Os dois glicosídeos conferem às mesmas, maior solubilidade, facilitando sua saída na matriz alimentícia a fim de entrar em solução. Além disso, as antocianinas presentes apresentam suas agliconas com radicais metoxilados no anel B, conferindo também a esta estrutura maior estabilidade. Este fruto é uma fonte promissora para o estudo de absorção, utilizando a cultura de células Caco-2.

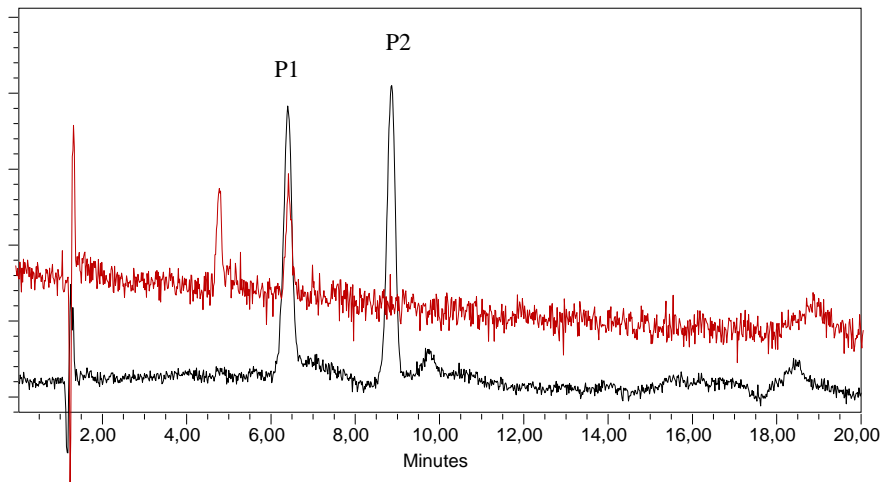


**Figura 37-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioaccessibilidade.

A Figura 37 apresenta os valores percentuais de bioaccessibilidade de cada umas das ACN, relativos ao valor total encontrado. Estes dados demonstraram que dentre as quatro antocianinas caracterizadas, três delas (delfinidina-3,5-*O*-diglicosídeo, petunidina-3,5-*O*-diglicosídeo e malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo) apresentaram contribuição semelhante, observação que ratifica o papel de proteção que os açucares diglicosídeos conferem a molécula.

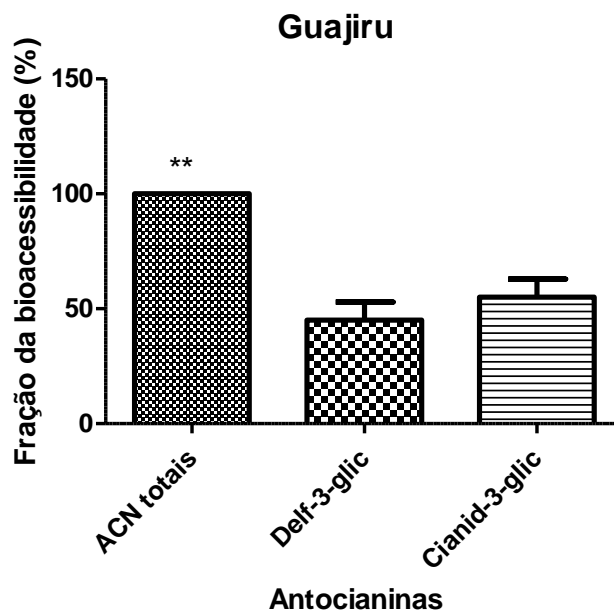
#### 4.1.5 Guajiru

A concentração total de antocianinas foi de  $1,75 \pm 0,05 \text{ mg/100g}$  antes da digestão *in vitro*, onde identificação do perfil cromatográfico extraído à 520nm indicou a presença de duas antocianinas, delfinidina-3-*O*-glicosídeo (P1), Cianidina-3-*O*-glicosídeo (P2 sendo as duas majoritárias (Figura 38). Os tempos de retenção da amostra antes da digestão caracteriza as antocianinas já identificadas em análises prévias, bem como os espectros de absorção no UV-Vis a 520nm de cada pico. Após a digestão, a quantificação das antocianinas ficaram comprometidas devido a excessiva diluição do digerido final, o que foi observado pela razão entre o sinal e o ruído no cromatograma. No entanto, esta é uma matriz que já foi muito estudada e caracterizada pelo grupo de pesquisa, tendo suas antocianinas já confirmadas por Espectrometria de Massa.



**Figura 38-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados no guajiru antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520 nm caracterizam os seguintes picos: delphinidina-3-*O*-glicosídeo (P1) e Cianidina-3-*O*-glicosídeo (P2).

Após a digestão, o perfil das antocianinas permaneceu constante, havendo a redução das concentrações finais e obtendo valores de bioacessibilidade de  $19,54 \pm 0,08$  (%) (Tabela 11). Embora não seja um valor alto, pode ser considerado bastante interessante, visto que este fruto apresentou baixa concentração inicial. Para as antocianinas em questão podemos inferir que elas mesmas sofreram degradação por apresentarem duas antocianinas, com as agliconas mais instáveis: delphinidina (dois grupos  $-OH$ ) e cianidina (um radical  $-OH$ ) ligados ao anel B, no entanto as mesmas poderiam estar ligadas a outros componentes (tais como fibras) da matriz, as protegendo contra a degradação. Assim, devido aos seus baixos valores iniciais, este fruto não representa uma fonte promissora para a realização dos estudos de transporte, já que sua quantificação posterior será dificultada, por sua baixa concentração inicial.



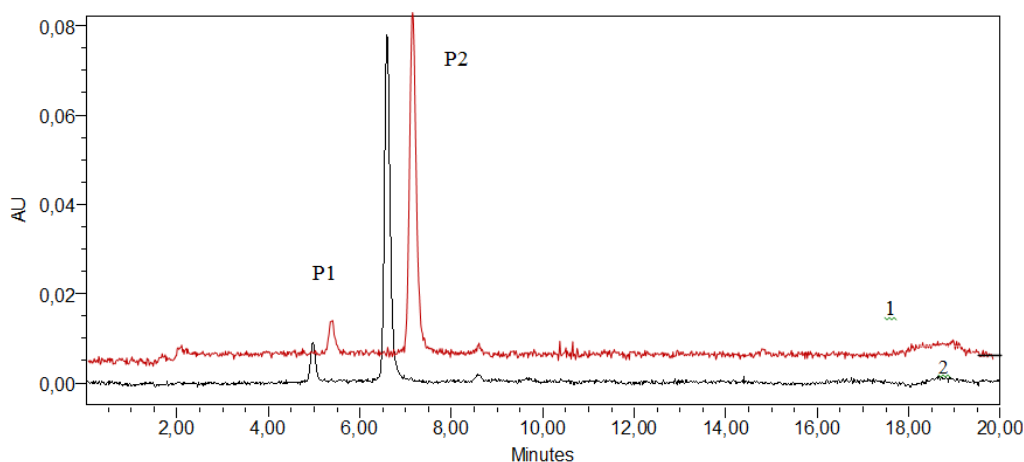
**Figura 39-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade.



A Figura 39 apresenta os valores percentuais de bioacessibilidade de cada uma das ACN, relativos ao valor total encontrado. Estes dados demonstraram que as duas antocianinas encontradas (delfinidina-3-*O*-glicosídeo, cianidina-3-*O*-glicosídeo) apresentaram a mesma contribuição final no valor final de bioacessibilidade.

#### 4.1.6 Jaboticaba

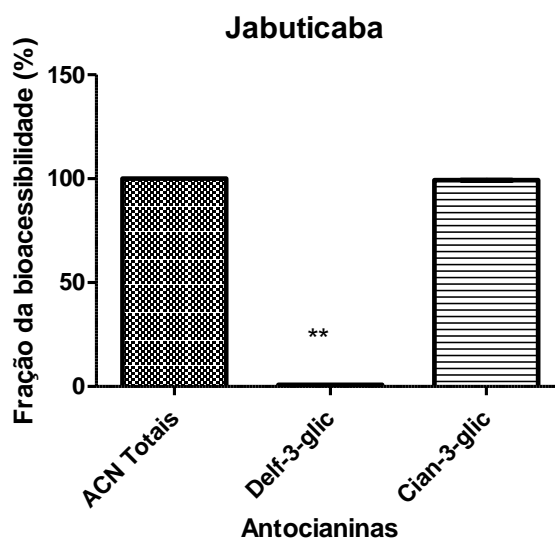
A concentração total de antocianinas foi de  $326,22 \pm 15,08 \text{ mg}/100\text{g}$  antes da digestão *in vitro*, onde identificação do perfil cromatográfico extraído à 520nm indicou a presença de duas antocianinas: delfinidina-3-*O*-glicosídeo (P1), cianidina-3-*O*-glicosídeo (P2), sendo as duas majoritárias (Figura 40).



**Figura 40-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados na jaboticaba antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520nm caracterizam os seguintes picos: delfinidina-3-*O*-glicosídeo (P1) e Cianidina-3-*O*-glicosídeo (P2).

Após a digestão o perfil de antocianinas permaneceu constante, havendo a redução das concentrações finais e obtendo valores de bioacessibilidade de  $19,07 \pm 1,13$  (%) (Tabela 11). A possível explicação para a degradação das antocianinas em questão, deve ao fato de apresentar as duas antocianinas, com as agliconas mais instáveis, tais como a delfinidina (dois grupos - OH) e cianidina (um radical -OH) ligados ao anel B, sofrendo em pH 6.5-7.0 o ataque nucleofílico da água, gerando a chalcona e destruindo o cromóforo da aglicona. Embora este fruto não tenha apresentado um resultado de bioacessibilidade alto, ele pode ser uma fonte promissora para a realização dos estudos de absorção, já que apresenta uma concentração inicial alta, o que facilita sua quantificação posterior.

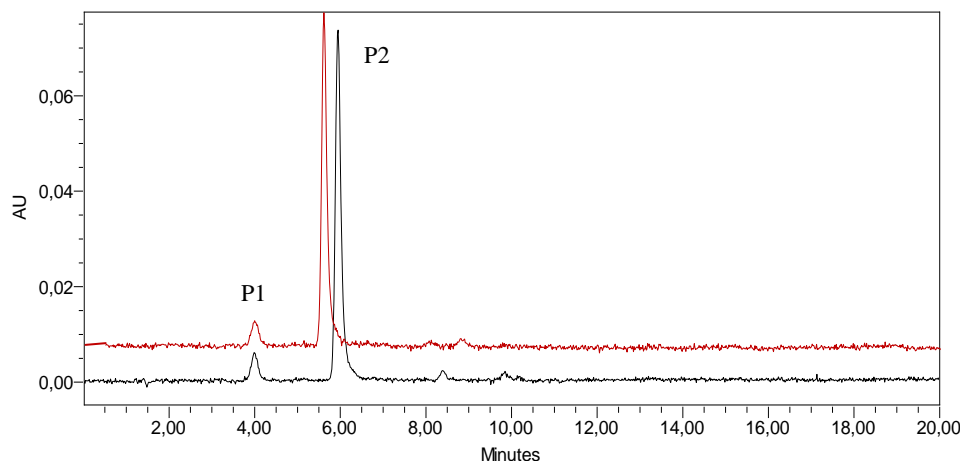
A Figura 41 apresenta os valores percentuais de bioacessibilidade de cada uma das ACN, relativos ao valor total encontrado. Estes dados demonstraram que a delfinidina-3-*O*-glicosídeo contribuiu significativamente muito pouco para o valor final de bioacessibilidade, comparativamente a cianidina-3-*O*-glicosídeo.



**Figura 41-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade. (\*\*) Houve diferença significativa  $p < 0,05$

#### 4.1.7 Jambo

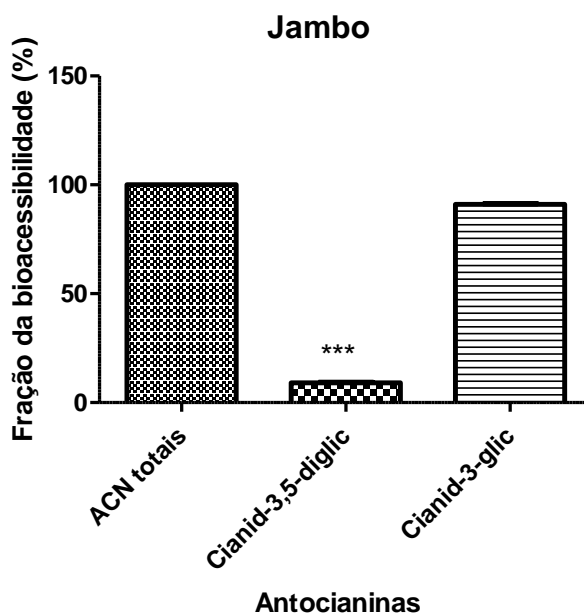
A concentração total de antocianinas foi de  $219,46 \pm 6,75 \text{ mg}/100\text{g}$  antes da digestão *in vitro*, onde a identificação do perfil cromatográfico extraído à 520nm indicou a presença de duas antocianinas: cianidina-3,5-*O*-diglicosídeo (P1), cianidina-3-*O*-glicosídeo (P2), sendo as duas majoritárias (Figura 42).



**Figura 42-** Cromatogramas representativos do perfil de antocianinas encontrados no jambo antes (2) e após (1) as etapas da digestão *in vitro*. Os tempos de retenção e espectros de absorção a 520 nm caracterizam os seguintes picos: cianidina-3,5-*O*-diglicosídeo (P1), cianidina-3-*O*-glicosídeo (P2).

O perfil de antocianinas permaneceu constante, embora tenha ocorrido a redução nas concentrações finais após a digestão gastrointestinal, onde a bioacessibilidade foi de  $6,50 \pm 0,01$  (%) (Tabela 11). Os tempos de retenção e os espectros de absorção no UV-Vis a 520nm de

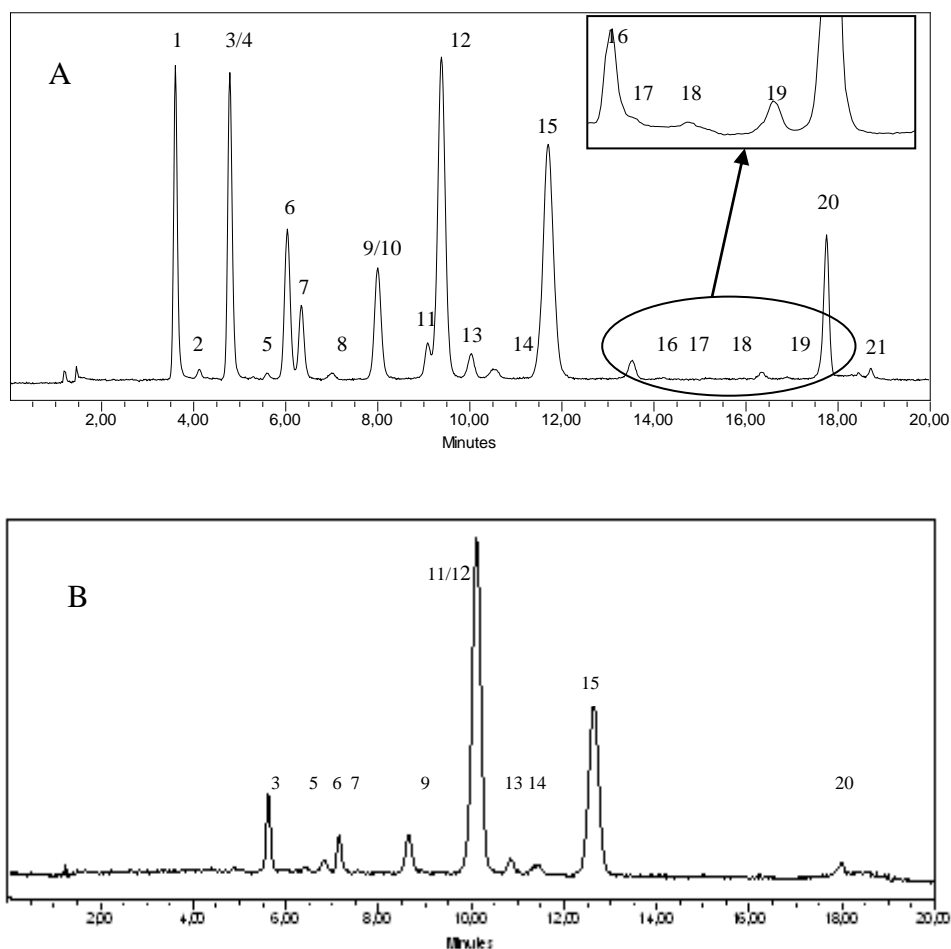
cada pico são característicos das antocianinas já estudadas na matriz. Este fruto não representou elevados valores de bioacessibilidade, no entanto, por apresentar elevados valores de concentração inicial de antocianinas, o mesmo será testado nos Ensaios de Transporte.



**Figura 43-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade. (\*\*\*) Houve diferença significativa  $p < 0,05$

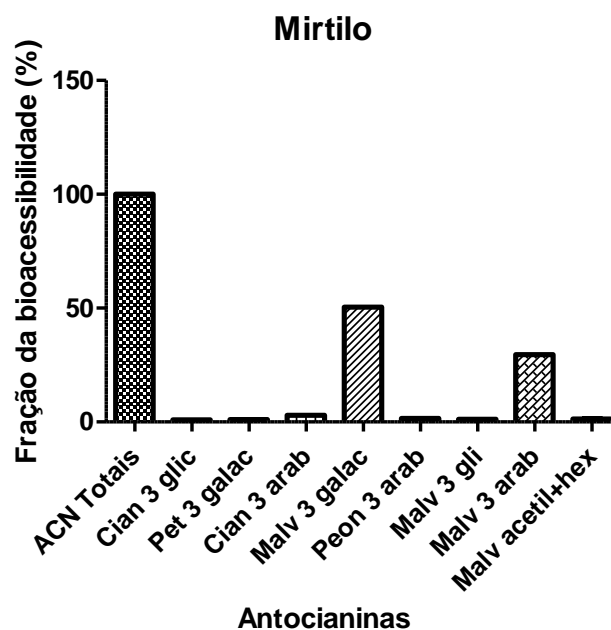
#### 4.1.8 Mirtilo

Um total de vinte e um (21) antocianinas foram observados e quantificados a partir de mirtilo: delfinidina-3-galactósido, delfinidina-3-glicosde, cianidina-3-galactósido, delfinidina-3-arabinósido, cianidina-3-glicoside, petunidina-3-galactósido, cianidina-3-arabinósido, petunidina-3-glicoside, peonidina-3-galactósido, petunidina-3-arabinósido, peonidina-3-glicosde, malvidina-3-galactósido, peonidina-3-arabinósido, malvidina-3-glicosde, malvidina-3-arabinoside, petunidina + acetoyl + hexose, malvidina + acetoyl + hexose (Figura 44A). Todas as antocianinas já havia sido descrito por outros estudos (WU & PIOR, 2005;. LOHACHOOMPOL *et al.*, 2008; MULER, SHANTZ; RICHILING, 2012), porém não no mesmo fruto. A quantidade total de antocianinas foi  $125\text{mg}100\text{g}^{-1}$  (Tabela 11). Na literatura, os dados de teor de antocianinas variam consideravelmente devido a diferenças genéticas entre variedades selvagens e cultivadas. Alguns desses valores foram medidos entre  $738\text{mg}100\text{g}^{-1}$  peso fresco e  $36\text{mg}100\text{g}^{-1}$  peso fresco, de amoras silvestres e cultivadas respectivamente (Kahle *et al.*, 2010). Este estudo permitiu a identificação de 5 dos 6 antocianidinas mais abundantes: cianidina (Cy), delfinidina (Dp), petunidina (Pt), peonidina (PN) e malvi A<sub>1</sub> (Mv), com combinações dos três tipos de açúcar (glicose, galactose e arabinose).



**Figura 44-** Cromatogramas por CLAE do perfil de antocianinas do mirtilo antes (A) e após (B) a digestão *in vitro*. Os picos presentes em ambos os cromatogramas são: Delfinidina-3-*O*-galactosídeo (1), Delfinidina-3-*O*-glicosídeo (2), Cianidina-3-*O*-galactosídeo (3), Delfinidina-3-*O*-arabinosídeo (4), Cianidina-3-*O*-glicosídeo (5), Petunidina-3-*O*-galactosídeo (6), Cianidina-3-*O*-arabinosídeo (7), Petunidina-3-*O*-glicosídeo (8), Peonidina-3-*O*-galactosídeo (9), Petunidina-3-*O*-arabinosídeo (10), Peonidina-3-*O*-glicosídeo (11), Malvidina-3-*O*-galactosídeo (12), Peonidina-3-*O*-arabinosídeo (13), Malvidina-3-*O*-glicosídeo (14), Malvidina-3-*O*-arabinosídeo (15), Petunidina+ acetil + hexose (16), Não identificados (17,18, 19 and 21), malvidina + acetil+ hexose (20)

A digestão *in vitro* foi testada a fim de determinar a influência das condições fisiológicas na manutenção de antocianinas. As antocianinas totais mantiveram-se estáveis após a fase gástrica (dados não publicados), mas houve uma significativa diminuição na recuperação após a digestão intestinal. Apenas cerca de  $6,5 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de antocianinas foram detectados após digestão intestinal, o que representou 5,2 % do conteúdo inicial.

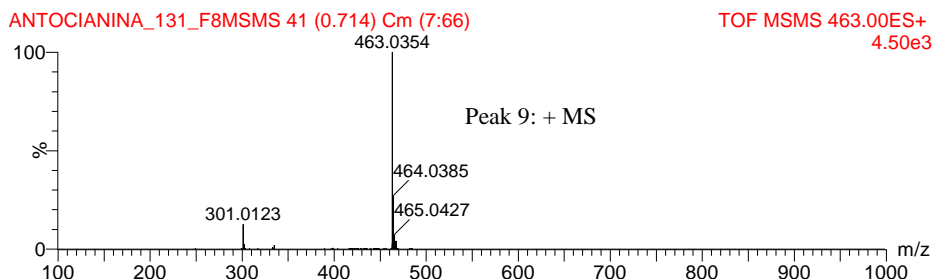
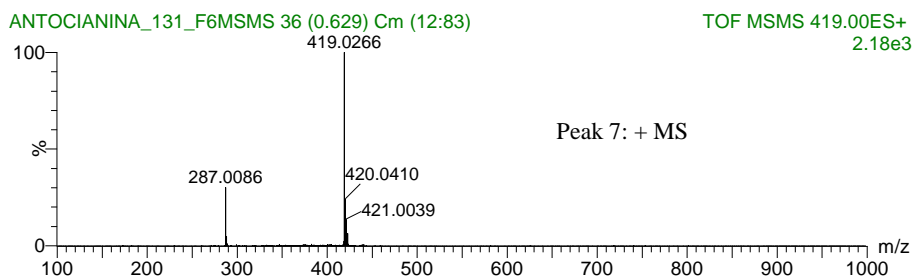
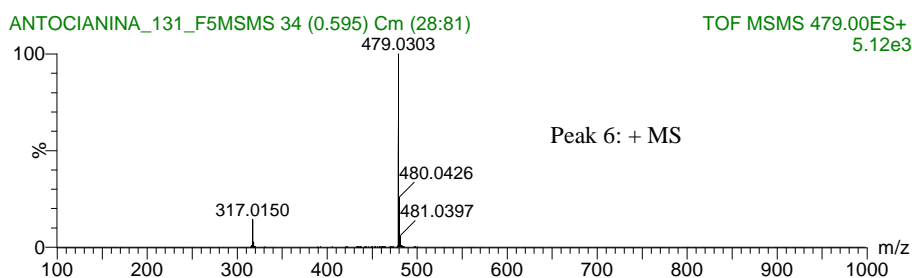
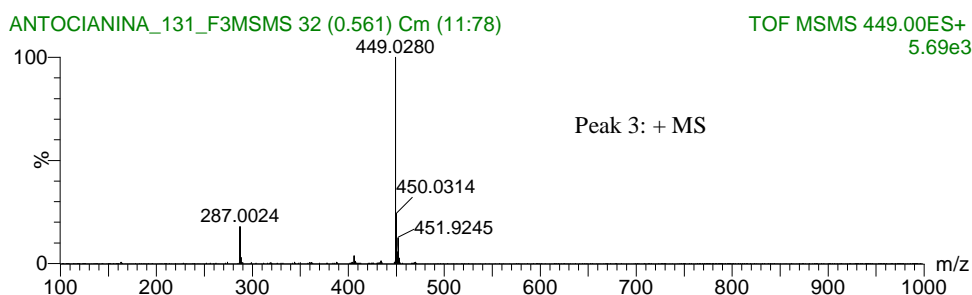


**Figura 45-** Percentual de contribuição de cada antocianina no valor total de bioacessibilidade.

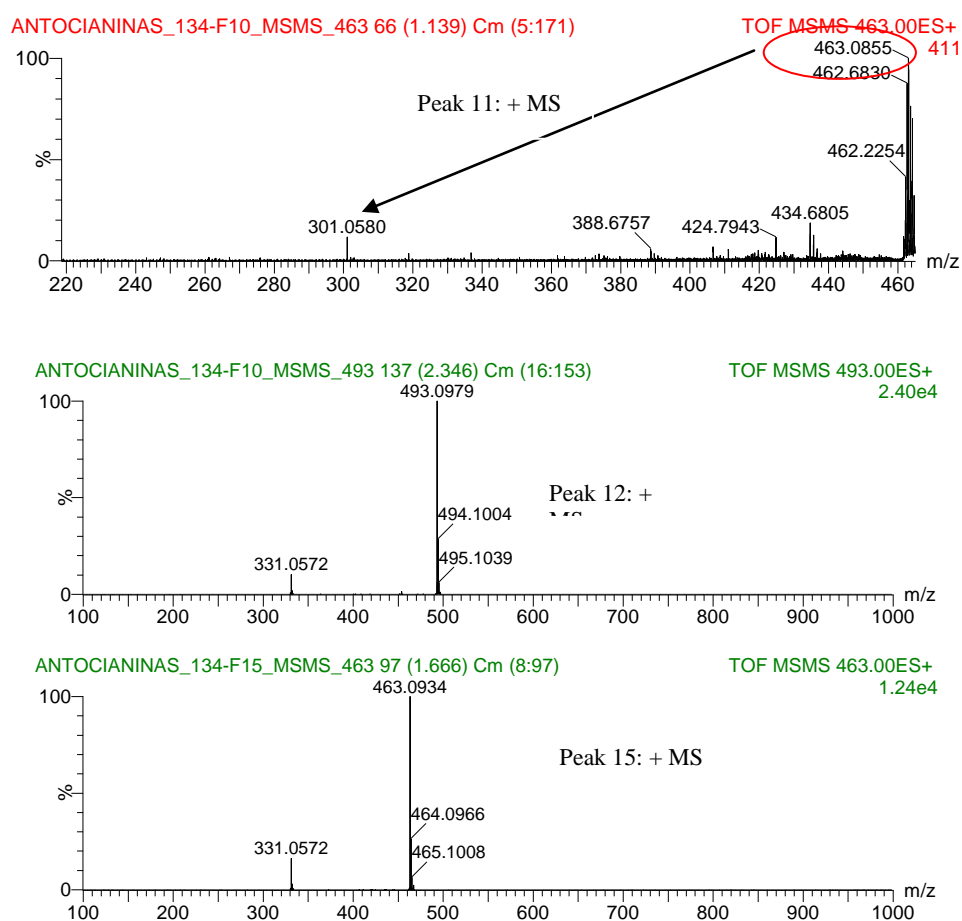
Esta redução pode ser atribuída ao efeito do processo de digestão, especificamente, para a ação de enzimas, compostos orgânicos e pH sobre os compostos bioativos e dos outros componentes da matriz alimentar. Para os compostos como as antocianinas, os valores de pH têm um efeito notável sobre a sua estabilidade e na cor dos meios de comunicação. Sabe-se que em soluções aquosas, antocianinas existem como um número de diferentes formas moleculares que estão em equilíbrio dinâmico (ASENSTORFER *et al.*, 2003). Medida que o pH é inferior a 2, a forma molecular antocianina é apresentada como um cátion flavílio, a forma mais abundante, com uma cor vermelha. Como o pH aumenta, há uma desprotonação rápida para formar uma base de quinoidal (azul) e depois de uma hidratação mais lenta do cátion flavílio ocorre, existe um equilíbrio entre *Z* e *E* (chalcona-carbitol) formas (incolor) (LOPES *et al.*, 2007). Em um modelo estático de digestão, a valores de pH intestinais (6,5-7,0) ocorreu a destruição do cromóforo antocianina, o que levou a uma dificuldade na sua identificação e quantificação. Previamente, outros autores relataram que o estudo de antocianina é complexo devido à sua aparente muito baixa biodisponibilidade, que pode ser atribuída à alta instabilidade destas moléculas na condição alcalina moderada do intestino delgado (PÉREZ-VECENTE; GIL-IZQUIERDO; GARCIA-VIGUERA, 2002) e porque o flavílio cátion é provavelmente demasiado muito hidrofílico para penetrar a parede do intestino por difusão passiva (MANACH *et al.*, 2004). Após a digestão *in vitro*, houve uma diminuição significativa na detecção de picos 1, 2, 4, 5, 8, 10, 16, 17, 18, 19 e 21 (Figura 44). Estes resultados mostraram que todas as formas de delphinidina (picos 1, 2 e 4) não foram detectadas após a digestão, provavelmente devido à sua alta sensibilidade para o efeito alcalino comparando às demais antocianinas ou devido à polimerização deste composto, produzindo uma forma indetectável. Também, parte das antocianinas poderiam co-precipitar com complexos insolúveis ou partículas apresentados na bile ou sais pancreáticos. Outro resultado importante foi o de que todas as formas malvidina, incluindo a forma de acetilato, foram estáveis e confirmadas após a digestão. Estas espécies têm dois grupos metilo no anel B (posições R1 e R3), que pode causar um efeito estérico na molécula. Esta característica pode ter as formas malvidina protegidas contra a degradação, promovendo uma contribuição de mais do que 30 % para a biodisponibilidade total de antocianina. Trabalhos recentes

estudaram os efeitos de uma fonte rica em gordura sobre a biodisponibilidade de antocianinas mirtilo, utilizando o modelo TIM, mostrou que a malvidina-3-*O*-arabinósido foram duas vezes mais bioacessível sob condições de jejum (RIBNICKY *et al.*, 2014), corroborando os nossos achados

A observação dos espectros de absorção máxima de cada pico foi uma ferramenta útil para caracterizar as antocianinas, porque elas fornecem informações sobre a natureza aglicona (WORSTALD; HONG, 1990). Após o isolamento das antocianinas, antes e após a digestão usando a válvula de seleção, a análise com detector de massa exata Q - TOF (ESI +) permitiu a identificação do íon molecular  $m/z$  de cada substância, bem como a fragmentação de íon de EM/EMS (Figura 46).







**Figura 46-** Espectros de ESI- EM/EM dos sete principais picos detectados após a digestão *in vitro* (picos de 3, 6, 7, 9, 11, 12 e 15).

Dezessete (17) antocianinas foram isoladas e caracterizadas por CLAE-EM antes de digestão *in vitro* (Tabela 10). Os dados mostraram por antocianina perfil cromatograma a 520 nm (tempo de retenção, sequência de eluição, e espectros de absorção máxima) e o espectro de ESI-MS (íon molecular) e fragmento permitiu a determinação do tipo de açúcar e o grupo ligado a ou as antocianidinas antocianina respectivamente. A Espectrometria de massa permitiu a identificação de um co-eluição de dois picos (picos 04/03 e 10/09). O pico 1 (Figura 44A) revelou um íon molecular para  $m/z$  465 e um fragmento ião a  $m/z$  303, indicando que era um derivado de delphinidina (Tabela 10). A perda de 162 unidades de massa corresponde a uma molécula de uma galactose. Assim, foi identificado como delphinidina - 3 - galactósido. A partir de picos 16 a 21, estas antocianinas foram descritas como substâncias menos polares, porque, de acordo com o fragmento do íon molecular provavelmente perderam 42 unidades de massa, como o ácido acético e 86 unidades de massa, como o ácido maléico (dados não mostrados).

**Tabela 10-** Identificação de antocianinas em extracto de mirtilo por ESI - MS / MS

<b>Pico</b>	<b>t<sub>R</sub></b>	<b>λ<sub>vis-max</sub> (nm)</b>	<b>[M<sup>+</sup>] (m/z) (Calculado)</b>	<b>[M<sup>+</sup>] m/z (Observdo)</b>	<b>MS<sup>2</sup> (m/z) (Calculado)</b>	<b>MS<sup>2</sup> (m/z) (Observado)</b>	<b>Antocianina</b>
<b>1</b>	3,60	521,5	465,1033	465,0504	303,0505	303,0183	Delfinidina-3-galactosideo
<b>2</b>	4,17	522,4	465,1033	465,0918	303,0505	303,0501	Delfinidina -3-glicosideo
<b>3</b>	4,78	516,5	449,1084	449,0280	287,0556	287,0024	Cianidina-3-galactosideo
<b>4</b>	4,78	521,4	435,0928	435,0141	303,0505	303,0509	Delfinidina -3-arabinosideo
<b>5</b>	5,59	516,5	449,1084	449,1284	287,0556	287,0676	Cianidina-3-glicosideo
<b>6</b>	6,00	526,2	479,1189	479,1103	317,0661	317,0650	Petunidina-3-galactosideo
<b>7</b>	6,33	516,5	419,0979	419,0266	287,0556	287,0586	Cianidina-3-arabinosideo
<b>8</b>	7,01	526,2	479,1189	479,1209	317,0661	317,0431	Petunidina-3-glicosideo
<b>9</b>	8,00	516,5	463,1240	463,0354	301,0712	301,0123	Peonidina-3-galactosideo
<b>10</b>	8,00	526,5	449,1084	449,0284	317,0661	317,0039	Petunidina-3-arabinosideo
<b>11</b>	9,08	526,5	463,1240	463,1452	301,0712	301,0835	Peonidin-3-glicosde
<b>12</b>	9,38	526,5	493,1346	493,0297	331,0818	331,0156	Malvidina-3-galactosideo
<b>13</b>	10,02	516,5	433,1100	433,0352	301,0712	301,0186	Peonidina-3-arabinosideo
<b>14</b>	10,50	526,2	493,1346	493,0379	331,0818	331,0222	Malvidina-3-glicosideo
<b>15</b>	11,69	526,2	463,1241	463,0354	331,0818	331,0156	Malvidina-3-arabinosideo
<b>16</b>	13,77	526,7	521,1295	521,1738	317,0661	317,0971	Petunidina+ acetil + hexose
<b>17</b>	14,50	526,2		Não identificado		NI	Não identificado
<b>18</b>	15,45	ND		NI		NI	Não identificado
<b>19</b>	16,46	520,1		NI		NI	Não identificado
<b>20</b>	17,75	526,4	535,1452	535,1864	331,0818	331,1046	Malvidina+ acetil+ hexose

ND: não determinado; UN: unido

O presente estudo demonstrou que o processo de digestão *in vitro* foi capaz de promover a liberação da antocianina a partir do mirtilo, sob as condições fisiológicas e que também este ambiente teve um efeito negativo sobre a estabilidade destes compostos. Foram quantificados cerca de 6,5 mg.100g<sup>-1</sup> de antocianinas após digestão intestinal, o que representou em 5,2% do teor inicial. Este valor pode ser explicado pela degradação ou por conversão destas antocianinas para formas ind. Além disso, verificou-se que todas as formas de delphinidina foram instáveis e não detectadas após a digestão e que todas as formas malvidinas, incluindo a forma de acetil, foram estáveis, confirmada após a digestão e resultando em contribuição de mais do que 30 % para a bioaccessibilidade total das antocianinas. Estes resultados são bastante interessantes, a fim de ajudar a comunidade científica a encontrar respostas para algumas dúvidas sobre antocianinas biodisponibilidade.

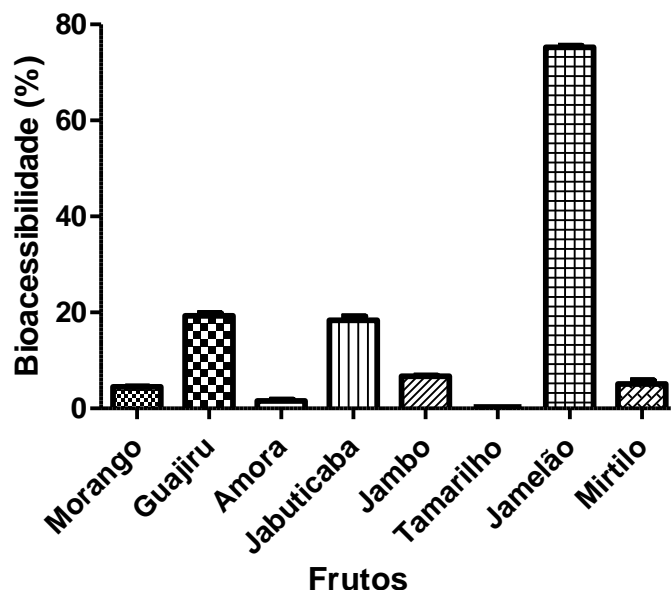
#### .4.1.9 Comparação entre frutos

Um resumo dos resultados das análises de todos os frutos estudados está apresentado na tabela 11 e o cálculo da bioaccessibilidade de ACN totais. Assim, entre eles, destacam-se os resultados de bioaccessibilidade da jabuticaba, do jamelão, do jambo e do guajiru. Exceto o guajiru, os outros três frutos apresentaram concentrações iniciais elevadas, o que possibilita que as ACN sejam quantificada, embora ocorra degradação e formação da forma chalcona em meio alcalino.

**Tabela 11-** Valores de concentração das antocianinas totais antes e após a digestão *in vitro* e bioaccessibilidade relativa.

<b>Frutos</b>	<b>Antocianinas monoméricas antes digestão <i>in vitro</i> (mg/100g)</b>	<b>Antocianinas monoméricas após digestão <i>in vitro</i> (mg/100g)</b>	<b>Bioaccessibilidade total(%)</b>
<b>Tamarilho</b>	19,51±0,03	0,06±0,002	0,29±0,03
<b>Guajiru</b>	1,75±0,05	0,34±0,009	19,54±0,05
<b>Jabuticaba</b>	326,22±15,08	62,22±3,53	19,07±3,53
<b>Jambo</b>	219,46±6,75	14,26±0,67	6,50±0,67
<b>Jamelão</b>	335,98±13,90	258,68±5,21	76,99±1,55
<b>Morango</b>	34,57±0,75	1,55±0,007	4,48±0,75
<b>Amora</b>	32,60±4,20	0,58±0,004	1,78±0,11
<b>Mirilo</b>	125,27±5,43	6,5±1,03	5,20±1,03

Média ±DV, n=3



**Figura 47-** Comparação dos valores de bioacessibilidade encontrados nos diferentes frutos analisados

#### 4.2 2ª Etapa- Estudos de bioacessibilidade seguido do transporte das antocianinas totais e majoritárias pelas células intestinais humanas Caco-2 e células epiteliais gástricas MKN-28 nos frutos selecionados

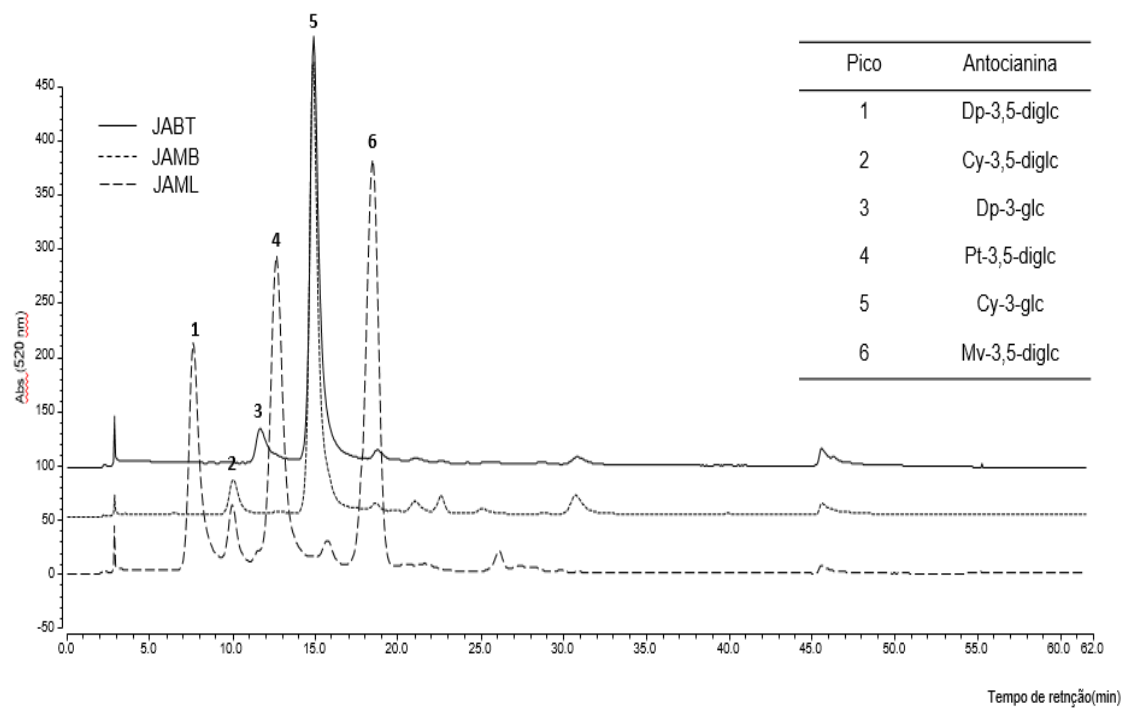
##### 4.2.1 Identificação e quantificação das antocianinas

A Tabela 12 resume os dados obtidos a partir da análise do pó das cascas do fruto por CLUE/DAD. Cinco antocianinas foram identificadas no jamelão (jambolão): delphinidina-3,5-*O*-diglucosídeo, cianidina-3,5-*O*-diglucosídeo, petunidina-3,5-*O*-diglucosídeo e malvidina-3,5-*O*-diglucosídeo (Figura 48). Anteriormente, este perfil foi caracterizado por De Brito *et al.*, (2007) e Santiago *et al.* (2016). Apenas as antocianinas com maior tamanho estrutural (delphinidina-3,5-*O*-diglucosídeo, cianidina-3,5-*O*-diglucosídeo, petunidina-3,5-*O*-diglucosídeo e malvidina-3,5-*O*-diglucosídeo) foram quantificadas durante os ensaios de transporte. O pó da casca da jabuticaba (*M. jabuticaba* (Vell.)O.Berg) apresentou duas antocianinas monoglicosiladas, que foram identificadas e quantificadas: delphinidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo. Estudos anteriores dão suporte aos resultados encontrados, pois ambas as antocianinas já foram identificadas na casca de jabuticaba M. (Vell.) O. Berg (LENQUISTE *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012). O pó da casca do jambo (*Syzygium malaccense* L.) apresentou outras duas antocianinas, identificadas e quantificadas como cianidina-3,5-*O*-diglucosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo. REYNERTSON e coautores (2008) relataram apenas a cianidina-3-*O*-diglucosídeo em *S. malaccense*, mas não detectaram a cianidina-3,5-*O*-diglucosídeo.

**Tabela 12-** As antocianinas nos frutos. Os resultados são expressos em mg de equivalentes de malvidina-3-*O*-glicosídeo 100 g<sup>-1</sup> em base seca.

Picos	Antocianinas	Jaboticaba	Jambo	Jamelão
3	Dp-3- <i>O</i> -glicosídeo	12,77±0,37		
5	Cy-3- <i>O</i> -glicosídeo	154,17±4,50		
	ACN Toatais	166,94±4,89		
2	Cy-3,5-di- <i>O</i> -glicosídeo		8,23±0,65	
5	Cy-3- <i>O</i> -glicosídeo		42,79±3,41	
	ACN totais		51,02±4,08	
1	Dp-3,5-di- <i>O</i> -glicosídeo			23,91±0,92
2	Cy-3,5-di- <i>O</i> -glicosídeo			5,60±0,21
3	Dp-3- <i>O</i> -glicosídeo			0,48±0,01
4	Pt-3,5-di- <i>O</i> -glicosídeo			44,63±1,71
6	Mv-3,5-di- <i>O</i> -glicosídeo			48,00±1,84
	ACN totais			124,10±4,78

As antocianinas de cada fruto foram caracterizadas de acordo com o tempo de retenção, sequência de eluição, espectros de absorção máxima e confirmadas pelo padrão dos fragmentos de massa (íon molecular e fragmentos) (Tabela 12). A análise da jaboticaba já mencionada, revelou dois picos a CLUE e produziu dois íons moleculares. O pico 3 revelou um íon molecular para  $m/z$  465 e um fragmento  $m/z$  303, indicando ser um derivado de delfinidina (LIANG *et al.*, 2012). Além disso, o pico 5 produziu o íon molecular  $m/z$  449 e um fragmento  $m/z$  287, indicando ser um derivado da cianidina. Além disso, a análise do jambo identificou pico 2, que apresentou um íon molecular  $m/z$  611, e os fragmentos  $m/z$  449 e  $m/z$  287, indicando ser um derivado de cianidina. O espectro de massa das antocianinas do jamelão revelou o pico 1, com um íon molecular  $m/z$  465, e dois fragmentos  $m/z$  465 e  $m/z$  303, indicando ser um derivado da delfinidina. Já o pico 2 apresentou um íon molecular  $m/z$  611, e dois fragmentos  $m/z$  449 e  $m/z$  287, indicando ser derivado da cianidina. O pico 4 revelou um íon molecular  $m/z$  641, e dois fragmentos  $m/z$  463 e  $m/z$  317, indicando ser um derivado petunidina. pico 6 revelou um íon molecular  $m/z$  655, um dois fragmentos  $m/z$  493 e  $m/z$  331, indicando ser um derivado da malvidina. A posição da hexose (posição 3 ou 5) foi avaliada em função da energia de colisão utilizada. Como mostrado na Tabela 13 também foi realizada a análise do MS<sup>3</sup>, para confirmação da natureza das antocianidinas.



**Figura 48-** Os cromatogramas de CLUE analítica de antocianinas antes da digestão *in vitro*

**Tabela 13-** Identificação das antocianinas no pó da casca do jmelão, jabuticaba e Jambo ntes de digestão *in vitro* por ESI-EM/EM e UV-Vis.

Picos	t <sub>R</sub> (min)	UV-vis (nm)	[M] <sup>+</sup> (m/z)	MS/MS (m/z)	MS/MS/MS (m/z)	MS/MS/MS (m/z)	Antocianinas	
<b>Jamelão</b>								
1	8.0	274.8/520.1	627.2425	465.1688	303.0991	257.2113	229.2001	dp-3,5-di- <i>O</i> -diglc
2	10.0	277.1/515.3	611.2027	449.1440	287.0698	213.2201	137.2508	cy-3,5-di- <i>O</i> -diglc
4	13.0	274.8/525.0	641.3052	479.2256	317.1504	302.1302	274.0012	pt-3,5-di- <i>O</i> -diglc
6	18.5	274.8/523.8	655.3374	493.2405	331.1596	315.1075	287.1095	mv-3,5-di- <i>O</i> -diglc
<b>Jabuticaba</b>								
3	12.0	275.6/526.2	465.1116	303.0590		257.0412	229.20448	dp-3- <i>O</i> -glc
5	15.0	279.5/516.5	449.1083	287.0556		213.0720	137.0346	cy-3- <i>O</i> -glc
<b>Jambo</b>								
2	10.0	277.1/512.3	611.1761	449.1061	287.0676	213.0720	137.0346	cy-3,5-di- <i>O</i> -diglc
5	15.0	279.1/515.4	449.1089		287.0575	213.0774	137.0389	cy-3- <i>O</i> -glc

Abreviações: delphinidina-3-*O*-glicoside (Dp-3-*O*-glc); delphinidina-3,5-*O*-diglicoside (Dp-3,5-*O*-diglc); cianidina-3-*O*-glicosideo (Cy-3-*O*-glc); cianidina-3,5-*O*-diglicosideo (Cy-3,5-*O*-diglc); petunidina-3,5-*O*-diglicosideo (Pt-3,5-*O*-diglc), peonidina-3,5-*O*-diglicosideo (Pn-3,5-*O*-diglc) e malvidina-3,5-*O*-diglicosideo (Mv-3,5-*O*-diglc).



#### 4.2.1.1 Elaboração das Curvas analíticas

Todas as análises foram realizadas utilizando os padrões analíticos da Tabela 14 para quantificação das antocianinas presentes tanto nos frutos da 1ª etapa deste estudo, como na 2ª etapa, para a quantificação das antocianinas após os Ensaio de transporte.

**Tabela 14** – Antocianinas utilizadas como padrão analítico com suas respectivas equações da reta e correlação

Padrão analítico	Equações:	Correlação
Cianidina-3-glicosídeo:	$y = 9,55 \cdot 10^6 x + 2,65 \cdot 10^4$	( $R^2=0,998$ )
Delfinidina-3-glicosídeo	$y = 1,09 \cdot 10^7 x + 3,35 \cdot 10^4$	( $R^2=0,995$ )
Pelargonidina-3-glicosídeo	$y = 1,03 \cdot 10^7 x + 6,71 \cdot 10^3$	( $R^2=0,998$ )
Cianidina-3,5-diglicosídeo	$y = 8,23 \cdot 10^6 x + 3 \cdot 10^5$	( $R^2=0,989$ )
Malvidina -3-glicosídeo	$y = 11,635x$	( $R^2=0,999$ )

#### 4.2.2 Testes de bioacessibilidade para os Ensaio de Transporte

Nesta situação, os resultados dos ensaios de bioacessibilidade gástrica e intestinal correspondem a fração de digerido das respectivas etapas de digestão que entraram em contato com a monocamada celular e estão apresentados na tabela 15. Os valores observados são inferiores aos encontrados durante a fase de seleção dos frutos, pois neste caso as antocianinas presentes no digerido podem ter sofrido degradação ou mesmo metabolismo pelas enzimas encontradas na borda apical.

**Tabela 15-** Percentual de bioacessibilidade calculada a partir dos valores de ACN totais quantificados no compartimento apical (antes) do ensaio de transporte

Pó de frutos	ACN totais antes digestão (mg.100g <sup>-1</sup> )	ACN totais fase gástrica (mg.100g <sup>-1</sup> )	ACN totais fase Intestinal (mg.100g <sup>-1</sup> )	Bioacessibilidade gástrica (%)	Bioacessibilidade intestinal(%)
Jaboticaba	166,94±48,69	20,52±4,12	16,06±3,55	13,13±7,5	10,84±6,27
Jambo	51,02±4,08	23,59±7,10	7,56±0,65	45,89±11,04	14,88±1,67
Jamelão	124,16±4,78	80,88±10,72	50,44±6,79	65,12±7,63	40,62±4,88

Os ensaios de bioacessibilidade necessitaram de algumas modificações, pois as massas iniciais (0,5 g) utilizadas para na fase de seleção dos frutos não permitiram a detecção e quantificação de antocianinas no compartimento basolateral após os testes de

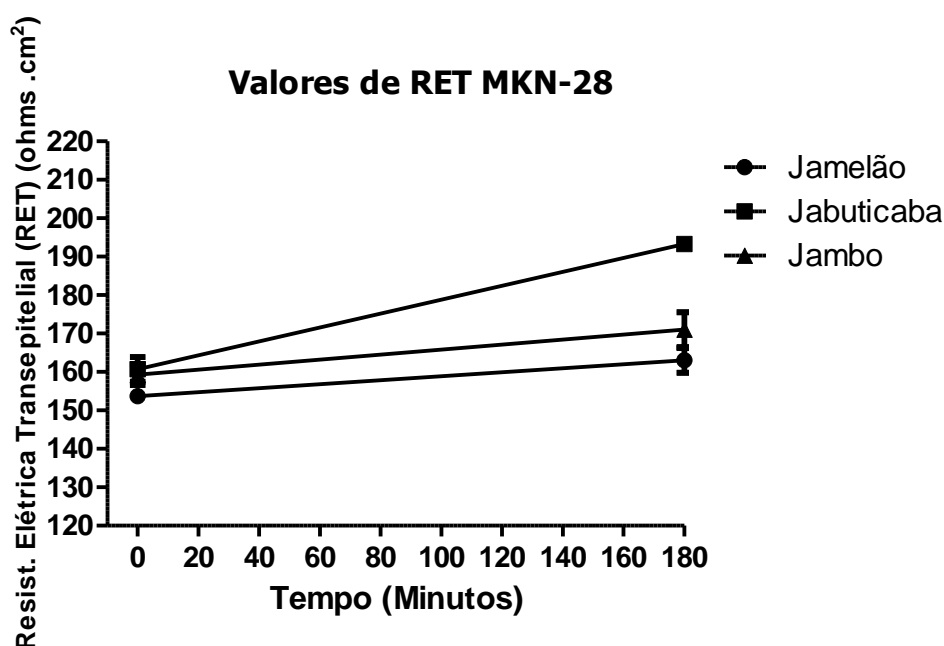
transporte. Desta forma, a massa inicial foi calculada para que a concentração final fosse três vezes superior ao do primeiro experimento e nesta situação então foi possível a detecção e quantificação de antocianinas no compartimento basolateral. O aumento de massa continua coerente com as quantidades normais ingeridas, pois a maior massa de análise foi de 0,6g.

A influência das condições fisiológicas na recuperação de antocianinas tem demonstrado ser crucial para a estabilidade e a absorção. Assim, no presente estudo, um modelo de digestão foi utilizado para determinar a quantidade de antocianinas dos pós da casaca da jabuticaba, jambo e jamelão que estavam disponíveis para a absorção e transporte, e posterior biodisponibilidade. A bioacessibilidade destas antocianinas após digestão gástrica foi de 13 % para jabuticaba, 45 % para jambo e 65 % para Jamelão, enquanto a bioacessibilidade intestinal foi de 10 % para jabuticaba, 15 % para jambo e 45 % para Jamelão. Estes baixos resultados baixos podem ser explicados pela a liberação incompleta das antocianinas a partir da matriz, devido as possíveis interações com outros compostos, tais como fibras e lípidos; pela hidrólise enzimática e, especialmente, pela instabilidade de antocianinas sob condições alcalinas (KOSINSKA-CAGNAZZO *et al.*, 2015). A destruição do cromóforo da antocianina ocorre sob um pH intestinal (7,4), o que leva a sua forma incolor (HE; GIUSTI, 2010). Esta modificação estrutural dificulta sua identificação e quantificação, subestimando os valores detectados. Sob condições gástrica e intestinal, o jamelão foi capaz de promover os maiores valores de bioacessibilidade (~ 65 % e 45 %), respectivamente, provavelmente porque este fruto apresenta quatro antocianinas diglicosiladas, que poderiam impactar positivamente sobre a sua estabilidade. No que tange a natureza da anthocianidina, os derivados da delphinidina e cianidina foram os únicos com o bioacessibilidade inferior, que também foi relatado por MCDOUGALL e colaboradores (2005).

#### **4.2.3 Ensaio de Transporte com MKN-28**

##### **4.2.3.1 Avaliação da integridade da monocamada MKN-28 através da medição da Resistência elétrica transepitelial (RET)**

A integridade das junções oclusivas das membranas formadas pelas células MKN-28 cultivadas na placa transwell foi avaliada através da determinação dos valores de RET antes ( $t = 0$  minuto) e após o ensaio ( $t = 180$  minutos). Os valores obtidos indicaram que a monocamada estava confluenta, com as junções oclusivas formadas e que as mesmas se apresentavam como uma barreira para a troca de eletrólitos e consequentemente e por esta razão gerou uma resistência elétrica. Os valores de resistência elétrica transepitelial encontrados variaram entre 150 e 196  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  a 37°C (Figura 49), sendo portanto igual ou superior a 150  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  a 37°C, como indicativo de integridade das junções oclusivas e portanto integridade das membranas. Além disso, após o teste de transporte não houve redução dos valores individuais, resultado que demonstra que o extrato digerido não alterou a integridade da membrana, mesmo após 3 horas de contato.



**Figura 49-** Valores de Resistência transepitelial (RET) medidos nas membranas de células MKN-28 ao tempo inicial (t = 0 minuto) e após o ensaio de transporte (t = 180 minutos) a 37°C em pH 5.0 (compartimento apical) e pH 7.4 (compartimento basolateral). Os valores expressos estão em  $\Omega.cm^2$  da média de três determinações. A barra indica o desvio padrão.

#### 4.2.3.2 Eficiência do transporte de antocianinas nas células MKN-28 dos três frutos

O digerido gástrico proveniente da digestão *in vitro* dos pós dos três frutos em estudo, foi analisado por CLUE, apresentando a composição antociânica como consta na tabela 16. Este digerido foi aplicado no lado apical da placa transwell, com a monocamada de células MKN-28. As antocianinas foram transportadas da região apical para basolateral através da monocamada celular e da membrana semi-permeável, e alíquotas de 150 $\mu$ L da fração permeada foram coletadas do compartimento basolateral em diferentes tempos. Os resultados do transporte de antocianinas monoméricas totais dos três frutos são apresentados pela tabela 16.

**Tabela 16-** Composição antociânica presente no digerido gástrico dos três frutos aplicado no compartimento apical

Concentração de ACN ( $\mu$ M)	Frutos		
	Jabuticaba	Jamelão	Jambo
ACN monoméricas Totais	7,88 $\pm$ 1,56	31,02 $\pm$ 4,11	9,09 $\pm$ 2,73
Cianidina-3-O-glicosídeo	7,27 $\pm$ 1,39	-	7,82 $\pm$ 2,46
Delfinidina- 3-O-glicosídeo	0,60 $\pm$ 0,15	-	-
Cianidina-3,5-O-diglicosídeo	-	1,42 $\pm$ 0,19	1,26 $\pm$ 0,26
Delfinidina-3,5-O-diglicosídeo	-	6,09 $\pm$ 1,07	-

<b>Petunidina 3,5- diglicosideo</b>	-	11,32±1,3	-
<b>Malvidina 3,5- diglicosideo</b>	-	12,18±1,55	-

Estas alíquotas foram quantificadas e as concentrações de antocianinas totais e das antocianinas presentes no permeado de cada fruto e nos diferentes tempos foram determinadas e estão representados na tabela 17.

**Tabela 17** – Valores de concentração de antocianinas encontradas no compartimento basolateral em função dos diferentes tempos após ensaio de transporte em células MKN-28.

<b>JABUTICABA</b>					
<b>Antocianinas</b> ( $\mu\text{M}$ )	30 min	60 min	120 min	180 min	Coeficiente de correlação de Pearson (r)
<b>ACN totais</b>	0,16 ± 0,02 a	0,27 ± 0,06 a,b A	0,45 ± 0,10 b A	0,72 ± 0,11 c A	0,867**
<b>CY- 3-O- glic</b>	0,15 ± 0,02 a	0,25 ± 0,05 a,b A	0,44 ± 0,10 b,c A	0,69 ± 0,11 c	0,864**
<b>Dp-3-O- glic</b>	0,01 ± 0,00 a	0,02 ± 0,00 a	0,02 ± 0,01 a,b	0,03 ± 0,01 b	0,800**
<b>JAMBO</b>					
<b>ACN totais</b>	0,31 ± 0,09 a	0,63 ± 0,10 a,b B	1,09 ± 0,14 b B	1,68 ± 0,30 c B	0,891**
<b>Cy-3-O-glic</b>	0,27 ± 0,08 a	0,56 ± 0,08 a,b B	0,96 ± 0,13 b,c B	1,46 ± 0,27 c	0,884**
<b>Cy-3,5O-diglic</b>	0,04 ± 0,01 a	0,07 ± 0,01 a	0,09 ± 0,04 a	0,22 ± 0,03 b	0,818**
<b>JAMELÃO</b>					
<b>ACN totais</b>	0,26 ± 0,13 a	1,41 ± 0,04 a C	2,64 ± 0,05 b C	4,11 ± 0,24 b C	0,989**
<b>Cy- 3, 5-O- diglic</b>	0,01 ± 0,01 a	0,07 ± 0,00 a	0,12 ± 0,00 b	0,20 ± 0,01 b	0,984**
<b>Dp-3,5-O- diglic</b>	0,05 ± 0,02 a	0,25 ± 0,02 b	0,47 ± 0,03 c	0,68 ± 0,05 d	0,983**
<b>Pt-3, 5-O- diglic</b>	0,10 ± 0,05 a	0,53 ± 0,01 a	0,97 ± 0,01 b	1,51 ± 0,08 b	0,990**
<b>Mv-3, 5-O- diglic</b>	0,12 ± 0,05 a	0,56 ± 0,01 a	1,07 ± 0,01 b	1,72 ± 0,10 b	0,987**

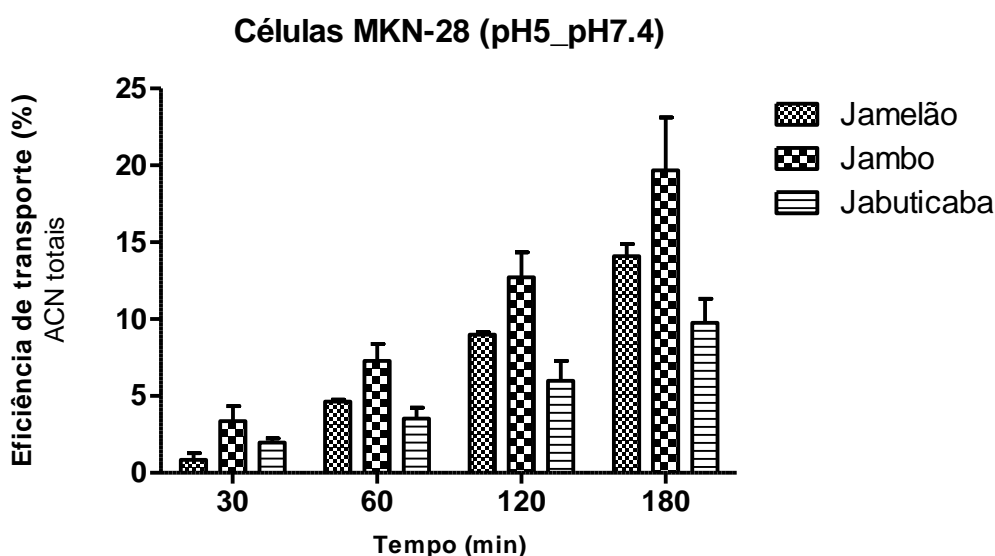
Letras minúsculas diferentes na mesma linha e para cada fruto correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha e para cada tempo correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

(\*\*) A correlação é significativa estatisticamente a nível  $p < 0,01$ .

Os resultados demonstraram que o transporte através da célula MKN-28 foi tempo-dependente, apresentando diferentes percentuais de transporte de ACNs totais

nos diferentes tempos de coleta para os três frutos. Aos 180 minutos de exposição do ensaio, o digerido gástrico do pó de jambo apresentou maiores valores de transporte, chegando a quase 20%, seguido pelo jamelão (14%) e jabuticaba (10%) (Figura 50). Após as coletas, as amostras não apresentavam coloração visível, confirmando que as mesmas não se apresentavam na sua forma mais estável, ou seja, se apresentavam em sua forma hemiacetal ou chalcona. Assim, todas as amostras foram acidificadas com 1% de HCl 6M a fim de evitar a degradação das ACN e permitir a conversão para a forma catiônica. Esta etapa já havia sido relatada em trabalhos anteriores (FERNANDES *et al.*, 2012), sendo essencial, pois, mesmo os eluentes cromatográficos não seriam suficientes para a conversão para a forma cationa, podendo-se assim subestimar sua quantificação. As concentrações de ACN dos digeridos gástricos, utilizadas nos ensaios de transporte eram inferiores a concentração de 200µg/mL já relatados por Faria e colaboradores (2009), como sendo crítica para a saturação dos transportadores de glicose, caso este fosse um dos possíveis mecanismos de transporte.



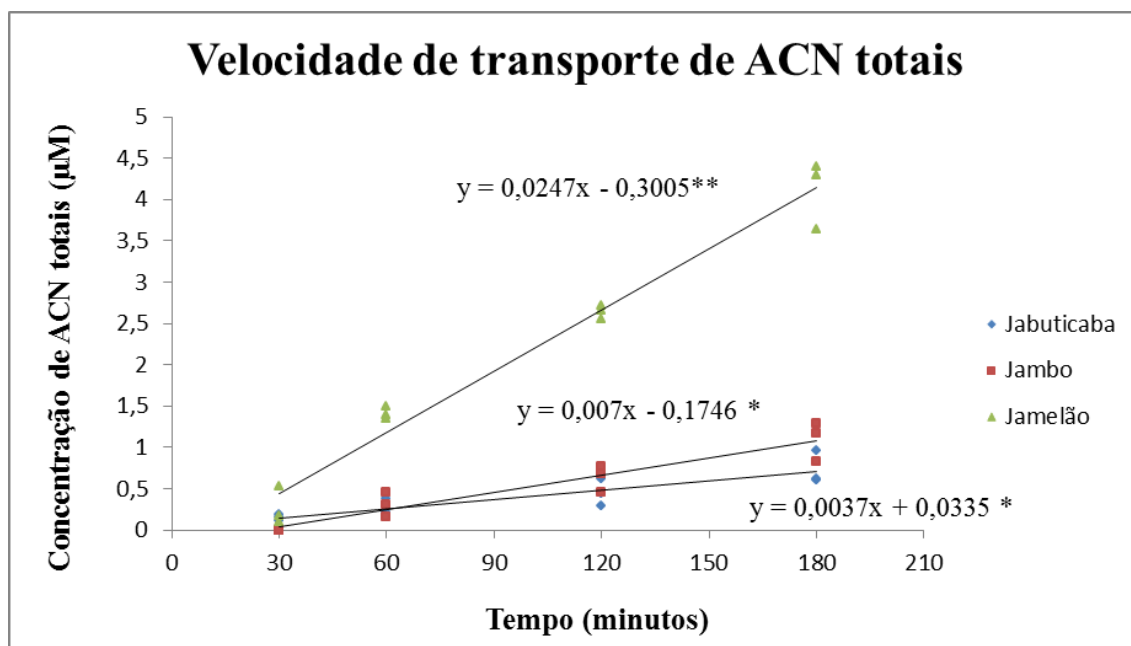
**Figura 50**– Eficiência de transporte de 7 µM, 9 µM e 31 µM de digerido gástrico de pó de jabuticaba, jambo e jamelão, respectivamente, através das células MKN-28 (apical → basolateral) em pH 5.0 apical/pH 7.4 basolateral). Os resultados são apresentados como eficiência de transporte (%) (média ± SEM). As diferenças significativas entre os transportes foram avaliadas com  $p < 0.05$ .

Os estudos anteriores, utilizando modelo de absorção gástrico (MKN-28) estimaram que a absorção da cianidina-3-*O*-diglicosídeo, malvidina-3-*O*-glucosídeo e delphinidina-3-*O*-glicosídeo foi de cerca de 10% em 3 h (FERNANDES *et al.*, 2012). Considerando as duas antocianinas presentes nas cascas de jambo, verificou-se que a presença de uma molécula de glicose adicional não afetou a quantidade dos compostos transportados. Com respeito ao jamelão, a 180 min, a cianidina-3,5-*O*-diglicosídeo e malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo não apresentaram diferenças significativas nos valores de eficiência de transporte; no entanto, elas apresentaram maiores percentuais quando comparadas a delphinidina-3,5-*O*-diglicosídeo e petunidina-3-*O*-glicosídeo (Figura 60). A malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo apresentou a maior concentração no compartimento apical

e sua elevada eficiência de transporte pode estar relacionada a sua superior concentração inicial.

No entanto, cianidina-3,5-O-diglicosídeo apresentou a concentração inicial mais baixa no compartimento apical, mas não apresentou diferença significativa na eficiência do transporte, provavelmente devido a sua maior estabilidade. A delphinidina-3,5-O-glucose apresentou menor eficiência do transporte em 180 min. A cianidina-3,5-O-diglicosídeo estava presente nas cascas do jambo e jamelão, mas a quantidade transportada não foi a mesma (Fig. 60 e 61)..

Além disso, a construção da reta de regressão linear das concentrações de antocianinas permeada nos diferentes tempos representou uma ferramenta muito útil, pois os valores do coeficiente angular (inclinação) de cada reta permitiram avaliar a velocidade de transporte dos compostos através da monocamada. Entre os valores obtidos e conforme representado na figura, as antocianinas presentes no jamelão foram transportadas mais rapidamente que as demais. Os valores de coeficiente angular das retas foram de 0,0247, 0,007 e 0,0037 do jamelão, jambo e jabuticaba, respectivamente. Esta observação significa dizer que ao consumirmos os três frutos, o  $t_{max}$  (tempo em que a concentração plasmática máxima) para as antocianinas totais é atingido mais rapidamente, ou seja, que a mesma apresenta maior biodisponibilidade que as demais, pois o conceito de biodisponibilidade relaciona a velocidade como fator determinante (Figura 57).



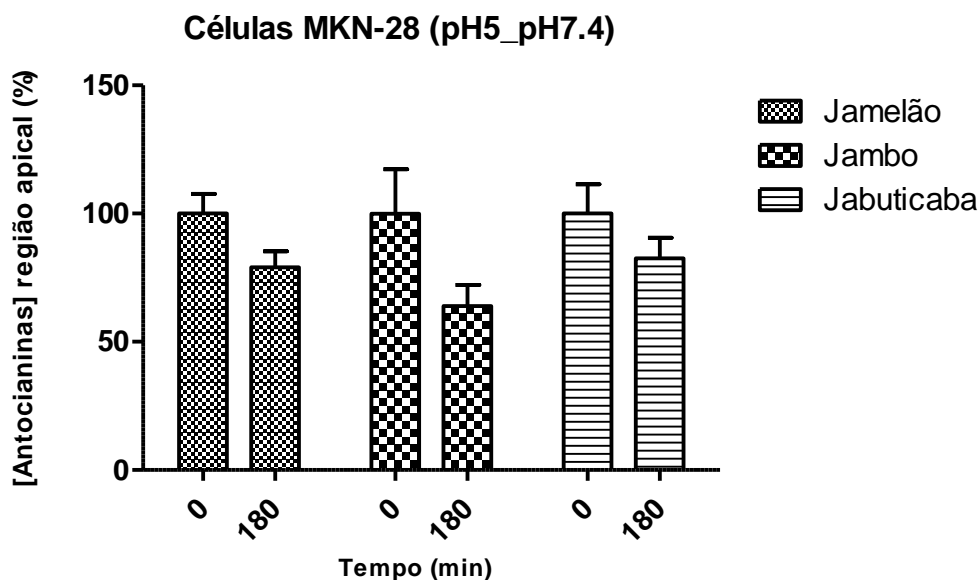
**Figura 51** - Retas de regressão linear das concentrações de ACN quantificadas na fração permeada dos pós dos três frutos após os tempos em monocamadas de MKN-28. (\*\*) Diferença estatística a nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ )

Em condições estomacais, a região apical das células pertencentes a mucosa gástrica é parcialmente protegida por um muco que contém íons de  $\text{NaHCO}_3$ , que tem a função de proteger este epitélio contra os baixos valores de pH, embora o seja parcialmente. Desta forma, o alimento ao alcançar este compartimento, rapidamente é envolvido por um ambiente com valores baixos de pH (1-2) e nesta condição, ocorre um equilíbrio entre o alimento e meio. Fernandes e colaboradores (2012) realizaram uma adição constante de HCl (concentração final = 0,3%) a cada 30 minutos ao

compartimento apical, a fim de manter o pH constante ao longo do ensaio. Esta abordagem objetiva manter os valores de pH constantes, no entanto durante o transporte celular *in vivo*, ocorre uma interação entre as ACN e célula epitelial, tornando predominante a presença das formas hemiacetal e chalcona em pH fisiológico (7.4). Assim, para o estudo do transporte *in vitro*, optou por criar um ambiente intermediário, entre o pH gástrico e o pH fisiológico (7.4). Para tal, após a simulação da digestão gástrica o pH dos digeridos foi ajustado de  $2.5 \pm 0.1$  para  $5,0 \pm 0.1$ , além de realizar uma mistura entre o digerido e solução salina de Hank (pH 5.0) (1:1), a fim de atuar como tampão.

O pH do meio e o pKa das ACN determinaram a forma estrutural que elas se apresentam na região apical para serem transportada pela célula. Assim, como as antocianinas monoglicosiladas e diglicosiladas se apresentam predominante como cátions flavílium coloridos em pH inferiores a 3.0 e 2.0, respectivamente (PINA et al., 2012) e em pH entre 3-5 predominam as formas chalconas, em pH 5.0, elas estavam em sua forma chalcona ao serem transportadas pelas células. Entretanto, a fração glicosídica não é capaz de atravessar a membrana plasmática, exceto pela utilização de transportadores. Conforme, relatos anteriores, as antocianinas são rapidamente detectadas no plasma, desta forma podem ocorrer diferentes mecanismos de transporte, incluindo a difusão passiva e transporte facilitado, dependendo das formas de antocianinas presentes. Além disso, devido a sua elevada massa estrutural, a absorção gástrica paracelular, através do espaço intercelular parece improvável, uma vez que o epitélio gástrico proporciona uma barreira excepcionalmente impermeável, impedindo a difusão mesmo da amônia e monóxido de carbono, que geralmente se difundem livremente através das membranas celulares. O mais provável é que o transporte das antocianinas seja mediado por um carreador trans celular.

Além disso, a quantificação da fração apical no tempo inicial (t= 0 minuto) e após o teste no tempo 180 minutos forneceu informações sobre o percentual de degradação ou metabolismo provocado pelo contato da célula com as ACN (Figura 58).



**Figura 52-** Valores percentuais de ACN totais quantificadas nos tempos 0 e 180 no compartimento apical do ensaio de transporte com células MKN-28. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os três frutos.



Esta determinação pôde ser realizada pela diferença percentual entre o total de ACN antes do ensaio e a soma das frações de permeação máxima (basolateral) e apical após o ensaio e os resultados demonstraram que o percentual de degradação ou metabolismo que ocorreu na região apical não apresenta diferença estatística entre os três frutos.

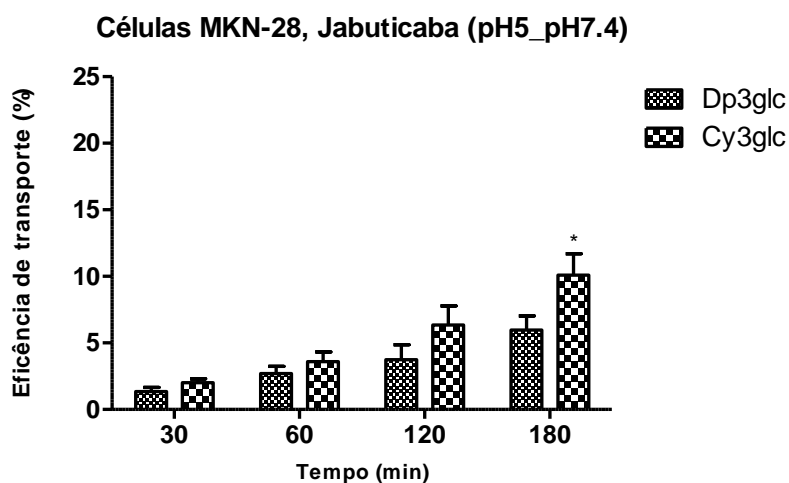
**Tabela 18** – Valores percentuais da fração de ACN totais degradada ou metabolizada após contato com as células MKN-28.

FRUTO	Fração apical após ensaio (%)	Fração máxima permeada (%)	Fração degradada ou metabolizada (%) <sup>(*)</sup>
<b>Jaboticaba</b>	82,52±13,90	9,74±2,70	7,74**
<b>Jambo</b>	63,95± 14,28	19,66±5,96	16,39
<b>Jamelão</b>	79,08±14,83	14,09±1,34	6,83**

(\*) A fração que sofreu degradação ou metabolismo foi calculada pela equação: 100 - (Fração apical + Fração max permeada). Os valores foram obtidos pela média ± DV (n=3)

(\*\*) Não houve diferença estatística a nível de significância de 5% (p<0,05)

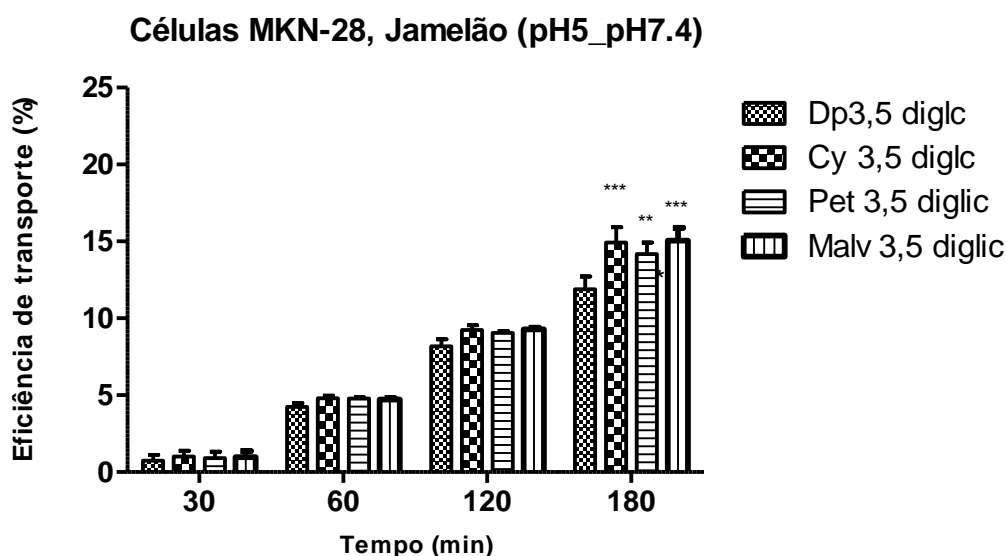
No que diz respeito a avaliação individual das antocianinas presentes no pó dos três frutos, a jaboticaba apresenta duas ACNs monoglicosiladas (delfinidina e cianidina), que foram transportadas tempo-dependentes. Dentre elas, a cianidina apresentou diferença significativa no seu transporte comparativamente a delfinidina 3-glicosídeo, no entanto é importante ressaltar que a mesma representa o conteúdo majoritário de antocianinas do fruto. Além disso, a delfinidina apresenta uma hidroxila na posição 5 do anel B, além da cianidina. Esta característica a torna mais hidrofílica, porém mais susceptível a reações. Além disso, como o local, mecanismo de absorção e bioatividade destas moléculas ainda não estão bem definidos, sua maior hidrofiliabilidade poderia dificultar seu transporte passivo, se fosse este um dos mecanismos, já que em pH 5,0 sua forma chalcona (não ionizada), não seria um impedimento para o seu transporte. No entanto, não parece ser esta a via preferencial de transporte.



**Figura 53**– Valores de eficiência de transporte das antocianinas presentes na jaboticaba entre os compartimentos apical-basolateral nas células MKN-28. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas (p< 0,05) entre as duas antocininas.

Os resultados de eficiência de transporte de cada antocianina presente no jamelão demonstraram que o transporte também é tempo-dependente e que o maior percentual de transporte ocorre aos 180 minutos. Além disso, a avaliação estatística apontou não haver diferenças no transporte entre a cianidina-3,5-*O*-diglicosídeo e a malvidina 3,5-*O*-diglicosídeo, onde ambas apresentam os maiores percentuais de transporte (Figura 54). Poderíamos presumir que a malvidina 3,5-*O*-diglicosídeo apresentaria maiores valores, já que a mesma se apresentava em maior concentração no pó, no entanto a cianidina que estava em menor concentração apresentou elevado percentual de transporte. Nos tempos 30, 60 e 120, não foi possível verificar diferenças comportamentais entre as antocianinas. Não há relatos na literatura sobre o transporte desta cianidina em células MKN-28 ou outras células. Fernandes e colaboradores investigou o transporte da malvidina 3-glicosídeo, da cianidina 3-glicosídeo e a delphinidina 3-glicosídeo e foi observado um percentual de 10 % de eficiência de transporte para as três. Além disso, destaca-se o fato de que estes autores as avaliaram de forma isolada.

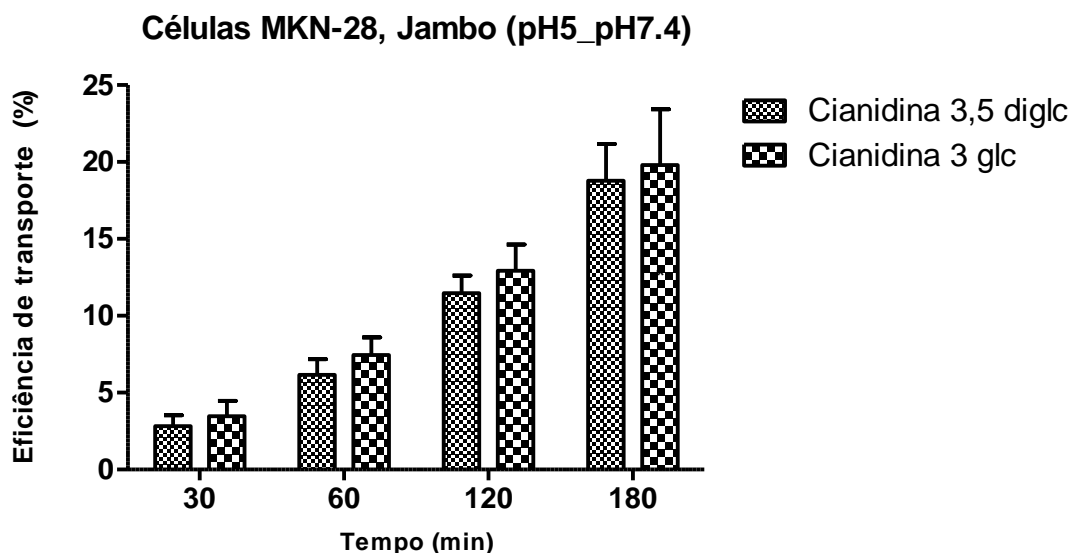
Cabe também ressaltar que as quatro ACN são diglicosiladas nas posições 3 e 5 e que portanto apresentam elevado volume estrutural, no entanto são capazes de atravessar a membrana plasmática. Este fato demonstra que o mecanismo de transporte pode não ocorrer por difusão passiva e que poderia ser através de um transportador.



**Figura 54-** Percentuais de eficiência de transporte das antocianinas majoritárias presentes no pó do jamelão do compartimento apical-basolateral após 180 minutos.

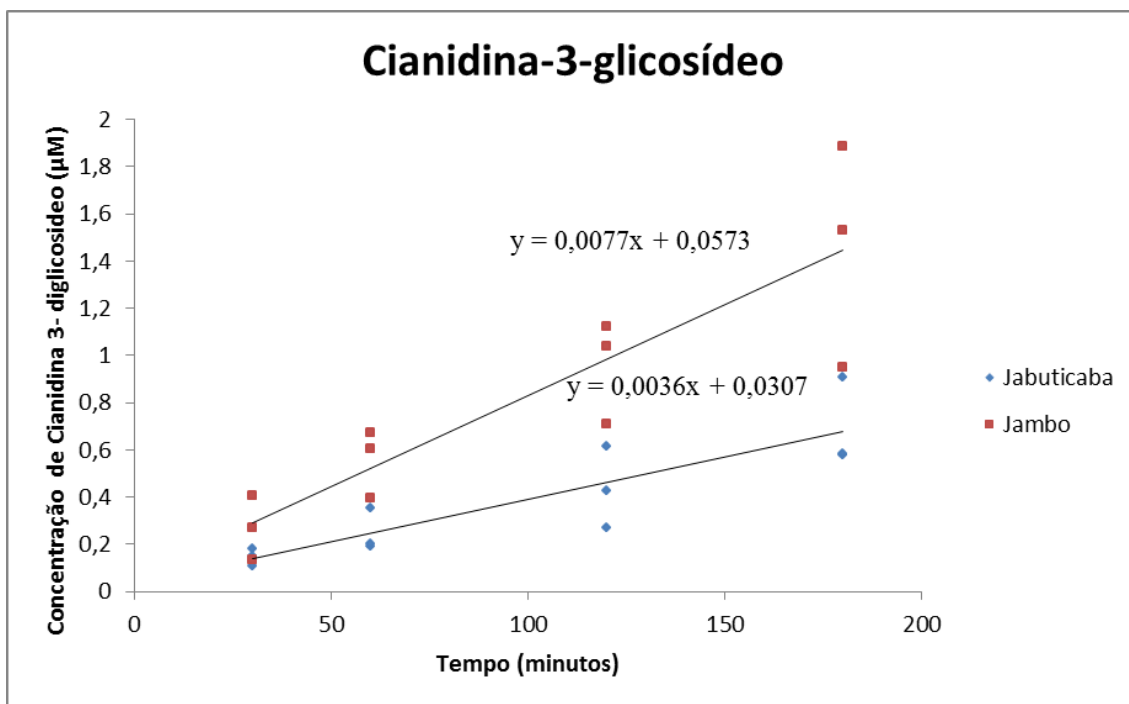
Segundo Passamonti e colaboradores 2002, as antocianinas podem se ligar a bilitranslocase, um transportador de ânions orgânicos presentes nas células epiteliais da mucosa gástrica, serem transportadas através destas células e desempenharem um papel importante na biodisponibilidade das antocianinas. Manzano e colaboradores (2010) ao investigarem o efeito dos compostos fenólicos no morango e da maçã, na captação e transporte de glicose em células Caco-2, verificaram que a pelargonidina 3-glicosídeo foi capaz de inibir em 26% o poder inibidor total dos compostos presentes no morango. Além disto, verificaram que a inibição foi maior do transportador GLUT2 e menor no SGLT1, o que sugere que o transporte de ACN pode ocorrer através do mesmo. Desta

forma, estes fatos podem explicar parcialmente a observação de que as ACN diglicosiladas são capazes de atravessar as membranas apical e basolateral das células epiteliais. Elas poderiam ser transportadas através de transportadores de membrana tal como a bilitranslocase ou os transportadores GLUT2 de glicose.



**Figura 55-** Percentual de eficiência de transporte das antocianinas majoritárias presentes no pó do jambo do compartimento apical-basolateral após 180 minutos em células MKN-28

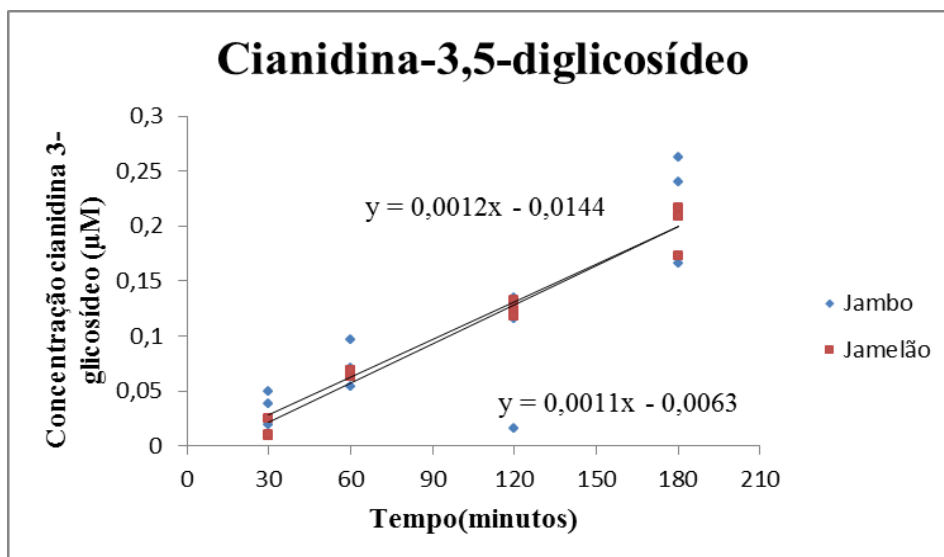
Além disso, a eficiência do transporte de cianidina-3-*O*-glucosídeo do jambo foi maior do que a observada a partir da jabuticaba, na qual foi alterada pela presença adicional de um monoglicosídeo em outra antocianina: delphinidina-3,5-*O*-glucose. Fernandes, de Freitas e Mateus (2014) demonstraram que as antocianinas foram capazes de atravessar a monocamada das células MKN-28, de forma tempo-dependente, provavelmente, através de um mecanismo de transporte saturável. Além disso, Oliveira e cols. (2015) constataram que os transportadores GLUT1, GLUT3, e MCT1 foram expressos nas células MKN-28. As simulações moleculares mostraram que o receptor humano GLUT1 forma complexos com a cianidina-3-*O*-glicosídeo, delphinidina-3-*O*-diglicosídeo e malvidina-3-*O*-diglicosídeo, testados em diferentes estados de protonação



**Figura 56-** Retas de regressão linear das concentrações de cianidina-3-glicosídeo quantificadas na fração permeada dos pós da jaboticaba e jambo após os tempos em monocamadas de MKN-28.

Não houve diferença estatística a nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ )

Não há relatos sobre a avaliação da eficiência de transporte destes compostos em células MKN-28. Este é um trabalho inédito. O interesse por esta linhagem celular está em expansão e necessita de maior investigação no que tange a sua caracterização, para a identificação de seus possíveis transportadores de membranas, enzimas metabólicas e etc. Além disso, muitos autores demonstraram que as antocianinas de diversas fontes são absorvidas intactas, podendo ser detectadas no plasma e na urina e que desaparecem rapidamente. Este fato dificulta a determinação exata das quantidades de antocianinas que são absorvidas, o estudo de sua cinética de absorção e de recuperação na urina. No entanto são fatos que sugerem que o estômago é o local preferencial de absorção das antocianinas.



**Figura 57-** Retas de regressão linear das concentrações de cianidina-3-glicosídeo quantificadas na fração permeada dos pós da jaboticaba e jambo após os tempos em monocamadas de MKN-28.

Não houve diferença estatística a nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ )

#### 4.2.4 Ensaio de Transporte com Caco-2

O digerido intestinal proveniente da digestão *in vitro* dos pós dos três frutos em estudo, foi analisado por CLUE, apresentando a composição antociânica como consta na tabela 19. Este digerido foi aplicado no lado apical da placa transwell, com a monocamada de células Caco-2 após diferenciação. As antocianinas foram transportadas da região apical para basolateral através da monocamada celular e da membrana semi-permeável, sendo depois coletada no compartimento basolateral em diferentes tempos. Os resultados do transporte de antocianinas monoméricas totais dos três frutos estão apresentados pela Figura 64.

**Tabela 19-** Composição antociânica presente no digerido intestinal dos três frutos aplicado no compartimento apical

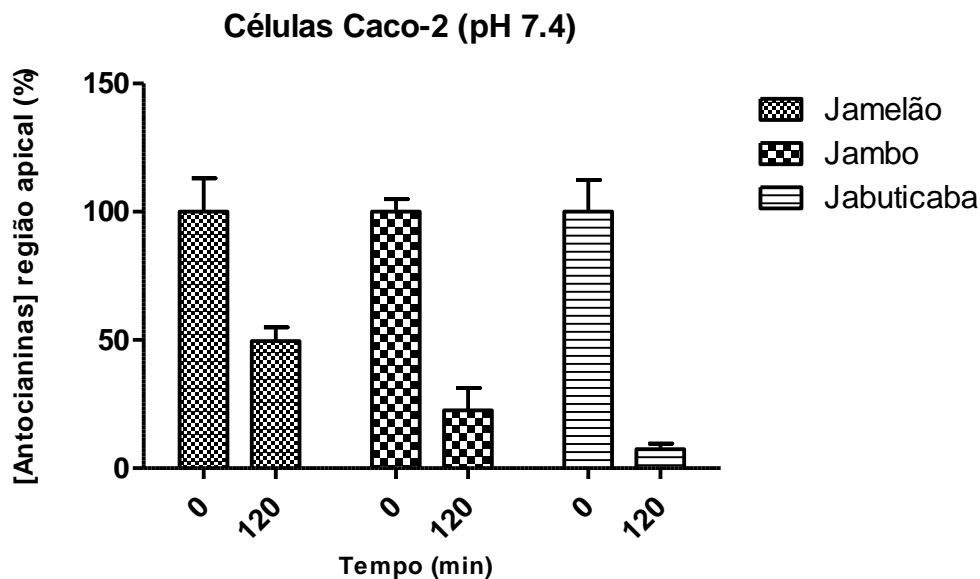
FRUTOS			
CONCENTRAÇÃO DE ACN (µM)	JABUTICABA	JAMELÃO	JAMBO
ACN monoméricas Totais	9,83± 0,78	34,56±7,79	9,23±0,78
Cianidina- 3-O-glicosídeo	9,04 ±1,89	-	7,98±0,69
Delfinidina- 3-O-glicosídeo	0,78±0,24	-	-
Cianidina- 3,5-O-diglicosídeo	-	2,13±0,63	1,24±0,09
Delfinidina-3,5-O-diglicosídeo	-	4,58±1,30	-
Petunidina-3,5-O- diglicosídeo	-	11,22±2,84	-
Malvidina-3,5-O-diglicosídeo	-	16,48±3,27	-

Os resultados demonstram que as antocianinas presentes no pó do jmelão são mais estáveis ao processo de digestão, em especial ao pH 6.5, do que os demais, resultando em valores de  $40,62 \pm 4,88$  % de bioacessibilidade intestinal (Tabela 21)

**Tabela 20** – Valores de concentração de antocianinas encontradas no compartimento basolateral em função dos diferentes tempos após ensaio de transporte em células Caco-2.

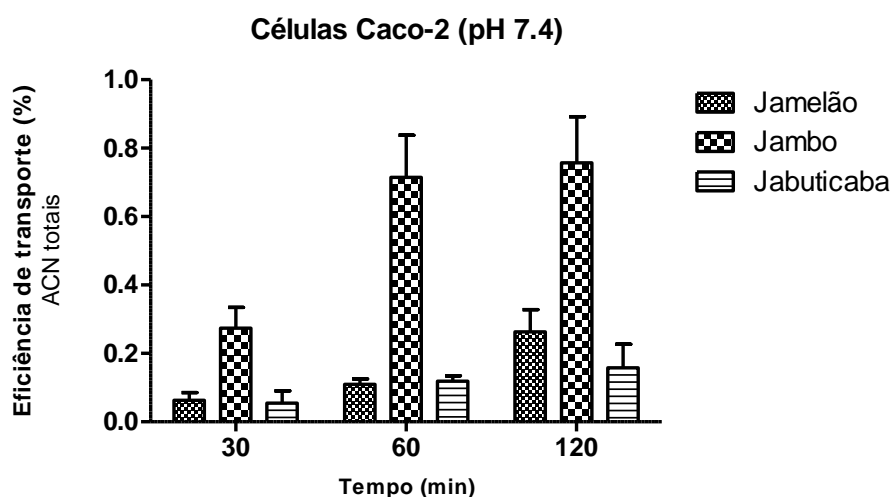
<b>JABUTICABA</b>			
<b>Antocianinas</b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>	<b>120 min</b>
<b>ACN totais</b>	0,005 $\pm$ 0,00	0,011 $\pm$ 0,002	0,014 $\pm$ 0,001
<b>Cianidina-3-O-glicosideo</b>	0,005 $\pm$ 0,00	0,011 $\pm$ 0,002	0,014 $\pm$ 0,001
<b>Delfinidina-3-O-glicosideo</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
<b>JAMBO</b>			
<b>ACN totais</b>	0,050 $\pm$ 0,001	0,127 $\pm$ 0,019	0,127 $\pm$ 0,041
<b>Cianidina-3-O-glicosideo</b>	0,044 $\pm$ 0,001	0,110 $\pm$ 0,033	0,113 $\pm$ 0,037
<b>Cianidina-3,5-O-diglicosideo</b>	0,006 $\pm$ 0,00	0,016 $\pm$ 0,004	0,013 $\pm$ 0,004
<b>JAMELÃO</b>			
<b>ACN totais</b>	0,021 $\pm$ 0,001	0,035 $\pm$ 0,008	0,087 $\pm$ 0,003
<b>Cianidina-3,5-O-diglicosideo</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
<b>Delfinidina-3,5-O-diglicosideo</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,002 $\pm$ 0,00	0,004 $\pm$ 0,00
<b>Petunidina-3,5-O-diglicosideo</b>	0,005 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,001	0,016 $\pm$ 0,009
<b>Malvidina-3,5-O-diglicosideo</b>	0,016 $\pm$ 0,007	0,023 $\pm$ 0,005	0,066 $\pm$ 0,025

Os valores encontrados demonstram que o transporte é tempo dependente, apresentando os menores valores após 30 minutos e aumentando progressivamente até 120 minutos. Dentre os frutos, somente o jambo não apresentou diferença estatística entre os tempos 60 e 120 minutos.



**Figura 58-** Valores percentuais de ACN totais quantificadas nos tempos 0 e 120 no compartimento apical do ensaio de transporte com células Caco-2. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os três frutos.

A degradação ou metabolização das antocianinas pelo contato com a monocamada na região apical é diferente estatisticamente entre os três frutos, já que cada um apresenta um perfil antociânico diferente (Figura 59). Dentre eles, o jamelão se destaca pelos maiores valores, o que já era de se esperar, já que as ACN diglicosiladas provocam um efeito estérico, capaz de proteger a cátion flavílio contra a hidratação. O jambo na sequencia é o segundo menos degradado, pois apresenta uma antocianina diglicosilada, enquanto a jabuticaba apresenta duas ACNs monoglicosiladas.

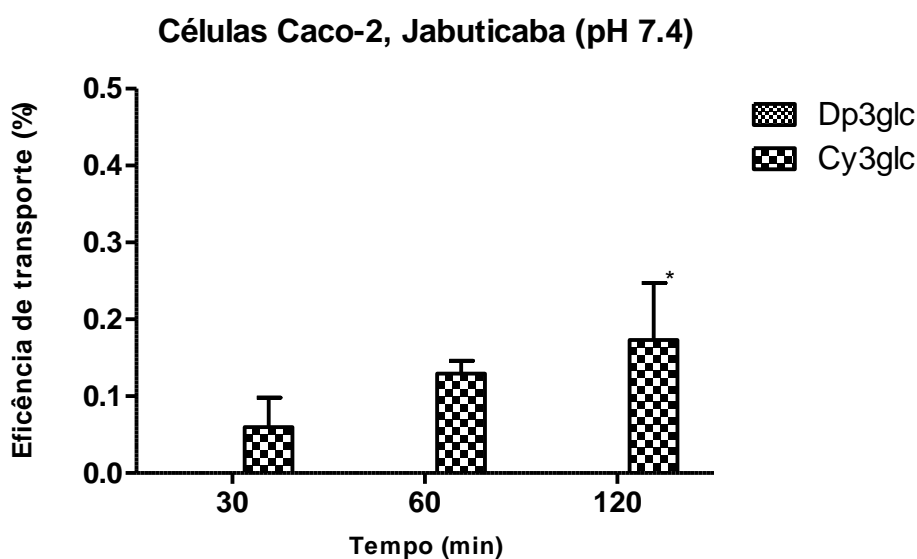


**Figura 59-** Eficiência de transporte de 9  $\mu\text{M}$ , 9  $\mu\text{M}$  e 34  $\mu\text{M}$  de digerido gástrico de pó de jabuticaba, jambo e jamelão, respectivamente, através das células Caco-2 (apical  $\rightarrow$  basolateral) em pH 7.4 apical/pH 7.4 basolateral). Os resultados são apresentados como eficiência de transporte (%) (média  $\pm$  DV). As diferenças significativas entre os transportes foram avaliadas com  $p < 0.05$ .



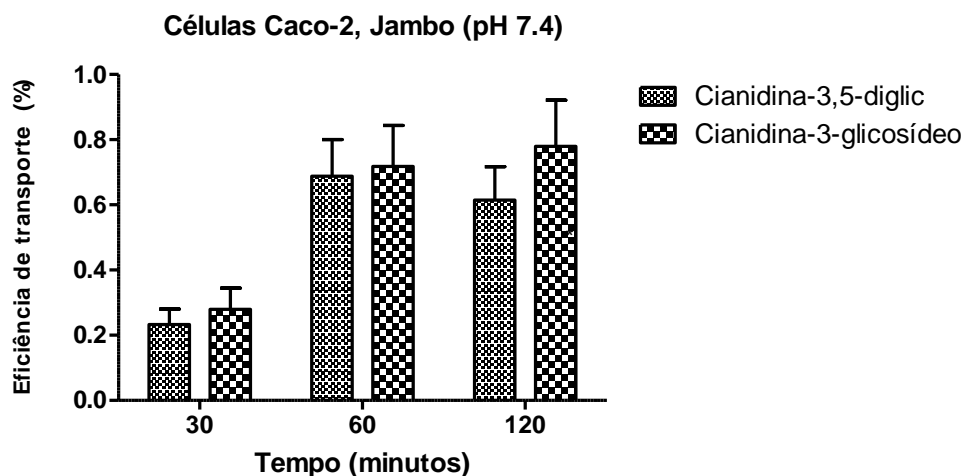
Aos 120 minutos, o digerido intestinal do pó da casca do jambo forneceu percentagens de eficiência de transporte mais elevados (0,8%), em comparação com jabuticaba (0,2%) e o jamelão (0,3%) (Figura 59). Segundo a literatura, o transporte intestinal das antocianinas foi estimado em cerca de 1-4% (YI *et al.*, 2006), ou até menos (~ 1%) (FARIA *et al.*, 2009) e mesmo em quantidades vestigiais, como relatados por Kosinska-Cagnazzo *et al.*, (2015).

No que diz respeito as antocianinas de jabuticaba, a delphinidina-3-*O*-glicosídeo não foi detectada na solução basolateral ao longo do tempo, ao passo que cianidina-3-*O*-glicosídeo aumentou sua eficiência do transporte entre 30 e 120 minutos (Figura 60). No que diz respeito às antocianinas de jambo, não foram observadas diferenças significativas na eficiência do transporte entre cianidina-3,5-*O*-diglicosídeo e a cianidina-3-*O*-glicosídeo em 30, 60 e 120 minutos (Figura 60). Estes resultados sugerem que o tipo de açúcar ligado às antocianinas não influenciou o transporte das antocianinas do jambo, jabuticaba e Jamelão, e que provavelmente a difusão passiva não deve ser o mecanismo para atravessar a parede do intestino (FARIA *et al.*, 2009; Passamonti *et al.*, 2002, 2009). No entanto, modificações químicas podem ocorrer nas antocianinas durante o transporte celular e que o tipo de via metabólica pode depender do açúcar ligado (WU *et al.*, 2005). FARIA *et al.* (2009) demonstraram que o transportador GLUT2 aumentou significativamente sua expressão em células Caco-2 em comparação com células controle, indicando que o transportador de glicose poderia estar envolvido na absorção de antocianinas. Os resultados mostraram, através da observação dos resultados no jamelão, que as delphinidina-3,5-*O*-diglicosídeo, petunidina-3,5-*O*-diglicosídeo e malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo, têm um comportamento de elevação dos seus valores semelhante nos tempos 30, 60 e 120 minutos; No entanto, a cianidina-3,5-*O*-diglicosídeo não foi detectada no compartimento basolateral em nenhum dos tempos. A 180 min, a malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo resultou, significativamente, em maior percentual de eficiência de transporte em comparação com as demais. Além disso, a malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo apresentou o maior concentração inicial na solução apical, e a eficiência do transporte poderia estar relacionada com a concentração inicial (Figura 53).



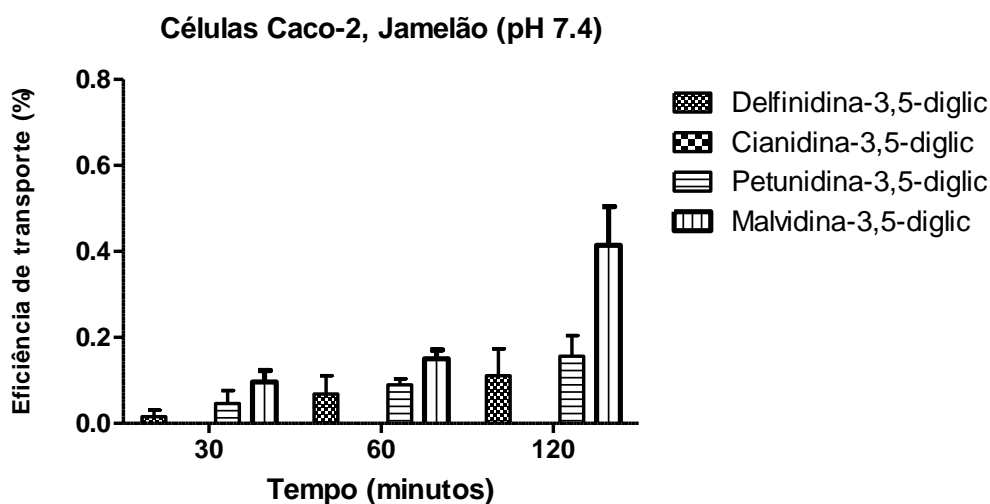
**Figura 60**– Valores de eficiência de transporte das antocianinas presentes na jabuticaba entre os compartimentos apical-basolateral nas células Caco-2. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as duas antocianinas.

Não foi possível verificarmos o transporte da delfinidina-3-*O*-glicosídeo no pó da jabuticaba, pois além da mesma apresentar uma estrutura com três hidroxilas no anel B, a mesma também está em baixa concentração no fruto, o que impossibilita a sua quantificação. Já o transporte da cianidina-3-*O*-glicosídeo foi tempo-dependente, apresentando os maiores valores aos 120 minutos.



**Figura 61-** Percentual de eficiência de transporte das antocianinas majoritárias presentes no pó do jambo do compartimento apical-basolateral após 120 minutos nas células Caco-2

O transporte das ACN presentes no jambo foi tempo dependente, não ocorrendo diferença significativa entre os tempos 60 e 120 minutos. A diferença estrutural entre elas, que deve-se a uma molécula de glicose na posição 3 do anel C, não demonstrou impactar no seu transporte pelas células Caco-2.



**Figura 62-** Percentuais de eficiência de transporte das antocianinas majoritárias presentes no pó do jamelão do compartimento apical-basolateral após 120 minutos em células Caco-2.

Pelos resultados encontrados, o comportamento do transporte não pode ser classificado como tempo-dependente, no entanto esta fuga de padrão pode se dever as baixas concentrações que foram encontradas, que dificultam sua a quantificação com maior precisão. No entanto, aos 120 minutos a malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo claramente apresentam maior eficiência de transporte. Além da mesma estar em maior concentração no pó, ela é o composto mais lipofílico entre as ACNs.

**Tabela 21-** Percentual de bioacessibilidade e eficiência de transporte calculados a partir dos valores de ACN totais quantificados no pó antes da digestão *in vitro* e no compartimento apical (antes) do ensaio de transporte, respectivamente.

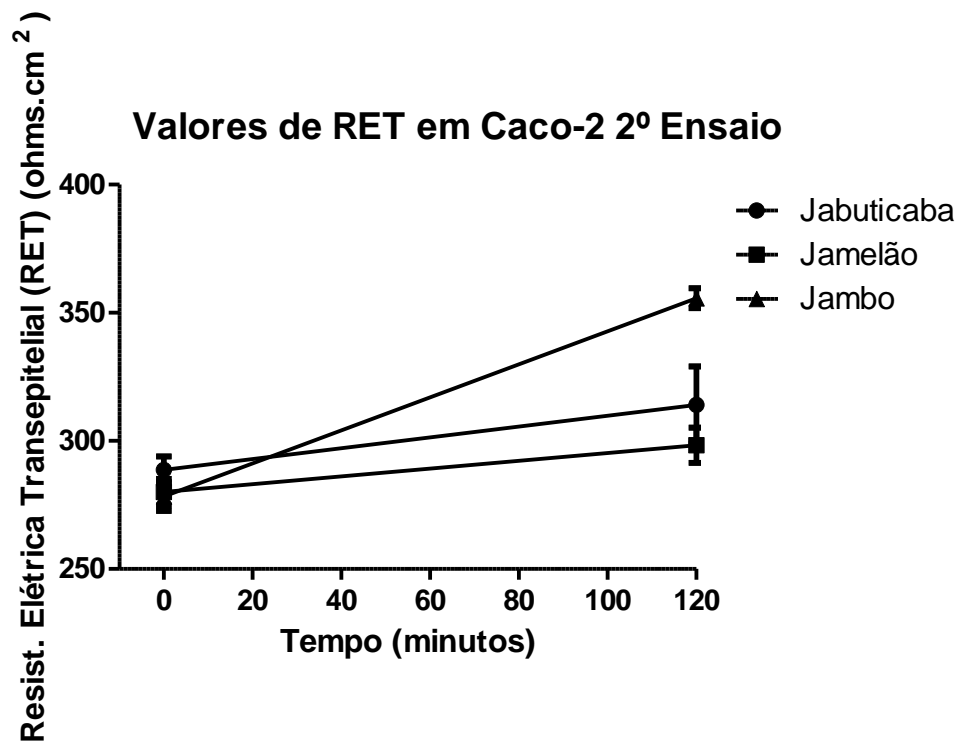
Pós dos frutos	ACN totais antes da digestão (mg.100g <sup>-1</sup> )	ACN totais AP (Ensaio MKN-28) (mg.100g <sup>-1</sup> )	ACN totais AP (Ensaio Caco-2) (mg.100g <sup>-1</sup> )	Bioacessibilidade gástrica (%)	Bioacessibilidade Intestinal (%)
Jabuticaba	166,94±48,69	20,52±4,12	16,06±3,55	13,73±7,57	10,84±6,27
Jambo	51,02±4,08	23,59±7,10	7,56±0,65	45,89±11,04	14,88±1,67
Jamelão	124,10±4,78	80,88±10,72	50,44±6,79	65,12±7,63	40,62±4,88
	Eficiência absorção Gástrica (%)	Eficiência absorção Intestinal (%)	ACN totais BL (Ensaio MKN-28) (mg.100g <sup>-1</sup> )	ACN totais BL (Ensaio Caco-2) (mg.100g <sup>-1</sup> )	
Jabuticaba	9,74±2,70	0,158±0,11	1,99±0,39	0,025±0,00	
Jambo	19,66±5,96	0,75±0,23	4,63±1,85	0,056±0,00	
Jamelão	14,09±1,34	0,26±0,11	11,32±1,34	0,131±0,00	

Os resultados finais apontaram o pó do jamelão como a matriz capaz de fornecer maiores valores de concentração após os Ensaio de transporte gástrico e intestinal (Tabela 21), embora as antocianinas presentes neste pó não apresentem os maiores valores de eficiência de transporte. Como este fruto apresentou os maiores valores iniciais dentre as três, ela foi capaz de contornar esta redução no transporte. Estes achados demonstram que este fruto pode ser considerado uma fonte rica em antocianinas para consumo.

#### 4.2.4.1 Avaliação da integridade da monocamada Caco-2 através da medição da Resistência elétrica transepitelial (RET)

A integridade das junções oclusivas das membranas formadas pelas células Caco-2 cultivadas na placa transwell foi avaliada através da determinação dos valores de RET antes (t= 0 minuto) e após o ensaio (t = 120 minutos). Os valores obtidos indicaram que a monocamada estava confluenta, com as junções oclusivas formadas e que as mesmas apresentavam-se como uma barreira para o transporte e consequentemente por esta razão gerou uma resistência elétrica. Os valores da resistência elétrica transepitelial encontrados variaram entre 270 e 372 Ω.cm<sup>2</sup> a 37°C ( Figura 63), sendo portanto superiores a 230 Ω.cm<sup>2</sup> a 37°C, como indicativo de

integridade das junções oclusivas e portanto integridade das membranas. Além disso, após o teste de transporte não houve redução destes valores, resultado que demonstra que o extrato digerido não alterou a integridade da membrana, mesmo após 2 horas de contato.



**Figura 63** – Valores de Resistência transepitelial (RET) medidos nas membranas de células Caco-2 ao tempo inicial (0 minuto) e após o ensaio de transporte (t = 120 minutos) a 37°C em pH 7.4 nos compartimentos apical e basolateral. Os valores expressos estão em  $\Omega.cm^2$  da média de três determinações. A barra indica o desvio padrão.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados apontaram que os pós obtidos a partir da casca da jabuticaba, jambo e jamelão podem ser boas fontes de compostos bioativos para a indústria alimentícia. Os dois modelos de digestão *in vitro* permitiram o estudo da estabilidade das antocianinas após a digestão gástrica e intestinal. A bioacessibilidade gástrica das antocianinas forneceu valores de 13 % para jabuticaba, 45 % para jambo e 65 % para Jamelão. Considerando a bioacessibilidade intestinal estes valores foram de 10 % para jabuticaba, 15% para jambo e 45 % para jamelão. A simulação do transporte gástrico e intestinal foi realizada com modelos celular MKN-28 (gástrica) e Caco-2 (intestinal). O modelo gástrico resultou em eficiências de transporte de antocianinas de 19,7 %, 9,7 % e 14,1 %, respectivamente, para jambo, jabuticaba e jamelão, enquanto que o modelo intestinal Caco-2 resultou na eficiência de transporte de 0,8 %, 0,2 % e 0,3 %, respectivamente. Assim, a mucosa gástrica pode ser apontada como o local preferencial para a absorção *in vitro* das antocianinas. Este é o primeiro estudo que aplica sequencialmente dois modelos: digestão *in vitro* gástrico e modelos absorção intestinal, e não há relatos sobre a avaliação da eficiência dos transportes de antocianinas de frutos, aplicando as células MKN-28. Os dados deste trabalho corroboram para achados anteriores, de que o estômago é o local preferido de absorção de antocianina, embora a mecanismos moleculares de absorção ainda não estejam claros. O interesse pela linhagem celular MKN-28 está em expansão e mais estudos de caracterização, diferenciação, suas enzimas metabólicas e mecanismo de transporte, são necessários na área.

## 6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABUJA, P. M.; MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W. Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density lipoprotein oxidation. **J. Agric. Food Chem**, v. 46, 4091 – 4096, 1998.

AFAQ, F.; SYED, D.N.; A. MALIK, A.; HADI, N.; SARFARAZ, S.; KWEON, M.H.; KHAN, N.; ZAID, M.A.; MUKHTAR, H. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis, **J. Invest. Dermatol.** V.127, p.222–232, 2007.

ADLERCREUTZ, H. Epidemiology of phytoestrogens. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.12, p. 605–623, 1998.

ALDHOUS, M. C.; SHMAKOV, A. N.; BODE, J.; GHOSH, S. Characterization of conditions for the primary culture of human small intestinal epithelial cells. **Clin. Exp. Immunol.** V.125, p.32–40, 2001.

ALMENDINGEN, K.; HOFSTAD, B.; VATN, M. H. Dietary habits and growth and recurrence of colorectal adenomas: results from a three-year endoscopic follow-up study. **Nutr Cancer**. v.49, n.2, p.131-8, 2004.

ALMINGER, M.; AURA, A.-M.; BOHN, T.; DUFOUR, C.; EL, S. N.; GOMES, A.; KARAKAYA, S.; MARTINEZ-CUESTA, M.C.; MCDUGALL, G. J.; REQUENA, T.; SANTOS, C.N. In Vitro Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in food science and food safety**, v.13, p. 413–436, 2014.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayer in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Reviews**. v.46, p.27-43, 2001.

ARTURSSON, P.; BORCHARDT, R. T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. **Pharmaceutical Research**. v.14, n.12, p.1655-1658, 1997.

BAGCHI, D.; SEN, C. K.; BAGCHI, M.; ATALAY, M. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. **Biochemistry (Mosc)**, v.69, n.1, 75-80, 2004.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.44, p. 301-312, 2000.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S. A combined cell based approach to identify P-glycoprotein substrates and inhibitors in a single assay. **International Journal of Pharmaceutics**. v.14, n. 301(1-2), p.80-8, 2005.

BALIMANE, P. V.; HAN, Y.H.; CHONG, S. Current Industrial of assessing permeability and P-glicoprotein interaction. **The AAPS Journal**. v.8, n.1, p.E1-E13, 2006.

BERMÚDEZ-SOTO, M. J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-CONESA, M.T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. **Food Chemistry**. v.102, p.865-874, 2007.

BITSCH, I., M. JANSSEN, et al. "Bioavailability of anthocyanidin-3-glycosides following consumption of elderberry extract and blackcurrant juice." **International Journal of Clinical Pharmacology**. v.42, n.5, p.293-300, 2004.

BORKOWSKI T, SZYMUSIAK H, GLISZCZYNSKA-SWIGLO A, TYRAKOWSKA B. The effect of 3-O-beta-glycosylation on structural transformations of anthocyanins. **Food Research International**, v.38, p.1031–37, 2005.

BOSCH, F. X., LEUBE, R. E., ACHTSTATTER, T., MOLL, R., AND FRANKE, W. W. Expression of simple epithelial type cytokeratins in stratified epithelia as detected by immunolocalization and hybridization in situ. **J. Cell Biol**. v.106, p.1635–1648, 1988.

BOSSO, S. T.; ENZWEILER, J. Ensaios para determinar a biodisponibilidade de chumbo em solos contaminados revisão. **Química Nova**, v. 31, n.2, p. 394-400, 2008.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods Enzymol**. v.186, 343-55, 1990.

BOUAYED, J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. **Food Chemistry**, V 128, n.1, p.14–21, 2011.

BROUILLARD, J. R. In: Anthocyanins a food colors; Markakis, P., ed.; Academic Press: New York. 1982, Cap.1, p.263.

BUB, A.; WATZL, B.; HEEB, D.; RECHKEMMER, G.; BRIVIBA, K. Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. **Eur J Nutr**. v.40, p.113– 120, 2001.

CASTANEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNANDEZ, M. L.; PAEZ-HERNANDEZ, M. E. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**.v.113,n.4, p.859–871, 2009.



CHEN, X.; MURAWSKI, A.; PATEL, K.; CRESPI, C.L.; BALIMANE, P.V. A Novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. **Pharm. Res.**, v.27, n.7, p.1511-20, 2008.

CLIFFORD, M. N. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.80, n.15, p.1063-1072, 2000.

COLDITZ, G. A.; BRANCH, L. G.; LIPNICK, R. J.; WILLETT, W. C.; ROSNER, B.; POSNER, B M HENNEKENS, C H. Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer deaths in an elderly population. **Am J Clin Nutr January**, vol. 4, n. 1,p.32-36, 1985.

CORREA-BETANZO, J.;ALLEN-VERCOE, E.; MCDONALD, J.; SCHROETER, K.; CORREDIG, M.; PALIYATH, G. Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**. v.15, n.165, p.522-31, 2014.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z Inflammation and cancer. **Nature**. v.420, n.6917, 860-7, 2002.

DEAN, J. R.; MA, R. Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: a critical review. **Chemosphere**, v. 68, f.8, p. 1399-1407, 2007.

DE BRITO, E. S., DE ARAUJO, M. C. P., ALVES, R. E., CARKEET, C., CLEVIDENCE, B. A., & NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolao, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.23, p.9389–9394, 2007.

DE FREITAS. V.; MATEUS, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. **J Agric Food Chem**, v.49, p.940–945, 2001.

DI, L.; KERNS, E. H.; FAN, K.; McDONNELL, O. J.; CARTER, G. T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p.223-232, 2003.

EDER, A. Pigments. In: Noller MLM, editor. Food analysis by HPLC. New York: Marcel Dekker. p. 845–880, 2000.

FAILLA, M. L. CHITCHUMROONCHOKCHAI, C.; ISHIDA, B. K. In vitro micellarization and intestinal cell uptake of cis isomeros of lycopene exceed those of All-trans lycopene. **The Journal of Nutrition**, p. 482-486, 2007.

FARIA, A.; PESTANA, D.; AZEVEDO, J.; MARTEL, F.; DE FREITAS, V.; AZEVEDO, I.; MATEUS, N.; CALHAU, C. Absorption of anthocyanins throught intestinal epithelial cells- Putative involvement of GLUT2. **Mol. Nutr. Food Res**. v.53, p. 1430-1437, 2009.

FELGINES, C.; TALAVERA, S.; GONTHIER, M. P.; TEXIER, O.; SCALBERT, A.; LAMAISON, J. L.; REMESY, C. Strawberry anthocyanins are recovered in urine as

glucuro- and sulfo- conjugates in humans. **Journal of Nutrition**, v.133, p.1296-1301, 2003.

FERNANDES, I., DE FREITAS, V., REIS, C. & MATEUS, N. A new approach on the gastric absorption of anthocyanins. **Food & Function**, v.3, p.508-516, 2012.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; MOSQUERA, M. I. M.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Changes in composition of the lipid matrix produce a differential incorporation of carotenoids in micelles. Interaction effect of cholesterol and oil. **Innovative food science and Emerging Technologies**, v.8, p.3379-384, 2007.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, p. 751–760, 2009.

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 273-314, 1989.

FRANK, T.; NETZEL, M.; STRASS, G.; BITSCH, R.; BITSCH, I. Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. **Can J Physiol Pharmacol**. v.81, p.423–435, 2003.

FUKUMOTO, L R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **J Agric Food Chem**. v.48, n.8, 3597-3604, 2000.

GAGO, S.; BASILIO, N.; MORO, A. J.; PINA, F. **Chem Communication**, v.51, 7349-7351, 2015.

GARCIA-ALONSO M<sup>1</sup>, MINIHANE AM, RIMBACH G, RIVAS-GONZALO JC, DE PASCUAL-TERESA S. Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. **J Nutr Biochem**. V.20, n.7. p.521-9, 2009.

GARTNER, Leslie P.; HIATT, James L. *Tratado de Histologia Em cores*. Rio de Janeiro: 2. ed. Guanabara koogan, 2003. 592 p.

GIORI, F. **Adaptação de metodologia de digestão *in vitro* e determinação da bioaccessibilidade *in vitro* de  $\beta$ -caroteno em três variedades de batata doce de polpa alaranjada**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica. 2010.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E.; Acylated anthocyanins edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Journal**, n.14, p.217-225, 2003.

GONÇALVES, J.E. **Padronização das condições para cultura de células Caco-2, visando à obtenção de membranas viáveis ao estudo da permeabilidade *in vitro* da rifampicina**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

GOUVÊA; A. C. M. S. **Quantificação das antocianinas majoritárias do açáí por cromatografia líquida de alta eficiência.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.Seropédica. 2010.

GOUVÊA A. C. M. S., ARAUJO M. P. DE, SCHULZ D. F., PACHECO S., GODOY R. L. DE O., CABRAL L. M. C. Anthocyanins Standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açáí (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC.**Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n.1, p.1-4, 2012.

GOUVÊA A. C. M. S.; MELO, A.; SANTIAGO, M. C. P. A.; PEIXOTO, F. M.; FREITAS, V.; GODOY, R. L. O; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Identification and quantification of anthocyanins in fruits from *Neomitrantes obscura* (DC.) N. Silveira an endemic specie from Brazil by comparison of chromatographic methodologies. **Food Chemistry**, v.185, 277-283, 2015.

GUYTON, A. C. Fisiologia Humana. 6ª ed. Editora Guanabara. 1988.

HARBORNE, J. B.; GRAYER, R. J. The anthocyanins. In: Harborne Although the chemical structure of anthocyanins is JB, ed. London: Chapman and Hall, 1–20. 1988.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v. 52, p. 481-504, 1994.

HE J, WALLACE TC, KEATLEY K, FAILLA M, AND GIUSTI MM. Stability of Black Raspberry Anthocyanins in the Digestive Tract Lumen and Transport Efficiency into Gastric and Small Intestinal Tissues in the Rat. **J Agric. Food Chem.** v.57,n.8, p. 3141-48, 2009.

HE J, AND GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural olorants with health-promoting properties. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.**, v.1, p.163-187, 2010.

HEANEY, R. P.; NORDIN, B. E. Calcium effects on phosphorus absorption: implications for the prevention and co-therapy of osteoporosis. **J Am Coll Nutr.** v.3, p. 239-44, 2002.

HOLLMAN, P. C.; BIJSMAN, M. N.; VAN GAMEREN Y.; CNOSSEN, E. P.; The type of sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radic Res**, v.31, p.569-573, 1999.

HOUBIERS C.; LIMA J. C.; MACANITA, A. L.; SANTOS, H. Color stabilization of malvidin 3-glucoside: Selfaggregation of the flavylium cation and copigmentation with the z-chalcone form. **J. Phys. Chem.**v.102, p.3578–85, 1998.

HORSZWALD, A.; JULIEN, H.; ANDLAUER, W. Characterisation of Aronia powder obtained by different drying processes. **Food Chemistry**, v.141, n.3, p.2858-2863, 2013.

HORWITT, M. K. Observations on behavior of the anthocyanin pigment from concord grapes in the animal body. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.30, p.949–51, 1933.

HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v.125, p.1–12, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.283-338.

WANG H, NAIR MG, STRASBURG GM, CHANG YC, BOOREN AM, GRAY JI, DEWITT DL. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. **J Nat Prod May**, v.62, n.5, 802, 1999.

WANG, L. S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Lett.** v.269, n.2, p.281-90, 2008.

WALLACE, T. C. Analysis of Procyanidins and Anthocyanins in Food Products using Chromatographic and Spectroscopic Techniques. DISSERTATION. Ohio State University, 2010.

WALTON, M. C. Berry Fruit. Anthocyanins in human nutrition- Bioavailability and antioxidant effects. Thesis. Massey University. New Zealand, 2006.

WATSON, R. R.; PREEDY, V.; ZIBADI, S. Polyphenols in Human Health and Disease. 1 ed. Academic Press, 2013.

WOODWARD, G.; KROON, P.; CASSIDY, A.; KAY, C. “Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.12, 5271–5278, 2009.

WROBLEWSKI, K.; MUHANDIRAM, R.; CHAKRABARTTY, A.; BENNICK, A. The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds. **Eur J Biochem.** v. 268, p.4384–97, 2001.

WU X.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Absorption and metabolism of anthocyanins in human subjects following consumption of elderberry or blueberry. **Journal of Nutrition**, v.132, 1865–1871, 2002.

WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR, R. L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. **J Agric Food Chem.** v.31, n.54(11), p.4069-75, 2006.

KALT, W., BLUMBERG, J. B., MCDONALD, J. E., VINQVIST-TYMCHUK, M. R., FILLMORE, S. A. E., GRAF, B. A. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.705–712, 2008.

KATZUNG, B.; MASTERS, S.B.; TREVOR, A. Farmacologia Básica & Clínica. ed 9. Editora Guanabara Koogan, 2009.

KANG, S. Y.; SEERAM, N.P.; NAIR, M.G.; BOURQUIN, L. D. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. **Cancer Lett.** V.194, n.1, p.13-9, 2003.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. **J Med Chem.** v.26, n.41(7), p.1007-10, 1998.

KARLSSON, J.; UNGELL, A.; GRASIO, J.; ARTURSSON, P. Paracellular drug transport across intestinal epithelia: influence of charge and induced water flux. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, N. 1, p.47–56, 1999.

KOIDE, T., KAMEI, H., HASHIMOTO, Y., KOJIMA, T., HASEGAWA, M. Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. **Cancer Biotherapy and Radiopharmacology**, v. 11,n.4, p.273–277, 1996.

KOIDE, T., KAMEI, H., HASHIMOTO, Y., KOJIMA, T., HASEGAWA, M.. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo. **Cancer Biotherapy and Radiopharmacology**, v.12, n.4, p.277–280, 1997.

KONG, J. M.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**. n.64, p.923-933, 2003.

KOSINSKA-CAGNAZZO, A.; DIERING, S.; PRIM, D. & ANDLAUER, W. Identification of bioaccessibility and uptaken phenolic compounds from strawberry fruits in in vitro digestion/Caco-2 absorption model. **Food Chemistry**, v.170, p.88-294, (2015).

KUHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World Rev. Nutr. Diet.**, v.24, p.117-191, 1976.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; GARCÍA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A. M.; FETT, R. Atividade antioxidante de pigmentos antocianícos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, 2004.

LAHAR, N., LEI, N. Y., WANG, J., JABAJI, Z., TUNG, S. C., JOSHI, V.; LEWIS, M.; STELZNER, M.; MARTÍN, M. G.; DUNN, J. C. Intestinal subepithelial myofibroblasts support in vitro and in vivo growth of human small intestinal epithelium. **PLoS One**. V.6, n.11, p.e26898, 2011.

LAPILOT, T.; HAREL. S.; GRANIT, R.; KANNER, J. Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.4297-4302, 1998.

LAMBERT, G.P.; CHANG, R.T.; XIA, T.; SUMMERS, R.W.; GISOLFI, C.V. Absorção em diferentes segmentos intestinais durante o exercício. **J. Applied Physiol**, v.83, p.204-212, 1997.

LIANG, L.; WU, X.; ZHAO, T.; ZHAO, J.; LI, F.; ZOU, Y. MAO, G.; YANG, L. in vitro bioaccessibility and antioxidant of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea roxb.* ) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Research International**. v. 46, p.76-82, 2012.

LOPES, T.J.; XAVIER, M.F.; QUADRI, M.G.N.; QUADRI, M.B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.13, n.3, p. 291-297, 2007.

MACHLIN, L.J., BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, Bethesda, v.1, n.6, p.441-445, 1987.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.5, p.727-747, 2004.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies 1–3. **Am J Clin Nutrition**, v.81, p.230S– 42S, 2005.

MANDARA, J.L.; TRIER, J.S. *Functional Morphology of Epithelium of the Small Intestine*. In Physiology of the gastrointestinal tract. Ed. R. Johnson (Raven Press, New York), 1577 p, 1994.

MALACRIDA, C. R; DA MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MALLERY, S. R.; BUDENDORF, D. E.; LARSEN, M. P.; PEI, P.; TONG, M.; HOLPUCH, A. S.; LARSEN, P. E.; STONER, G.D.; FIELDS, H. W.; CHAN, K. K.; LING, Y.; LIU, Z. Effects of human oral mucosal tissue, saliva and oral microflora on intraoral metabolism and bioactivation of black raspberry anthocyanins. **Cancer Prev Res**. v.4, n.8, p.1209-21, 2011.

MASON, R. P.; LAPORTE, J. M.; ANDRES, S. Factors Controlling the Bioaccumulation of Mercury, Methylmercury, Arsenic, Selenium, and Cadmium by Freshwater Invertebrates and Fish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, V. 38, n.3, p.283–297, 2000.

MATUSCHEK, M. C.; HENDRIKS, W. H.; MCGHIE, T. K.; REYNOLDS, G.W. The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. **J Nutr Biochem**. V.17, n.1, p.31-6, 2006.

MATSUMOTO, H.; TAKENAMI, E.; IWASAKI-KURASHIGE, K.; OSADA, T.; KATSUMURA, T.; HAMAOKA, T. Effects of blackcurrant anthocyanin intake on peripheral muscle circulation during typing work in humans. **Eur J Appl Physiol**. v.(1-2), p.36-45, 2005.

MCDOUGALL GJ, FYFFE S, DOBSON P, STEWART D.. Anthocyanins from red wine—their stability under simulated gastrointestinal digestion. **Phytochemistry**, v. 66, p.2540–8, 2005a.

MCDOUGALL GJ, DOBSON P, SMITH P, BLAKE A, STEWART D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. **J Agric Food Chem.**, v.53, p.5896–904, 2005b.

MCDOUGALL GJ, FYFFE S, DOBSON P, STEWART D. Anthocyanins from red cabbage—stability to simulated gastrointestinal digestion. **Phytochemistry**, v.68, p.1285–94, 2007.

MCGHIE, T. K.; WALTON, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. **Mol Nutr Food Res.** V.51, n.6, 702-13, 2007.

MILBURY, P. E., VITA JA, BLUMBERG JB. Anthocyanins are Bioavailable in Humans following an Acute Dose of Cranberry Juice. **J. Nutr.** v.140, n.6, 1099-1104. 2010.

MILLER, D. D., SCHRICKER, B. R., RASMUSSEN, R. R., & VAN CAMPEN, D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. **American Journal of clinical Nutrition**, v.34, p.2248–2256, 1981.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE, FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A.; MARZE, S.; MCCLEMENTS, D. J.; MÉNARD, O.; RECIO, I.; SANTOS, C. N.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S.; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. **Food Funct.** v.5, n.6, p.1113-24. 2014.

MIYAZAWA, T.; NAKAGAWA, K.; KUDO, M.; MURAISHI, K.; SOMEYA, K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. **J Agric Food Chem.** v.47, n.3, 1083-91, 1999.

MORAZZONI, P.; LIVIO, S.; SCILINGO, A.; MALANDRINO, S. Vaccinium myrtillus anthocyanosides pharmacokinetics in rats. **Drug Research**, v.41, p.128-131, 1991.

MURKOVIC, M.; MÜLLEDER, U.; ADAM, U.; PFANNHAUSER, W. Detection of anthocyanins from elderberry juice in human urine. **Journal of the science of food and Agriculture.** V.81, n.9, p.934–937, 2001.

NURMI, T.; MURSU, J.; HEINONEN, M.; NURMI, A.; HILTUNEN, R.; VOUTILAINEN, S. Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. **J. Agric. Food Chem.** v. 57, p.2274–2281, 2009.

OSHIMA, T.; MIWA, H.; JOHN, T. Aspirin induces gastric epithelial barrier dysfunction by activating p38 MAPK via claudin-7. **Am J Physiol Cell Physiol**. V.295, n.3, p.C800-6, 2008.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v.34, n.6, 2011.

OOMEN, A. G., ROMPELBERG, C. J. M., BRUEIL, M. A., DOBBE, C. J. G., PEREBOOM, D. P. K. H., & SIPS, A.J.A.M. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. **Archives of Environmental Contamination and toxicology**, v.44, 281-287, 2003.

PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** V.296, p.631–636, 2002.

PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; VANZO, A.; MATTIVI, F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. **FEBS Letters**, v.544, 210-213, 2003.

PASSAMONTI, S.; TERDOSLAVICH, M.; FRANCA, R.; VANZO, A.; TRAMER, F.; BRAIDOT, E.; PETRUSSA, E.; VIANELLO, A. Bioavailability of flavonoids. A review of their membrane transport and the function in animal and plant organisms. **Current Drug Metabolism**. V.10, p.369-394, 2009.

PEREBOOM, D. P. K. H.; SIPS, A.J.A.M. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. **Archives of Environmental Contamination and toxicology**, v. 44, p.281-287, 2003.

PINA, F.; MELO, N. M.J.; LAIA, C. A.; PAROLA, A. J.; LIMA, J. C. Chemistry and applications of flavylum compounds: a handful of colours. **Chemical Society Reviews**. v.21, n.41(2), p. 869-908, 2012.

PRIOR, R.L Fruits and vegetables in prevention of cellular oxidative damage. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.78, p 570S-578S, 2003.

PRIOR, R. L.; WU, X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. **Free Radical Research**, v.40,f. 10, p.1014-1028, 2006.

QUASTEL, J. Methods of study of intestinal absorption and metabolism. In: J. Quastel (Ed.), *Methods in medical research* ( pp. 255 ± 259). Chicago: Year Book Medical Publishers (1961).

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5a. ed. Elsevier; 2003.

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**. v.339, n.8808,p.1523-6, 1992.



RODHES, M. L. C. Physiologically-active compounds in plant foods: an overview. In: Proceedings of the Nutrition Society, v.55, p.371-397, 1996.

SAMBUY, Y.; DE ANGELIS, I.; RANALDI, G.; SCARINO, M. L.; STAMMATI, A.; ZUCCO, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell function characteristics. **Cell biology and toxicology**, v.21, p.1-26, 2005.

SANTIAGO, M. C. P, A. **Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum L.*)**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2014.

SARMA, A. D.; SHARMA, R.. Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. **Phytochemistry**, v.52, n.7, p.1313–1318, 1999.

SATO, T., VRIES, R. G., SNIPPERT, H. J., VAN DE WETERING, M., BARKER, N., STANGE, D. E., ET AL. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. **Nature**, v. 459, 262–265.

SATUÉ-GARCIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, n. 9, p. 3.362-367, 1997.

SEERAM, N. P.; MOMIN, R. A.; NAIR, M. G.; BOURQUIN, L. D. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. **Phytomedicine**. v.5, p.362-9, 2001.

SEERAM, N. P.; ADAMS, L.S.; ZHANG, Y.; LEE, R., SAND, D.; SCHEULLER, H. S.; HEBER, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro, **J. Agric. Food Chem.** v.54, p.9329–9339, 2006.

SILVERTHORN, D. U. Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada, Editora Manole, 5ª Edição.2010.

SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**. V.175, n.4023, p.720-31, 1972.

SOUZA J., FREITA Z.,STORPITIS S. Modelos in vitro para Determinação da Absorção de Fármacos e Previsão da Relação Dissolução/Absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2007.

SRINIVASAN, V. S.; Bioavailability of nutrients: a practical approach to in vitro demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. **Journal of Nutrition**. v.131, n.4, p.1349S-50S, 2001.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. (Eds). Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2009.

STENBERG, P.; LUTTMAN, K.; ARTURSSON, P. Virtual screening of intestinal drug permeability. **fmpeixoto**. v. 1, nº65(1-2), p.231-43, 2000.

TADAYUKI OSHIMA, HIROTO MIWA, AND TAKASHI JOH. Aspirin induces gastric epithelial barrier dysfunction by activating p38 MAPK via claudin-7. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.295, p.C800–C806, 2008.

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

TAVALERA, S.; FELGINES, C.; TEXIER, O.; BESSON, C.; LAMAISON, J. L.; REMESY, C. Anthocyanins are efficiently absorbed from stomach in anesthetized rats. **Journal of Nutrition**, v.133, p.4178-4182, 2003.

TAVALERA, S.; FELGINES, C.; TEXIER, O.; BESSON, C.; LAMAISON, J. L.; MANACH, C.; J. L. REMESY, C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2275-2279, 2004.

TIAN, Q.; GIUST M. M.; STONE, G. D.; SCHWARTZ, S J. Urinary excretion of black raspberry (*Rubus occidentalis*) anthocyanins and their metabolites. **J. Agric. Food Chem**, v.54, p.1467-1472, 2006.

TSUDA, T.; WATANABE, M.; OHSHIMA, K.; NORINOBU, S.; CHOI, S.W.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-beta-d-glucoside and cyanidin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.11, p.2407–2410, 1994.

TSUDA, T.; SHIGA, K.; OHSHIMA, K.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. **Biochem Pharmacol**. v.11, n.52 (7), p.1033-9, 1996.

TSUDA, T., HORIO, F., & OSAWA, T. Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-b-D-glucoside in rats. **FEBS Letters**, 449, p.179–182. 1999.

VITAGLIONE, P., G. DONNARUMMA, et al. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. **Journal of Nutrition**. v.137, n.9, p.2043-2048, 2007.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P.C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.23, n.2, p.141-149, 2008.

YANG, M.; KOO, S. I.; SONG, W. O.; CHUN, O. K. Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: review. **Curr Med Chem.** V.18, n.2, p.291-300, 2011.

YOU DIM, K.A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A .I Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, v.1, n.29, p.51-60, 2000.

ZHANG, Y.; VAREED, S. K.; NAIR, M.G Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables, **Life Sci.** v.76, n.23, p.1465–1472, 2005.

## ANEXOS

### A- RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS

**PEIXOTO, F. M.** ; SANTIAGO, M. C. P. A. ; GOUVÊA, A. C. M. S. ; PACHECO, S. ; NASCIMENTO, L. S. M. ; BORGUINI, R. G. ; GODOY, R. L. O. . Utilização da CLAE para avaliação da bioacessibilidade de antocianinas da casca de jambo. In: In: Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 2014, Campos de Jordão - SP. Utilização da CLAE para avaliação da bioacessibilidade de antocianinas da casca de jambo, 2014.

**PEIXOTO, F. M.**; BORGUINI, R. G.; PACHECO, Sidney; OLIVEIRA, L. M.; SANTIAGO, M. C. P. A.; GOUVÊA, A. C.; GODOY, R. L. O. Bioaccessibility of carotenoids from peanut butter fruit: Role of type of carotenoid. 2014 Annual Conference & Exhibition. Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements. Istanbul, Turquia. Book of Abstracts, 2014. v.1, p-342.

**PEIXOTO, F. M.**; GOUVÊA, A. C.; SANTIAGO, M. C. P. A.; PACHECO, Sidney; OLIVEIRA, L. M.; BORGUINI, R. G.; GODOY, R. L. O. Bioaccessibility assessment of anthocyanins from strawberries. 2014 Annual Conference & Exhibition. Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements. Istanbul, Turquia. Book of Abstracts, 2014. v.1, p-305.

**PEIXOTO, F. M.** ; CAVALCANTE, J. M. ; BORGUINI, R. G. ; PACHECO, S. ; GOUVEA, A. C. M. S. ; SANTIAGO, M. C. P. A. ; Godoy, R. L. O. ; OLIVEIRA, L. M. . Bioaccessibility assessment of carotenoids from commercial nutraceutical products. In: IUNS 20th International Congress of Nutrition, 2013, Granada. Annals of nutrition and Metabolism. Paris: S. Karger, 2013. v. 63. p. 1683-1683.

GOUVEA, A. C. M. S. ; SANTIAGO, M. C. P. A. ; OLIVEIRA, L. M. ; Godoy, R. L. O. ; **PEIXOTO, F. M.** ; Sidney Pacheco ; BORGUINI, R. G. . Fontes Naturais de antocianinas para a obtenção de padrões para análise de frutos vermelhos e seus produtos. In: VI Congresso Latinoamericano e XII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 2013, Gramado. Anais do VI Congresso Latinoamericano e XII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 2013.

BORGUINI, R. G. ; Sidney Pacheco ; GODOY, R. L. O. ; SOUZA, M. C. ; OLIVEIRA, L. M. ; SANTIAGO, M. C. P. A. ; **PEIXOTO, F. M.** . Peanut Butter Fruit: a rich source of lycopene. In: 20th International Congress of Nutrition, 2013, Granada. Annals of nutrition and Metabolism. Paris: S.Karger, 2013. v. 63. p. 1684-1684.

**PEIXOTO, F. M.** ; BORGUINI, R. G. ; GODOY, R. L. O. . Bioacessibilidade in vitro de antocianinas em mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.) após simulação de digestão in vitro. In: VIII Fórum de Pós-graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2013, Seropédica-RJ. Anais do VIII Fórum de Pós-graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2013. v.1.

## B- ARTIGOS PUBLICADOS

SANTIAGO, MANUELA C.P.A.; GOUVÊA, ANA C.M.S.; **PEIXOTO, FERNANDA M.**; BORGUINI, RENATA G. ; GODOY, RONOEL L.O ; PACHECO, SIDNEY ; NASCIMENTO, LUZIMAR S.M. ; NOGUEIRA, REGINA I. . Characterization of jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) fruit peel powder for use as natural colorant. Fruits (Paris. Imprimé) <sup>JCR</sup>, v. 71, p. 3-8, 2016.

**MARQUES PEIXOTO, FERNANDA**; FERNANDES, IVA; GOUVÊA, ANA CRISTINA M.S. ; SANTIAGO, MANUELA C.P.A. ; GALHARDO BORGUINI, RENATA ; MATEUS, NUNO ; FREITAS, VICTOR ; GODOY, RONOEL L.O. ; FERREIRA, ISABEL M.P.L.V.O. . Simulation of *in vitro* digestion coupled to gastric and intestinal transport models to estimate absorption of anthocyanins from peel powder of jabuticaba, jamelão and jambo fruits. Journal of Functional Foods <sup>JCR</sup>, v. 24, p. 373-381, 2016.

SANTIAGO, MANUELA CRISTINA PESSANHA DE ARAUJO; NOGUEIRA, REGINA ISABEL ; PAIM, DIEGO RENAN SOBREIRO FALCÃO ; GOUVÊA, ANA CRISTINA MIRANDA SENNA ; GODOY, RONOEL LUIZ DE OLIVEIRA ; **PEIXOTO, FERNANDA MARQUES** ; PACHECO, SIDNEY ; FREITAS, SUELY PEREIRA . Effects of encapsulating agents on anthocyanin retention in pomegranate powder obtained by the spray drying process. Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie / Food Science + Technology <sup>JCR</sup>, v. 73, p. 551-556, 2016

GOUVÊA, ANA CRISTINA M.S. ; MELO, ARMINDO ; SANTIAGO, MANUELA C.P.A. ; **PEIXOTO, FERNANDA M.** ; FREITAS, VITOR ; GODOY, RONOEL L.O. ; FERREIRA, ISABEL M.P.L.V.O. Identification and quantification of anthocyanins in fruits from *Neomitrantes obscura* (DC.) N. Silveira an endemic specie from Brazil by comparison of chromatographic methodologies. Food Chemistry, v. 185, p. 277-283, 2015.

PACHECO, S ; **PEIXOTO, F. M.** ; BORGUINI, R. G. ; BOBEDA, C. ; OLIVEIRA, L. M. ; SANTIAGO, M. C. P. A. ; GODOY, R. L. O. . MICRO SCALE EXTRACTION METHOD FOR HPLC CAROTENOIDS ANALYSIS IN VEGETABLE MATRICES'. Scientia Agricola (USP. Impresso) <sup>JCR</sup>, 2014.

M.C.P.A. SANTIAGO, A.C.M.S. GOUVÊA; **F.M. PEIXOTO.**;R.G. BORGUINI, , R.L.O GODOY, R.I. NOGUEIRA, L.S.M. NASCIMENTO, S. PACHECO. Influence of storage time on the stability of anthocyanins in jamelão (*syzygium cumini*) based natural colorant obtained by convective drying. 19th International Drying Symposium (IDS 2014), Lyon, France, August 24-27, 2014.

GOUVEA, A. C. M; SANTIAGO, M. C. P. A.; OLIVEIRA, L. M.; GODOY, R. L. O., **PEIXOTO, F.M.**; PACHECO, S.; OLIVEIRA, L. M.; BORGUINI, R. G. Isolamento de antocianinas da casca de uva-preta por CLAE/DAD. Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia, v.6, n.1-2, 2014.

**PEIXOTO, F. M.;** BORGUINI, R. G. ; PACHECO, S. ; Godoy, R. L. O. ; CARVALHO, J. L. V. ; Nutti, M.R. . Bioacessibilidade in vitro de Carotenoides em oito Cultivares de Batata Doce (*Ipomea batatas* Lam) de Polpa Alaranjada. In: VI Congresso Brasileiro Latinoamericano e XII Congresso Brasileiro Higienistas de Alimentos, 2013, Gramado. Revista Higiene Alimentar, 2013. v. 27. p. 272-276.

**PEIXOTO, F. M.;** BORGUINI, R. G. ; MACHADO, A. M. R. ; GOUVEA, A. C. M. S. ; PACHECO, S. ; GODOY, R. L. O. Teor de carotenóides em nutricosméticos: análise da adequação e qualidade do produto.. Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso), v. 72, p. 269-274, 2013.

PACHECO, S.; GODOY, R. L. O.; **GIORI, F.P.** ; GOUVEA, A. C. M. S. ; SANTIAGO, M. C. P. A. ; BORGUINI, R. G. ; FELBERG, I. . Preparation of High Purity Analytical Standards using High Performance Liquid Chromatography in Analytical Scale. Analytical Chemistry: An Indian Journal, v. 12, p. 194-197-197, 2013.