

# Perfil fenólico e propriedades antioxidantes de polpa de seriguela macerada enzimaticamente durante digestão gastrointestinal in vitro

**Palavras-Chave:** Digestão simulada in vitro; *Spondias purpurea* L.; maceração enzimática; antioxidantes.

**Autores(as):**

Bruna Egilio Macedo; Mariana de Oliveira Silva [FEA – UNICAMP]

Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro (Orientador) [FEA – UNICAMP]

---

## INTRODUÇÃO:

O consumo de frutas tem aumentado nos últimos anos devido ao seu valor nutricional e por estas serem reconhecidas como fonte importante de compostos bioativos como os compostos fenólicos, os quais estão fortemente relacionados à atividade antioxidante. Os compostos antioxidantes apresentam impactos positivos sobre a saúde de quem os consome e estão presentes em espécies frutíferas nativas e exóticas, como é o caso da seriguela (*Spondias purpurea* L.).

A seriguela é uma árvore nativa das Américas do Sul e Central, sendo facilmente encontrada no nordeste brasileiro. Seus frutos apresentam uma polpa aromática com sabor agridoce e são ricos em compostos fenólicos como ácido protocatecuico, ácido vanílico, rutina e catequina (OMENA et al., 2012; SILVA et al., 2016).

Embora alguns frutos apresentem quantidades significativas de compostos fenólicos, a composição da matriz alimentar pode interferir na estabilidade desses compostos durante o processo de digestão (DANTAS et al., 2023). Tem sido relatado que os compostos fenólicos são pouco absorvidos no intestino, portanto, investigar as transformações químicas desses compostos durante a digestão gastrointestinal é importante para entender melhor os seus efeitos biológicos (INADA et al., 2020).

Alguns processos biotecnológicos, como o tratamento enzimático, podem ser utilizados como estratégia para aumentar a extração e a bioacessibilidade de compostos fenólicos e conseqüentemente, as propriedades antioxidantes de matrizes alimentares. Essa tecnologia faz uso dos mais variados tipos de enzimas (pectinases, celulasas, proteases, dentre outras), que atuam na matriz alimentar hidrolisando componentes da parede celular vegetal onde comumente compostos bioativos podem estar complexados com macronutrientes, como os carboidratos e as proteínas; como consequência, esses compostos são liberados para a fração solúvel, tornando-os mais bioacessíveis (ALARA; ABDURAHMAN; UKAEGBU, 2021).

Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da digestão simulada de polpa de seriguela antes e após aplicação do tratamento enzimático sobre os seus compostos fenólicos e suas propriedades antioxidantes

## METODOLOGIA:

As polpas de seriguela (*Spondias purpurea* L.) foram adquiridas da empresa Frutaboa localizada na cidade de Limoeiro do Norte (Ceará, Brasil). As polpas de frutas foram transportadas sob refrigeração, ao abrigo de luz até o Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA - Unicamp e foram utilizadas para o tratamento enzimático.

Para o tratamento enzimático foram utilizadas as enzimas Pectinex® Ultra SP-L (pectinase), Celluclast® 1.5L (celulase) e Viscozyme® L (complexo multienzimático de carboidrases), adquiridas da empresa Novozymes.

As condições de ensaio utilizadas para condução do tratamento enzimático da polpa de seriguela foram definidas com base em estudos prévios do grupo de pesquisa. A polpa foi diluída em uma proporção de 1:1 (m:v) em tampão acetato (100 mmol/L, pH 5,0) para ajuste do pH. O tratamento foi conduzido à temperatura de 40 °C sob agitação de 100 rpm por 40 minutos utilizando a combinação ternária das enzimas, como segue: 1/6 Pectinex® Ultra SP-L, 1/6 Celluclast® 1.5L e 2/3 Viscozyme® L, na concentração final de 0,25% (v:v).

Após o tratamento, as amostras foram congeladas imediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  para paralisação das reações. A polpa sem aplicação de tratamento foi utilizada como controle.

A digestão simulada foi realizada na amostra tratada enzimaticamente e no ensaio controle, seguindo três fases sequenciais: fase oral, fase gástrica e fase intestinal, de acordo com o protocolo INFOGEST (BRODKORB et al. 2019). Para reduzir a presença de interferentes dos reagentes utilizados no processo de digestão, em especial das preparações enzimáticas, sobre as propriedades antioxidantes e o teor de compostos fenólicos totais, as amostras foram submetidas à ultrafiltração em membranas de corte com massa molecular de 10 kDa (Millipore Corporation Ultrafiltration Membranes, Billerica, MA, EUA). Os resultados foram avaliados a partir da verificação do efeito da digestão (%), calculado para cada resposta de interesse de acordo com a equação a seguir:

$$\text{Efeito da digestão (\%)}: \left[ \frac{(\text{amostra digerida} - \text{amostra não digerida})}{\text{amostra não digerida}} \times 100 \right]$$

As amostras foram analisadas quanto ao teor de compostos fenólicos totais (expressos em mg de ácido gálico equivalente por g de amostra - AGE  $\text{g}^{-1}$ ), capacidade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH e FRAP (RASERA et al., 2023) (expressa em  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalentes por g de amostra -  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ ). A identificação dos compostos fenólicos foi realizada por HPLC e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de composto por g de amostra - ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (DUTRA et al. 2017).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos para as amostras tratadas enzimaticamente e para o ensaio controle demonstraram que a digestão impactou positivamente a liberação dos compostos fenólicos da polpa de seriguela. Ao final da digestão houve variação significativa ( $p < 0,05$ ) no teor de compostos fenólicos (TFT) da polpa controle (não tratada enzimaticamente), resultando em aumento de 42,40%, quando a amostra digerida é comparada em relação à não digerida (Tabela 1). O mesmo efeito foi observado para a polpa tratada enzimaticamente, onde, ao fim da digestão, a amostra digerida apresentou aumento de 254,17% para TFT em relação à amostra não digerida. Esses compostos podem ser liberados de macromoléculas estruturais, especialmente carboidratos e proteínas, devido à ação enzimática e às condições de pH durante a digestão, resultando na quebra de ligações covalentes e também de outros tipos de interação (RASERA et al., 2023).

Com relação à atividade antioxidante, os resultados foram semelhantes. Na polpa controle, ao final do processo de digestão (fase intestinal), foram observados aumentos de 172,06, 206,87 e 39,18%, respectivamente, para ABTS, DPPH e FRAP. Resultados similares, porém menos expressivos, foram observados para a amostra tratada enzimaticamente, em que aumentos de 142,09, 27,52 e 2,82 foram observados para ABTS, DPPH e FRAP, respectivamente (Tabela 1). O fato de a polpa já ter sido submetida ao tratamento enzimático pode justificar essa menor variação; isto porque, a hidrólise prévia já resultou na liberação de compostos antioxidantes, reduzindo, assim, o efeito da digestão já que parte dos compostos insolúveis foram previamente liberados pela ação das enzimas Pectinex® Ultra SP-L, Celluclast® 1.5L e Viscozyme® L.

Durante o processo de digestão, variações marcantes entre as fases gástrica e intestinal foram observadas (Tabela 1). Na fase gástrica, em que o pH é mais ácido (pH 3,0), grande parte das variações das respostas foi negativa. Alguns estudos já reportaram a redução da atividade antioxidante na fase gástrica, porém com aumento na fase intestinal, semelhante ao observado em nosso estudo. Essa variação possivelmente está relacionada a alguns fatores: i) tempo adicional no processo digestivo (2 h); ii) a dependência do pH durante o processo digestivo, uma vez que em meio neutro (pH 7) ou levemente alcalino ( $\text{pH} \geq 7$ ), a desprotonação dos compostos fenólicos aumenta significativamente, o que favorece os mecanismos de ação antioxidante destes compostos; e iii) os efeitos das enzimas digestivas (pancreatina, que possui atividades de  $\alpha$ -amilase, lipase e protease), que facilitam a liberação de compostos fenólicos ligados à matriz alimentar (CORONA-LEO et al., 2021; SĘCZYK et al., 2021).

No presente estudo, apenas o teor de compostos fenólicos foi investigado quanto à relação com a atividade antioxidante mensurada pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP. Todavia, em um contexto mais amplo sabe-se que compostos como carotenoides, vitaminas e outros metabólitos (ácidos cítrico e ascórbico, por exemplo), presentes na polpa da seriguela, também apresentam potencial antioxidante e podem contribuir com o resultado observado.

**Tabela 1.** Teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpa de seriguela tratada enzimaticamente e ensaio controle antes e após a digestão in vitro.

		Polpa controle							
		TFT (mg AGE g <sup>-1</sup> )	Efeito da digestão (%)	ABTS (μmol TE g <sup>-1</sup> )	Efeito da digestão (%)	DPPH (μmol TE g <sup>-1</sup> )	Efeito da digestão (%)	FRAP (μmol TE g <sup>-1</sup> )	Efeito da digestão (%)
Fase Oral	Polpa digerida	0,84 ± 0,00 <sup>b</sup>		8,24 ± 0,40 <sup>d</sup>		5,83 ± 0,05 <sup>b</sup>		4,98 ± 0,06 <sup>c</sup>	
	Polpa não digerida	0,63 ± 0,01 <sup>b</sup>	33,33	8,29 ± 0,05 <sup>d</sup>	-0,60	5,88 ± 0,11 <sup>b</sup>	-0,85	5,30 ± 0,00 <sup>c</sup>	-6,04
Fase Gástrica	Polpa digerida	0,62 ± 0,01 <sup>b</sup>		14,87 ± 0,08 <sup>c</sup>		8,80 ± 0,11 <sup>b</sup>		5,46 ± 0,13 <sup>c</sup>	
	Polpa não digerida	0,94 ± 0,20 <sup>b</sup>	-34,04	16,75 ± 0,06 <sup>b</sup>	-11,22	6,73 ± 0,06 <sup>b</sup>	30,76	8,27 ± 0,15 <sup>a</sup>	-33,98
Fase Intestinal	Polpa digerida	1,78 ± 0,00 <sup>a</sup>		55,31 ± 0,10 <sup>a</sup>		18,32 ± 0,07 <sup>a</sup>		6,82 ± 0,14 <sup>b</sup>	
	Polpa não digerida	1,25 ± 0,00 <sup>a</sup>	42,40	20,33 ± 0,27 <sup>b</sup>	172,06	5,97 ± 1,31 <sup>b</sup>	206,87	4,90 ± 0,14 <sup>c</sup>	39,18
		Polpa tratada enzimaticamente							
		TFT (mg AGE g <sup>-1</sup> )	Efeito da digestão (%)	ABTS (μmol TE g <sup>-1</sup> )	Efeito da digestão (%)	DPPH (μmol TE g <sup>-1</sup> )	Efeito da digestão (%)	FRAP (μmol TE g <sup>-1</sup> )	Efeito da digestão (%)
Fase Oral	Polpa digerida	0,92 ± 0,02 <sup>d</sup>		10,45 ± 0,05 <sup>d</sup>		7,76 ± 0,05 <sup>d</sup>		6,67 ± 0,05 <sup>b</sup>	
	Polpa não digerida	0,83 ± 0,02 <sup>de</sup>	10,84	10,01 ± 0,16 <sup>d</sup>	4,40	6,72 ± 0,15 <sup>e</sup>	15,48	5,30 ± 0,07 <sup>c</sup>	33,20
Fase Gástrica	Polpa digerida	1,47 ± 0,03 <sup>b</sup>		16,64 ± 0,07 <sup>c</sup>		10,19 ± 0,20 <sup>c</sup>		6,98 ± 0,03 <sup>b</sup>	
	Polpa não digerida	1,16 ± 0,03 <sup>c</sup>	26,72	16,05 ± 0,07 <sup>c</sup>	3,68	10,24 ± 0,09 <sup>c</sup>	-0,49	7,99 ± 0,09 <sup>a</sup>	-13,00
Fase Intestinal	Polpa digerida	2,55 ± 0,01 <sup>a</sup>		54,76 ± 0,40 <sup>a</sup>		28,13 ± 0,01 <sup>a</sup>		5,85 ± 0,04 <sup>c</sup>	
	Polpa não digerida	0,72 ± 0,02 <sup>e</sup>	254,17	22,62 ± 0,14 <sup>b</sup>	142,09	22,06 ± 0,14 <sup>b</sup>	27,52	5,70 ± 0,08 <sup>c</sup>	2,82

O efeito da digestão foi calculado considerando a amostra não digerida como valor final e a amostra digerida como valor inicial. Os resultados estão expressos como a média (n = 3) ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p < 0,05) entre os resultados pelo teste de Tukey.

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada apenas na fase intestinal de cada amostra (Tabela 2). Os resultados demonstraram que a digestão da polpa de seriguela favoreceu a liberação dos compostos fenólicos, onde as amostras digeridas apresentaram aumento no teor de compostos liberados com relação às não digeridas. Foram identificados dez compostos, sendo seis ácidos fenólicos (ácido gálico, protocatecuico, cafeico, vanílico,  $\rho$ -cumárico e ferúlico) e quatro flavonoides (catequina, rutina, miricetina e kaempferol).

Para a amostra controle, foi possível observar que os ácidos gálico, protocatecuico, cafeico e a miricetina tiveram aumentos de 15,36, 223,51, 63,85 e 7,70%, respectivamente, após a digestão. Enquanto os ácidos  $\rho$ -cumárico, catequina e rutina apresentaram quantidades menores após o processo de digestão (Tabela 2).

Para a amostra tratada enzimaticamente, os ácidos gálico e  $\rho$ -cumárico e o flavonoide miricetina tiveram aumentos de 74,87, 27,07 e 199,07%, respectivamente, após a digestão. Em contraste, os ácidos protocatecuico e cafeico, além da miricetina, apresentaram quantidades menores após a digestão. O conteúdo de ácido vanílico não foi detectado após a digestão, o que pode ser resultado da complexação fenólica com macromoléculas, que pode ter resultado na diminuição da bioacessibilidade do composto durante a digestão (RASERA et al., 2023).

Em ambas as amostras, o kaempferol foi detectado apenas após a digestão. O kaempferol é um flavonoide encontrado em abundância em diversas partes das plantas, como sementes, flores, frutas, folhas e vegetais, e tem se mostrado importante para o tratamento de doenças relacionadas ao envelhecimento. Este composto, assim como os seus derivados glicosilados já foram reportados por apresentarem diversas propriedades benéficas, incluindo atividades cardioprotetoras, neuroprotetoras, anti-inflamatórias, antidiabéticas, antioxidantes, antimicrobianas e antitumorais (DANTAS et al., 2023).

Ao analisar a atividade antioxidante da amostra controle e da amostra tratada enzimaticamente e o efeito da digestão, foi possível constatar de forma geral que houve aumento nos valores absolutos obtidos. Para a análise de DPPH, houve aumento de 18,32  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  (amostra controle) para 28,13  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  (amostra tratada enzimaticamente) na polpa digerida após a fase intestinal. A variação positiva na capacidade antioxidante na polpa tratada tem relação com o efeito positivo da digestão sobre a liberação de compostos fenólicos como ácido gálico e miricetina. É válido ainda ressaltar que o tratamento enzimático mostrou um impacto notável e positivo sobre a polpa de seriguela. Em valores absolutos, a amostra tratada enzimaticamente apresentou melhores resultados após a digestão, mostrando que a hidrólise enzimática pode ser uma aliada na extração dos compostos bioativos e consequentemente, no aumento do potencial antioxidante da polpa de seriguela.

**Tabela 2.** Identificação de compostos fenólicos por HPLC em polpa de seriguela antes e depois do tratamento enzimático nas amostras digeridas e não digeridas.

Compostos fenólicos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Polpa controle			Polpa tratada enzimaticamente		
	Digerido	Não digerido	Efeito da digestão (%)	Digerido	Não digerido	Efeito da digestão (%)
Ácido gálico	375,94 $\pm$ 13,38	325,88 $\pm$ 93,29	15,36	499,54 $\pm$ 32,34	285,67 $\pm$ 33,01	74,87
Ácido protocatecuico	62,47 $\pm$ 14,52	19,31 $\pm$ 0,15	223,51	70,89 $\pm$ 5,04	168,74 $\pm$ 8,98	-57,99
Ácido cafeico	589,52 $\pm$ 21,79	359,80 $\pm$ 28,36	63,85	631,73 $\pm$ 26,58	773,33 $\pm$ 28,39	-18,31
Ácido vanílico	nd	nd	-	nd	162,78 $\pm$ 2,55	-
Ácido cumárico	161,99 $\pm$ 12,15	485,00 $\pm$ 3,40	-66,60	477,79 $\pm$ 35,39	376,00 $\pm$ 5,69	27,07
Ácido ferúlico	nd	135,13 $\pm$ 7,78	-	nd	nd	-
Catequina	565,74 $\pm$ 10,08	827,58 $\pm$ 15,42	-31,64	637,34 $\pm$ 3,73	707,11 $\pm$ 25,17	-9,87
Rutina	125,58 $\pm$ 0,62	557,01 $\pm$ 10,86	-77,45	nd	644,96 $\pm$ 11,18	-
Miricetina	85,88 $\pm$ 1,65	79,74 $\pm$ 1,58	7,70	227,95 $\pm$ 21,68	76,22 $\pm$ 3,02	199,07
Kaempferol	130,20 $\pm$ 0,76	nd	-	663,21 $\pm$ 18,90	nd	-

## CONCLUSÕES:

A partir dos resultados obtidos experimentalmente, foi possível demonstrar que a digestão das amostras resultou em aumento da liberação de compostos fenólicos e consequentemente das propriedades antioxidantes da polpa de seriguela, independentemente do tratamento enzimático prévio. A análise por HPLC permitiu a identificação de dez compostos fenólicos, os quais foram detectados em maiores quantidades na amostra tratada enzimaticamente quando comparados ao ensaio controle. Dessa forma, o tratamento enzimático prévio apresenta-se como um processo de suma importância para aumentar a liberação e a bioacessibilidade de compostos fenólicos, para que estes sejam mais bem aproveitados pelo organismo.

## AGRADECIMENTOS:

Agradeço primeiramente a Deus e ao Professor Doutor Ruann Janser Soares de Castro e à Mariana de Oliveira Silva pela oportunidade de concluir o meu segundo ano de iniciação científica na área de Bioquímica de Alimentos. Agradeço também ao CNPq/PIBIC e à Pró-Reitoria de Pesquisa (PRP) da Unicamp pela bolsa de iniciação científica, minha família, amigos e todos os integrantes do Laboratório de Bioquímica de Alimentos por todos os ensinamentos adquiridos nesse tempo, por todo o apoio e incentivo.

## BIBLIOGRAFIA

ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200–214, 2021.

BRODKORB, A. et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, p. 991-1014, 2019.

CORONA-LEO, L. S.; MEZA-MÁRQUEZ, O. G.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, D. M. Effect of in vitro digestion of phenolic compounds and antioxidant capacity of different apple (*Malus domestica*) varieties harvested in Mexico. **Food Bioscience**, v. 43, p.101311, 2021.

DANTAS, Aline Macedo et al. Gastrointestinal digestion assays for evaluating the bioaccessibility of phenolic compounds in fruits and their derivatives: an overview. **Food Research International**, v. 170, p. 112920, 2023.

DUTRA, R. L. T. et al. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 100, p. 650–657, 2017.

INADA, K.O.P. et al. Bioaccessibility of phenolic compounds of jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) peel and seed after simulated gastrointestinal digestion and gut microbiota fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 67, p. 103851, 2020.

OMENA, C. M. B. et al. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. Antioxidant, antiacetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 334–344, 2012.

RASERA, G.B et al. Germination and its role in phenolic compound bioaccessibility for black mustard grains: A study using INFOGEST protocol. **Food Chemistry**, v. 413, p. 135648, 2023.

ŚĘCZYK, L.; SUGIER, D.; ŚWIECA, M.; GAWLIK-DZIKI, U. The effect of in vitro digestion, food matrix, and hydrothermal treatment on the potential bioaccessibility of selected phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 344, p.128581, 2021.

SILVA, R. V. et al. In vitro photoprotective activity of the *Spondias purpurea* L. peel crude extract and its incorporation in a pharmaceutical formulation. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 509–514, 2016.