

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

ATIVIDADE ANTIHIPERGLICÊMICA DO IOGURTE PROBIÓTICO SUPLEMENTADO COM EXTRATO DE ARAÇÁ APÓS O PROCESSO DE DIGESTÃO *IN VITRO*

E.S. Pereira¹, T.M. Camargo¹, P.V. Rodrigues¹, S. Pieniz², M. Vizzotto³, A. Fiorentini¹

1-Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, – CEP: 96160-000 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 991387367 – e-mail: (lisaspereira@gmail.com; angefiore@gmail.com).

2- Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Pelotas – CEP: 96010-610 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 999617909 – e-mail: (nutrisimone@yahoo.com.br).

3- Núcleo de Alimentos – Embrapa Clima Temperado, - CEP: 96010-971 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone 55 (53) 32758287 – e-mail: (marcia.vizzotto@embrapa.br).

RESUMO – Inibidores da alfa-glicosidase são utilizados em indivíduos com diabetes tipo 2, a fim de promover a diminuição na captação da glicose e conseqüentemente redução nos níveis de glicose no sangue. O araçá já demonstrou uma forte atividade inibitória contra esta enzima, e é atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos. O objetivo do trabalho foi verificar a influência do processo de digestão *in vitro* na atividade de inibição da alfa-glicosidase, nos compostos fenólicos e na atividade antioxidante, de iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá. Foram verificados os compostos fenólicos presentes, assim como atividade antioxidante e inibição de alfa-glicosidase, do iogurte. Ácido cafeico, clorogênico, hidroxibenzoico, sinápico e catequina foram encontrados. Após a digestão, a inibição da alfa-glicosidase aumentou; ocorreu alteração nos compostos fenólicos e atividade antioxidante diminuiu. A digestão *in vitro* simulada indica que os compostos fenólicos alcançam o intestino, com propriedades inibitórias de alfa-glicosidase aumentadas ao longo da digestão.

ABSTRACT – Alpha-glucosidase inhibitors are used in individuals with type 2 diabetes, in order to promote a decrease in glucose uptake and consequently a reduction in blood glucose levels. Araçá has already shown a strong inhibitory activity against this enzyme, and is mainly attributed to the presence of phenolic compounds. The objective of the work was to verify the influence of the *in vitro* digestion process on the alpha-glucosidase inhibition activity, on the phenolic compounds and on the antioxidant activity, of probiotic yogurt supplemented with araçá extract. The phenolic compounds present were verified, as well as antioxidant activity and alpha-glycosidase inhibition, from yogurt. Caffeic, chlorogenic, hydroxybenzoic, synapic and catechin acids were found. After digestion, alpha-glycosidase inhibition increased; there was a change in phenolic compounds and antioxidant activity decreased. Simulated *in vitro* digestion indicates that phenolic compounds reach the intestine, with alpha-glucosidase inhibitory properties increased during digestion.

PALAVRAS-CHAVE: Diabetes tipo II; alfa-glicosidase; compostos fenólicos.

KEYWORDS: Type II diabetes; alpha-glucosidase; phenolic compounds.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



1. INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus tipo II é uma doença caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, ação de insulina ou ambos. A hiperglicemia crônica da diabetes está associada a disfunção e falha de diferentes órgãos. Ainda, pacientes com diabetes têm uma incidência aumentada de doença aterosclerótica cardiovascular, periférica arterial e cerebrovascular (Diretrizes SBD 2015-2016).

Evidências apontam que as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como a diabetes tipo II, podem ser largamente prevenidas por meio de ações de promoção de saúde (Costa et al., 2011). Devido a isso, o estímulo a pesquisas sobre alimentos que proporcionem benefícios à saúde, está aumentando. O araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) está entre as frutas nativas brasileiras que são altamente exploradas devido à presença de compostos biológicos ativos. Apresenta, em sua composição, uma quantidade elevada de compostos fenólicos, os quais já foram reportados com atividade antioxidante, anticancerígena, antidiabética, entre outras (Medina et al., 2011; Vinholes et al., 2017; Pereira et al., 2018).

Extratos de araçá foram avaliados como potenciais inibidores das enzimas digestivas e verificou-se que os genótipos de araçás vermelhos e amarelos foram capazes de inibir as enzimas alfa-glicosidase e alfa-amilase, sendo uma alternativa à modulação da hiperglicemia. A quercetina, por exemplo, é considerada um bom inibidor das enzimas digestivas com IC₅₀ quase 40 vezes menor do que o controle positivo (acarbose) (Vinholes et al., 2017). Pereira et al., (2020) avaliaram a inibição destas enzimas por extratos fenólicos fracionados de diferentes genótipos de araçá, e verificaram que as frações contendo flavonoides demonstraram maior inibição da alfa-glicosidase e alfa-amilase, ainda que todas as frações fenólicas tenham exercido atividade de inibição das enzimas. Extratos brutos de araçá já foram testados *in vivo* no controle da hiperglicemia, onde se notou melhora nos níveis da glicemia e de triglicérides (Cardoso et al., 2017).

Devido ao araçá ser uma fruta nativa e ainda não ser comumente encontrado nos mercados, o acesso a essa fruta pode ser limitado. O desenvolvimento de produtos alimentícios suplementados com o extrato de araçá poderá ser uma alternativa à indústria, para levar este produto até a população. O iogurte é um produto cuja fermentação se realiza com cultivos protossimbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-láticas que, dependendo da sua atividade, confere efeitos probióticos e contribuem para a determinação das características do produto final.

A formulação de um produto lácteo, como o iogurte, suplementado com extrato de araçá e ainda, contendo probióticos, seria uma alternativa para elevar o potencial benéfico do produto. Estudos relatam benefícios atribuídos aos probióticos, como a preservação da integridade intestinal, combate a doença intestinal inflamatória (Karimi et al., 2005), inibição da colonização gástrica com *Helicobacter pylori* que é associado a gastrite, úlcera péptica e câncer gástrico (Canducci et al., 2000). Há ainda evidências de que os probióticos estimulam a resposta imunológica e modulação de reações alérgicas, promovam a digestão da lactose em indivíduos intolerantes, reduzem o risco de câncer e influenciam na modulação dos níveis sanguíneos de lipídeos (Cuppari, 2005).

No entanto, para que os compostos fenólicos exerçam efeitos para além do trato gastrointestinal é necessário que estes compostos estejam biodisponíveis. Para isso, devem ser absorvidos, metabolizados, transportados pela circulação, e alcançar os tecidos-alvo em concentrações efetivas. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência do processo de digestão *in vitro* na atividade de inibição da alfa-glicosidase, nos compostos fenólicos e na atividade antioxidante total, de iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá.

2. MATERIAL E MÉTODOS



2.1 Material

Foi utilizado o genótipo de araçá AC-87 de coloração vermelha, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado, RS, Brasil. As frutas foram colhidas completamente maduras, de forma a se obter uma amostra representativa. Todas as frutas foram colhidas em 2018, entre março e abril, e foram selecionadas considerando a ausência de lesões e infecções visíveis e também a uniformidade de cor e tamanho. Foi utilizada apenas a porção de polpa-casca, sendo as sementes retiradas das amostras. As frutas foram congeladas -80 °C até as análises. A bactéria adicionada foi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. (R7), caracterizada com potencial probiótico e aspectos de segurança, em estudos anteriores pelo Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Nutrição – UFPel, RS, Brasil. As culturas iniciadoras *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, foram adicionadas para o processo fermentativo, adquiridas da Empresa Chr. Hansen.

2.2 Preparo do extrato e do iogurte

Os extratos foram preparados a partir da porção comestível da fruta de araçá (polpa-casca). As amostras (20 g) foram trituradas com 80 mL de etanol 95% durante 3 min utilizando ultraturrax. Os homogeneizados foram centrifugados a 5.000 rpm e o sobrenadante foi coletado e rotaevaporado. Após este processo, as amostras ainda foram liofilizadas para eliminação total de qualquer quantidade de água/solvente ainda presente. Para o preparo do iogurte, foram adicionadas culturas iniciadoras (0,1%) em 1 litro de leite integral a 40 °C, e depois disposto em iogurteira até atingir o pH de 4,6. Após este período foi armazenado em geladeira convencional (6-10 °C) por 24 h e após homogeneizado, acrescentado xilitol (4,6%), o probiótico R7 (0,1%) e o extrato de araçá (4%).

2.3 Simulação da digestão *in vitro*

O processo de digestão *in vitro* foi realizado com o iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá, para avaliar a bioacessibilidade de compostos fitoquímicos de acordo com Gião et al. (2012), com algumas modificações. O método reproduziu três fases do processo de digestão: simulação da digestão na boca, com alfa-amilase (Digestão boca); simulação da digestão gástrica, utilizando pepsina e HCl (Digestão gástrica); e a simulação da digestão em condições do intestino delgado, através de sais biliares e pancreatina (Digestão intestinal). A amostra foi avaliada para cada processo digestivo e para a digestão completa (Digestão completa). Primeiramente 0,9 mL da amostra foi diluída em 10 mL de água e misturada com a solução de alfa-amilase salivar (0,60 mL, 100 mU/mL), incubada a 37 °C por 1 min em banho-maria, sob agitação (200 rpm). A digestão gástrica foi realizada ajustando o pH para 2,0 (HCl, 1M) e a mistura foi incubada sob agitação (130 rpm) com uma quantidade (0,5 mL) de solução de pepsina (25 mg/mL em 0,1 M HCl). Para a digestão intestinal, as amostras foram ajustadas a pH 6,0 com NaHCO₃ (1M), antes da adição de 2,5 mL de solução de pancreatina e sais biliares recém-preparada (2g/L de pancreatina mais 12 g/L de sais biliares em NaHCO₃ (0,1 M)) e incubados por 1 hora a 37 °C e 45 rpm. A inativação enzimática foi realizada com as amostras imersas em água (100 °C), durante 1 minuto. Controles da amostra com pH ajustado para cada etapa, na ausência de enzimas, foram executadas em paralelo (controle digestão boca, controle digestão gástrica e controle digestão intestinal).

2.4 Compostos fenólicos individuais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os compostos fenólicos foram identificados no iogurte em cada etapa da digestão *in vitro*. Uma alíquota de 600 µL do iogurte foi liofilizada e ressuspensa em 2 mL de água deionizada para análise. A identificação dos compostos por LC-MS foi realizada em coluna Luna C18, em cromatógrafo líquido acoplado a

espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo. O fluxo foi de 0,2 mL min⁻¹, temperatura da coluna de 40 °C e as fases móveis foram água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (eluente B). O programa de gradiente foi o seguinte: iniciado em 10% B e aumentado linearmente para 90% B aos 18 minutos e foi mantido por 3 minutos a 90% B; retornou a 10% B em 2 minutos e foi mantido em 10% B por mais 7 minutos. O volume de injeção foi de 10 µL. Os compostos fenólicos foram identificados por comparação com os tempos de retenção, dados espectrais visíveis aos UV e pesos moleculares de compostos padrão relatados na literatura para frutos de araçá (Medina et al., 2011; Ribeiro et al., 2014; Silva et al., 2014).

2.5 Atividade de eliminação de radicais DPPH

Foi determinada pelo método adaptado de Brand-Williams et al. (1995) utilizando o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Em resumo, foram adicionados 200 µL de cada amostra ou metanol (controle) a 2800 µL de solução de DPPH. A reação foi misturada e incubada no escuro durante 24 h à temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi lida a 515 nm, em espectrofotômetro. Trolox foi usado como referência para a curva de calibração e os resultados foram expressos como µg de equivalente de trolox por g de amostra.

2.6 Inibição da alfa-glicosidade

A atividade da alfa-glicosidase foi avaliada usando um procedimento previamente relatado (Ferrerres et al., 2013), com algumas modificações. Primeiramente, 20 µL do extrato foi adicionado a 100 µL de PNP-G (3,25 mM) em tampão fosfato (pH 7,0). A reação foi iniciada pela adição de 100 µL da enzima (9,37 U/mL em tampão fosfato, pH 7,0) e os frascos foram incubados a 37 °C por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 0,600 mL de Na₂CO₃ (1M) e a absorbância foi medida a 405 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de simulação da digestão *in vitro* consistiu em avaliar o comportamento dos compostos presentes no iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá até a fase final da digestão, no intestino delgado. E ainda, foi verificada a atividade antioxidante e de inibição da alfa-glicosidase pelo iogurte, em todas as fases de digestão: na boca (DB), gástrica (DG) e intestinal (completa) (DC).

No presente estudo, os compostos fenólicos do iogurte foram determinados a fim de relacionar sua atividade inibitória enzimática com possíveis alterações na composição química. Os compostos mais comumente encontrados no araçá, foram identificados nas amostras digeridas de iogurte. Na DB foram verificados ácido cafeico, clorogênico e hidroxibenzóico; Na DG o ácido cafeico, catequina, ácido clorogênico e hidroxibenzóico; E na DC foram encontrados os ácido cafeico, hidroxibenzóico e sinápico. Estes resultados sugerem a liberação ou alteração de compostos durante o processo de digestão, capazes de influenciar a efetividade dos extratos em nível intestinal.

A atividade antioxidante foi avaliada através da capacidade de inibição do radical DPPH pelo iogurte (Tabela 1). Foi verificado um aumento da inibição do radical na DG (de 41,38% para 52,08%) e depois um decréscimo na DC (de 52,08% para 19,09%).

Tabela 1. Inibição (%) do radical DPPH e da enzima alfa-glicosidase pelo iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá, durante e após o processo de digestão.

	DB*	DG*	DC*
Radical DPPH (%)	41,38	52,08	19,09
Alfa-glicosidase (%)	46,93	57,34	78,99

*As abreviaturas para amostras são: ND: não digerido, PG: pós-gástrico, DC: digestão completa.



É bem estabelecido que os compostos fenólicos de uma matriz fornecem uma idéia de quão rico é este produto em antioxidantes, pois esses parâmetros estão intimamente relacionados. Além disso, há estudos que indicam potencial antioxidante de probióticos. Kudoh et al., (2001) identificaram um derivado da caseína que exibiu atividade de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazilo. A maioria dos peptídeos dentro de uma proteína pode ser liberado durante processos alimentares ou durante atividades gastrointestinais, sendo que o grau de proteólise, que depende da cepa utilizada, é diretamente relacionado à atividade antioxidante. (Gupta et al., 2009). Isso indica que os probióticos presentes no iogurte, poderiam ainda, influenciar nos níveis de atividade antioxidante.

A tabela 1 demonstra ainda, um aumento contínuo da atividade de inibição da enzima alfa-glicosidase desde a boca até o intestino. Na DB a alfa-glicosidase apresentou inibição de 46,93% pelo iogurte, aumentando para 57,34% na DG e a 78,99% de inibição após a digestão completa. Isto pode indicar que o último passo digestivo pode ser responsável pela liberação ou alteração de compostos bioativos levando a um aumento da atividade inibitória. Este fato pode-se dar pela diminuição do pH do iogurte após a incubação em fase gástrica, (pH 2,0), podendo favorecer a bioacessibilidade de alguns compostos.

Ainda, foram verificados na literatura, que os probióticos podem melhorar o prognóstico do diabetes através da modulação da microbiota intestinal (Gomes et al., 2014). Isso ocorre devido a redução da resposta inflamatória e do estresse oxidativo, além do aumento da expressão de proteínas de adesão no epitélio intestinal, reduzindo a permeabilidade intestinal. Assim, estes efeitos aumentam a sensibilidade à insulina e reduzem a resposta autoimune. Desarranjos funcionais podem contribuir para o aumento da expressão de citocinas inflamatórias podendo levar à resistência à insulina e a DM2. Com isso, um alimento que contenha em sua composição, probióticos, além de extrato de frutas ricas em compostos bioativos, torna-se uma opção para indivíduos que vivem com a doença ou procuram uma alimentação mais saudável.

4. CONCLUSÃO

A digestão *in vitro* simulada do iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá indica que os compostos fenólicos alcançam o órgão alvo, o intestino, com propriedades inibitórias de alfa-glicosidase aumentadas ao longo da digestão. No entanto, indica que os compostos alteram a composição ao longo do processo, e ainda, que a atividade antioxidante diminui após o processo de digestão.

O iogurte probiótico suplementado com extrato de araçá pode ser considerado fonte promissora de compostos bioativos e probióticos, a serem utilizados na prevenção, controle e tratamento de diabetes tipo II.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Canducci, F; Armuzzi, A; Cremonini, F.; Cammarota, G.; Bartolozzi, F.; Pola, P. (2000) A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*.
- Cardoso, J.S., Oliveira, P. S., Bona, N. P., Vasconcellos, F. A., Baldissarelli, J., Vizzotto, M., Soares, M. S. P, Ramos, V. P., Spanevello, R. M., Lencina, C. L., Tavares, R. G., & Stefanello, F. M. (2017). Antioxidant, antihyperglycemic, and antidyslipidemic effects of Brazilian-native fruit extracts in an animal model of insulin resistance. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 1–6.
- Costa, J. D. A., Balga, R. S. M., Alfenas, R. D. C. G., & Cotta, R. M. M. (2011). Promoção da saúde e diabetes: discutindo a adesão e a motivação de indivíduos diabéticos participantes de programas de saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16, 2001-2009.



27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020

ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

Cuppari L. Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto. Escola Paulista de Medicina. 2ª ed. São Paulo: Manole; 2005.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Sociedade Brasileira de Diabetes (2015 – 2016). Disponível em <http://www.diabetes.org.br/sbdonline/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>.

Gião, M. S., Gomes, S., Madureira, A. R., Faria, A., Pestana, D., Calhau, C., Pintado, M.E., Azevedo, I., & Malcata, F. X. (2012). Effect of in vitro digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia sp.* and *Satureja montana*. *Food Chemistry*, 131, 761-767.

Gupta, A.; Mann, B.; Kumar, R.; & Sangwan, R. B. (2009) Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 339–347.

Karimi, O.; Peña, A.S.; Bodegraven, A.A.; (2005) Probiotics (VSL# 3) in arthralgia in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease: A pilot study. *Drugs of today*. 41 (7), 453-460.

Kudoh, Y.; Matsuda, S.; Igoshi, K.; & Oki, T. (2001) Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgarius* IFO13953. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* (Japan), 48, 44–50.

Medina, A.L., Haas, L.I.R., Chaves, F.C., Salvador, M., Zambiasi, R.C., Da Silva, W.P., Nora, L., & Rombaldi, C.V. (2011). Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry* 128, 916–922.

Pereira, E.S., Vinholes, J. R., Camargo, T. M., Nora, F. R., Crizel, R. L., Chaves, F., ... & Vizzotto, M. (2020). Characterization of araçá fruits (*Psidium cattleianum* Sabine): Phenolic composition, antioxidant activity and inhibition of α -amylase and α -glucosidase. *Food Bioscience* 100665.

Pereira, E.S., Vinholes, J., Franzon, R. C., Dalmazo, G., Vizzotto, M., & Nora, L. (2018). *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. *Food Chemistry*, 258, 95-103.

Ribeiro, A.B., Chisté, R.C., Freitas, M., Da Silva, A.F., Visentainer, J.V., & Fernandes, E. (2014). *Psidium cattleianum* fruit extracts are efficient *in vitro* scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry* 165, 140–148

Silva, N.A., Rodrigues, E., Mercadante, A.Z., & Rosso, V.V. (2014). Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 5072–5084.

Vinholes, J., Lemos, G., Barbieri, R.L., Franzon, R.C., & Vizzotto, M. (2017). *In vitro* assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. *Food Bioscience* 19, 92-100.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br