

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

AMANDA DOS SANTOS LIMA

**RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DA GROSELHA NEGRA (*Ribes nigrum* L.)
COMO UM NOVO INGREDIENTE FUNCIONAL: PERCEPÇÕES SOBRE A
BIOACESSIBILIDADE E BIOATIVIDADE NA CARCINOGENESE COLORRETAL**

ALFENAS/MG

2023

AMANDA DOS SANTOS LIMA

**RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DA GROSELHA NEGRA (*Ribes nigrum* L.)
COMO UM NOVO INGREDIENTE FUNCIONAL: PERCEPÇÕES SOBRE A
BIOACESSIBILIDADE E BIOATIVIDADE NA CARCINOGENESE COLORRETAL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Luciana Azevedo
Coorientador(a): Dr^a. Nora Pap

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Lima, Amanda dos Santos.

Resíduo do processamento da groselha negra (*Ribes nigrum* L.) como um novo ingrediente funcional: : percepções sobre a bioacessibilidade e bioatividade na carcinogênese colorretal / Amanda dos Santos Lima. - Alfenas, MG, 2023.

84 f. : il. -

Orientador(a): Luciana Azevedo.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Torta de groselha negra. 2. Câncer. 3. Estresse oxidativo. 4. Inflamação. 5. Compostos fenólicos. I. Azevedo, Luciana , orient. II. Título.

AMANDA DOS SANTOS LIMA

RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DA GROSELHA NEGRA (Ribes nigrum L.) COMO UM NOVO INGREDIENTE FUNCIONAL: PERCEPÇÕES SOBRE A BIOACESSIBILIDADE E BIOATIVIDADE NA CARCINOGENESE COLORRETAL

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas

Área de concentração: Fisiologia

Aprovada em: 23 de janeiro de 2023

Profa. Dra. Luciana Azevedo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Daniel Granato
Instituição: Universidade de Limerick

Prof. Dr. Paulo Cesar Stringheta
Instituição: Universidade Federal de Viçosa
UFV



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 23/01/2023, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **DANIEL GRANATO, Usuário Externo**, em 23/01/2023, às 11:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **PAULO CESAR STRINGHETA, Usuário Externo**, em 23/01/2023, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0901974** e o código CRC **579FBBF6**.

AGRADECIMENTOS

Ao final desta etapa tão importante em minha vida, agradeço a Deus por guiar meu caminho e me dar a sabedoria e a força necessárias para não desistir dos meus objetivos.

Aos meus pais, Fátima e João, por todo apoio e incentivo. À minha irmã, Júlia, pela amizade e companheirismo. Ao meu parceiro, Pedro, por estar ao meu lado em todas as fases dessa caminhada.

À Universidade Federal de Alfenas, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – PPGMCF e ao Laboratório LANTIN por oferecer a oportunidade e a infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Luciana Azevedo, confiança depositada em mim e em meu trabalho, pela orientação, aprendizado, paciência e pelos conselhos que contribuíram tanto para minha formação profissional e pessoal.

Aos professores Daniel Granato (Universidade de Limerick/Irlanda) e Nora Pap, pelo envio da amostra e por todo direcionamento e confiança depositada em mim para a realização dos experimentos.

Ao professor Alexandre Giusti Paiva, por ceder o espaço de seu laboratório para realização do estudo animal, por compartilhar comigo seus conhecimentos e por toda paciência e confiança depositada em mim.

Aos professores Graziela Domingues de Almeida Lima, Lucas César Pinheiro, Leonardo Augusto de Almeida, Frederico Augusto Ribeiro de Barros, Hércia Stampini Duarte Martino, Vinicius Gonçalves Maltarollo e Rômulo Dias Novaes que contribuíram com seus conhecimentos, servindo de suporte para a execução deste trabalho.

Ao LANTIN pelo espaço, equipamentos e materiais cedidos para a execução desse trabalho, e também agradeço aos colegas do laboratório que participaram ativamente de todos os meus experimentos, por toda ajuda, pelas risadas e pelo companheirismo diário.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Código de Financiamento 11817), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq) (Processos 422096-2021-0, 306799-2021-9) pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Uma vez que os fatores dietéticos são considerados responsáveis pelo alto risco de câncer de cólon, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial efeito da torta de groselha negra em cultura de células e em modelos animais (ratos *Wistar*) induzidos ao câncer colorretal. Para isso, a torta de groselha negra passou por um processo de extração e digestão *in vitro*, análise química e seus respectivos extratos foram testados em modelo de cultura celular, para avaliação de parâmetros como citotoxicidade e atividade antioxidante. Da mesma forma, a torta de groselha negra bruta foi ofertada para os ratos, incorporada à ração, e foram avaliados parâmetros em relação à processo inflamatório, estresse oxidativo, focos de criptas aberrantes no cólon, morfologia do cólon e modulação da microbiota intestinal. Os resultados obtidos indicaram que a análise química da torta de groselha negra apresentou maior teor de antocianinas após digestão gastrointestinal *in vitro* e, conseqüentemente, maior potencial antioxidante. Quando testados em cultura de células, os extratos de torta de groselha negra protegeram contra a produção de EROs e peroxidação lipídica *in vitro* e não apresentou citotoxicidade nas linhagens celulares testadas. Em ratos induzidos por câncer de cólon (CCR), o consumo da maior dosagem de torta de groselha negra elevou os parâmetros pró-inflamatórios, bem como a expressão de citocinas antiapoptóticas, além de acentuar o início e a progressão do câncer de cólon, demonstrado através da análise de focos de criptas aberrantes e análises histomorfológicas. Além disso, a defesa antioxidante celular não pôde proteger de forma capaz contra as grandes quantidades de EROs produzidas. Finalmente, a análise fecal mostrou que a torta de groselha negra altera a composição e a função do microbioma intestinal. Juntas, essas evidências sugerem que as antocianinas presentes na torta de groselha negra em altas dosagens podem atuar como composto pró-oxidante, acentuando o ambiente inflamatório e a progressão do CCR.

Palavras-chave: Torta de groselha negra; câncer; estresse oxidativo; inflamação; compostos fenólicos.

ABSTRACT

Since dietary factors are considered responsible for the high risk of colon cancer, the present study aimed to evaluate the potential effect of blackcurrant press cake in cell culture and in animal models (*Wistar rats*) induced for colorectal cancer. For this, the blackcurrant press cake underwent an *in vitro* extraction and digestion process, chemical analysis and its respective extracts were tested in a cell culture model, to evaluate parameters such as cytotoxicity and antioxidant activity. Likewise, crude blackcurrant press cake was offered to the rats, incorporated into the feed, and parameters were evaluated in relation to the inflammatory process, oxidative stress, aberrant crypt foci in the colon, colon morphology and modulation of the intestinal microbiota. The results obtained indicated that the chemical analysis of the blackcurrant press cake showed a higher anthocyanin content after *in vitro* gastrointestinal digestion and, consequently, a higher antioxidant potential. When tested in cell culture, blackcurrant press cake extracts protected against ROS production and lipid peroxidation *in vitro* and showed no cytotoxicity in the tested cell lines. In colon cancer-induced (CRC) rats, consumption of the highest dosage of blackcurrant press cake increased pro-inflammatory parameters, as well as the expression of anti-apoptotic cytokines, in addition to accentuating the onset and progression of colon cancer, demonstrated through the analysis of aberrant crypt foci and histomorphological analyses. Furthermore, the cellular antioxidant defense could not adequately protect against the large amounts of ROS produced. Finally, fecal analysis showed that blackcurrant press cake alters the composition and function of the gut microbiome. Together, these evidences suggest that the anthocyanins present in blackcurrant press cake in highest dosages can act as a pro-oxidant compound, accentuating the inflammatory environment and the progression of CRC.

Keywords: Blackcurrant press cake; cancer; oxidative stress; inflammation; phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bagas e plantas de groselheira-preta (<i>Ribes nigrum</i>).....	18
Figura 2 - Estrutura química das antocianinas	22
Figura 3 - Estrutura das principais antocianinas presentes na groselha negra	23
Figura 4 - Torta de groselha negra utilizada nos experimentos	30
Figura 5 - Processo de produção das dietas experimentais	37
Figura 6 - Delineamento experimental in vivo	39
Figura 7 - Citotoxicidade dos extratos de TGN em cultura de células.....	48
Figura 8 - Efeito dos extratos de TGN frente as EROs.....	50
Figura 9 - Efeito do processo de digestão simulada in vitro sobre a peroxidação lipídica ...	52
Figura 10 - Efeito do processo de digestão simulada in vitro sobre a atividade antioxidante celular	54
Figura 11 - Efeito do processo de digestão simulada in vitro sobre os níveis de NADPH	55
Figura 12 - Efeito dos extratos de TGN nos FCA e FDM no cólon	60
Figura 13 - Imagens microscópicas do cólon dos animais tratados com DMH e TGN	62
Figura 14 - Distribuição de mucinas nas criptas intestinais dos animais	62
Figura 15 - Características das microestruturas do cólon dos animais	63
Figura 16 - Efeito do consumo de TGN frente à inflamação e apoptose no fígado e ceco....	65
Figura 17 - Efeitos do consumo de TGN frente ao estresse oxidativo no ceco	69
Figura 18 - Efeitos do consumo de TGN na modulação da microbiota intestinal	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulação das dietas experimentais	37
Tabela 2 - Grupos experimentais avaliados no modelo experimental in vivo.....	39
Tabela 3 - Sequências de primers usados para RT-PCR em ceco dos ratos	43
Tabela 4 - Sequências de primers usados para análise de microbiota fecal dos ratos	44
Tabela 5 - Composição fenólica e atividade antioxidante dos extratos de TGN.....	45
Tabela 6 - Efeito das dietas no ganho de massa e na ingestão alimentar.....	57
Tabela 7 - Parâmetros metabólicos dos animais	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOM	Azoximetano
BAX	Regulador apoptótico
BCL-2	Proteína intra-citoplasmática que inibe a apoptose
CCR	Câncer colorretal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cDNA	DNA complementar
COBEA	Código Brasileiro de Experimentação Animal
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	Dicloro-dihidro-fluoresceína
DMEM	Eagle Modificado por Dulbecco
DMH	1,2-dimethylhydrazine
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DTNB	Ácido 5,5' ditio-bis 2 nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FCA	Foco de Criptas Aberrantes
FDM	Foco Depletado de Mucina
FRAP	Poder antioxidante redutor férrico
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidase
GR	Glutathiona reductase
GPX	Glutathiona Peroxidase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IL-10	Interleucina 10
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
mg	Miligrama
MDA	Malondialdeído

MTT	3-4,5 dimetiltiazol-2, 5-brometo de difenil tetrazólio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaOH	Hidróxido de sódio
NFkB	Fator nuclear kappa B
p.c.	Peso corpóreo
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RPM	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido desmutase
SFB	Soro Fetal Bovino
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Tricloro acético
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
RNA	Ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	GROSELHA NEGRA.....	18
2.2	TORTA DA PRENSAGEM DE BAGAS.....	19
2.3	COMPOSTOS FENÓLICOS	20
2.4	ANTOCIANINAS	22
2.5	DIGESTÃO GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>	24
2.6	CÂNCER COLORRETAL	25
3	JUSTIFICATIVA	28
4	OBJETIVOS	29
4.1	OBJETIVO GERAL.....	29
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5	MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1	OBTENÇÃO E EXTRAÇÃO DA TORTA DE GROSELHA NEGRA	30
5.2	PROCESSO DE DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	30
5.3	ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	31
5.3.1	Conteúdo fenólico total	31
5.3.2	Conteúdo de antocianinas, taninos condensados e ácidos fenólicos	31
5.3.3	Atividade antioxidante (DPPH, FRAP e FCRC)	32
5.4	SISTEMA TESTE <i>IN VITRO</i>	33
5.4.1	Linhagens celulares e condição de cultivo	33
5.4.2	Teste de viabilidade celular	33
5.4.3	Análise de espécies reativas de oxigênio (EROs)	34
5.4.4	Marcadores do estresse oxidativo	34
5.4.4.1	Peroxidação lipídica	35
5.4.4.2	Índice da capacidade total antioxidante das células	35
5.4.4.3	Superóxido dependente de NADPH	36
5.5	SISTEMA TESTE <i>IN VIVO</i>	36
5.5.1	Animais	36
5.5.2	Formulação e caracterização das rações experimentais	36
5.5.3	Agente indutor de lesão colorretal	38
5.5.4	Delineamento experimental	38
5.5.5	Lesões pré-neoplásicas do cólon: FCA e FDM	40

5.5.6	Análise histomorfológica do ceco	41
5.5.7	Análise de expressão gênica.....	42
5.5.8	Análise de marcadores do estresse oxidativo.....	43
5.5.9	Análises quantitativas do conteúdo bacteriano em amostras fecais.....	43
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	45
6.2	SISTEMA TESTE <i>IN VITRO</i>	47
6.2.1	Avaliação de citotoxicidade das amostras <i>in vitro</i>	47
6.2.2	Atividade de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs).....	49
6.2.3	Avaliação de marcadores do estresse oxidativo e atividade antioxidante celular	51
6.3	SISTEMA TESTE <i>IN VIVO</i>	55
6.3.1	Caracterização das rações experimentais	55
6.3.2	Parâmetros nutricionais e metabólicos	56
6.3.3	Ensaio de focos de cripta aberrante (FCA) e focos depletados de mucina (FDM).....	58
6.3.4	Histomorfometria e imunohistoquímica do cólon	61
6.3.5	Expressão diferencial de citocinas e proteínas no ceco	64
6.3.6	Efeitos da TGN nos marcadores do estresse oxidativo.....	67
6.3.7	Efeitos da TGN no microbioma fecal.....	69
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
	ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

A groselha negra (*Ribes nigrum* L. fam. Grossulariaceae), uma baga nativa do Norte e centro da Europa e da Ásia, é comumente usada para produzir suco, concentrado de suco e extrato, que são ingredientes alimentares amplamente utilizados. Também tem sido usada como nutracêuticos para regular ou mesmo diminuir o risco de várias doenças relacionadas ao metabolismo, aos sistemas cardiovascular, imunológico e nervoso; e vários tipos de cânceres (XUE *et al.*, 2022). Esses efeitos na saúde estão intimamente relacionados com a variabilidade de compostos químicos presentes nas bagas, principalmente como compostos fenólicos, que atuam através de propriedades antioxidantes (OLAS, 2018). Sendo parte dos compostos fenólicos, as antocianinas, que são sintetizadas pela via dos flavonoides, são consideradas os principais contribuintes para essa propriedade (GONÇALVES *et al.*, 2021).

A groselha negra contém grandes quantidades de antocianinas (250 mg/100 g de frutas frescas), como delphinidina-3-O-glucosídeo, delphinidina-3-O-rutinosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo (BISHAYEE *et al.*, 2011) e foi relatado como uma fonte valiosa de compostos benéficos para a saúde (XU *et al.*, 2018). Considerando que as antocianinas são compostos fenólicos capazes de promover benefícios relevantes para a saúde em relação à diversas doenças (BARS-CORTINA *et al.*, 2022), as groselhas negras têm recebido atenção considerável devido aos seus principais benefícios, incluindo efeito antidiabético e inibidor de doenças neurodegenerativas (SALEHI *et al.*, 2020), efeitos antimicrobianos e antiproliferativos (XUE *et al.*, 2022), atividades antioxidantes, anti-inflamatórias (OCKERMANN *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2018) e antitumorais de cólon *in vitro* (OLEJNIK *et al.*, 2018). Uma vez que a groselha negra apresenta a maior atividade antioxidante *in vitro* quando comparada com outras bagas (BORGES *et al.*, 2010), e seu fluxo industrial (ou seja, torta de prensagem de groselha [TPG]) mostrou atividade antioxidante usando ensaios químicos, mas nenhuma eficácia em diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio em células de monócitos humanos (THP-1) (PAP *et al.*, 2021). As tecnologias alimentares são usadas para produzir uma grande variedade de alimentos à base de polpa de groselha, mas o uso de torta de prensa é incipiente. A prensagem de bagas deixa um subproduto,

conhecido como bagaço, que normalmente é descartado em solos ou aterros sanitários. No entanto, o resíduo de prensagem é uma fonte valiosa de carboidratos que podem ser utilizados como fonte de fibra alimentar, componentes estruturantes e compostos bioativos, como os polifenóis (ALBA *et al.*, 2018).

O câncer é a principal causa de morte em todo o mundo, sendo responsável por quase 10 milhões de mortes em 2020 ou quase uma em cada seis mortes (BILLER; SCHRAG, 2021). Além disso, de acordo com os dados mais recentes divulgados pelo Global Cancer Observatory (<https://gco.iarc.fr/>), o adenocarcinoma de cólon e reto, também denominado câncer colorretal, está entre os três tipos de câncer com maior incidência mundial (10,2%). À semelhança de todos os tipos de câncer, o CCR caracteriza-se por uma patologia agressiva com caráter invasivo e disseminativo (BARS-CORTINA *et al.*, 2022), com a presença de sendo as lesões precursoras ou lesões pré-neoplásicas, conhecidas como focos de criptas aberrantes (ACF) (BIRD, 1995). Em particular, foi relatado que os radicais livres, incluindo espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), desempenham um papel crucial na patogênese do câncer, assim como o processo inflamatório e a disbiose intestinal (EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016; GUBINA-VAKULYCK *et al.*, 2018).

Intervenções experimentais e baseadas em humanos mostraram que frutas e vegetais ricos em antocianinas estão associados a uma diminuição do risco de CCR (DE SOUSA MORAES *et al.*, 2019). De fato, as antocianinas têm sido associadas à inibição da proliferação celular no câncer da mama (CHEN *et al.*, 2018a), e a redução do número de lesões pré-neoplásicas no CCR (BARS-CORTINA *et al.*, 2022), além de prevenir a iniciação e progressão do câncer, principalmente pela destruição seletiva de células tumorais por meio de três vias de sinalização: AMPK, PI3K/AKT/mTOR e vias JAK-STAT (OLEJNIK *et al.*, 2018). Embora a atividade antitumoral da groselha negra seja conhecida *in vitro* (XUE *et al.*, 2022), os efeitos e mecanismos da groselha negra contra o CCR *in vivo* não estão bem elucidados.

Ainda que os produtos derivados da groselha negra sejam fontes de compostos antioxidantes, sabe-se da literatura que a alta atividade *in vitro* nem sempre se traduz em atividade *in vivo* comparável, principalmente devido a processos biológicos que ocorrem no organismo (GRANATO; MOCAN; CÂMARA, 2020). Os estudos *in vitro* costumam produzir resultados diferentes dos estudos *in vivo*, principalmente porque um modelo *in vitro* estático não considera a dinâmica do trânsito durante a digestão ou as condições microbianas e digestivas em vários segmentos do trato

gastrointestinal (OLEJNIK *et al.*, 2018). Além disso, justamente por causa desses processos biológicos, esses compostos são alterados por processos enzimáticos e fermentativos, através de mecanismos de absorção, transporte e biodisponibilidade, influenciando sua bioatividade e no impacto em seu valor nutricional e propriedades promotoras da saúde (DO CARMO *et al.*, 2018b; GONÇALVES *et al.*, 2021). Considerando que o cólon é um local importante para o metabolismo e absorção de polifenóis, principalmente antocianinas e seus produtos de degradação (OLEJNIK *et al.*, 2018), deve-se levar em conta que seus efeitos fisiológicos irão depender de sua biodisponibilidade e das concentrações alcançadas nos tecidos-alvo.

Na prática, uma das etapas para caracterizar novos ingredientes para o desenvolvimento de alimentos (como a torta de groselha negra rica em antocianina), uma investigação abrangente de sua bioatividade *in vitro*, triagem toxicológica inicial em diferentes modelos celulares e os efeitos na microbiota intestinal são tarefas cruciais a serem realizadas. Segundo a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA EC 1924/2006), novos ingredientes devem atender a três critérios: (1) a substância bioativa é suficientemente caracterizada, (2) a alegação proposta deve incluir um efeito fisiológico benéfico e (3) uma relação de causa e efeito entre a substância bioativa e o efeito fisiológico benéfico devem ser estabelecidos (LENSSSEN; BAST; DE BOER, 2018). Quanto à torta de groselha negra, dados *in vivo* são escassos e devem ser disponibilizados para que os resíduos alimentares gerados pelo processamento de frutas possam ser utilizados para a fabricação de alimentos de alto valor agregado. Nesse sentido, investigamos o potencial funcional dos extratos da torta de groselha negra em modelos celulares, após processo de digestão gastrointestinal *in vitro*, bem como a ingestão da torta de groselha negra bruta em modelo animal *in vivo* induzido ao câncer colorretal. Com isso, examinamos as alterações associadas à formação de focos de criptas aberrantes e alterações morfológicas, composição da microbiota intestinal, expressão de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo envolvido na regulação da carcinogênese nesses animais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GROSELHA NEGRA

As groselhas são frutos de pequeno diâmetro, produzidos em plantas arbustivas de porte relativamente baixo (Figura 1). São pertencentes ao género *Ribes* e genericamente oriundas de zonas temperadas como Europa, Ásia Central ou América do Norte, por exemplo. Embora a groselha-vermelha seja a mais conhecida, existem diferentes tipos de variadas cores e com sabores e aromas diferentes, como a groselheira-preta (*Ribes nigrum*), a groselheira-branca (variedade da vermelha) e a uva-espim, ou groselheira-espim (*Ribes uva-crispa*). Uma ampla gama de compostos nutricionais, como ácidos orgânicos, ácidos graxos insaturados, vitaminas, polissacarídeos, flavonoides e antocianinas, tornam a groselha uma das espécies mais notáveis no reino das bagas (DUAN *et al.*, 2020).

Figura 1 - Bagas e plantas de groselheira-preta (*Ribes nigrum*)



Fonte: Adaptado de Cortez e Gonzales de Mejia (2019)

Especialmente a groselha negra é de grande interesse entre os cientistas em comparação com outras variedades vegetais, devido ao seu conteúdo de compostos polifenólicos que exibem uma variedade de propriedades saudáveis. A groselheira-preta é originária da Europa central e oriental, e do Norte e Centro da Ásia, e atinge de 1,50m a 1,80m (CORTEZ; GONZALEZ DE MEJIA, 2019). O arbusto de groselha é

comumente cultivado em climas temperados em todo o mundo. Seus frutos são uma rica fonte de vitaminas, macro e microelementos, ácidos orgânicos, pectinas e óleos essenciais, além de uma gama de compostos polifenólicos com ação positiva no organismo (CYBORAN *et al.*, 2014; TABART *et al.*, 2012).

O extrato de groselha negra é obtido por extração física e/ou quimicamente assistida, para liberação completa dos fitoquímicos ligados dos resíduos, enquanto o pó de groselha é obtido por liofilização e moagem (ARCHAINA *et al.*, 2018). Tradicionalmente, a groselha negra é usada como corante alimentar natural devido ao seu alto nível de pigmentos coloridos (cerca de 700 mg de antocianinas/100 g de frutas frescas), e é uma fruta clássica que há muito é usada para fazer suco, geleia, licor e alguns medicamentos (XUE *et al.*, 2022).

A groselha negra também é rica em ácido ascórbico, e isso, juntamente com um alto teor de flavonoides, reforça a capacidade antioxidante da fruta e aumenta seu potencial para promover benefícios à saúde (XUE *et al.*, 2022). Recentemente, a groselha negra tem recebido considerável atenção devido aos seus benefícios proeminentes para a saúde humana, incluindo atividades antitumorais (OLEJNIK *et al.*, 2018), antimicrobianas e antiproliferativas (SALAMON *et al.*, 2021), antioxidantes (XU *et al.*, 2018) e anti-inflamatórias (DIACONEASA *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2018). As evidências existentes indicam que uma dieta rica em frutas e vegetais, em particular em compostos fenólicos e antocianinas, reduz a incidência de doenças, como o câncer colorretal (OLEJNIK *et al.*, 2018).

2.2 TORTA DA PRENSAGEM DE BAGAS

A demanda por produtos saudáveis tem levado pesquisadores e a indústria a desenvolverem alimentos sustentáveis ou nutracêuticos com altas propriedades nutricionais. Os nutracêuticos são alimentos medicinais que desempenham um papel na melhoria da saúde, manutenção do bem-estar e, assim, prevenção e tratamento de doenças (KUMAR *et al.*, 2017). A recuperação de compostos bioativos, como vitaminas, lipídios e compostos fenólicos, de subprodutos do processamento de alimentos e sua reutilização na cadeia alimentar contribui para o uso otimizado das matérias-primas produzidas. Isso corresponde ainda ao crescente interesse dos consumidores por nutrientes que proporcionem efeitos benéficos aos seres

humanos em termos de promoção da saúde e redução do risco de doenças (GARCIA-MENDOZA *et al.*, 2021).

Na indústria de suco de bagas, a torta de prensagem deixada após os processos de filtragem pode representar aproximadamente 30% em peso das frutas cruas em base seca. Essa torta é constituída, principalmente, por cascas, aparas, talos, sementes, farelos e resíduos remanescentes da extração do suco, óleo, amido e açúcar, sendo uma excelente fonte de compostos polifenólicos, que podem ser extraídos e utilizados para a produção de suplementos alimentares ou novos produtos alimentícios (GRIMM *et al.*, 2020).

A quantidade de torta de prensa no processo de produção de suco é significativa: SANDELL *et al.* (2009) relataram $24 \pm 4\%$ de massa de baga com 38% de matéria seca, e ainda é rico em antocianinas, flavonóis e ácidos hidroxicinâmicos. KHANAL *et al.* (2009) apontaram que 25-50% das procianidinas de mirtilos frescos permanecem no bagaço após a extração do suco, o que indica uma perda de compostos nutricionais valiosos quando o bagaço deixa a cadeia alimentar. Sendo assim, volume da torta de prensa é relevante porque mesmo com a melhor técnica disponível, a quantidade que permanece é importante e contém valiosos ingredientes potenciais.

Atualmente na literatura há poucos trabalhos que colocam a torta da prensagem de groselha negra no centro dessas análises químicas e investigam seus efeitos na saúde. Análises prévias da composição de bagaços de groselha negra demonstraram quantidades de proteínas e carboidratos, celulose, lignina, pectina e hemiceluloses com predominância de fibras insolúveis. Além disso, os bagaços de groselha eram compostos por açúcares como glicose e galactose, com outros açúcares presentes em menor concentração (ALBA *et al.*, 2018). A partir dessas análises, os primeiros resultados biológicos encontrados foram conduzidos em testes *in vitro* (GRANATO *et al.*, 2022; PAP *et al.*, 2021). Dessa forma, os estudos em modelos *in vivo* ainda são incipientes e, portanto, mais pesquisas são necessárias para investigar seu potencial biológico e funcional na saúde e na doença.

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Estimativas sugerem que existam mais de 8.000 tipos de polifenóis diferentes, representando uma abundante classe de metabólitos secundários e sendo

enquadrados em diferentes classes gerais com base em sua estrutura química (HARRIS; DENICOLA, 2020). Um polifenol é um composto que contém em sua estrutura um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ($-OH$) ligado a um anel benzênico (HALLIWELL, 2007) e o número de subunidades de fenol determina a classificação dos compostos em flavonoides, os ácidos fenólicos (essencialmente ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos) e os taninos, que são os três maiores grupos de fenólicos encontrados (OLSZOWY, 2019).

Esses compostos fenólicos estão presentes em diversos produtos vegetais e vêm sendo cada vez mais estudados em função da capacidade em proporcionar atividades biológicas promotoras da saúde, bem como capacidade antioxidante, regulação do crescimento, atividade hormonal, atividade antimicrobiana, regulação do pH, metabolismo, entre outros (EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016). Sendo assim, a ingestão de alimentos que incluam compostos fenólicos melhora a qualidade de vida e reestabelece o equilíbrio no mecanismo de proteção ao organismo (OLAS, 2018).

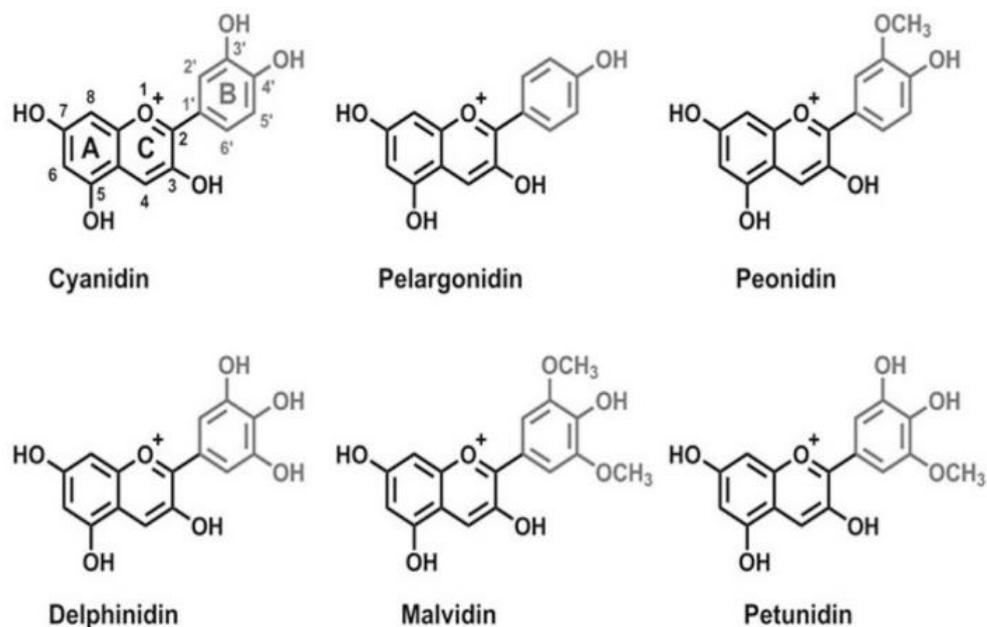
Numerosos estudos mostraram que os polifenóis vegetais são eficazes na eliminação de radicais livres, que são promotores do estresse oxidativo (HARRIS; DENICOLA, 2020). O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e sistemas antioxidantes endógenos. Resumidamente, as moléculas de oxigênio que não são devidamente reduzidas pelo sistema endógeno, recebem somente um elétron, que ocupará um dos orbitais externos, enquanto que o outro continuará não emparelhado, acarretando o surgimento de intermediários altamente reativos, denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) (HALLIWELL, 2007). Como forma de retardar essas reações danosas ao organismo e interromper reações de radicais em cadeia, são utilizadas substâncias com propriedades antioxidantes que, quando presente em certas quantidades, se opõe à oxidação ou inibe reações promovidas pelo oxigênio ou peróxido (WOLFE; LIU, 2007).

O potencial quimiopreventivo dos polifenóis tem chamado atenção dos estudiosos, podendo ser explicado como a capacidade desses polifenóis agirem em diversas vias ou sistemas de sinalização intracelular envolvidos na iniciação ou promoção do câncer, podendo, assim, interromper ou reverter o desenvolvimento tumoral. As atenções se voltam para a capacidade desses compostos em desencadear apoptose de células cancerosas por meio da modulação de componentes essenciais nas vias de sinalização celular (HAZAFÁ *et al.*, 2020).

2.4 ANTOCIANINAS

As antocianinas são um subgrupo de flavonóides, caracterizado por ser uma classe prevalente e numerosa de metabólitos secundários de plantas, que compartilham o esqueleto C₆-C₃-C₆ flavan ou 2-fenil-benzodi-hidopirano. As antocianinas podem ser ainda divididas com base em suas substituições no esqueleto, especialmente no anel B, ou na glicosilação no anel A e C. Entre os derivados de antocianinas estruturalmente diferentes, apenas seis (cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina – Figura 2) são predominantes na natureza e representam aproximadamente 90% de todas as antocianinas conhecidas até o momento (OCKERMANN *et al.*, 2021).

Figura 2 - Estrutura química das antocianinas

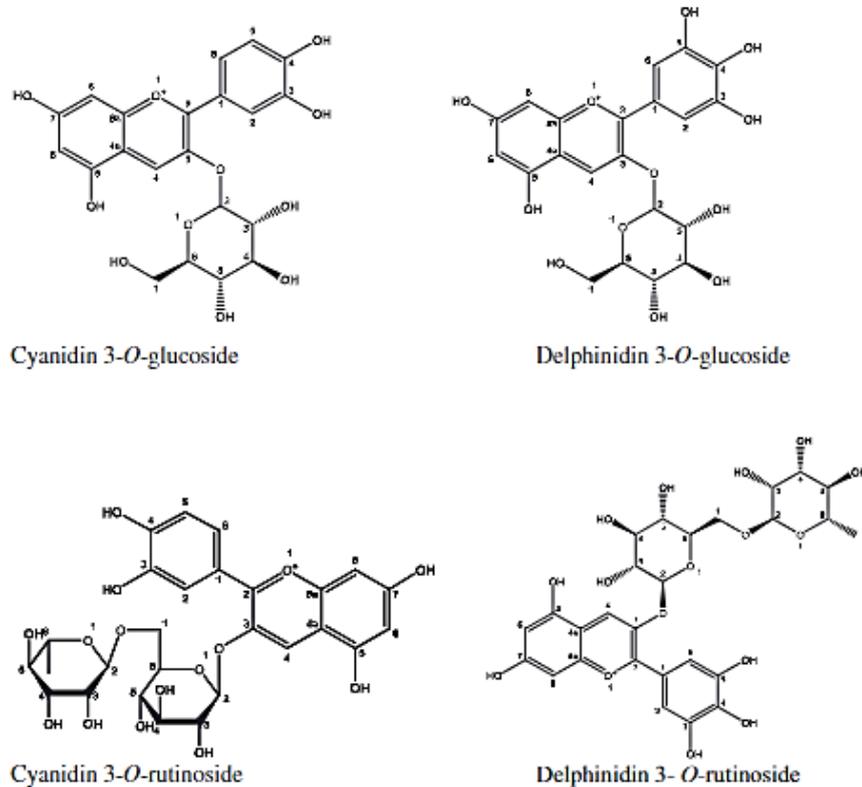


Fonte: Adaptado de Salehi *et al.* (2020).

Na groselha negra, as antocianinas representam mais de 90% do total de polifenóis, incluindo cianidina 3-O-glicosídeo, delphinidina 3-O-glicosídeo, cianidina 3-O-rutinosídeo, delphinidina 3-O-rutinosídeo (Figura 3). Geralmente, a cianidina é a antocianina mais abundante e a cianidina-3-glicosídeo a antocianina mais comum encontrada na groselha negra (OLEJNIK *et al.*, 2018). Devido ao seu alto teor de antocianinas e sua grande área de cultivo, as groselhas negras são uma excelente

fonte de antocianinas como corantes naturais e ingredientes bioativos de alimentos e produtos de saúde (YANG *et al.*, 2019).

Figura 3 - Estrutura das principais antocianinas presentes na groselha negra



Fonte: Adaptado de Cortez e Gonzales de Mejia (2019)

As concentrações de antocianinas em frutas/legumes são influenciadas por fatores genéticos, ambientais e agrônômicos como luz, temperatura, umidade, fertilização, estágio de maturidade na colheita, processamento de alimentos e condições de armazenamento (CHANDRA SINGH *et al.*, 2020). As antocianinas estão presentes principalmente nas camadas epidérmicas e hipodérmicas da casca do fruto, mas também estão presentes em todo o fruto, nos tecidos circundantes das sementes, assim como localizadas na polpa de alguns frutos (BELWAL *et al.*, 2020).

Estudos demonstram que os alimentos ricos em antocianinas apresentam várias atividades biológicas que podem ter implicações positivas na saúde humana, incluindo atividades antimicrobianas (ZHAO *et al.*, 2021), anti-inflamatórias (YAZAWA *et al.*, 2011), antidiabéticas e antioxidantes (EKER *et al.*, 2020; GREMSKI *et al.*, 2019), neuroprotetores (KENT *et al.*, 2017) e anticâncer (FAKHRI *et al.*, 2020). Há também

seu uso comercial através das indústrias de nutracêuticos, medicamentos e de cosméticos que utilizam antocianinas como corantes naturais para funções biológicas (BELWAL *et al.*, 2020).

Para que exerçam suas funções no organismo, as antocianinas dietéticas precisam estar disponíveis na circulação e nos tecidos. A absorção de antocianinas se inicia na cavidade oral, através da ação enzimática da microbiota oral, temperatura oral elevada e, em menor grau, ligação das antocianinas às proteínas salivares. No estômago, a absorção gástrica é um passo primordial em relação ao grande e rápido aparecimento das antocianinas na circulação sistêmica. Além disso, o baixo pH estomacal (1,5-4) favorece a estabilidade das antocianinas, permitindo que elas persistam na forma glicosídica. O intestino delgado é o principal local de absorção de antocianinas. Lá, as antocianinas podem sofrer desglicosilação produzindo as antocianidinas (forma de aglicona), que podem então entrar nas células epiteliais por transporte passivo e exercer suas funções biológicas (BARS-CORTINA *et al.*, 2022).

2.5 DIGESTÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

O interesse por modelo de digestão *in vitro* tornou-se maior nos últimos anos, uma vez que são adequados para estudos mecanísticos e construção de hipóteses. O objetivo de seu uso é tentar mimetizar as condições fisiológicas *in vivo*, levando em consideração a presença de enzimas e suas diferentes concentrações, alterações de pH, tempo de digestão, entre outros fatores. Esse modelo engloba a simulação de uma digestão humana que inclui fases oral, gástrica e do intestino delgado e, ocasionalmente, fermentação do intestino grosso (MINEKUS *et al.*, 2014).

Apesar da grande quantidade de pesquisas sobre as propriedades benéficas à saúde das bagas, os estudos que investigam os efeitos da digestão gastrointestinal sobre o perfil químico e nutricional são escassos (OLEJNIK *et al.*, 2018). A determinação da bioacessibilidade e eficácia dos compostos presentes no alimento devem estar biodisponíveis para absorção (CHIANG; KADOUH; ZHOU, 2013). Quando falamos em digestão de polifenóis, devemos entender que esse grupo sofre modificações consideráveis durante o trato gastrointestinal e, portanto, é recomendado levar em consideração sua influência nas propriedades benéficas atribuídas à sua ingestão (BURGOS-EDWARDS *et al.*, 2020). Os compostos fenólicos podem ser sensíveis às condições de digestão e alguns podem ser modificados em

estruturas promotoras de saúde favoráveis ou desfavoráveis (CHIANG; KADOUH; ZHOU, 2013).

As antocianinas, particularmente, ao longo do processo de digestão, sofrem uma intensa variação de pH que, juntamente com a ação enzimática e bacteriana, pode causar a hidrólise e transformação em metabólitos, produtos conjugados ou compostos fenólicos mais simples (TENA; MARTÍN; ASUERO, 2020). A administração de antocianinas em ratos demonstrou que são inicialmente absorvidas no estômago (25%), rapidamente absorvidas no intestino delgado (12 a 15%) e parte delas atingem o intestino grosso, onde são metabolizados pela microbiota em catabólitos de baixo peso molecular, podendo ser excretados ou reabsorvidos (SALEHI *et al.*, 2020; TENA; MARTÍN; ASUERO, 2020).

Existem muitos fatores críticos que afetam o destino das antocianinas e seus metabólitos como: a facilidade de atravessar membranas, digestibilidade, pH, ação da microbiota intestinal, presença de ácidos biliares ou matriz alimentar. Em relação a esses aspectos, é necessário a variabilidade interindividual que, devido a fatores intrínsecos, podem induzir diferenças marcantes sobre as enzimas e atividade microbiana (GONÇALVES *et al.*, 2021). Os últimos estudos têm enfatizado, principalmente, o papel fundamental da microbiota na transformação de antocianinas, o que não é considerado em ensaios *in vitro*, mas também ainda é pouco estudado em estudos *in vivo* e *ex vivo* (TENA; MARTÍN; ASUERO, 2020). A ação e metabolização da microbiota intestinal nas moléculas das antocianinas produz quebra em moléculas menores, como ácido protocatecúico, ácido vanílico ou ácido ferúlico (KRGÁ *et al.*, 2018). Por um lado, os métodos *in vitro* (ensaios baseados em células) falham em considerar o papel da microbiota individual presente no corpo humano; enquanto, por outro lado, em ensaios *in vivo* (ensaios em humanos e estudos em animais), cada sujeito tem sua própria microbiota (CHIANG; KADOUH; ZHOU, 2013).

2.6 CÂNCER COLORRETAL

Caracterizado por um crescimento desordenado de células tumorais, o câncer é uma doença multifatorial que está relacionada com anormalidades do estado metabólico do indivíduo, principalmente quando se trata de processos inflamatórios (ARMSTRONG *et al.*, 2018). O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais

comumente diagnosticado em todo o mundo e um dos cânceres mais amplamente estudados e sua incidência tem aumentado dramaticamente, especialmente em países desenvolvidos (INCA, 2021). A etiologia da doença está baseada em fatores ambientais como estilo de vida e fatores intrínsecos como o microambiente inflamatório e o estresse oxidativo, que também ocasionam disbiose microbiana. Essas alterações, já comprovada cientificamente, se dão através de mecanismos relacionados com o aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-17) e também pela desregulação de genes decorrente de polimorfismos (ARMSTRONG *et al.*, 2018; DE ALMEIDA *et al.*, 2019; REA *et al.*, 2018; TIKKA *et al.*, 2020).

A carcinogênese colorretal inclui mudanças na mucosa do cólon tanto a nível histológico como molecular e o aparecimento de lesões pré-neoplásicas é o primeiro passo desse processo, conhecidas como focos de cripta aberrante (FCA) (BIRD RP, 1995). Histologicamente, os FCA são um grupo heterogêneo de lesões intraepiteliais que apresentam características variáveis, desde atipia quase normal ou leve até displasia grave (ESSAWY *et al.*, 2017), identificadas por uma morfologia característica de criptas aumentadas, revestimento epitelial espessado, lúmens irregulares e elevação da mucosa (RAMOS CAETANO *et al.*, 2020).

Uma vez feito o diagnóstico, usualmente por colonoscopia e, posteriormente, por análise histológica do cólon, o tratamento baseia-se em cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou ambos. Além da ação inespecífica dos quimioterápicos, tem-se ainda, uma série de efeitos adversos, como náusea, vômito, diarreia, mucosite da cavidade oral, dores de cabeça, mielossupressão, anemia, cardiotoxicidade, agranulocitose, alopecia, entre outros (REJHOVÁ *et al.*, 2018). Diante desse cenário, é cada vez maior o interesse por novos alimentos ricos em compostos bioativos capazes de reduzir os efeitos colaterais dos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos, além de modular o processo inflamatório, reduzir a disbiose bacteriana e prevenir a ocorrência de doenças como o câncer colorretal.

Estudos recentes sugerem uma redução no risco de desenvolvimento de vários tipos de cânceres quando associado a ingestão regular de frutas e vegetais (CHENG *et al.*, 2019; FARRÀS *et al.*, 2020; SCHWINGSHACKL *et al.*, 2017). Esse fato se deve ao grande número de compostos bioativos presentes nestes alimentos, que são moléculas orgânicas de baixa massa molecular (polissacarídeos, polifenóis, carotenoides, entre outros) responsáveis por atuar sobre um organismo vivo, tecido ou células, em relação à mudanças em seu comportamento, fisiologia ou metabolismo

(KUMAR *et al.*, 2021). Através dessas propriedades, os compostos bioativos podem atuar, direta e indiretamente na prevenção ou tratamento de doenças como diabetes, doenças cardiovasculares e também o câncer (MEREGALLI, 2017; OLEJNIK *et al.*, 2018).

Outro ponto importante a ser levado em consideração é que a microbiota intestinal pode ser modulada de forma preventiva ou terapêutica a partir da alimentação (POPE *et al.*, 2017). Dessa forma, o entendimento de como os compostos gerados através do processamento digestivo dos alimentos podem modular o microbioma intestinal, usando um modelo de tumor *in vitro* e *in vivo*, é essencial para a determinação do potencial funcional desses ingredientes.

3 JUSTIFICATIVA

Levando em consideração que o processo digestivo transforma metabolicamente os constituintes bioativos dos alimentos e que isso afeta diretamente suas propriedades funcionais, o presente estudo foi desenvolvido como forma de comparar amostras brutas e amostras que passaram pelo processo de digestão *in vitro*. Até o momento, a maioria das pesquisas tem se concentrado apenas em extratos brutos de torta de groselha negra, sem considerar sua biodisponibilidade, que depende em grande parte da estabilidade digestiva, absorção intestinal e transformações metabólicas dos constituintes.

Além disso, o reaproveitamento de resíduos, que normalmente são descartados em solos e aterros sanitários, contribuindo para a poluição, podem propiciar a ocorrência de maior economia circular do alimento, promover aproveitamento integral da baga e favorecer a consciência social e ambiental.

No que diz respeito ao câncer colorretal, pouco se sabe sobre os efeitos da digestão gastrointestinal de compostos fenólicos da torta de groselha negra na sua atividade biológica, incluindo seu potencial anticancerígeno. No entanto, os mecanismos dessa atividade antitumoral permanecem incipientes.

4 OBJETIVOS

O trabalho foi desenvolvido traçando objetivos gerais e específicos, como observado a seguir:

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetivou extrair compostos bioativos, mais especificamente antocianinas, da torta de prensagem comercial de groselha negra e avaliar as propriedades funcionais do extrato aquoso através de análises químicas e de seu potencial bioativo em modelos *in vitro* antes e depois do processo de digestão gastrointestinal *in vitro*, bem como sua ingestão bruta em modelos *in vivo* induzidos ao câncer colorretal.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Extrair os compostos bioativos da torta de prensagem comercial de groselha negra, a partir do método de maceração;
- b) Realizar o processo de digestão gastrointestinal *in vitro* da torta de groselha negra bruta;
- c) Realizar análises químicas e atividade antioxidante dos extratos obtidos;
- d) Avaliar o potencial funcional *in vitro* dos extratos;
- e) Avaliar o potencial funcional da torta de groselha negra em modelo *in vivo* usando ratos Wistar câncer-induzidos;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO E EXTRAÇÃO DA TORTA DE GROSELHA NEGRA

A torta industrial de groselha negra (teor de umidade de 49,6%) foi obtida em 2019 de uma empresa de processamento de bagas localizada no leste da Finlândia (Suomussalmi), secada e enviada ao Brasil para análises (Figura 4). As matérias-primas foram extraídas usando um método clássico de maceração, de acordo com PAP et al. (2021). Para a extração por maceração, foram misturados 20 g da matéria-prima e 200 mL de água destilada, sob agitação magnética constante por 60 min com monitoramento da temperatura a 40 °C. Em seguida, os extratos foram filtrados usando papel Whatman nº1. As extrações foram realizadas em duas réplicas independentes.

Figura 4 - Torta de groselha negra utilizada nos experimentos



Fonte: Do autor (2022).

5.2 PROCESSO DE DIGESTÃO *IN VITRO*

A digestão *in vitro* foi realizada de acordo com o protocolo COST INFOGEST (MINEKUS *et al.*, 2014), seguindo a porção recomendada de pequenas bagas, incluindo etapas sequenciais de digestão oral, gástrica e intestinal. Resumidamente, 5g da torta de groselha negra foram submetidos às fases oral (pH 7, solução de amilase), gástrica (pH 2, solução de pepsina) e intestinal (pH 7, solução de

pancreatina/sais biliares), incubadas em banho-maria a 110 oscilações/min; a 37 °C, por 5 min na fase oral e 2 h nas fases gástrica e intestinal. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 RPM por 10 min para separar a fração solúvel ou bioacessível da fração residual, sendo coletado o sobrenadante. Para análise em cultura celular, após a digestão gastrointestinal, foi utilizado 2% de ácido tricloroacético (TCA), com o intuito de inibir as diferentes atividades enzimáticas. Brancos sem amostra foram executados em paralelo e analisados para descartar interferências devido aos reagentes do processo de digestão. O pH foi ajustado para 2,5 a fim de obter maior estabilização dos compostos fenólicos.

5.3 ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS

5.3.1 Conteúdo fenólico total

O conteúdo de fenólicos totais foi quantificado de acordo com o método colorimétrico de Azul da Prússia, conforme descrito por PRICE; BUTLER (1977) e adaptado por MARGRAF *et al.* (2015). Para isso, foi pipetado em microplaca de 96 poços uma alíquota de 100 µL da solução de cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (0,5 mmol/L) e 100 µL das amostras de extratos de torta de groselha negra, nas devidas proporções (1:100, v/v), deixando reagir por 2 min. Posteriormente a absorbância foi medida no comprimento de onda de 725 nm em leitor de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas devidas proporções, com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. Para calcular o teor de compostos fenólicos totais foi construída uma curva analítica com ácido gálico na faixa de concentração de 0 - 35 mg/L, obtendo-se um $R^2=0,999$. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente a 100 g de torta de groselha preta (mg GAE/100 g).

5.3.2 Conteúdo de antocianinas, taninos condensados e ácidos fenólicos

A determinação por HPLC de antocianinas, taninos condensados e dos ácidos cafeoilquínicos dos extratos de torta de groselha negra foi realizada de acordo com o método descrito por (HELLSTRÖM; MATTILA; KARJALAINEN, 2013). O dispositivo

de HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Espoo, Finlândia) equipado com detecção de arranjo de diodos (DAD) e uma coluna Gemini C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm) foi usado e a separação foi realizada com uma eluição em gradiente de acetonitrila em 5% de ácido fórmico (aq). Todas as antocianinas foram quantificadas no comprimento de onda de detecção de 518 nm usando um padrão externo de cianidina 3- O -rutinosídeo, delphinidina 3- O -rutinosídeo, cianidina 3- O -glicosídeo, delphinidina 3- O-glucósido. Três réplicas foram analisadas a partir das amostras.

5.3.3 Atividade antioxidante (DPPH, FRAP e FCRC)

A atividade antioxidante frente ao radical DPPH foi determinada conforme a metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET (1995). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 40 µL de amostras de extratos de torta de groselha negra diluídas (1:50, v/v) e 260 µL de uma solução metanólica de 0,10 mmol/L de DPPH. Decorrido o tempo de reação, 30 min, em um ambiente escuro, com temperatura de aproximadamente 25 °C, a absorvância foi registrada no comprimento de onda de 517 nm, utilizando espectrofotômetro de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). A linha de base do equipamento foi registrada a partir de uma solução com todos os reagentes em suas devidas proporções, com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. A curva analítica foi preparada com solução padrão de ácido ascórbico, na faixa de concentração de 0 a 21 mg/L, obtendo-se um $R^2=0,992$.

O potencial antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro (FRAP) foi determinado conforme metodologia descrita por BENZIE; STRAIN (1996). O reagente FRAP foi preparado a partir da adição de 25 ml de tampão acetato 0,3 mol.L⁻¹, 2,5 ml de uma solução de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mmol.L⁻¹ e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mmol.L⁻¹. Para a reação, 120 µL da amostra devidamente diluída foram misturados com 1680 µL de reagente FRAP recém-preparado. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 30 min e depois lidas em espectrofotômetro UV-VIS a 595 nm. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram calculados a partir da curva de calibração e expressos em mg equivalentes de ácido ascórbico em 100 g de torta de groselha negra (mg AAE/100 g).

A capacidade redutora de Folin-Ciocalteu foi testada conforme MARGRAF *et al.* (2015) e As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram calculados a partir da curva de calibração e expressos em μg de equivalente de ácido gálico por mL (μg GAE /mL).

5.4 SISTEMA TESTE *IN VITRO*

5.4.1 Linhagens celulares e condição de cultivo

As linhagens celulares: Caco-2 (células epiteliais de adenocarcinoma colorretal), HepG2 (células de hepatocarcinoma humano) e EA.hy926 (híbrido de células somáticas endoteliais) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Foram mantidas estocadas em nitrogênio líquido ($-195\text{ }^{\circ}\text{C}$), em alíquotas de 2×10^6 células/mL em uma solução de congelamento composta por 90% de soro bovino fetal (*Nutricell*) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, *SigmaAldrich*).

As células Caco-2 e EA.hy926 foram mantidas em meio de cultura DMEM/High glucose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e as células HepG2 foram mantidas em meio de cultura DMEM/Ham-F12, suplementado com 10% de SFB (SFB, Gibco, São Paulo, Brasil). Todos os meios continham 100 UI de penicilina/100 μg de estreptomicina. As linhagens celulares foram cultivadas em incubadora umidificada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ contendo 5% de CO_2 e as culturas foram replicadas a cada 2 ou 3 dias e apenas células na fase exponencial do crescimento foram utilizadas neste estudo.

5.4.2 Teste de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células/poço (Caco-2 e EA.hy926) e 2×10^4 (HepG2), 100 μL /poço. Após 24 h, as células foram tratadas com 100 μL de concentrações seriadas (10 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de extrato digerido e não digerido de torta de groselha negra. Após 48 h de tratamento, 10 μL de solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados em cada poço. Após 4 h de incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan que se formaram foram dissolvidos em 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo que a quantidade de formazan produzida é

diretamente proporcional ao número de células vivas. A absorbância a 570 nm foi lida utilizando um leitor de microplacas (Synergy™ H1, Biotek).

A concentração que promove 50% de inibição do crescimento celular (IC_{50}), a concentração do agente que inibe o crescimento em 50% em comparação com células não tratadas (IG_{50}) e a concentração do agente que resulta em uma perda líquida de 50% de células em comparação com o número de células no início do tratamento (LC_{50}) foi determinada de acordo com DO CARMO *et al.* (2019). Os experimentos foram conduzidos em medidas quadruplicadas e a análise dose-resposta foi determinada por meio de regressão não-linear usando o software GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

5.4.3 Análise de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A análise de EROs intracelular foi avaliada nas mesmas linhagens celulares, utilizando o ensaio de diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH-DA). Células Caco-2, HepG2 e EA.hy926 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 6×10^4 por poço, 100 μ L/poço. Após 24 h, as células foram tratadas com 100 μ L de concentrações seriadas (5 - 50 μ g/mL) de extrato digerido e não digerido de torta de groselha negra com ou sem a presença de peróxido de hidrogênio (22,5 μ mol/L), por 1 h a 37 °C. Após o tratamento, os tratamentos foram removidos, os poços foram lavados com 100 μ L de PBS e posteriormente foi adicionado uma mistura de H_2O_2 (22,5 μ mol/L) diluído em solução de HANKS em cada poço. A intensidade de fluorescência (λ emissão = 538 nm e λ excitação = 485 nm) foi medida (ESCHER *et al.*, 2018) utilizando um leitor de microplacas (Synergy™ H1, Biotek). O experimento foi conduzido em triplicatas e os resultados foram analisados usando o software GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

5.4.4 Marcadores do estresse oxidativo

A linhagem celular EA.hy926 foi semeada em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^5 células/poço em 1000 μ L de meio de cultura e incubada por 24 h a 37 °C. A linhagem celular foi tratada com amostras em diferentes concentrações (5, 25 e 50 μ g/ml) por 1 h, com ou sem peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Após o

tratamento, o meio foi removido e as células são coletadas e ressuspensas em 250 μL de PBS. As amostras foram armazenadas em $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises. As atividades dos níveis de MDA, GSH, GSSG e GSH Total e NADPH foram medidos em triplicata previamente detalhados por PINHEIRO *et al.* (2016).

5.4.4.1 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada medindo as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Resumidamente, em microtubos, foram adicionados 50 μL de cada amostra celular, 50 μL de água destilada, 50 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS 8,1%), 175 μL de tampão de ácido acético e 175 μL de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Em seguida, os microtubos foram colocados em banho-maria por 1 h a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ocorrer a reação. Os microtubos então foram centrifugados a 10.000 RPM por 10 min. De cada microtubo foram coletados 150 μL da mistura e colocado em placa de 96 poços de fundo transparente em triplicata. Foi realizada leitura em leitor de microplacas (Synergy™ H1, Biotek) a 532 nm de absorvância e os níveis de oxidação lipídica foram expressos em termos de malondialdeído (MDA, nmol/mL).

5.4.4.2 Índice da capacidade total antioxidante das células

Os níveis de GSH foram medidos para avaliar o índice da capacidade total antioxidante das células após um estresse oxidativo. A concentração total de GSH foi determinada da seguinte maneira: 20 μL de cada homogeneizado celular foi adicionado em placa de 96 poços de fundo transparente, assim como os respectivos pontos da curva padrão. Em seguida, 175 μL tampão fosfato de potássio [1M] pH 7,4 e 10 μL de DTNB (Reagente de Ellman) foram adicionados. Foi realizada leitura em leitor de microplacas (Synergy™ H1, Biotek) a 412 nm. Para medir GSSG, 25 μL da solução glutatona redutase e NADPH foi adicionado nos poços, menos no correspondente ao branco da curva padrão, sendo mantido em descanso por 20 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente lido em 412 nm. A glutatona foi usada como padrão e os resultados foram expressos em relação micromol de GSH e GSSG/mg de proteína. Os valores de GSH total foram encontrados com base na soma dos valores de GSH e GSSG.

5.4.4.3 Superóxido dependente de NADPH

A quimioluminescência de lucigenina foi realizada para avaliar a produção de superóxido dependente de NADPH. Resumidamente, 50 µL de cada amostra foi adicionado nos poços correspondentes em uma placa de 96 poços de fundo branco. Em seguida, 175 µL de lucigenina (5 µmol/L) foi adicionada ao homogeneizado celular em cada poço. A leitura basal foi realizada em aparelho espectrofotômetro com método de quimioluminescência a 37 °C por 5 min, para a leitura basal. Após a primeira leitura, 25 µL de uma concentração de βNADPH (12 µmol/L) foi adicionado e as contagens de luminescência foram continuamente quantificadas nas mesmas condições por 20 min. Os resultados foram quantificados subtraindo o sinal de fundo do sinal dirigido por NADPH, seguido pela normalização da quantidade de proteína celular. Os resultados foram expressos como quimioluminescência de lucigenina/mg de proteína.

5.5 SISTEMA TESTE *IN VIVO*

5.5.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* (espécie *Rattus norvegicus*), com 4 semanas de vida e peso corpóreo (p.c.) inicial aproximado de 80 – 100 g, oriundos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Alfenas. A condução experimental foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas - CEUA (Protocolo 0011/2021, APENDICE A) e seguindo os princípios éticos para pesquisa animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Durante o período experimental, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno sob ciclo claro/escuro de 12 h a uma temperatura média de 23°C ± 2 ° C, com acesso à ração e água *ad libitum*. O peso dos animais foi monitorado semanalmente do início ao final do experimento e o consumo alimentar foi monitorado diariamente.

5.5.2 Formulação e caracterização das rações experimentais

As dietas experimentais foram preparadas conforme descrito por AZEVEDO *et al.* (2003). Quatro matrizes alimentícias para roedores foram preparadas, a partir da

moagem da ração comercial Nuvilab CR-1 e da torta de groselha negra (TGN), adicionado de celulose para igualar os teores de fibras de todas as rações, com base na quantidade de fibra presente na maior quantidade de torta de groselha negra adicionada, conforme quantidades descritas na Tabela 1. Cada um dos ingredientes foi pesado e passado pela peneira para melhor homogeneização e incorporação (Figura 5). As dietas foram refrigeradas a 2 – 8 °C até serem fornecidas aos animais.

Tabela 1 - Formulação das dietas experimentais

Dietas experimentais	Nuvilab (g/100g)	Celulose (g/100g)	TGN (g/100g)
Nuvilab + celulose	96,3 g	3,5 g	-
Nuvilab + TGN 5% + celulose	93,7 g	2,2 g	5 g
Nuvilab + TGN 10% + celulose	88,7 g	1,17 g	10 g
Nuvilab + TGN 15%	85 g	-	15 g

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Legenda: TGN (torta de groselha negra).

Figura 5 - Processo de produção das dietas experimentais



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: 1) Processo de moagem da torta de groselha negra.

2) Pesagem dos componentes das rações experimentais.

3) Processo de incorporação dos componentes alimentares.

4) Rações experimentais prontas para consumo.

A análise química e caracterização das rações foram realizadas em triplicata, conforme (AOAC, 2012). A umidade foi determinada em estufa (Nova Ética®, modelo 400/6ND, São Paulo, Brasil) a 105 °C. As cinzas foram quantificadas em forno mufla (Quimis, modelo Q320 M, Brasil) a 550 °C. O teor de proteína foi determinado através de micro-Kjeldahl. A proteína foi determinada como porcentagem de nitrogênio x 6,25. A fibra alimentar total (fibra solúvel e insolúvel) das amostras secas e isentas de gordura foi determinada pelo método gravimétrico não enzimático. α -amilase, proteases e enzimas de amiloglucosidase termorresistentes (kit de ensaio de fibra dietética total, Sigma®) foram usados para realizar a hidrólise enzimática. O teor de fibra alimentar total foi obtido pela soma das frações solúvel e insolúvel. O conteúdo lipídico foi determinado pelo método de Soxhlet. Os carboidratos foram calculados por diferença, usando a seguinte equação: $[100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ lipídios} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ fibra alimentar total} + \% \text{ cinzas})]$.

5.5.3 Agente indutor de lesão colorretal

Os animais foram induzidos com câncer de cólon administrando quatro injeções subcutânea de dicloridrato de 1,2-dimetilhidrazina (DMH, 40 mg/kg b.w., *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), uma vez por semana durante quatro semanas. O DMH foi dissolvido em ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA, 1mM) e os animais não induzidos receberam injeções semelhantes de solução de EDTA.

5.5.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi realizado com 6 grupos (n = 10 animais por grupo). Um resumo acerca dos grupos experimentais pode ser observado na Tabela 2. Os animais foram alocados aleatoriamente em G1 (controle negativo, Nuvilab comercial + EDTA), G2 (Nuvilab com 15% de torta de groselha negra + EDTA), G3 (controle positivo, Nuvilab comercial + DMH), G4 (Nuvilab com 5% de torta de groselha negra + DMH), G5 (Nuvilab com 10% de torta de groselha negra + DMH) e G6 (Nuvilab com 15% de torta de groselha negra + DMH).

O estudo foi conduzido por um período total de 6 semanas, conforme mostrado na Figura 6. A ração com e sem os tratamentos foi dada a todos eles por via oral à vontade em potes de alumínio concomitante com a aplicação do pró-carcinógeno

DMH, durante todo o experimento. As diferentes doses de torta de groselha negra utilizadas neste estudo foram estabelecidas com base em ensaios anteriormente realizados em nosso laboratório e não incluídos nesta proposta. A administração do DMH nos animais foi realizada sempre no quinto dia de cada semana, 1x por semana, durante 4 semanas, por via subcutânea (s.c.), de modo que ao final da quarta semana a dose final fosse de 160 mg/kg p.c. s.c., conforme delineamento previamente realizado por (FIDELIS *et al.*, 2021). Os animais do grupo controle negativo e TGN 15% receberam a mesma quantidade de EDTA 1mM s.c., a fim de se simular o estresse experimental.

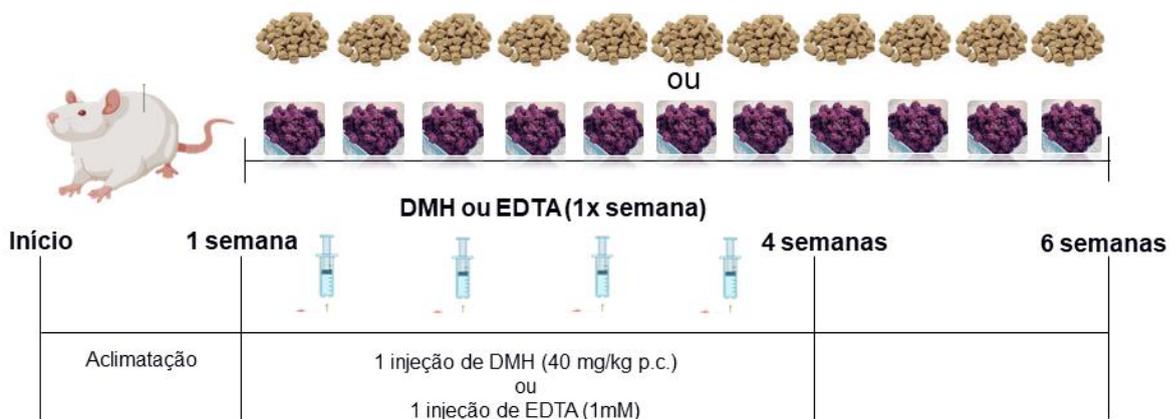
Tabela 2 - Grupos experimentais avaliados no modelo experimental *in vivo*

Grupos	Tratamentos
G1	Controle negativo (Ração comercial + celulose + EDTA 1 mM, s.c.)
G2	Controle TGN 15% (Ração comercial + TGN + EDTA 1 mM, s.c.)
G3	Controle positivo (Ração comercial + celulose + DMH 40 mg/Kg p.c., s.c.)
G4	TGN 5% (Ração comercial + TGN + celulose + DMH 40 mg/Kg p.c., s.c.)
G5	TGN 10% (Ração comercial + TGN + celulose + DMH 40 mg/Kg p.c., s.c.)
G6	TGN 15% (Ração comercial + TGN + DMH 40 mg/Kg p.c., s.c.)

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Legenda: EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); DMH (1,2 Dimetilhidrazina); p.c. (peso corpóreo); TGN (torta de groselha negra); s.c. (subcutâneo);

Figura 6 - Delineamento experimental *in vivo*



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: A-B: período de adaptação animal; B-C: período de 4 semanas com aplicação de 1 injeção de DMH por semana, durante 4 semanas, com consumo concomitante de TGN; C-D: período de 2 semanas de consumo da TGN; D: Eutanásia.

Ao final do estudo, foram coletadas assepticamente fezes dos animais para análise da composição da microbiota intestinal. Em seguida, os animais foram anestesiados com ketamina (0,08 mg/kg p.c.) e xilazina (0,04 mg/kg p.c.) e posteriormente eutanasiados. Foi realizada laparotomia seguida da excisão do cólon e fígado. Os cólons, por sua vez, foram limpos com solução salina 0,9% para remoção de resíduos fecais. Dos cólons, foram retiradas porções distais, mais especificamente na região do ceco, para análise histomorfológicas, expressão de citocinas e estresse oxidativo. Em seguida, foram abertos longitudinalmente na borda mesentérica e colocados em placas de poliestireno codificadas, esticados com ajuda de alfinetes. As placas com os cólons foram adicionadas em formalina tamponada com fosfato a 10% para fixação, por período máximo de 24 h. Após a fixação, os cólons foram transferidos e mantidos em álcool 70% até o momento da análise (DIAS *et al.*, 2010). O fígado coletado foi mantido a uma temperatura de -80 °C até o momento da análise.

5.5.5 Lesões pré-neoplásicas do cólon: FCA e FDM

Após a fixação, o intestino foi medido e dividido igualmente em três fragmentos: proximal, medial e distal. Em seguida, foi corado com azul de metileno a 0,2% por 1 min e colocado em lâmina de microscópio com o lado da mucosa voltado para cima. Campos sequenciais do segmento médio e distal do cólon foram analisados em microscópio de luz com aumento de 100x para determinar a frequência de focos de criptas aberrantes (FCA). Os FCAs são diferenciados das criptas normais por suas paredes mais espessas, mais escuras e elevadas, com lúmens alongados e em forma de fenda e distância significativamente aumentada da lâmina até a superfície basal das células (BIRD, 1995). O número de FCAs e criptas aberrantes (CA) por foco foram registrados e categorizados determinando a frequência observada de criptas aberrantes para cada foco.

Após a contagem de FCA, os segmentos de cólon foram armazenados em solução de etanol a 70% (v/v) para remover o azul de metileno para posterior análise de focos depletados de mucina (FDM). Com isso, os cólons foram colocados em uma solução de azul de toluidina 1% em ácido acético 3% por 5 min (PRADO-SILVA *et al.*, 2014). Após a coloração, as amostras foram examinadas ao microscópio (40x) para identificar os focos depletados de mucina. O FDM é caracterizado pela ausência ou

pouca produção de mucinas, distorção da abertura do lúmen em relação às criptas normais e elevação da lesão acima da superfície da mucosa (JUAN *et al.*, 2019).

5.5.6 Análise histomorfológica do ceco

Fragmentos do ceco foram fixados por imersão em formalina tamponada a 10% (pH 7,2) por período máximo de 24 h, desidratados em série de etanol (70%–99,9%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina (DO CARMO *et al.*, 2021). Cortes histológicos (5 μm de espessura) foram obtidos usando um micrótomo rotativo (Leica Multicut 2045, Reichert-Jung Products, Alemanha). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para morfologia geral e com histoquímica de azul Alcian para detecção de mucina (SEQUETTO *et al.*, 2014). Os cortes histológicos foram obtidos em semi-séries, coletando-se um a cada intervalo de 100 μm para evitar análises da mesma área do órgão (SANTOS *et al.*, 2018). As imagens digitais foram obtidas usando um fotomicroscópio de campo claro (Axioscope A1; Carl Zeiss, Alemanha). Dez campos microscópicos para cada animal foram amostrados aleatoriamente usando uma lente objetiva 40x para que 57,2 x 105 μm^2 da área do cólon fosse analisado para cada grupo (DO CARMO *et al.*, 2021).

Os seguintes parâmetros microestruturais foram analisados em cortes corados com hematoxilina e eosina (SEQUETTO *et al.*, 2014): (i) comprimento da cripta, (ii) largura da cripta, (iii) número de criptas por área histológica (criptas/ mm^2) e (iv) número de linfócitos intraepiteliais por área epitelial (células/ mm^2). Os números das criptas foram quantificados a partir de cortes transversais, enquanto as demais medidas foram obtidas em cortes longitudinais por meio de planimetria computacional, aplicada no software de análise de imagens Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA), como relatado anteriormente por NOVAES *et al.* (2016).

A distribuição de mucina nas criptas intestinais (%) foi quantificada a partir de cortes corados com azul de alcian. A quantificação foi baseada no método computacional de segmentação de cores conforme relatado anteriormente (GONÇALVES *et al.*, 2019). Resumidamente, as imagens foram convertidas para o canal de 8 bits e submetidas à segmentação de cores para preto e branco. Com as mucinas segmentadas em preto, a área histológica ocluída por essas moléculas foi calculada automaticamente usando a função limiar do programa image J (GONÇALVES *et al.*, 2019).

5.5.7 Análise de expressão gênica

Genes envolvidos em nós de sinalização chave de vias-alvo que dizem respeito à modulação muitos processos celulares, incluindo condições inflamatórias e apoptose (BOUREUX *et al.*, 2007), foram analisados pela técnica da *Reverse-transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR, reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa) tais como: inflamação (*TNF- α* e *IL-10*) e apoptose (*BAX* e *BCL-2*).

Um pedaço de ceco de ratos tratados ou não tratados com torta de groselha negra foi usado para extrair o RNA total usando o reagente trizol (*Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA*) e quantificado usando um *Invitrogen Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA)*. Em seguida, foi realizada a incubação do RNA total com DNase, por 15 min em termociclador a 37 °C, a fim de eliminar possível contaminação com DNA genômico. A transcrição reversa de 1 μ g de RNA total foi realizada usando *Illustra™ Ready-To-Go RT-PCR Beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido)*, conforme orientações do fabricante.

A RT-PCR foi conduzida em triplicata em um volume final de 10 μ L contendo: SYBR® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), cDNA como modelo de PCR e 20 μ M de primers. A reação de PCR foi realizada usando o *StepOne PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)* e os seguintes parâmetros de ciclagem: 60 °C por 10 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 seg, e 60 °C por 1 min, e um estágio de dissociação de 95 °C por 15 seg, 60 °C por 1 min, 95 °C por 15 seg e 60 °C por 15 seg. Primers foram usados para amplificar um fragmento específico de 100-120 pb correspondente a alvos de genes específicos, conforme descrito na Tabela 3. A normalização dos valores de expressão dos genes alvo foi feita utilizando a expressão do gene constitutivo GAPDH. O método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência foi empregado para calcular a expressão relativa de cada gene (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 3 - Sequências de primers usados para RT-PCR em ceco dos ratos

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
GAPDH	5'- GTATTGGGCGCCTGGTCACC - 3'	5'- CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG - 3'
BCL2	5'GTATGATAACCGGGAGATCG-3'	5'AGCCAGGAGAAATCAAACAG-3'
BAX	5'AAGAAGCTGAGCGAGTGTCT-3'	5' CAAAGATGGTCACTGTCTGC-3
IL-10	5'-CAGAGCTCAGGAAACTGCTG-3'	5'- AGGCCTGGTCTTCTTTTCAGA-3'
TNF- α	5'- ACTGAACTTCGGGGTGATTG - 3'	5'- GCTTGGTGGTTTGCTACGAC - 3'

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Legenda: TNF- α : *Fator de necrose tumoral alfa*; IL-10: *Interleucina 10*; BAX: *regulador apoptótico*; BCL-2: *linfoma de células B-2*; GAPDH: *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*; A: adenina; T: timina; C: citosina; G: guanina.

5.5.8 Análise de marcadores do estresse oxidativo

O pedaço de ceco coletado de cada animal, armazenado em -80°C , foi homogeneizado em salina tamponada com fosfato (PBS, pH = 7,4) através da maceração com bastão de vidro. As atividades de peroxidação lipídica (MDA), os níveis de GSH, GSSG e GSH total e a atividade de NADPH foram avaliados conforme o método descrito no item 5.4.4.

5.5.9 Análises quantitativas do conteúdo bacteriano em amostras fecais

As fezes foram coletadas assepticamente de cada animal e separadas por grupo um dia antes da eutanásia. O DNA total foi extraído das amostras fecais de todos os grupos usando um QIAamp DNA Stool Mini Kit (*Qiagen, Hilden, Alemanha*). Para evitar qualquer efeito inibitório, o tampão InhibitEX foi adicionado antes da extração do DNA. O DNA total foi obtido usando a coluna de spin QIAamp e quantificado por Invitrogen Qubit Fluorometer (*ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA*). Um nanograma de DNA total foi usado para analisar genes de RNA ribossômico 16S (rRNA) usando primers específicos para Bactérias Totais, Bacteroidetes, Firmicutes ou Gammaproteobacteria, conforme descrito na Tabela 4.

A PCR em tempo real foi realizada em triplicata em um volume final de $10\ \mu\text{L}$ contendo o seguinte: SYBR® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), cDNA como modelo de PCR e $20\ \mu\text{M}$ de primers. A PCR foi realizada utilizando o StepOne PCR System (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), com os seguintes parâmetros de ciclagem: $60\ ^{\circ}\text{C}$ por 10 min, $95\ ^{\circ}\text{C}$ por 10 min, 40 ciclos

de 95 °C por 15 seg, e 60 °C por 1 min, e um estágio de dissociação de 95 °C por 15 seg, 60 °C por 1 min, 95 °C por 15 seg e 60 °C por 15 seg. A normalização dos valores de expressão dos genes alvo foi feita utilizando a expressão do gene constitutivo GAPDH. O método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência foi empregado para calcular a expressão relativa de cada gene, conforme item anterior.

Tabela 4 - Sequências de primers usados para análise de microbiota fecal dos ratos

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
Bactérias totais	5'- AAAC TCAA AKGAATTGACGG-3'	5'- CTCACRRCACGAGCTGAC-3'
Bacteroidetes	5'- GTTTAATTCGATGATACGCGAG-3'	5'- TTAASCCGACACCTCACGG-3'
Firmicutes	5'- GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA-3'	5'- AGCTGACGACAACCATGCAC-3'
Gammaproteobacteria	5'-GCTAACGCATTAAGTRYCCCG-3'	5'-GCCATGCRGCACCTGTCT-3'

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Legenda: Bacteroidetes (Bac960F and Bac1100R), Firmicutes (Firm934F, Firm1060R), Gammaproteobacteria (Gamma877F, Gamma1066R), e bactérias totais (926F and 1062R). Símbolos de nucleotídeos: R = A ou G; Y = C ou T; S = C ou G.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O *software Graph Pad Prism*® (Versão 8.0) foi utilizado para a análise estatística dos resultados e representação gráfica. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos como médias seguidas do desvio padrão. Para experimentos aleatorizados, as diferenças entre os grupos foram comparadas usando análise de variância unidirecional (*One-way ANOVA*), e as médias foram comparadas usando o pós-teste de Tukey, no caso de $p < 0,05$. Quando duas amostras foram comparadas, um teste-t de Student pareado foi utilizado.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A análise dos extratos digeridos e não digeridos da torta de groselha negra revelou a presença de compostos fenólicos, incluindo antocianinas, ácidos Cafeoilquínicos e taninos condensados (Tabela 5). As antocianinas são os componentes mais abundantes de todos os polifenólicos quantificados nos extratos de torta de groselha negra, e um total de quatro tipos de antocianinas foram identificadas, como 3-O-glicosídeo e 3-O-rutinosídeo de delphinidina e cianidina, sendo delphinidin-3-O-rutinosídeo como a antocianina predominante. Esses dados são confirmados pela literatura, quanto a composição de bagas como a groselha negra, que apresentam em maior quantidade os mesmos tipos de antocianinas, representando coletivamente 94-98% do teor total, dependendo do cultivo (BISHAYEE *et al.*, 2010).

Tabela 5 - Composição fenólica e atividade antioxidante dos extratos de TGN

Compostos fenólicos	Amostra bruta	Amostra digerida
Conteúdo fenólico total (mg AGE/100g)	2.046 ± 92	3.076 ± 243*
Total Antocianinas (mg/100g)	197 ± 13	269 ± 15,7*
Delphinidina-3-Glucosídeo	26 ± 2	51 ± 3,4*
Delphinidina-3-Rutinosídeo	101 ± 6,6	129 ± 6,6*
Cianidina-3-Glucosídeo	8,4 ± 0,3	9,4 ± 0,3*
Cianidina-3-Rutinosídeo	60,6 ± 4,8	79 ± 5,8*
Ácidos Cafeoilquínicos (mg/100g)	6,8 ± 0,4	5,2 ± 0,18*
Ácido Neoclorogénico	1,2 ± 0,02	0,8 ± 0,04*
Ácido Clorogénico	5,6 ± 0,4	4,4 ± 0,16*
Taninos condensados (mg/100g)	142 ± 5,9	21 ± 2*
Atividade antioxidante		
DPPH (mg AAE/100g)	2.082 ± 7,7	4.368 ± 90*
FRAP (mg AAE/100g)	10.142 ± 163	23.585 ± 556*
FCRC (mg GAE/100g)	5.082 ± 160	11.596 ± 203*

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Legenda: DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; FRAP, Poder Antioxidante Redutor Férrico; FCRC, Capacidade redutora de Folin Ciocalteu; AGE, ácido gálico equivalente; AAE, ácido ascórbico equivalente. Médias ± DP. * indica uma diferença estatística ($p \leq 0,05$) e n.s. não significativo.

Os resultados mostram que a contribuição de compostos fenólicos totais e de antocianinas no extrato de torta de groselha digerido se tornaram mais bioacessíveis após o processo de digestão *in vitro*, ao qual inclui boca, estômago e o intestino. Esses resultados sugerem que o processo de digestão gastrointestinal *in vitro* afeta fortemente a extração desses compostos. Diferentemente desses resultados, a presença de ácidos cafeoilquínicos e de taninos condensados foi menor na amostra digerida em relação à amostra bruta, o que pode ser indicativo de degradação ou mudanças estruturais destes compostos ao longo das fases de digestão.

O aumento na bioacessibilidade dos compostos fenólicos no extrato de torta de groselha após o processo de digestão *in vitro* correspondeu a uma melhor atividade antioxidante, conforme mostrado na Tabela 5, comprovado pelas análises de FRAP, DPPH e FCRC. O extrato de torta de groselha negra digerida apresentou maior atividade antioxidante ($4.367,9 \pm 90$ mg AAE/mL), em comparação com o extrato não digerido ($2.082,11 \pm 7,7$ mg AAE/mL), conferindo proteção contra radicais livres (ABREU-NARANJO *et al.*, 2020). CHIANG *et al.* (2013) investigaram os efeitos da digestão sobre as propriedades antioxidantes da groselha através do método DPPH e obtiveram resultados que indicam que a digestão aumenta a biodisponibilidade dos antioxidantes presentes nesta fruta. Ao contrário desses resultados, OLEJNIK *et al.* (2018) relataram que a contribuição de compostos de antocianina no extrato de groselha negra foi significativamente reduzida ($\downarrow 91,9\%$) após a digestão simulada *in vitro* e, conseqüentemente, uma atividade antioxidante reduzida. Um forte corpo de evidências científicas destaca que o conteúdo de compostos fenólicos foi relatado como o principal contribuinte para o efeito antioxidante, e que a quantidade de compostos fenólicos presente corresponde com uma maior atividade antioxidante (COSME *et al.*, 2020), como evidenciado nesse trabalho.

A digestão gastrointestinal é considerada um processo que permite a extração mecânica, química e enzimática de macronutrientes, micronutrientes e fitoquímicos (BURGOS-EDWARDS *et al.*, 2020), incluindo uma modificação estrutural considerável, responsável por afetar seu efeito biológico (BROWN *et al.*, 2012). Durante o processo de digestão, os compostos fenólicos, principalmente as antocianinas, sofrem uma ação enzimática que provoca a hidrólise e a transformação em metabólitos, produtos conjugados ou compostos fenólicos mais simples (TENA; MARTÍN; ASUERO, 2020). Ainda que a digestão *in vitro* tenha limitações, por ser um modelo tipicamente estático de digestão, ela permite o estudo das mudanças nos

componentes dos alimentos durante as fases oral, gástrica e intestinal. Essas alterações podem ser influenciadas por fatores como matriz alimentar, pH, temperatura, presença de inibidores ou intensificadores de absorção, presença de enzimas e outros fatores relacionados ao hospedeiro (BOUAYED; HOFFMANN; BOHN, 2011).

Embora seja principalmente no estômago que ocorra a extração de compostos fenólicos, o intestino também pode liberá-los por meio de enzimas lipase e pancreatina, e alguns compostos fenólicos resultam de suas transformações microbianas intestinais. Desta forma, a extração de compostos funcionais ocorre em todo o trato gastrointestinal (KRGGA *et al.*, 2018). Apenas os compostos fenólicos que são solubilizados da matriz alimentar são verdadeiramente bioacessíveis e, portanto, potencialmente biodisponíveis (BOUAYED; HOFFMANN; BOHN, 2011; TAGLIAZUCCHI *et al.*, 2010). Tendo isso em mente, o desenho experimental baseado na imitação *in vitro* da digestão gastrointestinal, que foi aplicado neste trabalho, permitiu a criação de condições semelhantes às que ocorrem no corpo e a capacidade de obter resultados que são provavelmente mais relevantes fisiologicamente do que os dados anteriormente publicados na literatura.

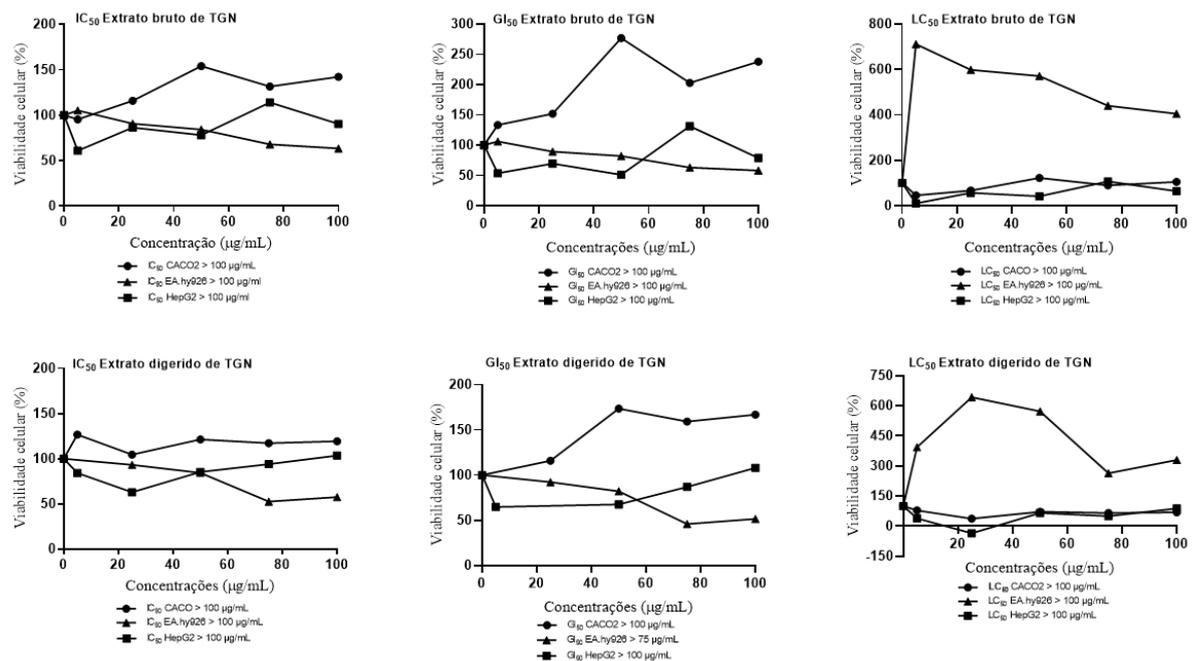
6.2 SISTEMA TESTE *IN VITRO*

6.2.1 Avaliação de citotoxicidade das amostras *in vitro*

Após a identificação dos compostos fenólicos em extratos bruto e digerido de torta de groselha negra, seus efeitos citotóxicos *in vitro* foram avaliados em um experimento baseado em cultura de células (Figura 7). Em primeiro lugar, o crescimento das linhagens celulares testadas não foi inibido pelo extrato bruto, que apresentou valores elevados de IC₅₀ e GI₅₀ (>100 µg/mL) e não apresentou valores letais (LC₅₀). Em concordância com nossos resultados, PAP *et al.* (2021) descobriram que extratos liofilizados de torta de groselha negra, obtidos via maceração, exibiram altos valores de IC₅₀ e IG₅₀ (>2000 µg/ml) em todas as linhagens celulares testadas (A549, HCT e IMR90) quando tratadas por 48 h. DIACONEASA *et al.* (2015) testaram uma amostra de antocianina purificada de suco de groselha negra e encontraram uma redução na viabilidade dependente da dosagem em linhagens celulares HeLa, A2780 e B16-F10, em concentrações entre 200 e 300 µg/mL, após 24 h de tratamento. Da

mesma forma, BISHAYEE *et al.* (2011) encontrou um potente efeito de citotoxicidade do extrato de groselha negra, rico em delphinidina e cianidina, em células de câncer de fígado humano (HepG2) na concentração de 1,35 mg/mL. Esses achados, comparados com nossos resultados, indicam que concentrações mais altas são necessárias para inibir a proliferação de metade dessas células, significando baixa inibição do crescimento e viabilidade celular.

Figura 7 - Citotoxicidade dos extratos de TGN em cultura de células



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: CACO-2 (células de adenocarcinoma colorretal humano), HepG2 (células de câncer de fígado humano) e EA.hy926 (híbrido de células somáticas endoteliais). IC₅₀ (concentração dos extratos que inibe a viabilidade celular em 50%); GI₅₀ (concentração dos extratos inibe o crescimento celular em 50%); e LC₅₀ (concentrações dos extratos que resultam em perda de 50% de células).

Dentre as linhagens celulares testadas, a linhagem híbrida de células somáticas endoteliais (EA.hy926) foi a mais sensível ao extrato de torta de groselha negra digerida, pois foi a única que apresentou valores estimados baixos de GI₅₀ = 75 µg/mL. Em contraste, a mesma amostra não apresentou citotoxicidade para células HepG2 e Caco-2 (IC₅₀, GI₅₀ e LC₅₀ > 100 µg/ml). BROWN *et al.* (2012) também demonstraram que não houve atividade citotóxica na linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano (HT29), quando tratadas com groselha negra digerida, em concentrações entre 0 a 50 µg/mL após 24 h. Essas variações entre os

extratos se devem principalmente à composição química antes e após o processo de digestão, mostrando que as diferenças encontradas na análise química das amostras podem refletir nos efeitos biológicos encontrados nos testes celulares.

6.2.2 Atividade de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs)

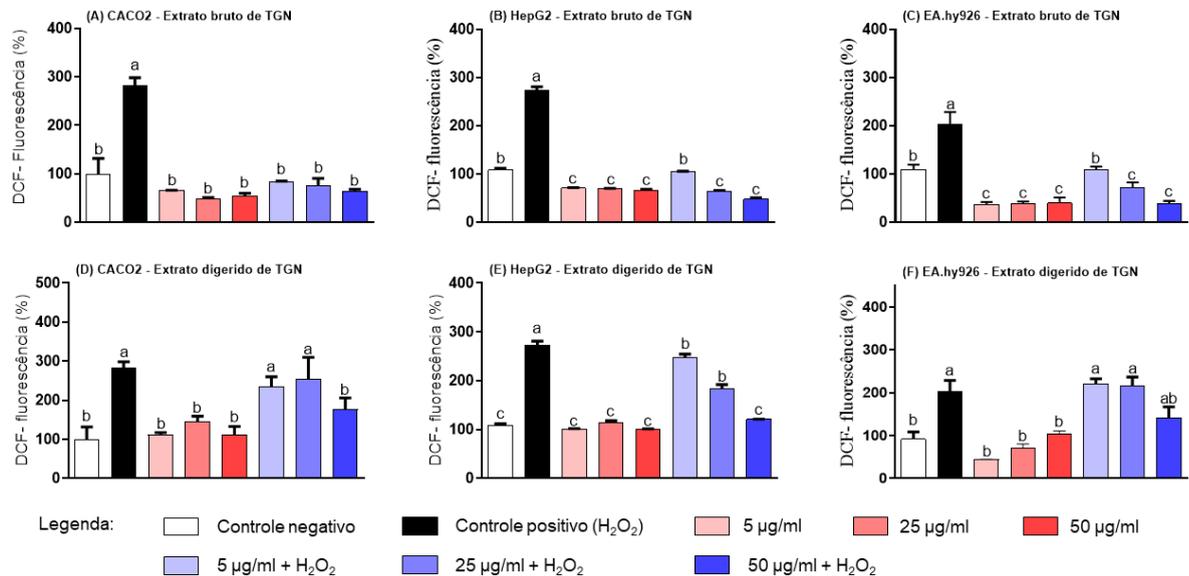
As ROS produzidas em linhagens celulares expostas a diferentes concentrações dos extratos de torta de groselha negra foram acessadas por meio de uma sonda fluorescente denominada Diacetildiclorofluoresceína (DCFH-DA). Em resumo, o DCFH-DA penetra na membrana celular e é hidrolisado pela esterase intracelular para produzir diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Na presença de radicais livres (EROs), o DCFH transforma-se em diclorofluoresceína (DCF) e emite fluorescência; assim, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode ser estimada a partir da quantidade de fluorescência emitida em diferentes situações (condições basais e condições oxidantes) (YU *et al.*, 2021).

Nesse estudo, como esperado, os níveis de EROs induzidos pela adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram superiores ao grupo de geração espontânea (controle negativo) e este grupo foi semelhante a alguns grupos de tratamento (Figura 8). Destaca-se que o extrato bruto de torta de groselha negra, quando exposto a altas concentrações de H_2O_2 , apresentou redução nas EROs, chegando ao mesmo nível da geração espontânea ou até mesmo abaixo, sugerindo um efeito protetor contra lesões de espécies reativas de oxigênio em todas as linhagens celulares testadas (Figura 8A-C). Resultados semelhantes são observados por PAP *et al.* (2021), que investigaram o efeito do extrato de torta de groselha negra em células de câncer de cólon (HCT8) e encontraram supressão da produção de EROs intracelular em todas as concentrações testadas na faixa de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Em consonância com esses resultados, o extrato digerido de torta de groselha foi suficientemente capaz de eliminar as EROs, dependendo da dosagem testada, sendo a redução mais evidente na dosagem mais alta (50 $\mu\text{g/mL}$), nas linhagens celulares Caco2 e HepG2 (Figura 8D-E). A linhagem endotelial (EA.hy926), por sua vez, apresentou comportamento diferente, demonstrando que a torta de groselha negra digerida não foi capaz de reduzir os níveis de H_2O_2 , mantendo-os no mesmo nível do grupo controle positivo (H_2O_2) (Figura 8F). Conforme o estudo de OLEJNIK *et al.* (2018), concentrações mais altas de extrato de groselha negra digerida (20

mg/mL), induziu um aumento substancial na formação de EROs em células de câncer de cólon (HT-29).

Figura 8 - Efeito dos extratos de TGN frente as EROs



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: H₂O₂: peróxido de hidrogênio. DCF: diclorofluoresceína.

Dessa forma, levando em consideração esses achados, nossos resultados sugerem que o extrato bruto de torta de groselha negra desempenha papéis importantes na proteção das células contra os efeitos potencialmente deletérios da geração de EROs, enquanto a torta de groselha digerida mantém os níveis elevados de EROs nas células endoteliais. Até onde sabemos, esse ajuste pode ser atribuído aos componentes antioxidantes de acordo com o perfil químico de cada extrato e às adaptações celulares, que pode conferir atividades citoprotetoras ou citotóxicas (DO CARMO *et al.*, 2021). Embora os polifenóis sejam conhecidos como potentes antioxidantes, eles também podem atuar como pró-oxidantes, dependendo da concentração e solubilidade dos compostos, do pH do ambiente e da modificação estrutural durante a digestão gastrointestinal (FAKHRI *et al.*, 2020; OLEJNIK *et al.*, 2018).

A partir dessas considerações, nossos resultados sugerem que o comportamento antioxidante diferente das amostras, conforme evidenciado no perfil químico do nosso extrato, reflete a atividade antioxidante contra os efeitos potencialmente deletérios das ROS. Para superar os efeitos prejudiciais pró-oxidantes

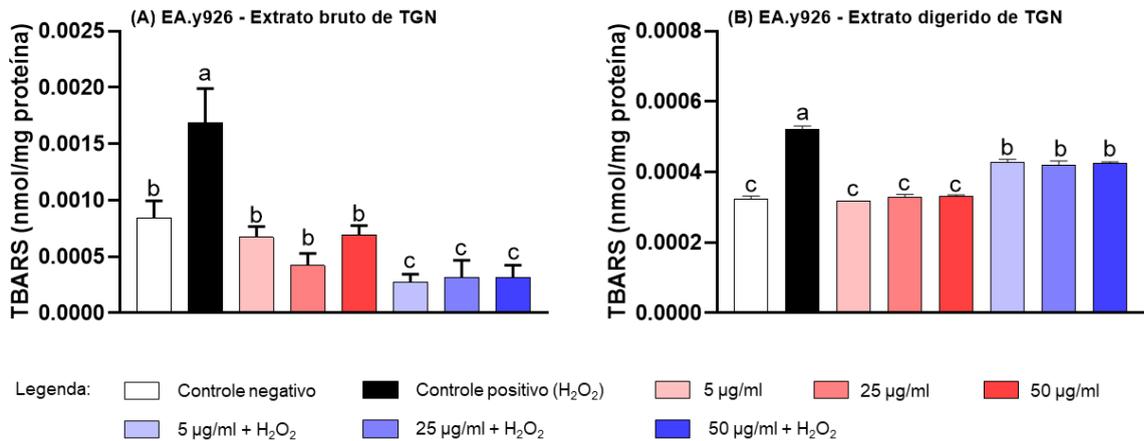
causados pelas EROs, as células possuem mecanismos não enzimáticos específicos (polifenóis, vitaminas A, C e E) e antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, por exemplo), que resultam em baixas concentrações de EROs intracelulares (DO CARMO *et al.*, 2018a; GUBINA-VAKULYCK *et al.*, 2018).

6.2.3 Avaliação de marcadores do estresse oxidativo e atividade antioxidante celular

Considerando a resposta biológica apresentada no teste de viabilidade e o comportamento das amostras frente aos efeitos deletérios do peróxido de hidrogênio, a linhagem celular EAhy926 foi escolhida para avaliar os mecanismos celulares antioxidantes que podem estar envolvidos nestas respostas.

Atualmente, a peroxidação lipídica é considerada o principal mecanismo molecular envolvido no dano oxidativo. O malondialdeído (MDA) é originário de ácidos graxos poli-insaturados, quando uma dupla ligação carbono-carbono é atacada por um radical livre, resultando na formação de radical lipídico insaturado com liberação de água (MAS-BARGUES *et al.*, 2021). Dessa forma, os níveis de peroxidação lipídica foram avaliados, medindo substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Como esperado, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico do grupo controle positivo (H₂O₂) foram maiores, em comparação com o grupo espontâneo (Figura 9). Este resultado é promissor, uma vez que as EROs causam um tipo de dano oxidativo à membrana celular, sendo o MDA um produto desse dano (ABREU-NARANJO *et al.*, 2020).

Figura 9 - Efeito do processo de digestão simulada *in vitro* sobre a peroxidação lipídica



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: H₂O₂: peróxido de hidrogênio; TBARS: ácido tiobabitérico.

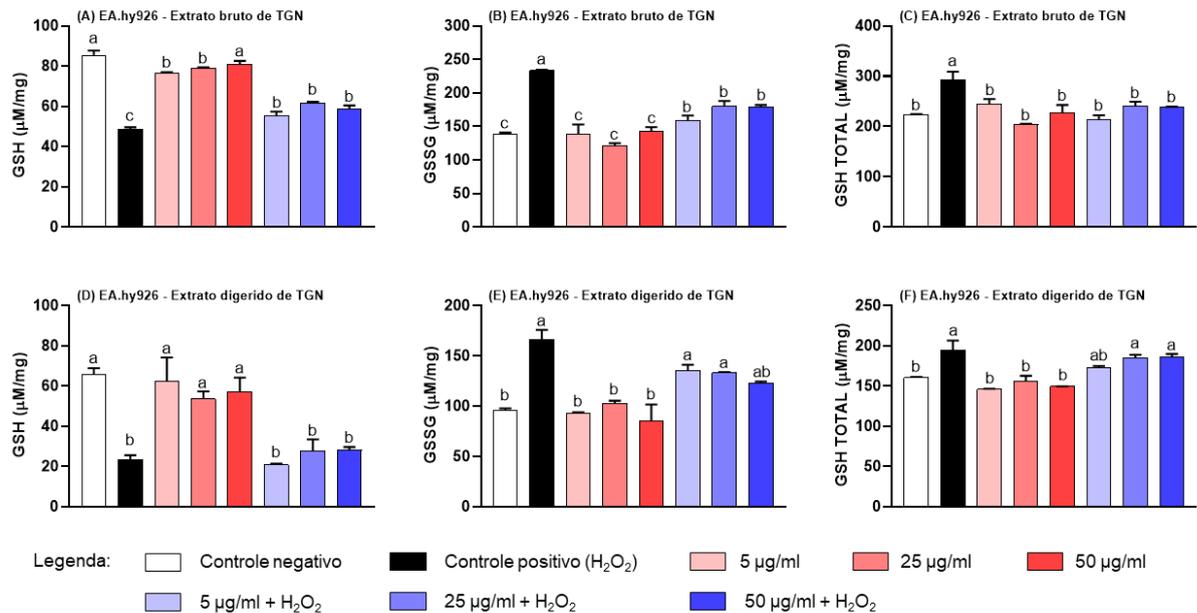
Curiosamente, o tratamento com extrato bruto de torta de groselha conferiu, em todas as concentrações testadas (5 – 50 µg/mL) efeitos antioxidantes na linhagem celular EA.hy926 contra a indução de estresse oxidativo por H₂O₂, apresentando menores níveis de peroxidação lipídica e atingindo níveis basais dos teores de MDA (grupo espontâneo) (Figura 9A). No entanto, comportamento diferente foi observado quando o extrato digerido de torta de groselha foi testado nas mesmas circunstâncias, mostrando um menor efeito protetor na peroxidação lipídica contra a indução de estresse oxidativo por H₂O₂, em todas as concentrações (Figura 9B).

A diferença na proteção contra as EROs encontrada entre os extratos bruto e digerido pode ser devido à complexa composição do extrato bruto após o processo de digestão *in vitro*, uma vez que esse processo pode favorecer interações entre os compostos da matriz celular, ou alterar significativamente sua estrutura química, o que também pode modificar seu efeito protetor contra a peroxidação lipídica da membrana celular (ABREU-NARANJO *et al.*, 2020). Juntos, esses resultados sugerem que o tratamento com torta de groselha negra digerida e não digerida está relacionado às interações bioquímicas (pelo processo de digestão) podendo eliminar, reduzir e até melhorar sua bioatividade, tornando esses compostos prejudiciais ou benéficos ao organismo (DO CARMO *et al.*, 2018b).

Uma vez que a glutatona (GSH) desempenha um papel protetor adicional ao catalisar a redução de hidroperóxidos orgânicos e peróxidos lipídicos nas membranas, foram avaliados os níveis de GSH, GSSG e GSH total na mesma linhagem celular. O estresse oxidativo pode desencadear mudanças no ambiente redox celular que

podem alterar as cascatas de transdução de sinal na célula (SCIREÈ *et al.*, 2019). Durante os episódios de estresse oxidativo, a glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução (e inativação) de H₂O₂ e outros peróxidos às custas da oxidação de GSH. Por sua vez, a glutathiona redutase (GR) regenera GSH a partir da glutathiona oxidada (GSSG) usando NADPH como agente redutor. Portanto, a regulação dos níveis intracelulares de GSH/GSSG e NADPH/NADP⁺ pode ser usada como um indicador do ambiente redox dentro da célula (KARUNAKARAN *et al.*, 2022; KENNEDY *et al.*, 2020).

Como forma de combate ao estresse oxidativo gerado pelo peróxido de hidrogênio, foi observada uma intensificação do consumo de glutathiona, sugerindo uma resposta compensatória ao aumento da produção de EROs (Figura 10). O tratamento com torta de groselha negra digerida apresentou o mesmo consumo de GSH que o grupo controle positivo, e foram encontrados os mesmos níveis na relação GSH/GSSG, enquanto que a amostra bruta manteve os níveis basais de EROs das células, conforme o controle negativo. De fato, a glutathiona está envolvida na regulação do ciclo celular pela modulação de vários processos celulares e pode ajudar o corpo a reparar danos oxidativos causados pelo estresse (SCIREÈ *et al.*, 2019), portanto, alterações moleculares no sistema antioxidante da GSH e distúrbios na homeostase da GSH foram implicados na iniciação, progressão e resposta ao tratamento do tumor (MORENO-SÁNCHEZ *et al.*, 2018). Embora em células saudáveis sejam cruciais para a remoção e desintoxicação, os níveis elevados da razão GSH/GSSG nas células tumorais estão associados à progressão do tumor e ao aumento da resistência aos medicamentos quimioterápicos (KENNEDY *et al.*, 2020). Após o surgimento de uma molécula oxidante, o estresse oxidativo induz o fornecimento imediato de NADPH, que pode ser mantido em uma resposta de longo prazo à oxidação (MORENO-SÁNCHEZ *et al.*, 2018).

Figura 10 - Efeito do processo de digestão simulada *in vitro* sobre a atividade antioxidante celular

Fonte: Do autor (2022).

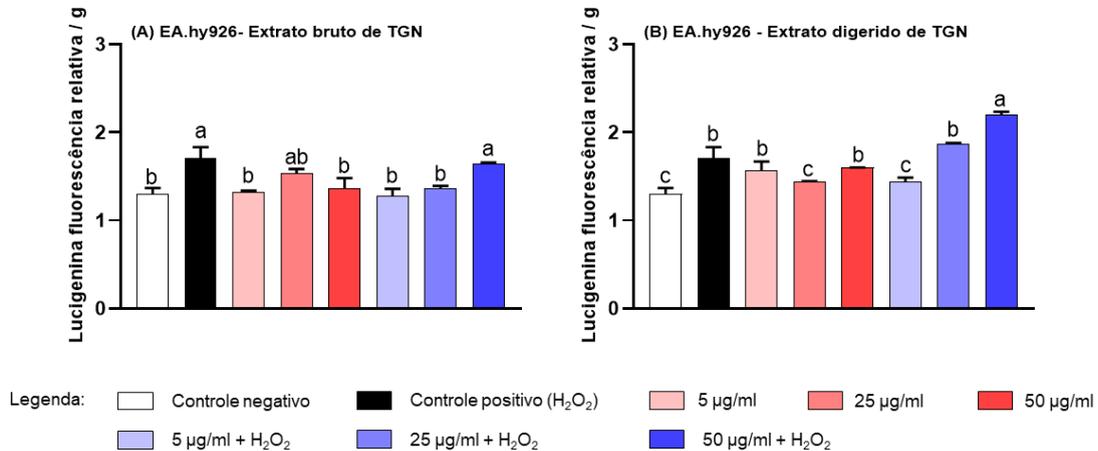
Legenda: GSH, glutationa reduzida; GSSG, glutationa oxidada; GSH Total: GSH + GSSG; H₂O₂: peróxido de hidrogênio;

O fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) é um cofator que é usado para transferir e reservar o potencial de redução. Sua função está pautada principalmente na ação antioxidante celular, combatendo os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio e radicais livres e participando da síntese de ácidos graxos e compostos esteroides (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; JU *et al.*, 2020). A manutenção do pool de NADPH mitocondrial é essencial para a proteção do estresse oxidativo para preservar as funções mitocondriais (MORENO-SÁNCHEZ *et al.*, 2017).

O tratamento com alta dosagem de torta de groselha negra bruta, contra indução de peróxido de hidrogênio, apresentou os mesmos níveis de NADPH comparado ao grupo controle positivo e a mesma resposta foi observada quando as células foram tratadas com torta de groselha negra digerida nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, apresentando níveis mais elevados de NADPH quando expostas a H₂O₂ (Figura 11). É importante ressaltar que o NADPH previne a inativação da enzima pelo H₂O₂ e mantém sua capacidade antioxidante, reduzindo os equivalentes que permitem que o GSH seja gerado a partir do GSSG. Por sua vez, o GSH permite que as glutatonas peroxidases (GPXs) cumpram suas funções antioxidantes, reduzindo H₂O₂ a H₂O (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020). Portanto, esses resultados

sugerem que os extratos de torta de groselha negra exercem efeitos oxidantes, requerendo maior atividade do NADPH, de maneira dose-dependente.

Figura 11 - Efeito do processo de digestão simulada *in vitro* sobre os níveis de NADPH



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: TGN: torta de groselha negra; H₂O₂: peróxido de hidrogênio.

6.3 SISTEMA TESTE *IN VIVO*

6.3.1 Caracterização das rações experimentais

Segundo a NRC (1995), a dieta experimental ofertada aos animais deve ser suficientemente palatável para garantir o consumo alimentar adequado e deve ser nutricionalmente balanceada para que os nutrientes essenciais sejam fornecidos para os suprir os objetivos específicos. Os valores observados em todas as dietas atenderam às necessidades nutricionais das Exigências Nutricionais de Animais de Laboratório (NRC).

A composição química média das rações aponta que o carboidrato ($27 \pm 1,42$ g/100 g), lipídios ($3,73 \pm 0,07$ g/100 g), proteína ($22,18 \pm 0,48$ g/100 g), fibra total ($30,06 \pm 0,74$ g/100 g), fibra insolúvel ($27,2 \pm 0,77$ g/100 g) e fibra solúvel ($2,92 \pm 0,55$ g/100 g) são adequadas para atender as necessidades nutricionais das Exigências Nutricionais de Animais de Laboratório. Os resultados da presente investigação demonstraram que as rações são uma boa fonte dietética, sendo essenciais para o crescimento e desenvolvimento dos animais.

6.3.2 Parâmetros nutricionais e metabólicos

A observação cuidadosa dos animais durante o período experimental mostrou que não houve mortes relacionadas ao tratamento de ratos de qualquer grupo antes do término do estudo, ou seja, 36 dias. A fim de analisar os parâmetros nutricionais e metabólicos dos animais, foram avaliados: ganho de massa corporal, ingestão alimentar e calórica durante o experimento.

Os animais iniciaram o experimento pesando $93,08 \pm 20,31$ g, e ganharam peso entre 239,15 e 295,35 g durante os 36 dias de experimento, indicando um ganho médio diário de $4,84 \pm 0,45$ g/rato. Embora todos os animais tenham apresentado ganho de massa corporal durante todo o experimento, os ratos dos grupos de câncer induzido por DMH que consumiram torta de groselha negra apresentaram o menor ganho de massa corporal em comparação com o grupo controle EDTA e DMH, que foram semelhantes (Tabela 6). Isso indica que o consumo de TGN conferiu menor ganho de massa corporal quando associado à aplicação do DMH. Independente do menor ganho de massa corporal, o consumo alimentar, de calorias e proteína foi igualmente positivo em todos os grupos. Esses resultados sugerem que o baixo ganho de massa corporal possivelmente está associado ao processo inflamatório causado por TGN e DMH, conforme demonstrado anteriormente. De fato, o excesso de mediadores inflamatórios leva a síndromes de caquexia do câncer que induzem alterações no metabolismo corporal e funções endócrinas, resultando em anorexia e perda de massa muscular (SUN; KATO, 2016).

Esses parâmetros nutricionais demonstram que a fome, ingestão alimentar e calórica nos ratos não são afetadas pelo tratamento com torta de groselha negra ou DMH. No entanto, esses resultados demonstram que as três dosagens de torta de groselha negra podem contribuir para o menor ganho de massa corporal dos animais em consonância com a ação do pró-carcinógeno DMH, causando alterações nutricionais deletérias não intencionais em ratos experimentais, através do processo inflamatório e estresse oxidativo gerados, como serão discutidos ao longo desse trabalho.

Tabela 6 - Efeito das dietas no ganho de massa e na ingestão alimentar

Grupo /tratamento	Massa inicial (g/rato)	Massa final (g/rato)	Ganho de massa (g/rato)	Consumo alimentar	
				(g/dia)	(Kcal/dia)
EDTA	92.2 ± 25.93 ^{n.s.}	287.2 ± 30.5 ^a	195 ± 22.26 ^a	23.02 ± 0.38 ^{n.s.}	54.87 ± 0.91 ^{n.s.}
TGN15.EDTA	92.7 ± 21.49 ^{n.s.}	285.0 ± 16.17 ^a	192.3 ± 19.74 ^a	26.12 ± 1.05 ^{n.s.}	60.10 ± 2.41 ^{n.s.}
DMH	91.9 ± 22.92 ^{n.s.}	267.7 ± 34.4 ^{ab}	175.8 ± 23.17 ^a	21.98 ± 2.22 ^{n.s.}	52.40 ± 5.29 ^{n.s.}
TGN5.DMH	94.4 ± 15.66 ^{n.s.}	254.2 ± 20.18 ^{ab}	159.8 ± 18.59 ^b	21.90 ± 1.46 ^{n.s.}	59.44 ± 3.95 ^a
TGN10.DMH	93.2 ± 20.61 ^{n.s.}	251.3 ± 24.37 ^b	158.1 ± 12.93 ^b	22.17 ± 0.72 ^{n.s.}	46.36 ± 1.51 ^{n.s.}
TGN15.DMH	94.1 ± 19.21 ^{n.s.}	258.1 ± 20.89 ^{ab}	164 ± 18.97 ^b	23.60 ± 0.57 ^{n.s.}	54.31 ± 1.32 ^{n.s.}

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Legenda: TGN: torta de groselha negra; DMH: 1,2-dimetil-hidrazina; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético. Valores com letras diferentes em uma coluna são significativamente diferentes. n.s.: não significativo.

Os resultados da presente investigação demonstraram a qualidade das dietas experimentais, uma vez que o consumo de ração e os parâmetros nutricionais e metabólicos (FER, PER, MGR e SGR) de todos os grupos de tratamento foram semelhantes aos do grupo controle negativo (Tabela 7). Nas condições experimentais, essas variáveis metabólicas, de crescimento e de comportamento nutricional servem como indicadores da saúde e bem-estar geral dos animais (DO CARMO *et al.*, 2021), mostrando que a digestão e absorção de nutrientes das dietas foram semelhantes (FERREIRA *et al.*, 2018).

Tabela 7 - Parâmetros metabólicos dos animais

Grupos/ tratamento	SGR (% por dia)	MGR (g kg ^{0.8} dia ⁻¹)	FER	PER
EDTA	3.25 ± 0.69 ^{n.s.}	0.256 ± 0.18 ^{n.s.}	0.24 ± 0.004 ^{n.s.}	1.00 ± 0.11 ^{n.s.}
TGN15.EDTA	3.19 ± 0.63 ^{n.s.}	0.234 ± 0.13 ^{n.s.}	0.21 ± 0.010 ^{n.s.}	0.94 ± 0.10 ^{n.s.}
DMH	3.03 ± 0.49 ^{n.s.}	0.211 ± 0.10 ^{n.s.}	0.25 ± 0.03 ^{n.s.}	0.95 ± 0.12 ^{n.s.}
TGN5.DMH	2.77 ± 0.35 ^{n.s.}	0.169 ± 0.04 ^{n.s.}	0.25 ± 0.02 ^{n.s.}	0.93 ± 0.11 ^{n.s.}
TGN10.DMH	2.80 ± 0.37 ^{n.s.}	0.177 ± 0.06 ^{n.s.}	0.24 ± 0.009 ^{n.s.}	0.92 ± 0.07 ^{n.s.}
TGN15.DMH	2.84 ± 0.43 ^{n.s.}	0.179 ± 0.06 ^{n.s.}	0.23 ± 0.006 ^{n.s.}	0.88 ± 0.10 ^{n.s.}

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Legenda: SGR, taxa de crescimento específica; MGR, taxa de crescimento metabólico; FER, índice de eficiência alimentar; PER, taxa de eficiência proteica; TGN: torta de groselha negra; DMH: 1,2-dimetil-hidrazina; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético. n.s.: não significativo.

6.3.3 Ensaio de focos de cripta aberrante (FCA) e focos depletados de mucina (FDM)

Usamos focos de criptas aberrantes (FCA), especialmente os displásicos, como biomarcador para avaliar os estágios iniciais da carcinogênese do cólon (BIRD, 1995). Com isso, os grupos alimentados apenas com ração e que receberam o veículo EDTA não apresentaram alterações compatíveis com a carcinogênese no cólon e, portanto, nenhuma FCA foi observada. O resultado fornece um importante parâmetro de segurança do consumo da maior dose da torta de groselha negra isolada, sugerindo que não há fator pró-carcinogênico associado ao desenvolvimento de focos de criptas aberrantes clássicas (Figura 12A). Em contraste, os grupos injetados com DMH apresentaram FCA (Figura 12B) e FDM (Figura 12E), indicando que a indução de carcinogênese no cólon foi firmemente estabelecida.

Os focos de criptas aberrantes são lesões desenvolvidas no CCR e apresentam hiperplasia acentuada, identificadas por uma morfologia característica de criptas aumentadas, revestimento epitelial espessado, lúmens irregulares e elevação da mucosa (RAMOS CAETANO *et al.*, 2020). O estágio mais avançado da FCA é denominado FDM, que se caracteriza por uma produção escassa ou ausente de mucinas secretadas pelas células caliciformes, com características displásicas. A região colônica é o local onde os tumores apresentam maior propensão de evolução de FCA em carcinoma de fato (JUAN *et al.*, 2019; RAMOS CAETANO *et al.*, 2020). FCA e FDM são usados para avaliar o potencial quimiopreventivo de compostos bioativos. Quando avaliamos o comportamento do consumo de TGN pelos animais, observamos uma redução no número total de FCA em 26,8% (Figura 12C) e na multiplicidade de criptas em 25,57% (categoria CA \leq 2, Figura 12D), quando consumida a dosagem mais baixa (5%), em comparação com o grupo controle positivo (DMH). Essa redução indica um efeito protetor contra a indução do câncer, reduzindo a hiperplasia em todo o cólon.

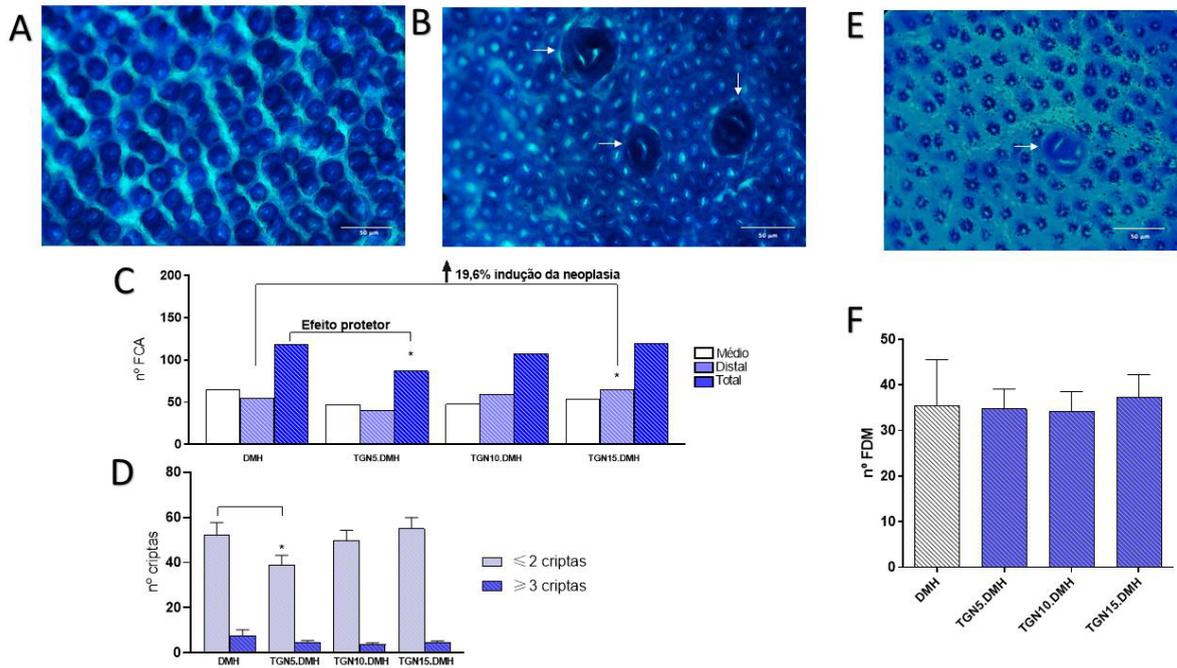
A multiplicidade das criptas (número de criptas por foco) é outro biomarcador importante para avaliar a progressão de uma lesão no CCR (CAMPOS *et al.*, 2019; RAMOS CAETANO *et al.*, 2020). Nesse sentido, o número de criptas é mais preditivo de transformação maligna do que o número de focos, pois muitos FCAs pequenos podem regredir, enquanto focos maiores podem evoluir para câncer (PRADO-SILVA *et al.*, 2014). O maior número de criptas \leq 2 encontrado em todos os grupos, quando

comparado ao número de criptas ≥ 3 , possivelmente está associado à duração do experimento após a indução da carcinogênese. Segundo RAJU (2008), após 8 semanas de experimento foi mais frequente FCA com 1, 2 e 3 criptas evoluindo nas semanas seguintes para um aumento na multiplicidade. O retardo pré-neoplásico da tumorigênese em estágio inicial pode enfatizar o mecanismo pelo qual a torta de groselha negra atenua o desenvolvimento do tumor e sugere a dinâmica da resposta imune na pré-neoplasia (MOLAN; LIU; PLIMMER, 2014).

Quando a dose mais baixa de torta de groselha negra foi consumida, a multiplicidade de criptas para categoria AC ≤ 2 foi reduzida em 25,57% no grupo de câncer de cólon induzido (DMH) (Figura 12D). Em conclusão, essa diminuição na incidência e multiplicidade de criptas indica a atividade protetora da dosagem mais baixa de TGN contra o início e a progressão do câncer de cólon. Outras frutas ricas em antocianinas também mostraram potencial atividade preventiva do câncer contra DMH e AOM em ratos. A suplementação com extrato de louro chinês (50 ou 500 mg/kg b.w.) reduziu o número total de FCA, assim como os focos com mais de quatro criptas (YANG *et al.*, 2011); o açaí em pó (5%) apresentou 37% de inibição no número de FCA total (FRAGOSO *et al.*, 2013), e o extrato de ameixa reduziu o número de FCA displásicas em 48% (BANERJEE *et al.*, 2016).

Por outro lado, o consumo da maior dosagem de TGN (15%) aumentou o número de FCA na porção distal do cólon em até 19,6% em relação ao grupo DMH (Figura 12C). Isso evidenciou um aumento no efeito pré-neoplásico causado pelo DMH no epitélio intestinal; no entanto, o número de FDM não foi diferente entre os grupos que receberam o DMH (Figura 12E). Portanto, apesar do comprometimento causado pela TGN em 15%, essa torta de baga não interferiu na escassa produção de muco das células epiteliais e no aumento da displasia. Segundo CAMPOS *et al.* (2019), a possível ausência de efeito protetor sobre a dosagem mais elevada de TGN e o número de focos no epitélio intestinal podem estar associados à disbiose intestinal, elevação do pH e promoção de processos inflamatórios, que favorecer a continuidade da agressão tecidual (RAMOS CAETANO *et al.*, 2020). Neste trabalho, foi demonstrado que a TGN favorece um processo de inflamação e disbiose intestinal, o que será destacado nas seções sobre a expressão de citocinas inflamatórias e a caracterização do microbioma de amostras fecais.

Figura 12 - Efeito dos extratos de TGN nos FCA e FDM no cólon



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: (A) vista topográfica da área com criptas colônicas não alteradas; (B) Três FCA-azul de metileno clássico corados com duas criptas aberrantes; (C) número de FCA presentes no segmento medial e distal e o total de FCA do cólon inteiro; (D) número de criptas presentes no número total de ACF; (E) vista topográfica de um FDM com três criptas aberrantes; (F) Número total de FDM.

Considerando o curto tempo experimental, esse retardo em estágio inicial ou progressão da tumorigênese (SILVA-REIS *et al.*, 2022) pode enfatizar o mecanismo pelo qual a TGN na dosagem mais baixa atenua os efeitos do DMH e acentua o desenvolvimento do tumor na dosagem mais alta, o que sugere a dinâmica da resposta pré-neoplásica. O DMH é um agente alquilante que metila biomoléculas de células epiteliais colônicas, e os metabólitos produzidos (metildiazônio e íons metil) podem alquilar bases de DNA após bioativação hepática e intestinal, produzindo dano oxidativo extenso, inflamação, depleção de diferentes sistemas antioxidantes e danos ao epitélio intestinal, desencadeando eventos pré mutagênicos como a formação de FCA (MEGARAJ *et al.*, 2014; RAMOS CAETANO *et al.*, 2020).

Sendo assim, acredita-se que os compostos presentes na TGN, principalmente os teores de antocianinas, inibem a iniciação e o desenvolvimento de tumores, o que está associado à sua capacidade de aumentar as defesas antioxidantes, exercer ações anti-inflamatórias e interferir nos genes ERK, JNK, PI3K/ Vias Akt, MAPK e NF- κ B (FAKHRI *et al.*, 2020). No entanto, as antocianinas podem mudar de antioxidantes

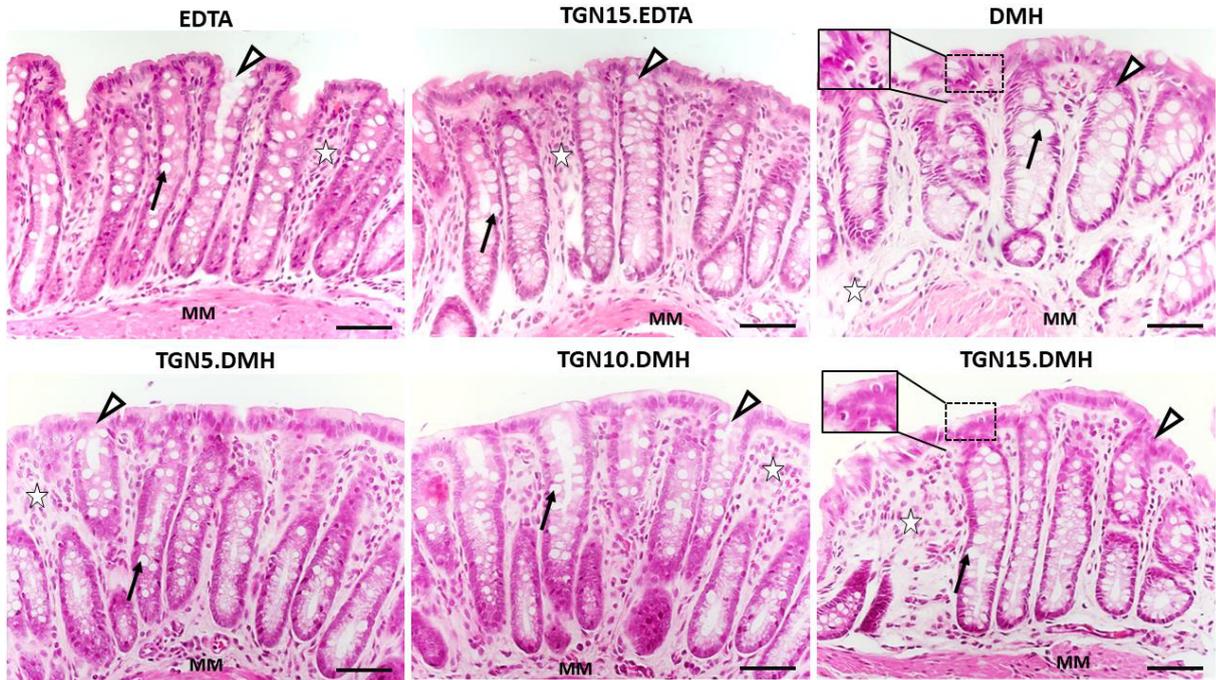
para pró-oxidantes na presença de metais de transição, induzindo a geração de ROS e danos ao DNA. Os principais flavonoides da torta de groselha negra, cianidina e delphinidina, que possuem antocianinas do anel B do catecol, têm menores potenciais de redução e mais atividades pró-oxidantes (EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016). As atividades pró-oxidantes diretas dos compostos fenólicos são baseadas na geração de um radical fenoxila ou um complexo redox com um íon de metal de transição, com a formação de radicais hidroxila através da oxidação do cobre reduzido (reação de Fenton) (HANIF *et al.*, 2008).

A atividade pró-oxidante de numerosos compostos fenólicos, em células normais e cancerígenas, pode induzir peroxidação lipídica e dano ao DNA (DO CARMO *et al.*, 2018b). Além disso, AZEVEDO *et al.* (2007) postularam possíveis interações entre os compostos contidos na complexa matriz alimentar que, devido à sua carga positiva na estrutura do anel central, esses compostos podem se auto associar a substâncias com estruturas semelhantes. Tendo isso em mente, o maior consumo de torta de groselha negra pode ser protetor ou prejudicial dependendo do ambiente (pH, presença de oxigênio e íons) e da concentração de compostos fenólicos presentes, que impactam diretamente na proliferação celular.

6.3.4 Histomorfometria e imunohistoquímica do cólon

A partir de uma análise morfológica geral do ceco, conforme mostrado na Figura 13, a análise histopatológica revelou uma camada mucosa definida e criptas intestinais bem definidas em todos os grupos. O espessamento epitelial foi especialmente detectado no grupo controle DMH, com áreas epiteliais espessadas também evidentes no grupo que recebeu o DMH e consumiu a maior dosagem de TGN. Uma redução acentuada no comprimento e aumento na largura das criptas de Lieberkuhn foram identificadas no grupo controle DMH. Além disso, observou-se maior basofilia nuclear nos enterócitos e menor área de coloração histoquímica de mucina (Figura 14) nos grupos DMH e TGN15.DMH.

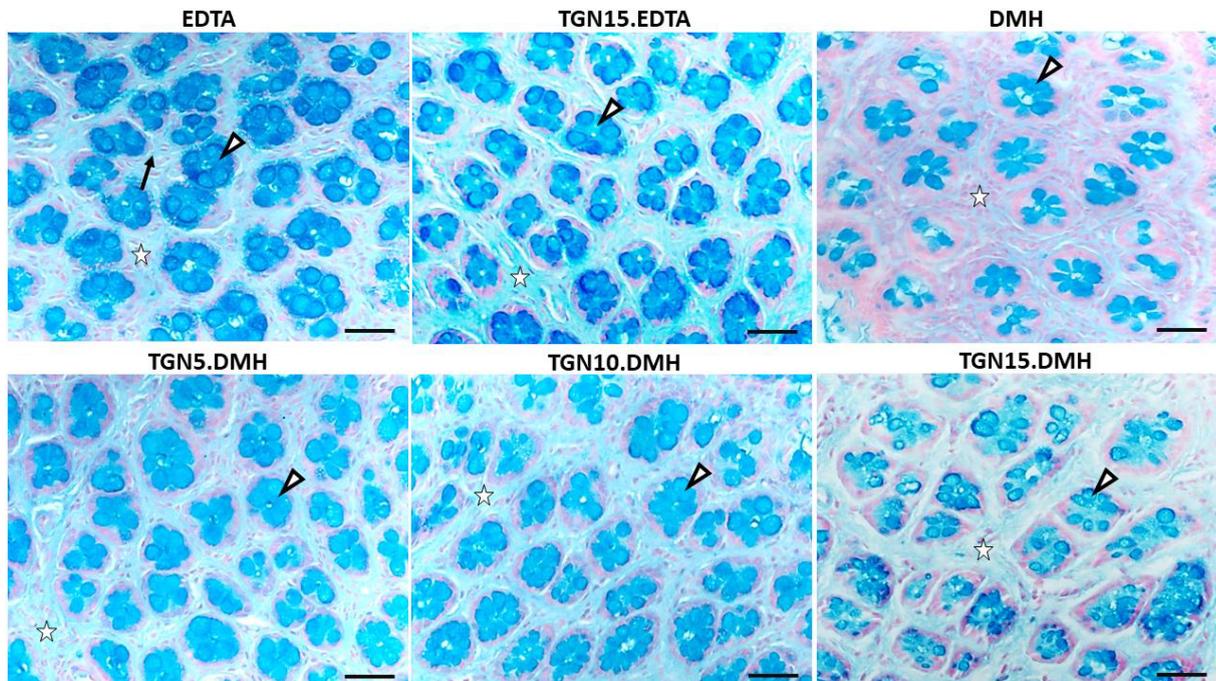
Figura 13 - Imagens microscópicas do cólon dos animais tratados com DMH e TGN



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Pontas de flecha: criptas intestinais. Setas: epitélio de cripta com células caliciformes em imagem negativa. Estrela: lâmina própria (tecido conjuntivo frouxo).

Figura 14 - Distribuição de mucinas nas criptas intestinais dos animais



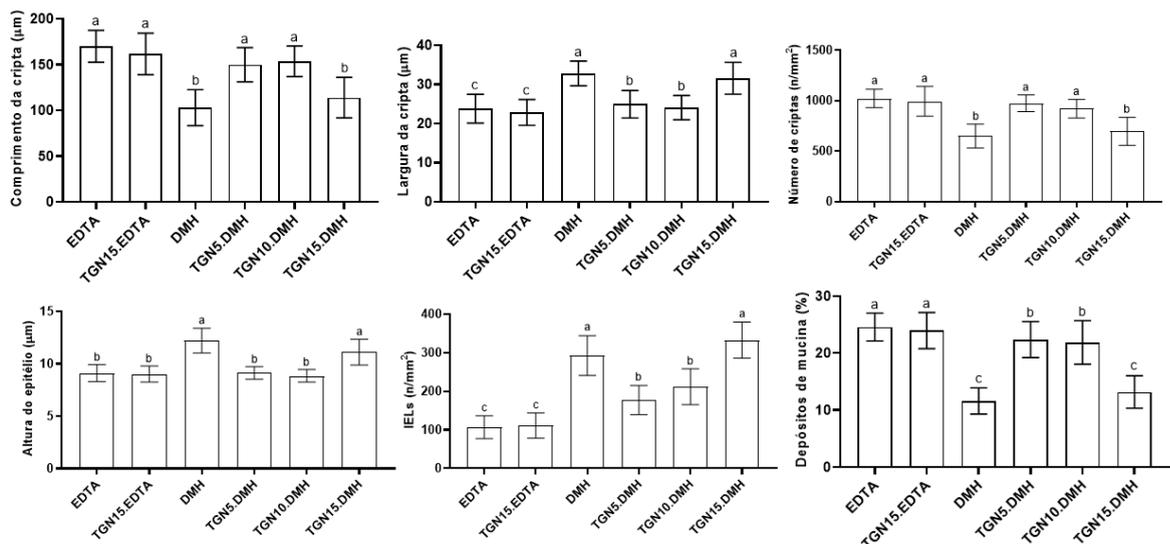
Fonte: Do autor (2022).

Legenda: Pontas de seta: criptas intestinais com estoques de mucina marcados em azul nas células caliciformes. Estrela: lâmina própria (tecido conjuntivo frouxo). Os núcleos celulares estão corados em vermelho.

Conforme mostrado na Figura 15, a análise microestrutural quantitativa corroborou com os achados qualitativos, indicando uma redução acentuada no comprimento e número de criptas, aumento da espessura média das criptas e do epitélio de revestimento intestinal, bem como um maior número de linfócitos intraepiteliais em DMH e TGN15.DMH comparados aos demais grupos ($p < 0,05$). Uma área reduzida de criptas ocupadas por mucinas também foi identificada nos animais dos grupos DMH e TGN15.DMH em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

Esses achados corroboram o efeito pró-inflamatório do DMH e da TGN no consumo da dosagem mais elevada, cujo potencial genotóxico está frequentemente associado a eventos pró-inflamatórios, que estão diretamente implicados no remodelamento patológico do cólon e no desenvolvimento dos FCA (JUAN *et al.*, 2019), conforme foi constatado na análise de FCA. Curiosamente, a infiltração leucocitária do epitélio e da lâmina própria foi maior nos grupos DMH e TGN15.DMH, enfatizando o efeito inflamatório da TGN nos mesmos níveis dos mecanismos paraneoplásicos induzidos pelo DMH. Assim, foi investigada a expressão diferencial de citocinas pró ou anti-inflamatórias e de proteínas pró e antiapoptóticas para avaliar o desenvolvimento de marcadores precoces de câncer de cólon e o aumento de linfócitos intraepiteliais encontrados.

Figura 15 - Características das microestruturas do cólon dos animais



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: IELs: linfócitos intraepiteliais.

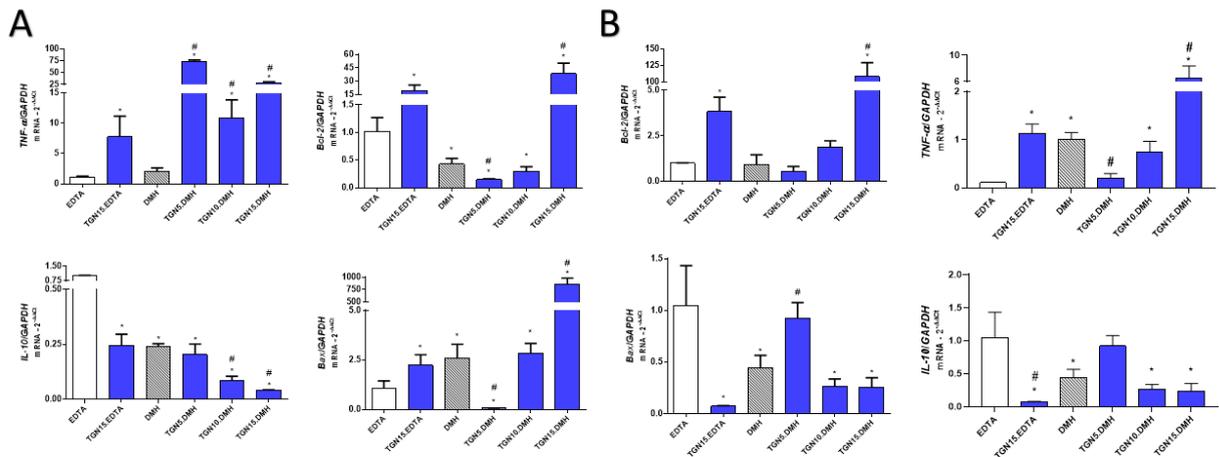
6.3.5 Expressão diferencial de citocinas e proteínas no ceco

A expressão diferencial de citocinas pró ou anti-inflamatórias e apoptóticas no ceco e no fígado (Figura 16) foi avaliada para esclarecer os mecanismos do por trás do desenvolvimento de marcadores precoces de câncer de cólon (FCA e FDM) induzido por torta de groselha negra e DMH. O DMH é um pró-carcinógeno que sofre ativação metabólica no fígado através das monooxigenases P450 e os metabólitos produzidos são transportados via bile ou corrente sanguínea para o cólon e leva a eventos pró-mutagênicos como resultado da inflamação (MEGARAJ *et al.*, 2014). Nesse trabalho, o tratamento com a maior dosagem de torta de groselha negra desencadeou o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral- α [TNF- α]) e proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) no fígado e no ceco, sugerindo seu envolvimento na atividade tumoral e na tumorigênese.

Resultados experimentais revelaram uma estreita relação entre inflamação crônica e sistêmica com o início e progressão do câncer colorretal (SILVA-REIS *et al.*, 2022). O TNF- α atua como um regulador mestre da inflamação e contribui para as respostas homeostáticas, uma vez que é tem papel crucial na rede de citocinas, sobrevivência celular e morte celular (ANNIBALDI; MEIER, 2018). Por outro lado, a interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que exerce funções imunossupressoras (como uma resposta imune inata e adaptativa) para reduzir o dano tecidual causado por respostas inflamatórias (OUYANG; O'GARRA, 2019).

Conforme mostrado na Figura 16A, no tecido hepático, a expressão de TNF- α foi supra regulada e a expressão de IL-10 foi subregulada nos grupos que consumiram 15% de TGN tanto recebendo DMH quanto o veículo EDTA. Por outro lado, quando avaliamos a mesma expressão de citocinas no ceco (Figura 16B), no consumo da dosagem mais baixa de TGN (5%), o processo inflamatório causado pelo DMH foi reduzido, evidenciado pela menor expressão de TNF- α , enquanto que TGN sozinha na dosagem mais alta desencadeou um processo inflamatório e ampliou a expressão do TNF- α em todas as dosagens nos grupos tratados com DMH. Esse resultado demonstra o mesmo efeito protetor na dosagem mais baixa e efeito neoplásico na dosagem mais alta, já evidenciado em análises morfológicas.

Figura 16 - Efeito do consumo de TGN frente à inflamação e apoptose no fígado e ceco



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: (A) expressões de mRNA de Bcl-2, Bax, TNF- α e IL-10 no tecido hepático; (B) expressões de mRNA de Bcl-2, Bax, TNF- α e IL-10 no ceco. TNF- α : *Fator de necrose tumoral alfa*; IL-10: *Interleucina 10*; BAX: *regulador apoptótico*; BCL-2: *linfoma de células B-2*. * valor $p < 0,05$, é referente ao grupo controle e # valor $p < 0,05$ referente ao grupo DMH.

A elevação de citocinas inflamatórias pode promover a proliferação e sobrevivência de células cancerosas, por meio da ativação de vias específicas (como a via de sinalização do NF- κ B), nas quais outros fatores de crescimento se acumulam e formam um microambiente metastático (LIU *et al.*, 2021). Esse processo inflamatório também foi observado na histopatologia através do aumento da infiltração de leucócitos, indicando que níveis detectáveis de inflamação local estavam presentes nas fases iniciais da carcinogênese.

Como o cólon é considerado um local importante para o metabolismo e absorção de antocianinas, a eficácia desses metabólitos na proteção contra o câncer é altamente dependente de sua absorção, metabolismo e biodisponibilidade (FAKHRI *et al.*, 2020; JUAN *et al.*, 2019). As antocianinas que não são absorvidas no trato gastrointestinal superior podem sofrer intensa biotransformação através da digestão intestinal e fermentação bacteriana no intestino grosso (CHEN *et al.*, 2018b; MUELLER *et al.*, 2017) e modificações do conteúdo e perfil de compostos polifenólicos pode ter um efeito significativo na atividade biológica das groselhas negras (OLEJNIK *et al.*, 2018). Embora as antocianinas sejam consideradas e conhecidas como potentes antioxidantes, anti-inflamatórios e pró-apoptóticos, elas também podem atuar como pró-oxidantes, dependendo da concentração e do ambiente celular (pH,

concentração de compostos fenólicos, presença de oxigênio e íons) e seu comportamento impacta diretamente na proliferação celular (OLEJNIK *et al.*, 2018).

Intrinsecamente relacionadas com a inflamação estão as vias apoptóticas das células, caracterizadas por um evento altamente complexo de morte celular programada, através de alterações morfológicas, como a condensação da cromatina e subsequente fragmentação nuclear e do DNA, por exemplo (DE SOUSA MORAES *et al.*, 2019). A apoptose é um mecanismo de autodestruição empregado para controlar o crescimento e a sobrevivência celular, caracterizado pela redução de proteínas antiapoptóticas/pró-sobrevivência, como Bcl-2, e/ou supra regulação de marcadores pró-apoptóticos, incluindo Bax (DO CARMO *et al.*, 2021). Além disso, a desregulação da proteína de apoptose está possivelmente ligada a vários distúrbios, incluindo câncer (GAMALLAT *et al.*, 2019).

Nesse estudo, o tratamento com o consumo da maior dosagem de TGN aumentou significativamente a expressão de Bcl-2 no ceco e nos tecidos hepáticos, quando comparado com o grupo DMH e o grupo EDTA, enquanto a proteína Bax foi reduzida no fígado e aumentada no tecido do ceco quando consumida a menor dosagem. A alta expressão da proteína Bcl-2 sequestra e se liga à proteína pró-apoptótica, como Bax, impedindo o início da apoptose e a lesão do controle do crescimento celular (GAMALLAT *et al.*, 2019). Esses resultados estão de acordo com o ensaio de citotoxicidade celular realizado previamente, comprovando que dosagens de torta de groselha negra, ainda que altas, não são capazes de reduzir viabilidade celular ou inibir a proliferação. Da mesma forma, os achados de tumorigênese mostram que doses mais altas de torta de groselha negra são capazes de gerar um ambiente inflamatório promovendo aumento nos números de FCA.

Doses mais elevadas de antocianinas podem afetar os níveis de marcadores inflamatórios e apoptóticos. Os efeitos colaterais das antocianinas dietéticas são incomuns (XUE *et al.*, 2022), embora os efeitos das antocianinas nos marcadores inflamatórios, de maneira dependente da dose administrada, tenham sido comprovados em modelos *in vitro* e demonstrados aqui neste experimento animal. Essa falta de conhecimento requer estudos sobre efeitos dose-dependentes em ensaios clínicos em humanos.

6.3.6 Efeitos da TGN nos marcadores do estresse oxidativo

O estresse oxidativo, orquestrador a montante das vias destrutivas, é resultante de um desequilíbrio entre a eliminação e a produção de radicais livres/espécies reativas de oxigênio (EROs), ativa várias vias de sinalização para o início do câncer (FAKHRI *et al.*, 2020). Após a ativação metabólica, o DMH induz o estresse oxidativo gerando radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença de íons metálicos, que podem desempenhar um papel no início da peroxidação lipídica (VENKATACHALAM *et al.*, 2020). Nesse sentido, foram avaliados os níveis de peroxidação lipídica no tecido do ceco medindo substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. A peroxidação lipídica é um mecanismo molecular envolvido no dano oxidativo e atua como mutagênico e promotor tumoral (MAS-BARGUES *et al.*, 2021), sendo observada uma notável elevação no nível de malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, em todos os grupos que receberam TGN, independentemente da dosagem e da presença ou ausência de DMH (Figura 17A). Essa lesão pode estar associada à atividade pró-oxidante das antocianinas (GRANATO; MOCAN; CÂMARA, 2020) por meio da superprodução de radicais livres e oxidação de estruturas celulares que induzem a peroxidação lipídica e danos ao DNA em células normais e cancerosas (OLEJNIK *et al.*, 2018).

Entre as antocianinas, cianidinas e delphinidinas têm menor potencial de redução e maior atividade pró-oxidante na lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana (EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016). ABUJA *et al.* (1998) demonstraram que o extrato de sabugueiro, rico em antocianinas, apresentou comportamento pró-oxidante na oxidação de LDL, dependendo do tempo de adição do extrato e da presença de cobre. Da mesma forma, HANIF *et al.* (2008) mostraram que na presença de metais de transição (como por exemplo, cobre), a delphinidina causa danos ao DNA por induzir processos oxidativos no citoplasma e no núcleo das células. Em um indivíduo saudável, os íons de cobre são amplamente sequestrados em formas que são incapazes de catalisar reações de radicais livres. No entanto, no caso de lesão tecidual, pode haver liberação de cobre e íons metálicos catalíticos podem ser detectados (LOMOZOVÁ *et al.*, 2022), o que pode favorecer o comportamento pró-oxidante dos compostos fenólicos presentes na torta de groselha negra.

Estudos não demonstraram que a ingestão de antocianinas reduz o risco de câncer em humanos, mas sugerem que a ingestão pode reduzir certos parâmetros de

dano oxidativo. No entanto, DUTHIE *et al.* (2006), em um estudo humano no Reino Unido, mostrou que as antocianinas no suco de cramberry não afetaram o dano oxidativo do DNA. Da mesma forma, FENG *et al.* (2007) analisaram 25 pacientes com câncer de cólon que consumiram 60g/dia de pó de framboesa negra por 4 semanas e demonstraram que não houve ação sobre os FCA. Alguns dados farmacocinéticos indicam que a absorção de antocianinas na corrente sanguínea de roedores e humanos é mínima, sugerindo que podem ter pouca eficácia (WANG; STONER, 2008).

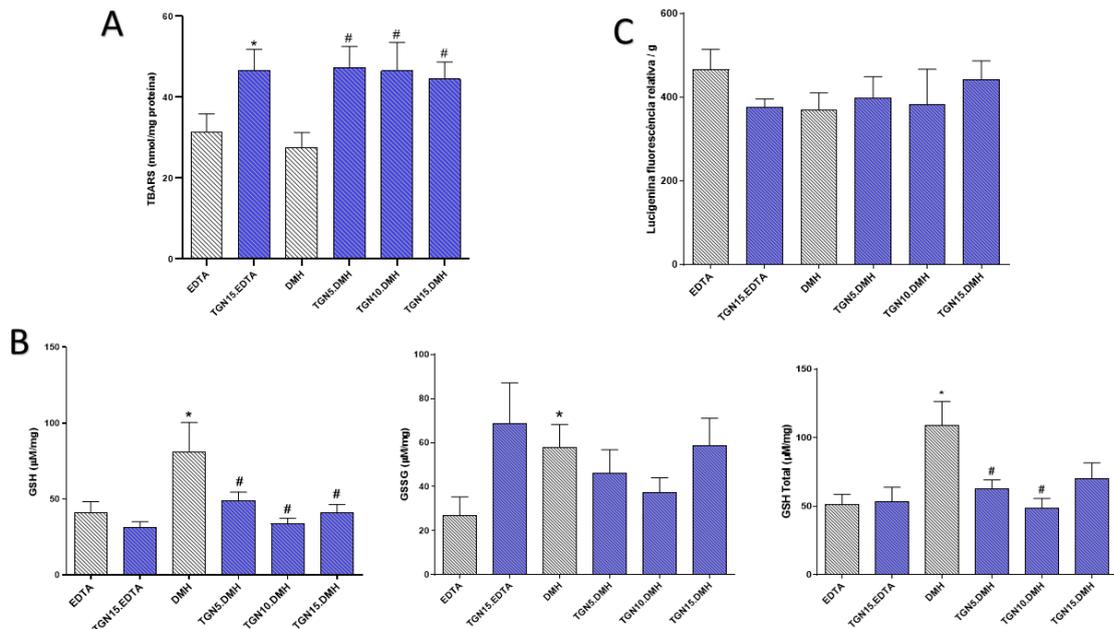
Para manter um equilíbrio entre produção e deleção de ROS, vários antioxidantes endógenos são liberados pelas células, incluindo sistemas não enzimáticos (GSH) e enzimáticos (SOD, GPx, GR, catalase, etc.) (FAKHRI *et al.*, 2020). Em termos de GSH, resultados experimentais foram realizados para determinar seus níveis, pois ela desempenha um papel protetor adicional ao catalisar a redução de hidroperóxidos orgânicos e peróxidos lipídicos nas membranas (MAS-BARGUES *et al.*, 2021). Aqui, foi possível observar que GSH, GSSG e GSH total aumentaram no grupo DMH em comparação com o grupo controle negativo, sugerindo uma resposta compensatória ao aumento da produção de estresse oxidativo gerado pelo pró carcinógeno (Figura 17B).

O consumo de TGN em adição ao tratamento com DMH levou a uma maior depleção dos níveis de GSH em comparação com o controle positivo (DMH), o que significa que o GSH foi oxidado a GSSG nos mesmos níveis que a oxidação causada pelo dano do grupo que recebeu DMH e consumiu ração comercial sem adição de TGN. Isso sugere que em uma situação estressante causada pelo DMH, a TGN oxida e induz ativamente uma reposição dinâmica de GSH, com conseqüente produção de GSSG, da mesma forma que o grupo DMH. Alguns antioxidantes endógenos, incluindo glutathiona (GSH), também exibem atividade pró-oxidante na presença de metais de transição como o cobre (HSU *et al.*, 2012). De fato, essa maior ativação do sistema de defesa celular pode ser decorrente do potencial agressivo da TGN contra as células, evidenciado pela prévia análise da peroxidação lipídica.

Além disso, não houve diferenças na atividade da NADPH oxidase no ceco entre os grupos (Figura 17C), o que significa que a TGN não exerce efeito oxidante por meio do aumento da produção de espécies oxidativas no tecido, assim como evidenciado no ensaio de produção de EROs realizado *in vitro*. Dessa forma, os efeitos adversos da TGN (peroxidação lipídica) podem estar relacionados ao dano

direto à membrana celular por meio de um efeito pró-oxidante sinérgico ou por alterações na composição/função da microbiota, desencadeando o processo inflamatório, que por sua vez está altamente associado ao desenvolvimento de câncer colorretal (GAMALLAT *et al.*, 2019).

Figura 17 - Efeitos do consumo de TGN frente ao estresse oxidativo no ceco



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: (A) MDA, malondialdeído; (B) GSH, glutatona reductase; GSSG, glutatona oxidada e GSH total, GSH + GSSG; (C) NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.

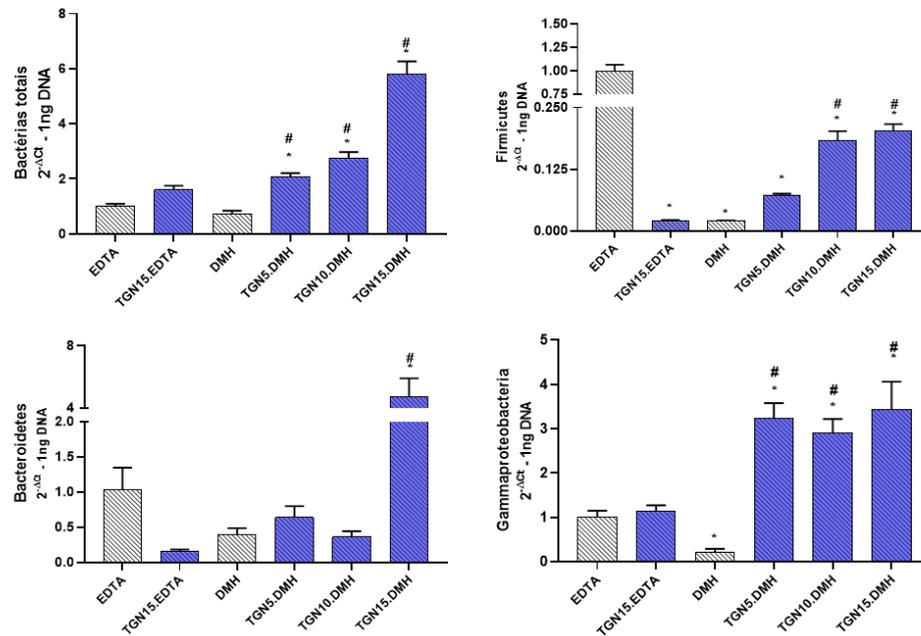
6.3.7 Efeitos da TGN no microbioma fecal

A microbiota intestinal representa um ecossistema complexo, incluindo bactérias, vírus, fungos etc., sendo responsável pela produção de vitaminas, metabolização de compostos dietéticos e proteção contra patógenos (SUN; KATO, 2016). Qualquer alteração no equilíbrio entre as espécies no intestino pode levar ao comprometimento da microbiota (denominado disbiose) e alterações na permeabilidade intestinal, que por sua vez está altamente associada a diversas patologias (FIDELIS *et al.*, 2021). Mudanças na comunidade microbiana intestinal pode desencadear atividades nocivas de algumas bactérias, levando à doença inflamatória intestinal, que desempenha papel crucial no início do tumor e na progressão do câncer colorretal (CHEN *et al.*, 2018b; GAMALLAT *et al.*, 2019).

No entanto, o mecanismo pelo qual a microbiota intestinal participa da formação e desenvolvimento do CCR ainda não está claro. A iniciação e/ou promoção da carcinogênese estão possivelmente associadas à clivagem de compostos não tóxicos em compostos tóxicos e à conversão de procarcinógenos em carcinógenos proximais (VENKATACHALAM *et al.*, 2020). A associação entre a modulação da microbiota, as alterações moleculares e o desenvolvimento do tumor é, portanto, a chave para entender a patogênese da doença. Portanto, a microbiota intestinal é essencial para a atividade pró-carcinogênica do DMH e, como consequência, o DMH induz uma alteração na microbiota intestinal (SILVA-REIS *et al.*, 2022), conforme mostrado na Figura 18.

Nesse estudo, foi evidenciado que o grupo controle positivo (ratos tratados com DMH) exibiu uma redução na abundância de *Firmicutes* e *Gammaproteobacteria* em comparação com ratos saudáveis. Isso foi observado de forma semelhante por SUN *et al.* (2017), que destacaram a menor abundância de *Firmicutes* nos grupos de modelos inflamatórios e uma diminuição gradual durante o desenvolvimento do tumor do filo *Proteobacteria*, no qual pertencem às *Gammaproteobacteria*. Em contraste, o DMH não exerceu efeito sobre a quantidade de bactérias totais e *Bacteroidetes*. O consumo de torta de groselha negra nas três dosagens com DMH destacou seu efeito pró-inflamatório ao aumentar a abundância da população bacteriana em termos dos filios *Gammaproteobacteria* e *Bacteroidetes*, principalmente quando consumida a maior dosagem (15%). Os efeitos pró-inflamatórios encontrados estão relacionados a endotoxinas bacterianas que desencadeiam a produção de citocinas, como o TNF- α no cólon. Por outro lado, as três dosagens de TGN também aumentaram o filo *Firmicutes*, que apresenta efeitos anti-inflamatórios.

Figura 18 - Efeitos do consumo de TGN na modulação da microbiota intestinal



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: TGN, torta de groselha negra; DMH, 1,2-dimetil-hidrazina e EDTA, ácido etilenodiaminotetracético.

Os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* são dominantes no ambiente intestinal, seguidos por *Proteobacteria* (SUN *et al.*, 2017), e o equilíbrio entre os dois filos (*Firmicutes* e *Bacteroidetes*) parece ser crítico para regular a progressão de doenças. A relação *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) é amplamente aceita por ter uma influência importante na manutenção da homeostase intestinal normal, e alterações na relação estão associadas ao desenvolvimento de disbiose intestinal e certas doenças, como a doença inflamatória intestinal (GAMALLAT *et al.*, 2019). Aqui, quando avaliamos a relação F/B na maior dosagem da TGN, com proporção de *Bacteroidetes* (4,73) superior à de *Firmicutes* (0,20), fica evidente que esta relação está desregulada. Além disso, quando associamos essa relação F/B com um aumento na proporção de bactérias potencialmente patogênicas, como as *Gammaproteobacterias* (3,44), sugerimos fortemente que o alto consumo de TGN pode contribuir para a disbiose bacteriana intestinal.

Após o consumo, as antocianinas e seus constituintes sofrem muitas modificações no trato digestivo (XUE *et al.*, 2022). Ao chegar ao cólon, eles são convertidos em compostos bioativos pela microbiota colônica antes de serem absorvidos pela mucosa colônica (CHEN *et al.*, 2018b). Da mesma forma, neste sistema circular, os metabólitos das antocianinas também são capazes de modular ou

alterar a composição do microbioma (BARS-CORTINA *et al.*, 2022; FAKHRI *et al.*, 2020). Por ter um alto teor de fibras solúveis e insolúveis (ALBA *et al.*, 2018), a torta de groselha negra também pode ser capaz de modular a microbiota intestinal, uma vez que os metabólitos seletivos, gerados a partir da fermentação de fibras pelas bactérias, podem modular diversas vias envolvidas na inflamação e no câncer (POPE *et al.*, 2017).

Em conclusão, a disbiose bacteriana intestinal pode estar associada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, bem como ao aumento do número de criptas presentes no cólon e alterações morfológicas, ambos no consumo das dosagens mais altas de TGN. De fato, a suplementação dietética contendo altas doses de polifenóis é, neste momento, questionável e deve ser bem justificada em cada caso, uma vez que maiores quantidades de compostos antioxidantes podem não produzir uma atividade antioxidante (GRANATO; MOCAN; CÂMARA, 2020).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A torta de groselha negra mostrou-se como excelente fonte de compostos fenólicos e de antocianinas, os quais se tornaram mais bioacessíveis após o processo de digestão *in vitro*, sugerindo que a digestão afeta fortemente a atividade antioxidante desses compostos. Essa atividade antioxidante foi confirmada nos ensaios *in vitro* realizados com células humanas. No entanto, em um modelo *in vivo* de carcinogênese de cólon, a ingestão da TGN na dosagem mais alta (15%) acentuou o surgimento de lesões pré-neoplásicas e alterações morfológicas no tecido do cólon de ratos *Wistar* e causou disbiose bacteriana intestinal. Além disso, a quantidade de polifenóis biologicamente ativos contidos na TGN é suficiente para manter um efeito pró-tumorigênese, envolvendo aumento de citocinas inflamatórias e inibição de proteínas pró-apoptóticas. Supõe-se que, após a digestão e fermentação, a atividade biológica da TGN seja dramaticamente alterada devido a modificações estruturais consideráveis, o que sugere fortemente que os produtos de degradação e os metabólitos individuais do cólon podem modular os processos celulares associados ao câncer de cólon. Os resultados *in vivo* evidenciam que as investigações sobre a atividade pró-oxidante, muitas vezes limitadas a experimentos *in vitro* e em amostras brutas, não necessariamente traduzem o sistema dinâmico *in vivo*. Sem dúvidas, todas as preocupações sobre a atividade pró-oxidante dos antioxidantes naturais estão relacionadas a altas doses. Além disso, os mecanismos pelos quais os compostos fenólicos e as antocianinas podem exercer sua bioatividade não está claro, uma vez que sua atividade pode estar relacionada a formas nativas, a seus derivados ou ambos. A distinção de seus diferentes papéis biológicos é uma tarefa muito desafiadora e as atividades pró-oxidantes dos compostos fenólicos da torta de groselha negra precisam ser melhor investigadas em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- ABREU-NARANJO, R. et al. Bioactive compounds, phenolic profile, antioxidant capacity and effectiveness against lipid peroxidation of cell membranes of *Mauritia flexuosa* L. fruit extracts from three biomes in the Ecuadorian Amazon. **Heliyon**, Ecuador, v. 6, n. 10, 1 Oct. 2020.
- ABUJA, P. M.; MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W. Antioxidant and Prooxidant Activities of Elderberry (*Sambucus nigra*) Extract in Low-Density Lipoprotein Oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Áustria, v. 46, n. 10, p. 4091–4096, 1998.
- ALBA, K. et al. Fractionation and characterisation of dietary fibre from blackcurrant pomace. **Food Hydrocolloids**, Reino Unido, v. 81, p. 398–408, 2018.
- ANNIBALDI, A.; MEIER, P. Checkpoints in TNF-Induced Cell Death: Implications in Inflammation and Cancer. **Trends in Molecular Medicine**, Reino Unido, v. 24, n. 1, p. 49–65, 2018.
- AOAC. Official methods of analysis of AOAC International: Agricultural chemicals, contaminants, drugs. Maryland, v. 16, n. 0935584676, 2012.
- ARCHAINA, D. et al. Physical and functional properties of spray-dried powders from blackcurrant juice and extracts obtained from the waste of juice processing. **Food Science and Technology International**, Ecuador, v. 24, n. 1, p. 78–86, 12 Jan. 2018.
- ARMSTRONG, H. et al. The complex interplay between chronic inflammation, the microbiome, and cancer: Understanding disease progression and what we can do to prevent it. **Cancers**, Canada, v. 10, n. 3, p. 1–29, 2018.
- AZEVEDO, L. et al. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Viçosa, v. 41, n. 12, p. 1671–1676, 2003.
- AZEVEDO, L. et al. Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, Alfenas, v. 45, n. 5, p. 852–858, 2007.
- BANERJEE, N. et al. Plum polyphenols inhibit colorectal aberrant crypt foci formation in rats: potential role of the miR-143/protein kinase B/mammalian target of rapamycin axis. **Nutrition Research**, Estados Unidos, v. 36, n. 10, p. 1105–1113, 2016.
- BARS-CORTINA, D. et al. Chemopreventive effects of anthocyanins on colorectal and breast cancer: A review. **Seminars in Cancer Biology**, Espanha, v. 81, n. January 2021, p. 241–258, 2022.
- BELWAL, T. et al. Anthocyanins, multi-functional natural products of industrial relevance: Recent biotechnological advances. **Biotechnology Advances**. **Biotechnology Advances journal**. China, v.43, Nov. 2020.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, Reino Unido, v. 239, n. 1, p. 70–76, Jul. 1996.

BILLER, L. H.; SCHRAG, D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: A review. **Journal of the American Medical Association**, Boston, v. 325, n. 7, p. 669–685, 2021.

BIRD RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Letters**, Irlanda, v. 93, p. 55–71, 1995.

BISHAYEE, A. et al. Natural Product Communications Anthocyanin-Rich Black Currant Extract Suppresses the. **Natural Product Communications**, Ohio - Estados Unidos, v. 5, n. 10, p. 1613–1618, 2010.

BISHAYEE, A. et al. Anthocyanin-rich black currant (*Ribes nigrum* L.) extract affords chemoprevention against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Ohio - Estados Unidos, v. 22, n. 11, p. 1035–1046, 2011.

BORGES, G. et al. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Glasgow - UK, v. 58, n. 7, p. 3901–3909, 2010.

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**, Luxemburgo, v. 128, n. 1, p. 14–21, 2011.

BOUREUX, A. et al. Evolution of the Rho family of Ras-like GTPases in eukaryotes. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 203–216, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, França, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1 Jan. 1995.

BROWN, E. M. et al. Persistence of Anticancer Activity in Berry Extracts after Simulated Gastrointestinal Digestion and Colonic Fermentation. **PLoS ONE**, Reino Unido, v. 7, n. 11, p. 3–12, 2012.

BURGOS-EDWARDS, A. et al. Effects of gastrointestinal digested polyphenolic enriched extracts of Chilean currants (*Ribes magellanicum* and *Ribes punctatum*) on in vitro fecal microbiota. **Food Research International**, Chile, v. 129, n. October 2019, p. 108848, 2020.

CAMPOS, R. C. DE A. B. et al. In vitro and in vivo resistance of *Lactobacillus rhamnosus* GG carried by a mixed pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) and jussara (*Euterpe edulis* Martius) juice to the gastrointestinal tract. **Food Research International**, Minas Gerais, v. 116, n. November 2017, p. 1247–1257, 2019.

CHANDRA SINGH, M. et al. Validated liquid chromatography separation methods for identification and quantification of anthocyanins in fruit and vegetables: A systematic

review. **Food Research International**, Australia, v. 138, n. PA, p. 109754, 2020.

CHEN, J. et al. Delphinidin induced protective autophagy via mTOR pathway suppression and AMPK pathway activation in HER-2 positive breast cancer cells. **BMC Cancer**, China, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2018a.

CHEN, L. et al. Chemoprevention of colorectal cancer by black raspberry anthocyanins involved the modulation of gut microbiota and SFRP2 demethylation. **Carcinogenesis**, China, v. 39, n. 3, p. 471–481, 2018b.

CHENG, S. et al. Mediterranean dietary pattern and the risk of prostate cancer a meta-analysis. **Medicine (United States)**, China, v. 98, n. 27, p. 1–7, 2019.

CHIANG, C. J.; KADOUH, H.; ZHOU, K. Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**, Detroit, v. 51, n. 2, p. 417–422, 2013.

CORTEZ, R. E.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Blackcurrants (*Ribes nigrum*): A Review on Chemistry, Processing, and Health Benefits. **Journal of Food Science**, Detroit, v. 84, n. 9, p. 2387–2401, 27 Sep. 2019.

COSME, P. et al. Plant phenolics: Bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. **Antioxidants**, Espanha, v. 9, n. 12, p. 1–20, 2020.

CYBORAN, S. et al. Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves. **Food Research International**, Polonia, v. 65, p. 47–58, Nov. 2014.

DE ALMEIDA, C. V. et al. Role of diet and gut microbiota on Colorectal cancer immunomodulation. **World Journal of Gastroenterology**, Florence, v. 25, n. 2, p. 151–162, 2019.

DE SOUSA MORAES, L. F. et al. Anthocyanins/anthocyanidins and colorectal cancer: What is behind the scenes? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Washington, v. 59, n. 1, p. 59–71, 2019.

DIACONEASA, Z. et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice. **International Journal of Molecular Sciences**, Romania, v. 16, n. 2, p. 2352–2365, 2015.

DIAS, M. C. et al. Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, Botucatu, v. 48, n. 3, p. 772–780, Mar. 2010.

DO CARMO, M. A. V. et al. Polyphenols as potential antiproliferative agents: scientific trends. **Current Opinion in Food Science**, Alfenas, v. 24, p. 26–35, 2018a.

DO CARMO, M. A. V. et al. Hydroalcoholic Myrciaria dubia (camu-camu) seed extracts prevent chromosome damage and act as antioxidant and cytotoxic agents. **Food Research International**, Alfenas, v. 125, n. July, p. 108551, 2019.

DO CARMO, M. A. V. et al. Ellagitannins from jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) seeds attenuated inflammation, oxidative stress, aberrant crypt foci, and modulated gut

microbiota in rats with 1,2 dimethyl hydrazine-induced colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, Alfenas, v. 154, n. April, 2021.

DO CARMO, M.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. **Antioxidant/pro-oxidant and antiproliferative activities of phenolic-rich foods and extracts: A cell-based point of view**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2021.

DUAN, S. et al. Preparation, characteristics, and antioxidant activities of carboxymethylated polysaccharides from blackcurrant fruits. **International Journal of Biological Macromolecules**, China, v. 155, p. 1114–1122, Jul. 2020.

DUTHIE, S. J. et al. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. **European Journal of Nutrition**, Glasgow, v. 45, n. 2, p. 113–122, 2006.

EGHBALIFERIZ, S.; IRANSHAHI, M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. **Phytotherapy Research**, Irã, v. 1391, n. April, p. 1379–1391, 2016.

EKER, M. E. et al. A review of factors affecting anthocyanin bioavailability: Possible implications for the inter-individual variability. **Foods**, Espanha, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2020.

ESCHER, G. B. et al. Chemical study, antioxidant, anti-hypertensive, and cytotoxic/cytoprotective activities of *Centaurea cyanus* L. petals aqueous extract. **Food and Chemical Toxicology**, Ponta Grossa, v. 118, p. 439–453, 2018.

ESSAWY, S. S. et al. Effect of celecoxib and cisplatin combination on apoptosis and cell proliferation in a mouse model of chemically-induced colonic aberrant crypt foci. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, Egito, v. 4, n. 4, p. 323–331, 2017.

FAKHRI, S. et al. The ameliorating effects of anthocyanins on the cross-linked signaling pathways of cancer dysregulated metabolism. **Pharmacological Research**, Irã, v. 159, p. 104895, 2020.

FARRÀS, M. et al. Beneficial effects of olive oil and Mediterranean diet on cancer physio-pathology and incidence. **Seminars in Cancer Biology**, Espanha, v. 73, p.178-195, 2020.

FENG, R. et al. Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, Pennsylvania, v. 282, n. 18, p. 13468–13476, 2007.

FERREIRA, R. S. et al. The impact of laboratory chow for rats in the experiments: Chemical and biological evaluation of nine grain-based diet options. **Human and Experimental Toxicology**, Alfenas, v. 37, n. 3, p. 275–284, 2018.

FIDELIS, M. et al. Polyphenols of jaboticaba [*Myrciaria jaboticaba* (Vell .) O . Berg] seeds incorporated in a yogurt model exert antioxidant activity and modulate gut microbiota of 1 , 2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Food Chemistry**, Alfenas, v. 334, n. July 2020, p. 127565, 2021.

FRAGOSO, M. F. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, Botucatu, v. 58, p. 68–76, 2013.

GAMALLAT, Y. et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* modulates the gut microbiome composition attenuates preneoplastic colorectal Aberrant crypt foci. **Journal of Functional Foods**, China, v. 53, n. October 2018, p. 146–156, 2019.

GARCIA-MENDOZA, M. DEL P. et al. Recovery and antioxidant activity of phenolic compounds extracted from walnut press-cake using various methods and conditions. **Industrial Crops and Products**, França, v. 167, n. October 2020, 2021.

GONÇALVES, A. C. et al. Dietary effects of anthocyanins in human health: A comprehensive review. **Pharmaceuticals**, Portugal, v. 14, n. 7, p. 1–34, 2021.

GONÇALVES, R. V et al. Trans-fatty acids aggravate anabolic steroid-induced metabolic disturbances and differential gene expression in muscle, pancreas and adipose tissue. **Life Sciences**, Viçosa, v. 232, n. June, p. 116603, 2019.

GRANATO, D. et al. Enzyme-assisted extraction of anthocyanins and other phenolic compounds from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) press cake: From processing to bioactivities. **Food Chemistry**, Irlanda, v. 391, n. May, 2022.

GRANATO, D.; MOCAN, A.; CÂMARA, J. S. Is a higher ingestion of phenolic compounds the best dietary strategy? A scientific opinion on the deleterious effects of polyphenols in vivo. **Trends in Food Science and Technology**, Finlândia, v. 98, n. December 2019, p. 162–166, 2020.

GREMSKI, L. A. et al. Antioxidants-rich ice cream containing herbal extracts and fructooligosaccharides: manufacture, functional and sensory properties. **Food Chemistry**, Ponta Grossa, v. 298, n. June, 2019.

GRIMM, A. et al. Novel drying treatment to stabilize bilberry, blackcurrant, and cloudberry press cakes: Dryer performance and product quality characteristics. **Lwt**, Suécia, v. 128, n. November 2019, 2020.

GUBINA-VAKULYCK, G. I. et al. RIBES NIGRUM FRUIT EXTRACT SHOWS CARDIOPROTECTIVE. **Studia Universitatis “Vasile Goldiș”, Seria Științele Vieții**. Ucrânia, v. 28, n. 3, p. 122–130, 2018.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, Singapura, v. 35, n. 5, p. 1147–1150, 1 Nov. 2007.

HANIF, S. et al. The anthocyanidin delphinidin mobilizes endogenous copper ions from human lymphocytes leading to oxidative degradation of cellular DNA. **Toxicology**, India, v. 249, n. 1, p. 19–25, 2008.

HARRIS, I. S.; DENICOLA, G. M. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. **Trends in Cell Biology**, Rochester, p. 1–12, 2020.

HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TEW, K. D. Oxidative Stress in Cancer. **Cancer Cell**, Reino Unido, v. 38, n. 2, p. 167–197, 10 Aug. 2020.

HAZAFI, A. et al. The Role of Polyphenol (Flavonoids) Compounds in the Treatment of Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, Paquistão, v. 72, n. 3, p. 386–397, 2020.

HELLSTRÖM, J.; MATTILA, P.; KARJALAINEN, R. Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. **Journal of Food Composition and Analysis**, Finlândia, v. 31, n. 1, p. 12–19, 1 Aug. 2013.

HSU, F. L. et al. In vivo antioxidant activities of essential oils and their constituents from leaves of the Taiwanese *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Taiwan, v. 60, n. 12, p. 3092–3097, 2012.

JU, H.-Q. et al. NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications. **Nature**, China, v.5, 231: 2020.

JUAN, M. E. et al. Reduction of preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colon by maslinic acid, a pentacyclic triterpene from *olea europaea* L. **Molecules**, Barcelona, v. 24, n. 7, p. 1–15, 2019.

KARUNAKARAN, U. et al. c-Abl tyrosine kinase inhibition attenuate oxidative stress-induced pancreatic β -Cell dysfunction via glutathione antioxidant system. **Translational Research**, Coreia, v.249, p.74-87, 2022.

KENNEDY, L. et al. Role of glutathione in cancer: From mechanisms to therapies. **Biomolecules**, Ottawa, v. 10, n. 10, p. 1–27, 2020.

KENT, K. et al. Food-based anthocyanin intake and cognitive outcomes in human intervention trials: a systematic review. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, Australia, v. 30, n. 3, p. 260–274, 2017.

KHANAL, R. C.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Procyanidin Composition of Selected Fruits and Fruit Byproducts Is Affected by Extraction Method and Variety. **J. Agric. Food Chem**, Austrália, v. 57, n. 19, p. 8839–8843, 2009.

KRGA, I. et al. Anthocyanins and their gut metabolites attenuate monocyte adhesion and transendothelial migration through nutrigenomic mechanisms regulating endothelial cell permeability. **Free Radical Biology and Medicine**, França, v. 124, n. May, p. 364–379, 2018.

KUMAR, K. et al. Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. **Bioresources and Bioprocessing**, India, v. 4, n. 1, 2017.

KUMAR, K.; SRIVASTAV, S.; SHARANAGAT, V. S. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**. v.70, 105325, 2021.

LENSEN, K. G. M.; BAST, A.; DE BOER, A. Clarifying the health claim assessment procedure of EFSA will benefit functional food innovation. **Journal of Functional Foods**, Holanda, v. 47, n. May, p. 386–396, 2018.

LIU, X. et al. Inflammation and cancer: paradoxical roles in tumorigenesis and implications in immunotherapies. **Genes and Diseases**, China, 2021.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, Foster City, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOMOZOVÁ, Z. et al. The effect of flavonoids on the reduction of cupric ions, the copper-driven Fenton reaction and copper-triggered haemolysis. **Food Chemistry**, República Theca, v. 394, n. February, 2022.

MARGRAF, T. et al. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. **Journal of Food Science**, Ponta Grossa, v. 80, n. 11, p. C2397–C2403, Nov. 2015.

MAS-BARGUES, C. et al. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Espanha, v. 709, p. 108941, 30 Sep. 2021.

MEGARAJ, V. et al. Role of hepatic and intestinal P450 enzymes in the metabolic activation of the colon carcinogen azoxymethane in mice. **Chemical Research in Toxicology**, Estados Unidos, v. 27, n. 4, p. 656–662, 21 Apr. 2014.

MEREGALLI, M. M. **Estudo comparativo de diferentes métodos de extração de compostos bioativos da casca do Araçá-vermelho (Psidium cattleianum Sabine)**. Uruguai, p. 76, 2017.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food Funct.**, Nova Zelandia, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MOLAN, A. L.; LIU, Z.; PLIMMER, G. Evaluation of the effect of blackcurrant products on gut microbiota and on markers of risk for colon cancer in humans. **Phytotherapy Research**, Nova Zelândia, v. 28, n. 3, p. 416–422, 2014.

MORENO-SÁNCHEZ, R. et al. Control of the NADPH supply for oxidative stress handling in cancer cells. **Free Radical Biology and Medicine**, Mexico, v. 112, p. 149–161, 1 Nov. 2017.

MORENO-SÁNCHEZ, R. et al. Control of the NADPH supply and GSH recycling for oxidative stress management in hepatoma and liver mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, Mexico, v. 1859, n. 10, p. 1138–1150, 2018.

MUELLER, D. et al. Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries. **Food Chemistry**, Alemanha, v. 231, p. 275–286, 2017.

NOVAES, R. D. et al. Depletion of enteroendocrine and mucus-secreting cells is associated with colorectal carcinogenesis severity and impaired intestinal motility in rats. **Microscopy Research and Technique**, Alfenas, v. 79, n. 1, p. 3–13, 2016.

NRC. **Nutrient Requirements of Laboratory Animals**,. 4. ed. Washington, D.C.: National Academies Press, 1995.

OCKERMANN, P. et al. A review of the properties of anthocyanins and their influence on factors affecting cardiometabolic and cognitive health. **Nutrients**, Alemanha, v. 13, n. 8, 2021.

OLAS, B. Berry Phenolic Antioxidants – Implications for Human Health? **Front. Pharmacol.** Polonia. v. 9, n. March, p. 1–14, 2018.

OLEJNIK, A. et al. ROS-modulating anticancer effects of gastrointestinally digested *Ribes nigrum* L. fruit extract in human colon cancer cells. **Journal of Functional Foods**, Polonia. v. 42, n. September 2017, p. 224–236, 2018.

OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? **Plant Physiology and Biochemistry**, Polonia. v. 144, p. 135–143, 2019.

OUYANG, W.; O’GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity**, Reino Unido, v. 50, n. 4, p. 871–891, 2019.

PAP, N. et al. Toxicological and bioactivity evaluation of blackcurrant press cake, sea buckthorn leaves and bark from Scots pine and Norway spruce extracts under a green integrated approach. **Food and Chemical Toxicology**, Finlandia, v. 153, n. May, 2021.

PINHEIRO, L. C. et al. Omeprazole impairs vascular redox biology and causes xanthine oxidoreductase-mediated endothelial dysfunction. **Redox Biology**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 134–143, 2016.

POPE, J. L. et al. Microbiota as a mediator of cancer progression and therapy. **Translational Research**, Florida, v. 179, p. 139–154, 2017.

PRADO-SILVA, L. et al. Sesame and resistant starch reduce the colon carcinogenesis and oxidative stress in 1,2-dimethylhydrazine-induced cancer in Wistar rats. **Food Research International**, Alfenas, v. 62, p. 609–617, 2014.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Indiana, v. 25, n. 6, p. 1268–1273, 1 Nov. 1977.

RAJU, J. Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: Relevance in studying chemoprevention of colon cancer. **World Journal of Gastroenterology**, Canada, v. 14, n. 43, p. 6632–6635, 2008.

RAMOS CAETANO, B. F. et al. Early molecular events associated with liver and colon sub-acute responses to 1,2-dimethylhydrazine: Potential implications on preneoplastic and neoplastic lesion development. **Toxicology Letters**, Botucatu, v. 329, n. May, p. 67–79, 2020.

REA, D. et al. Microbiota effects on cancer: from risks to therapies. **Oncotarget**, Italia, v. 9, n. 25, p. 17915–17927, 2018.

REJHOVÁ, A. et al. Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Republica Tcheca, v. 144, p.

582–594, 2018.

SALAMON, I. et al. Antiproliferative and Antimicrobial Activity of Anthocyanins from Berry Fruits after Their Isolation and Freeze-Drying. **Applied Sciences**, Eslováquia, v. 11, n. 5, p. 2096, 2021.

SALEHI, B. et al. The Therapeutic Potential of Anthocyanins: Current Approaches Based on Their Molecular Mechanism of Action. **Frontiers in Pharmacology**, China, v. 11, n. August, p. 1–20, 2020.

SANDELL, M. et al. Orosensory Profiles and Chemical Composition of Black Currant (*Ribes nigrum*) Juice and Fractions of Press Residue. **J. Agric. Food Chem**, Finlândia, v. 57, n. 9, p. 3718–3728, 2009.

SANTOS, J. S. et al. Optimized *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. **Food Chemistry**, Ponta Grossa, v. 254, n. January, p. 348–358, 2018.

SCHWINGSHACKL, L. et al. Adherence to mediterranean diet and risk of cancer: An updated systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, Alemanha, v. 9, n. 10, p. 1–24, 2017.

SCIRÈ, A. et al. Glutathione compartmentalization and its role in glutathionylation and other regulatory processes of cellular pathways. **BioFactors**, Itália, v. 45, n. 2, p. 152–168, 2019.

SEQUETTO, P. L. et al. Naringin accelerates the regression of pre-neoplastic lesions and the colorectal structural reorganization in a murine model of chemical carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, Viçosa, v. 64, p. 200–209, 2014.

SILVA-REIS, R. et al. An Integrative Approach to Characterize the Early Phases of Dimethylhydrazine-Induced Colorectal Carcinogenesis in the Rat. **Biomedicines**, Portugal, v. 10, n. 2, p. 1–19, 2022.

SUN, J.; KATO, I. Gut microbiota, inflammation and colorectal cancer. **Genes and Diseases**, Estados Unidos, v. 3, n. 2, p. 130–143, 2016.

SUN, T. et al. Evolutionary biologic changes of gut microbiota in an “adenoma-carcinoma sequence” mouse colorectal cancer model induced by 1, 2-dimethylhydrazine. **Oncotarget**, China, v. 8, n. 1, p. 444–457, 2017.

TABART, J. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ribes nigrum* extracts. **Food Chemistry**, Belgica, v. 131, n. 4, p. 1116–1122, Apr. 2012.

TAGLIAZUCCHI, D. et al. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, Italia, v. 120, n. 2, p. 599–606, 2010.

TENA, N.; MARTÍN, J.; ASUERO, A. G. State of the art of anthocyanins: Antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health. **Antioxidants**, Sevilla, v. 9, n. 5, 2020.

TIKKA, C. et al. Immune disruption occurs through altered gut microbiome and NOD2 in arsenic induced mice: Correlation with colon cancer markers. **Chemosphere**, China, v. 246, p. 125791, 1 May 2020.

VENKATACHALAM, K. et al. Biochemical and molecular aspects of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. **Toxicology Research**, Emirados Arabes Unidos, v. 9, p. 2–18, 2020.

WANG, L. S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Letters**, Ohio, v. 269, n. 2, p. 281–290, 2008.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Nova York, v. 55, n. 22, p. 8896–8907, 2007.

XU, Y. et al. Characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of degraded polysaccharides from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) fruits. **Food Chemistry**, China, v. 243, p. 26–35, 2018.

XUE, B. et al. Application, emerging health benefits, and dosage effects of blackcurrant food formats. **Journal of Functional Foods**, China, v. 95, p. 105147, 1 Aug. 2022.

YANG, W. et al. Enzymatic acylation of blackcurrant (*Ribes nigrum*) anthocyanins and evaluation of lipophilic properties and antioxidant capacity of derivatives. **Food Chemistry**, Finlandia, v. 281, n. October 2018, p. 189–196, 2019.

YANG, Z.; CAO, S.; HENG, Y. Chinese bayberry fruit extract alleviates oxidative stress and prevents 1,2-dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis. **Food Chemistry**, China, v. 125, n. 2, p. 701–705, 2011.

YAZAWA, K. et al. Anti-Inflammatory Effects of Seeds of the Tropical Fruit Camu-Camu (*Myrciaria dubia*). **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 57, n. 1, p. 104–107, 2011.

YU, D. et al. Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, China, v. 339, n. January, p. 129878, 2021.

ZHAO, M. et al. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolic compounds from *Ribes nigrum* L. and its antibacterial effect on foodborne pathogens. **Food Control**, China, v. 119, p. 107449, 2021.

ANEXOS

Aprovação CEUA

<p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG <small>Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005</small></p> <p>Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG</p>				
<h2 style="color: blue;">Certificado</h2>				
<p>Certificamos que a proposta intitulada EFEITOS ANTIOXIDANTES E ANTIPROLIFERATIVOS DE ANTOCIANINAS DE GROSELHA PRETA (RIBES NIGRUM L.) EM RATOS INDUZIDOS AO CÂNCER DE CÔLON., registrada com o nº 0011/2021, sob a responsabilidade de Luciana Azevedo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, com vigência de 01/03/2021 a 17/12/2021, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.</p>				
Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / Wistar	120	120	0	Biotério central da unifal-mg
Alfenas, 19 de Julho de 2022				
<p>Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG</p>				
<p><small>Para verificar autenticidade acesse: http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/ e digite a chave: f6c3674029653670688076beaaba91</small></p>				