Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Polifenóis não-extraíveis provenientes do guaraná
(*Paullinia cupana*): caracterização por MALDi-
TOF/TOF e avaliação do potencial e cinética de
inibição da alfa-glicosidase**

Ana Clara da Costa Pinaffi

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

Área de concentração: Nutrição

**Orientadora: Prof.^a. Dr.^a Elizabeth Aparecida
Ferraz da Silva Torres**

São Paulo

2018

**Polifenóis não-extraíveis provenientes do guaraná
(*Paullinia cupana*): caracterização por MALDi-TOF/TOF
e avaliação do potencial e cinética de inibição da alfa-
glicosidase**

Ana Clara da Costa Pinaffi

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

Área de concentração: Nutrição

**Orientadora: Prof.^a. Dr.^a Elizabeth Aparecida
Ferraz da Silva Torres**

Versão corrigida

São Paulo

2018

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

Aos meus pais, Ana Lúcia e Edézio,
Pelos quais tenho profunda admiração.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana e Edézio, que me proporcionaram a oportunidade de me dedicar aos estudos e constante apoio e incentivo.

À minha família, pelo apoio e incentivo.

Ao Derek, pelo companheirismo.

À Prof.^a Dr.^a Elizabeth Torres, pela oportunidade, orientação e confiança.

À Dr.^a Geni Sampaio, pelo suporte técnico e aprendizado.

À Dr.^a Rosana Soares, pelo suporte técnico e auxílio.

Às integrantes do grupo, Glória, Karina, Kelly, Maiara e Marcela, pela ajuda, apoio, bom-humor e amizade.

Ao Prof. Dr. Gianluca Azzellini, pelo apoio, aprendizado e mentoria desde a graduação.

Ao Marcos Vinícius Petri, pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Massuo Kato e Dr.^a Lydia Yamaguchi, por disponibilizarem seu tempo e equipamento.

À Faculdade de Saúde Pública da USP, pela oportunidade.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

RESUMO

PINAFFI ACC. Polifenóis não-extraíveis provenientes do guaraná (*Paullinia cupana*): caracterização por MALDi-TOF/TOF e avaliação do potencial e cinética de inibição da α -glicosidase. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: Polifenóis não-extraíveis (NEPPs) são uma fração de polifenóis que não são extraídos da forma convencional por estarem associados à parede celular de produtos de origem vegetal. Um corpo crescente de estudos tem evidenciado seus potenciais efeitos benéficos, especialmente associados à saúde intestinal e interações com a microbiota. O guaraná (*Paullinia cupana*), fruto típico da biota amazônica, é conhecidamente rico em polifenóis da família dos flavanóis, mas ainda existe uma lacuna a respeito da fração de polifenóis não-extraíveis em sua composição. **Objetivo:** Caracterizar a fração de polifenóis não-extraíveis quanto a sua composição química, e avaliar sua potencial capacidade de inibição enzimática. **Métodos:** O guaraná em pó foi submetido a extração aquo-orgânica para obtenção da fração extraível, e o resíduo proveniente dessa extração foi submetido a hidrólise ácida e hidrólise básica para obtenção dos NEPPs. A capacidade redutora total (CRT) foi quantificada pelo método de Folin-Ciocalteu. A quantificação de taninos condensados foi realizada pelo método de Porter. A determinação do perfil de fenólicos foi realizada por HPLC-ECD e LC-MS para as frações extraíveis e hidrolisáveis, e MALDi-TOF/TOF para a fração condensada. Os testes enzimáticos foram realizados com base na cinética de estado estacionário. Os testes estatísticos foram realizados utilizando *softwares* Excel e SPSS. **Resultados:** O perfil de fenólicos para a fração extraível consiste na presença de catequina e epicatequina como componentes majoritários, com $5,45 \pm 0,15$ e $5,95 \pm 0,22$ mg/g de guaraná em pó (base seca), respectivamente, além de proantocianidinas B1 e B2 e trímero de tipo A. Já o perfil fenólico da fração não-extraível contém uma mistura complexa de monômeros como catequina, leucoantocianidina, cianidina e delphinidina. A fração NEPP também contém dímeros, trímeros, tetrâmeros e pentâmeros de flavanóis, tanto de tipo A quanto de tipo B, com alta variabilidade de grau de hidroxilação. O ensaio enzimático com α -glicosidase resultou em valores de IC_{50} de 9,504 e 1,624 μ g EAG/mL para a fração extraível e a não-extraível, respectivamente. O modo de inibição para ambas as frações foi classificado como misto, com valores de K_i e K'_i de 0,403 e 1,735 μ g/mL para a fração extraível e 0,287 e 0,847 μ g/mL para a fração não-extraível. **Conclusões:** A fração de polifenóis não-extraíveis possui composição variada e complexa quando comparada a fração extraível, e possui potencial de inibição de α -glicosidase que deve ser explorado de maneira mais aprofundada, uma vez que tal potencial é de interesse para o controle de doenças crônicas como o diabetes tipo 2.

Palavras-chave: *Paullinia cupana*, polifenóis não-extraíveis, α -glicosidase, MALDi

ABSTRACT

PINAFFI ACC. [Non-extractable polyphenols from guarana (*Paullinia cupana*): MALDi-TOF/TOF characterization and evaluation of potential and kinetics of alpha-glucosidase inhibition] [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2018. Portuguese.

Introduction: Non-extractable polyphenols (NEPPs) are a portion of polyphenols that cannot be extracted in the conventional way due to being associated with the cell wall of products of plant origin. A growing number of studies have been showing its potential beneficial effects, especially in relation to gut health and microbiota interactions. The guarana (*Paullinia cupana*), a fruit native of the Amazon rainforest, is known to be rich in polyphenols from the flavanol family, but there is still a gap about non-extractable polyphenols in its composition. **Objective:** Characterize the non-extractable polyphenol portion in relation to its chemical composition and evaluate its enzymatic inhibition capacity. **Methods:** The extractable fraction was obtained by aqueous-organic extraction, and the residue from this extraction was treated with acid and alkaline hydrolysis to obtain the NEPPs. The total reducing capacity (TRC) was quantified by the Folin-Ciocalteu method. The quantification of condensed tannins was performed with the Porter method. The phenolic profile was determined by HPLC-ECD and LC-MS for the extractable and hydrolysable fractions, and MALDi-TOF/TOF for the condensed fraction. The enzymatic assay was carried out using steady-state kinetics. The statistical tests were performed using Excel and SPSS. **Results:** The phenolic profile of the extractable fraction consists of catechin and epicatechin as major components with $5,45 \pm 0,15$ and $5,95 \pm 0,22$ mg/g guarana powder (dry weight), respectively, besides B1 and B2 proanthocyanidins and type A trimer. The phenolic profile of the non-extractable fraction contains a complex mixture of monomers like catechin, leucoanthocyanidin, cyanidin, and delphinidin. The NEPP fraction also contains type A and type B dimers, trimers, tetramers, and pentamers of flavanols, with high variability of the degree of hydroxylation. The α -glucosidase enzymatic assay had IC_{50} values of 9,504 and 1,624 μ g GAE/mL for the extractable and non-extractable fraction, respectively. The mode of inhibition was classified as mixed for both fractions, with K_i and K'_i values of 0,403 and 1,735 μ g/mL for the extractable fraction and 0,287 and 0,847 μ g/mL for the non-extractable fraction. **Conclusions:** The non-extractable polyphenols fraction has a varied and complex composition when compared to the extractable fraction, and it has a α -glucosidase inhibition potential that must be explored in a more detailed fashion since said potential is of interest for the control of chronic diseases such as type 2 diabetes.

Keywords: *Paullinia cupana*, non-extractable polyphenols, α -glucosidase, MALDi

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
	1.1 O GUARANÁ.....	13
	1.2 POLIFENÓIS.....	19
	1.3 POLIFENÓIS NÃO-EXTRAÍVEIS.....	27
	1.4 DOENÇAS CRÔNICAS NÃO-TRANSMISSÍVEIS.....	35
	1.4.1 Diabetes, microbiota e polifenóis.....	37
2	JUSTIFICATIVA.....	38
3	OBJETIVOS.....	39
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
	4.1 MATERIAL.....	40
	4.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO.....	41
	4.2.1 Extração aquo-orgânica.....	41
	4.2.2 Liofilização e teor de umidade.....	41
	4.2.3 Hidrólise ácida.....	42
	4.2.4 Hidrólise básica.....	43
	4.2.5 Extração em fase sólida (SPE).....	43
	4.3 MÉTODOS DE <i>SCREENING</i>	44
	4.3.1 Capacidade Redutora Total.....	44
	4.3.2 Quantificação de taninos condensados.....	45
	4.4 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO PERFIL DE FENÓLICOS.....	46
	4.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	46
	4.4.2 Espectrometria de massas.....	47
	4.5 MÉTODO DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO.....	48
	4.5.1 Teste de inibição de α -glicosidase.....	48
	4.5.2 Determinação do modo de inibição.....	49
	4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
	5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	51
	5.1.1 <i>Screening</i>	51
	5.1.2 Perfil de fenólicos individuais.....	53
	5.1.3 MALDi.....	60
	5.2 TESTE ENZIMÁTICO.....	71

5.2.1	Determinação de IC ₅₀	71
5.2.2	Determinação do modo de inibição.....	74
6	CONCLUSÃO.....	83
7	REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICE		
1.	Curva de calibração do método de determinação da Capacidade Redutora Total.....	98
2.	Curva de calibração da quantificação de taninos condensados.....	99
3.	Curvas de calibração dos padrões utilizados na quantificação de fenólicos individuais.....	100
4.	Cromatograma representativo dos padrões injetados no HPLC-ECD.....	104
5.	Espectro de massas para os padrões utilizados na identificação de fenólicos individuais.....	105
CURRÍCULO LATTES		

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos recentes sobre os efeitos do guaraná na saúde.....	17
Tabela 2 – Estudos sobre a composição do guaraná.....	18
Tabela 3 – Estudos selecionados sobre efeitos de polifenóis na saúde dos últimos 5 anos.....	22
Tabela 4 - Estudos recentes sobre a influência de polifenóis na ativação de AMPK.....	27
Tabela 5 – Estudos sobre polifenóis não-extraíveis em diferentes matrizes vegetais.....	32
Tabela 6 - Estudos sobre efeitos de polifenóis não-extraíveis na saúde dos últimos 5 anos.....	35
Tabela 7 – Capacidade redutora total das diferentes frações de polifenóis.....	51
Tabela 8 – Quantificação de taninos condensados não-extraíveis do guaraná em pó.....	53
Tabela 9 – Quantificação de fenólicos individuais da fração extraível do guaraná em pó.....	54
Tabela 10 – Identificação de fenólicos individuais na fração extraível do guaraná em pó.....	55
Tabela 11 – Possíveis identidades de picos obtidos por MALDi-TOF da fração NEPA do guaraná em pó.....	70
Tabela 12 – Valores de Vmax e Km obtidos pela equação de Michaelis-Menten na ausência e presença de inibidores.....	77
Tabela 13 – Valores das constantes pertinentes a cinética de inibição para EPP e NEPA.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Descrição anatômica do guaranazeiro por Franz Eugen Köhler, 1897.....	13
Figura 2 - Guaraná in natura (esquerda) e guaraná em pó (direita).....	15
Figura 3 – Esquema simplificado da rota do ácido xiquímico a partir de fenilalanina.....	20
Figura 4 – Representação dos flavonoides e suas subclasses.....	21
Figura 5 – Representação da deslocalização responsável pela estabilização do radical fenoxila.....	24
Figura 6 – Representação de um flavanol (esquerda) e seu metabólito (direita).....	25
Figura 7 – Representação do processo de fosforilação catalisado por quinases.....	26
Figura 8 – Estruturas de polifenóis não-extraíveis: proantocianidina (esquerda) e ácido gálico e seu derivado (direita).....	28
Figura 9 – Esquema simplificado da biossíntese de proantocianidinas a partir de dihidroflavonol.....	29
Figura 10 – Estruturas químicas dos principais metabólitos provenientes de proantocianidinas e o intermediário ligado à sua obtenção.....	34
Figura 11 – Representação da relação entre DCNT, microbiota e dieta.....	36
Figura 12 – Desenho geral do estudo.....	40
Figura 13 – Cromatograma representativo dos polifenóis extraíveis do guaraná em pó.....	54
Figura 14 – Espectros de massas dos picos identificados na fração extraível do guaraná em pó.....	56
Figura 15 – Cromatograma representativo dos polifenóis hidrolisáveis do guaraná em pó.....	57
Figura 16 – Cromatograma em 280 nm da fração hidrolisável do guaraná em pó.....	58
Figura 17 – Cromatograma de íons para a fração hidrolisável do guaraná em pó.....	58
Figura 18 – Espectro de massas correspondente ao pico eluído em 2,0 minutos.....	59
Figura 19 – Espectros de massas correspondentes aos picos eluídos a 16,7 (acima) e 18,3 minutos (abaixo).....	59
Figura 20 – Espectros de massas obtidos por MALDI-TOF para a fração condensada do guaraná em pó (200 – 1400 Da).....	62
Figura 21 – Estrutura química dos monômeros constituintes de proantocianidinas e representação dos tipos de ligações A e B.....	63
Figura 22 – Estruturas químicas de flavanóis mono e di-hidroxilados.....	64
Figura 23 – Representação de reações de fragmentação e processos de aromatização.....	64

Figura 24 - Espectro de massas obtidos por MALDI-TOF para a fração condensada do guaraná em pó (200 – 400 Da).....	65
Figura 25 - Espectro de massas obtidos por MALDI-TOF para a fração condensada do guaraná em pó (460 – 660 Da).....	66
Figura 26 - Espectro de massas obtidos por MALDI-TOF para a fração condensada do guaraná em pó (780 – 880 Da).....	67
Figura 27 - Espectro de massas obtidos por MALDI-TOF para a fração condensada do guaraná em pó (1080 – 1190 Da).....	68
Figura 28 - Espectro de massas obtidos por MALDI-TOF para a fração condensada do guaraná em pó (700 – 4700 Da).....	69
Figura 29 – Curva dose-resposta da atividade inibitória da fração EPP.....	72
Figura 30 – Curva dose-resposta da atividade inibitória da fração NEPA.....	72
Figura 31 – Curva de saturação de α -glicosidase na ausência de inibidores.....	75
Figura 32 – Curva de saturação de α -glicosidase na presença de EPP.....	76
Figura 33 – Curva de saturação de α -glicosidase na presença de NEPA.....	77
Figura 34 – Representação esquemática da relação enzima, substrato e inibidor no modo de inibição misto.....	78
Figura 35 – Lineweaver-Burk plot na presença de EPP.....	79
Figura 36 – Lineweaver-Burk plot na presença de NEPA.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 O GUARANÁ

Profundamente enraizada na identidade cultural da população indígena da região de Maués, na Amazônia, a planta do guaraná possui sua própria lenda: a morte trágica de uma criança muito estimada, cujos olhos foram retirados e plantados por ordem de Tupã. A intervenção divina deu origem à planta e seu fruto, que quando maduro se abre a revelar um envoltório branco e uma semente negra em formato semelhante a um olho humano (NAZARE e FIGUEIREDO, 1982). A estória ajuda a entender a importância do fruto, não só como alimento, mas como parte da cultura indígena e patrimônio tipicamente brasileiro.

Figura 1 - Descrição anatômica do guaranazeiro por Franz Eugen Köhler, 1897¹

A domesticação do guaraná, mais especificamente *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, é amplamente creditada à tribo dos Sateré-Maué, povo indígena cujo território original é a bacia hidrográfica do rio Maués-Açu. Em sua tradição, o cultivo e o beneficiamento do guaraná, regionalmente conhecido como *fabrico*, é intimamente ligado à cultura social e religiosa da

¹ Köhler's Medizinal-Pflanzen - List of Koehler Images, Domínio público.
[<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=255591>, março de 2018].

tribo e possui ritual específico: o guaraná em bastão é ralado em pedra ou língua de pirarucu sobre uma cuia com água, tarefa exclusivamente feminina, que é então passada de mão em mão para o consumo da bebida resultante, conhecida como *capó* (LORENZ, 2015).

Os primeiros relatos do consumo de guaraná pelos índios foram feitos pelo padre jesuíta Betendorf, que chegou a equiparar o valor do fruto para o povo indígena com o valor do ouro para o homem branco. Ele notou que a bebida à base de guaraná era utilizada pelo indígena como fonte de energia durante caças e pescas, e também como tratamento para dor de cabeça e febre, além de diurético. Já no período colonial, o comércio do guaraná se intensificou, sendo vendido como fortificante, estimulante, tônico, e como anti-diarréico, com a ressalva de que o excesso de consumo poderia levar à insônia e tontura. Foi somente no início do século 20 que o guaraná foi introduzido no país como bebida gaseificada, a partir do qual passou de bebida caseira e regional a sinônimo de refrigerante em todo o território nacional (SMITH e ATROCH, 2010).

O Brasil detém a exclusividade da produção comercial de guaraná, que possui uma produtividade média de 298 kg por hectare, o que é considerado um valor baixo. A principal razão para a baixa produtividade é a forma de cultura: o plantio a partir de sementes produz plantas de alta variabilidade genética e baixa resistência a doenças e pragas. Como forma de solucionar o problema, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) vem trabalhando no melhoramento genético da planta, com o plantio a partir de estacas provenientes de clones selecionados e resistentes a doenças (GOSS, 2017).

A baixa produtividade é um problema em especial no estado do Amazonas - apesar de ser o berço do cultivo do guaraná, acredita-se que exista maior resistência a adoção de técnicas de plantio modernas, o que mantém a produção relativamente baixa e os custos elevados. Dessa forma, atualmente, a Bahia assumiu o posto de maior estado produtor de guaraná do país, tendo produzido 1539 toneladas da semente do fruto em 2017, enquanto o estado do Amazonas produziu 854 toneladas no mesmo período (IBGE, 2017).

De forma geral, o processo de beneficiamento do guaraná pode ser resumido da seguinte maneira: a colheita é feita manualmente, cortando-se os cachos inteiros quando os frutos estão maduros, ou seja, quando estão abertos, expondo a polpa e a semente. Depois de colhido, o fruto sofre leve fermentação para subsequente retirada da casca e despulpamento. Em seguida, as sementes são lavadas, peneiradas e torradas. O processo de torrefação leva tempo variado, uma vez que diferentes produtos necessitam de diferentes pontos de torra, ou porcentagem de umidade (SEBRAE, 2016). Especificamente para a produção do guaraná em pó, o casquilho da

semente é retirado, de forma a restar somente a amêndoa do guaraná, que é então transformada em pó por esmagamento em moinho de pedra (SUFRAMA, 2003).

Figura 2 - Guaraná *in natura* (esquerda) e guaraná em pó (direita)

O guaraná é processado e comercializado na forma de bastão, xarope, extrato e pó, sendo o xarope e o pó as formas mais populares. O mercado interno absorve a maior parte da produção e cerca de 70% é destinada a fabricação de bebidas gaseificadas (SEBRAE, 2016). Além do vasto consumo na forma de refrigerante, o guaraná também está presente em bebidas energéticas, tanto nas formas industrializadas quanto em receitas caseiras, geralmente em associação com outros alimentos como açaí e ginseng, e pode ser comumente encontrado em lojas de produtos naturais.

A primeira análise química do guaraná remonta ao século 18, quando o botanista alemão Theodore von Martius isolou a cafeína de sua composição, batizada primeiramente de guaranina. A cafeína presente no guaraná está usualmente associada a outros compostos, como os taninos, o que levou o botanista a acreditar se tratar de um novo composto, e é justamente essa associação a que se credita o efeito estimulante duradouro característico do fruto (SCHIMPL et al., 2013). Quando comparado a outros alimentos populares por seu teor de cafeína, o guaraná se destaca de forma indiscutível: enquanto o café expresso, o chocolate amargo e o chá preto possuem, em média, 212 mg/100 g, 43 mg/100 g e 20 mg/100 g de cafeína em sua composição, respectivamente, o guaraná em pó apresenta cerca de 4 g/100 g de cafeína (USDA, 2018; YONEKURA et al., 2016).

Dessa forma, a cafeína e seus efeitos se tornaram, então, o foco dos estudos relacionados ao fruto por um longo período. KENNEDY et al. (2004) e HASKELL et al. (2007) demonstraram os efeitos psicoativos do guaraná em humanos saudáveis, como aumento da performance cognitiva, melhora na velocidade de atenção e de recuperação de informação, e melhora da memória secundária, mas com a ressalva de que os níveis de cafeína nos extratos

utilizados eram muito baixos para se atribuir os efeitos observados somente à cafeína. Similarmente, RUCHEL et al. (2016) demonstraram que o guaraná foi capaz de modular a atividade enzimática de ratos em estado de hipercolesterolemia, enquanto a mesma dose de cafeína isoladamente não teve essa capacidade. Dessa forma, os estudos sugerem que os efeitos do guaraná advêm de uma complexa interação sinérgica entre seus vários componentes, e não somente de seu teor de cafeína.

Diversos estudos demonstram que os efeitos do guaraná na saúde são bastante diversos. CAMPOS et al. (2011) avaliaram o efeito do guaraná na fadiga de pacientes com câncer de mama em tratamento quimioterápico em um estudo *crossover* randomizado e controlado por placebo. Após 21 e 49 dias de intervenção, os marcadores de fadiga melhoraram significativamente, sem relatos de efeitos adversos. KREWER et al. (2011) avaliaram a associação entre o consumo habitual de guaraná por idosos e marcadores antropométricos e biomarcadores para distúrbios metabólicos através de um estudo epidemiológico do tipo caso-controle. A prevalência de hipertensão, obesidade e síndrome metabólica foi menor no grupo que consumia guaraná regularmente do que no grupo que não o consumia, indicando um potencial efeito sistemático benéfico.

Mais recentemente, LIMA et al. (2018) estudaram os efeitos do guaraná na biogênese mitocondrial de ratos que receberam uma dieta rica em gordura. O grupo no qual o guaraná foi administrado apresentou menor peso corporal, menores índice glicêmico e nível de triglicerídeos, assim como níveis de colesterol estáveis. Além disso, o grupo apresentou maior gasto de energia basal e um aumento de DNA mitocondrial nos músculos, demonstrando o impacto do consumo de guaraná no metabolismo energético. A Tabela 1 sumariza estudos relacionados ao efeito do guaraná na saúde.

Concomitantemente aos estudos que se debruçaram sobre os efeitos do guaraná, diversas investigações foram realizadas a respeito de sua composição. A composição centesimal do guaraná em pó se diferencia significativamente das outras partes do fruto. O teor de umidade é bastante reduzido, enquanto os teores de carboidratos e proteínas é maior se comparado à polpa, casca e semente. O teor de fibras totais, no entanto, corresponde a cerca de metade do encontrado na semente (ANTUNES, 2011).

Tabela 1 – Estudos recentes sobre os efeitos do guaraná na saúde

Referência	Efeito	Tipo de estudo	Dosagem de guaraná	Duração
Arantes et al. (2018)	Efeito anti-envelhecimento	Modelo animal	100, 500 e 1000 µg/mL	Variada
Boasquívís et al. (2018)	Proteção para Alzheimer e doença de Huntington	Modelo animal	5, 10 e 50 mg/mL	Variada
Ferrini et al. (2018)	Tratamento para disfunção erétil	Modelo animal	0,9 mg/mL	24 horas
Bonadiman et al. (2017)	Proteção para danos à retina	Modelo celular	25, 30, 50, 100, 250 e 500 µg/mL	54 horas
Lima et al. (2017)	Modulação da adipogênese	Modelo celular	150 µg/mL	96 horas
Kober et al. (2016)	Efeito hepatoprotetor	Modelo animal	100, 300 e 600 mg/kg do animal	14 dias
Yonekura et al. (2016)	Redução de estresse oxidativo	Intervenção em humanos	3 g/dia	30 dias
Machado et al. (2015)	Medicina regenerativa	Modelo celular	1, 5, 10 e 20 mg/mL	72 horas
Veasey et al. (2015)	Melhora de performance física	Intervenção em humanos	222,2 mg	11 dias
Bittencourt et al. (2014)	Proteção para doenças neurodegenerativas	Modelo celular	10, 100 e 1000 µg/mL	Variada
Krewer et al. (2014)	Efeito anti-inflamatório	Intervenção em humanos	90 mg/dia	14 dias
Basile et al. (2013)	Antifúngico e antibactericida	Modelo celular	0,01 - 1000 µg/mL	Variada
Portella et al. (2013)	Redução de oxidação de LDL	Estudo em humanos	N/A	N/A

N/A = não aplicável

ÂNGELO et al. (2008) identificaram marcadores de sequência genética (da sigla em inglês, ESTs) que podem estar envolvidos nos efeitos biológicos da planta. Relembrando o destaque do guaraná em seu teor de cafeína, foram identificados 94 ESTs relacionados ao metabolismo de alcaloides purínicos. Similarmente, foram identificados 129 ESTs relacionados ao metabolismo de flavonoides, incluindo marcadores para expressão de enzimas essenciais para a biossíntese de catequina/epicatequina, como *Dihydroflavonol 4-reductase* e *Anthocyanidin synthase*. De fato, os polifenóis de maior representatividade encontrados no guaraná são a catequina e seu isômero, epicatequina, além de proantocianidinas B1 e B2 (YONEKURA et al., 2016). A Tabela 2 lista diversos estudos a respeito da composição do guaraná.

Tabela 2 – Estudos sobre a composição do guaraná

Compostos	Produto	Resultados	Métodos	Referência
Polissacarídeos	Pó	28,9 - 16,1%	Extração com DMSO	Dalonso e Petkowicz (2014)
Ácidos graxos	Óleo da semente	Ácidos oleico, <i>cis</i> -vacênico, <i>cis</i> -11-eicosenoico e linoleico	GC, GC-MS	Avato et al. (2003)
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	Semente torrada	Naftaleno: 0,13 - 1,54 µg/kg de amostra	HPLC-DAD/FLD	Veiga et al. (2014)
Elementos-traço	Pó	Mn: 20 µg/g de amostra Ni: 3,57 µg/g de amostra Rb: 26,7 µg/g de amostra Sr: 44,4 µg/g de amostra	HR-CS AAS	de Gois et al. (2016)
Alcalóides purínicos	Pó	Teobromina: 0,02% Teofilina: 0,01% Cafeína: 2,94%	HPLC-PDA	Machado et al. (2018)
	Pó	Teobromina: 0,03% Teofilina: 0,06% Cafeína: 3,95%	HPLC-DAD	Sousa et al. (2010)
	Pó	Catequina: 0,46% Epicatequina: 0,55% PA2: 0,06% PB2: 0,10%	HPLC-PDA	Machado et al. (2018)
Polifenóis	Pó	Catequina: 11,6 - 5,2 mg/g de amostra Epicatequina: 9,2 - 3,7 mg/g de amostra	UPLC-MS/MS	da Silva et al. (2017)
	Pó	Catequina + Epicatequina: 4,6 mg/g de amostra	Enzimático-Espectrofotométrico	Dias et al. (2017)
	Pó	Catequina: 30 mg/g de amostra Epicatequina: 20,2 mg/g de amostra PB1: 3,72 mg/g de amostra PB2: 3,37 mg/g de amostra	HPLC-ECD	Yonekura et al. (2016)

1.2 POLIFENÓIS

Polifenóis são produtos relacionados ao metabolismo secundário de plantas. Metabólitos secundários são definidos como compostos que não possuem função essencial no crescimento e reprodução vegetal e, portanto, não são incluídos nos processos de metabolismo primário. Eles possuem funções específicas, como proteção contra patógenos, sinalização para atração de insetos e animais, e regulação hormonal. Apesar de não estarem envolvidos diretamente nos processos essenciais para manutenção da vida do organismo vegetal, metabólitos secundários são fonte de produtos naturais de interesse farmacológico e vem sendo explorados antes mesmo do surgimento da medicina moderna (TAIZ et al., 2014).

A definição do termo “polifenóis” se origina tradicionalmente de sua estrutura, cuja característica marcante é a presença de um ou mais anéis benzênicos com substituintes hidroxila, e de sua capacidade de precipitar proteínas, capacidade esta que deu origem ao termo “tanino”, também utilizado para se referir a polifenóis. Com a intensificação de pesquisas na área, a definição foi constantemente revisitada. Apesar de não existir um consenso, a definição mais comum propõe que o termo polifenol seja utilizado para se referir a metabólitos secundários de plantas derivados exclusivamente das rotas do ácido xiquímico e/ou malônico (QUIDEAU et al., 2011).

A rota do ácido xiquímico (Figura 3), envolvida na biossíntese de polifenóis, converte produtos do metabolismo primário - mais especificamente provenientes da glicólise e da via da pentose-fosfato - em fenilalanina, que marca então o início da complexa sequência de etapas para dar origem a vários compostos. A atividade de enzimas relacionados a esse processo está intimamente relacionada com fatores ambientais, como exposição à luz solar e níveis de nutrientes. Dessa forma, plantas iguais, mas que foram cultivadas em condições diferentes, podem exibir um perfil de compostos fenólicos bastante variado (LATTANZIO, 2013; TAIZ et al., 2014).

Figura 3 – Esquema simplificado da rota do ácido xiquímico a partir de fenilalanina

Tantas possibilidades se traduzem em uma imensa variabilidade e complexidade de estruturas, que vão desde os relativamente simples derivados de ácido benzoico, até intrincadas estruturas poliméricas. Polifenóis podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química em quatro classes: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas. Considerando apenas a classe dos flavonoides, estima-se que tenham sido identificadas mais de 8000 estruturas (LATTANZIO, 2008).

A classe dos flavonoides é a mais comumente presente em frutas, vegetais e hortaliças, o que consequentemente a torna a classe mais estudada, especialmente na área de química dos alimentos e nutrição. Flavonoides são divididos em subclasses de acordo com alterações no heterociclo: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianidinas e flavanóis (Figura 4). Adicionalmente, as próprias subclasses possuem variações estruturais com base no grau de substituição dos anéis. Os compostos também podem aparecer na forma de derivados metilados

ou em associação com outras moléculas, como sacarídeos, proteínas e ácidos carboxílicos (BELSCAK-CVITANOVIC et al., 2018).

Figura 4 – Representação dos flavonoides e suas subclasses

Ao longo das últimas décadas, polifenóis foram sistematicamente estudados pela sua capacidade de retardar o aparecimento de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), como diabetes, doenças cardiovasculares e neurológicas. A incidência dessas doenças é associada com os efeitos oxidantes de diversas espécies reativas (ERs) aos quais o organismo está exposto, tanto de origem endógena como exógena, processo conhecido como estresse oxidativo. O estresse oxidativo e a formação de ERs, bem como os mecanismos de remoção e controle dessas espécies – a rede de defesa antioxidante –, compõe a manutenção do estado de homeostase celular. Por outro lado, níveis excessivos de ERs podem causar danos a componentes celulares, como peroxidação de lipídeos e oxidação de proteínas e DNA, e são justamente esses efeitos que são relacionados com o processo de envelhecimento e o aparecimento de doenças (LOSADA-BARREIRO e BRAVO-DÍAZ, 2017). A Tabela 3 relaciona estudos sobre efeitos dos polifenóis provenientes de diferentes matrizes alimentares dos últimos 5 anos.

Tabela 3 – Estudos selecionados sobre efeitos de polifenóis na saúde dos últimos 5 anos

Referência	Fonte alimentar	Classe de polifenóis	Efeitos	Tipo de estudo
Sun et al. (2018)	Chás verde, preto e oolong	Flavanóis	Modulação da microbiota intestinal	Modelo celular
Hilbig et al. (2018)	Casca da noz pecã	Ácidos fenólicos e flavanóis	Efeito antiproliferativo de células cancerígenas	Modelo celular
Scarano et al. (2018)	Tomate	Flavonóis, antocianinas e estilbenóides	Tratamento de Síndrome do Intestino Irritável	Modelo animal
Giampieri et al. (2017)	Morango	N/E	Efeito anti-envelhecimento	Modelo animal
Vazquez-Calvo et al. (2017)	Composto isolado	Flavanóis e antocianidinas	Efeito anti-viral	Modelo celular
Othman et al. (2017)	Composto isolado	Flavanóis	Tratamento para parada cardíaca	Modelo animal
Collins et al. (2016)	Uva	Antocianinas e proantocianidinas	Proteção para efeitos de alto consumo de gorduras	Modelo animal
Zhang et al. (2016)	Batata-doce roxa	Antocianinas	Modulação da microbiota intestinal	In vitro
Anhe et al. (2015)	Cranberry	Ácidos fenólicos, flavonóis, antocianinas e proantocianidinas	Proteção para obesidade	Modelo animal

Tabela 3 – Estudos sobre efeitos de polifenóis na saúde dos últimos 5 anos (continuação)

Referência	Fonte alimentar	Classe de polifenóis	Efeitos	Tipo de estudo
Vitaglione et al. (2015)	Trigo integral	Ácidos fenólicos	Redução de inflamação	Intervenção em humanos
Espley et al. (2014)	Maça	Antocianinas, flavanóis e flavonóis	Redução de marcadores de inflamação	Modelo animal
Alvarez-Suarez et al. (2014)	Morango	Antocianinas	Redução de risco cardiovascular	Intervenção em humanos

N/E = não especificado

A importância dos polifenóis como antioxidantes dietários é atribuída a sua capacidade de doar hidrogênio e de quelar metais de transição como ferro e cobre. De fato, muitos estudos *in vitro* confirmaram diversos polifenóis como potentes antioxidantes, protegendo células e DNA de sofrer dano oxidativo, mesmo que os mecanismos pelos quais eles agem não estejam claramente elucidados (LEANDERSON et al., 1997; PENG e KUO, 2003; SEVGI et al., 2015). Além de estudos *in vitro*, também foram realizados diversos estudos *in vivo*, majoritariamente com o intuito de confirmar os efeitos benéficos para a saúde humana dos polifenóis e, posteriormente, formular uma recomendação diária de ingestão de tais compostos. Os resultados, entretanto, são contraditórios e sua relevância ainda é discutida (HALLIWELL, 2008; HOLLMAN et al., 2011).

GROSSO et al. (2017) avaliaram as evidências a respeito da associação entre consumo de flavonoides e risco de câncer em humanos através de meta-análise de estudos observacionais. Os resultados foram considerados inconclusivos e os autores destacaram a necessidade de novos estudos de coorte prospectiva, assim como métodos mais precisos de avaliação de consumo de flavonoides para determinação de níveis mínimos de exposição para efeito na saúde. GARCÍA-CONESA et al. (2018) realizaram uma meta-análise a respeito do nível de evidência do efeito de alimentos ricos em elagitaninos e antocianinas em biomarcadores cardiovasculares. Os resultados incluem evidências significativas para redução de pressão arterial, circunferência da cintura e níveis de colesterol LDL e glicose em indivíduos com sobrepeso ou obesos, porém sem evidências de efeito em indivíduos com peso normal. Por fim, SOMERVILLE et al. (2016) avaliaram as evidências sobre o efeito de flavonoides em infecções do trato respiratório e função imune através de meta-análise de estudos intervencionais. Os resultados incluem efeito positivo na redução da incidência de infecções respiratórias, embora não tenha sido verificado efeito significativo nos biomarcadores do sistema imunológico.

A visão clássica a que se atribui os efeitos dos polifenóis está baseada em suas características estruturais, marcadamente a presença do anel aromático B dihidroxilado, como pode ser visto na Figura 4. O radical fenoxila formado pela remoção de um hidrogênio é estabilizado pela deslocalização do elétron desemparelhado ao redor do anel aromático, conforme é ilustrado na Figura 5. A dihidroxilação presente no anel B também é responsável pela capacidade de quelar metais de transição, na qual a adjacência das substituições é fundamental para a complexação com íons metálicos (RICE-EVANS, 1995). No entanto, a visão clássica dos mecanismos pelos quais os polifenóis exercem seus efeitos na saúde humana acaba oferecendo uma visão demasiadamente simplista, além de não levar em consideração dois pontos principais que trazem uma camada extra de complexidade para o problema.

Figura 5 – Representação da deslocalização responsável pela estabilização do radical fenoxila

A capacidade antioxidante, especialmente aquela atribuída a capacidade de sequestrar espécies reativas através de doação de hidrogênio, está diretamente ligada ao potencial redox da espécie em questão, isto é, a tendência da espécie química de receber ou doar elétrons, sendo consequentemente reduzida ou oxidada, respectivamente. No organismo humano, os polifenóis ingeridos serão em sua maior parte metabolizados. Dessa forma, a espécie que atinge a circulação e os tecidos-alvo não são as mesmas espécies que foram ingeridas e seu potencial redox é significativamente alterado. Uma das modificações mais comuns é a metilação do agrupamento hidroxila presente no anel B, conforme ilustrado na Figura 6. Tal alteração altera o elemento-chave presente na visão clássica, impactando a habilidade do metabólito de sequestrar espécies reativas e complexar metais que o composto original exibia (WILLIAMS et al., 2004).

Figura 6 – Representação de um flavanol (esquerda) e seu metabólito (direita)

Outro fator associado à disparidade entre os estudos *in vitro* e *in vivo* é a baixa absorção dos compostos fenólicos pelo organismo, o que impossibilita que níveis fisiologicamente relevantes desses compostos sejam atingidos no plasma e tecidos-alvo nos quais eles poderiam exercer sua função antioxidante - em outras palavras, no complexo ambiente fisiológico da célula, os compostos devem ser cineticamente competitivos e sua concentração no seu possível local de ação influencia diretamente nessa competitividade (WINTERBOURN, 2008). Quando comparado a outras espécies que reconhecidamente compõe a defesa antioxidante celular, como ácido ascórbico e α -tocoferol, a diferença de concentração é de, no mínimo, 3 ordens de grandeza – polifenóis atingem tipicamente concentrações na faixa de nano molar, enquanto outras espécies chegam a micro molar (HALLIWELL et al., 2005).

Os efeitos benéficos do consumo de alimentos como frutas, verduras, hortaliças, grãos e nozes são bem estabelecidos – desafiar a visão clássica na qual se baseava o efeito de polifenóis não é desafiar a importância desses alimentos e sua inclusão em uma dieta saudável, mas sim reconhecer a complexidade dos compostos em questão e a matriz alimentar em que se encontram, além de levar em conta efeitos sinérgicos entre seus diversos componentes. Por esses motivos, a visão clássica vem sendo substituída com o auxílio de um crescente corpo de evidências sobre o papel que polifenóis podem exercer na regulação de sinais celulares.

Polifenóis podem interagir com diversos componentes celulares, modulando efeitos cascata em diversas rotas de sinalização. Eles podem se ligar diretamente a proteínas e lipídeos presentes na membrana celular e interagir com receptores, dando início a processos de sinalização celular. Além disso, podem inibir fatores de transcrição, influenciando a expressão gênica. Um dos efeitos mais estudados, no entanto, é a modulação de mensageiros secundários no meio intracelular, como peróxido de oxigênio, cálcio, monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). Em especial, o aumento na presença de cAMP pode levar à ativação de proteína quinase AMP-dependente, ou AMPK, processo que

vem sendo estudado como importante alvo para controle de doenças como diabetes, câncer e doenças cardiovasculares (WILLIAMS et al., 2004; HWANG et al., 2009; KIM et al., 2014).

Quinases são parte da família de enzimas conhecidas como fosfotransferases, que catalisam a transferência de grupos fosfato provenientes de ATP para substratos como lipídeos, proteínas e carboidratos (Figura 7). Proteína quinase, portanto, é específica para modificações em proteínas. O grau de fosforilação de um substrato afeta sua reatividade e atividade e, por ser um processo reversível, é uma ferramenta utilizada na regulação celular, respondendo a sinais extracelulares. AMPK é tipicamente ativada quando ocorre uma diminuição nos níveis de ATP e, consequentemente, modula positivamente rotas de geração de ATP, como glicólise, β -oxidação e lipólise, além de modular negativamente rotas de consumo de ATP, como gliconeogênese, síntese de colesterol e síntese de proteínas (NELSON e COX, 2012).

Figura 7 – Representação do processo de fosforilação catalisado por quinases

LIU et al. (2018) investigaram o mecanismo de polifenóis provenientes de rosa rugosa no controle de dislipidemia em ratos diabéticos. Após 4 semanas de tratamento, os ratos que receberam o tratamento tiveram níveis de colesterol hepático e triglicérides reduzidos, além de níveis elevados de lipase. Tais efeitos foram atribuídos a um aumento da expressão de FGF21, uma proteína que estimula a absorção de glicose em adipócitos, causado pela presença dos polifenóis, e consequente ativação de AMPK no fígado dos animais. ZHAO et al. (2018) avaliaram o efeito de polifenóis da framboesa na resposta inflamatória de ratos obesos. Foram utilizadas duas linhagens de ratos: uma normal e outra deficiente na subunidade catalítica da AMPK. Os efeitos protetores da framboesa só foram observados na linhagem normal, indicando a importância da presença de AMPK. Outros estudos específicos sobre AMPK estão relacionados na Tabela 4.

Tabela 4 - Estudos recentes sobre a influência de polifenóis na ativação de AMPK

Referência	Classe de polifenóis	Doença associada
Saenz et al. (2018)	Flavonona	Aterosclerose
Tain et al. (2018)	Flavonoides	Hipertensão e doenças renais
Xu et al. (2018)	Ácidos fenólicos e flavonoides	Doença hepática gordurosa não alcoólica
Giovannini e Bianchi (2017)	Ácidos fenólicos e flavonoides	Variada
Zhao et al. (2017)	Flavonoides	Inflamação associada a obesidade
Cordero-Herrera et al. (2015)	Flavanóis	Doenças hepáticas
Gonzalez et al. (2015)	Flavanóis	Diabetes tipo 2

Outra característica associada à visão clássica sobre polifenóis é a utilização exclusivamente da fração atualmente conhecida como “extraível”, ou “solúvel”. Desde o início dos estudos sobre polifenóis, a porção utilizada e aquela considerada como representativa do teor de polifenóis em diversas fontes vegetais é a fração extraível em solvente aquo-orgânico. Essa extração gera um resíduo que é majoritariamente descartado e é justamente nesse descarte que se encontram os polifenóis não-extraíveis (em inglês, NEPPs – *Non-extractable polyphenols*, também referido como *Insoluble-bound*).

1.3 POLIFENÓIS NÃO-EXTRAÍVEIS

Os estudos sobre polifenóis como compostos bioativos mais abundantes na dieta humana vêm gerando um grande volume de estudos, incluindo investigações sobre o conteúdo total e perfil individual de compostos fenólicos em diversas matrizes alimentares. Todavia, a maior parte desses estudos utiliza a fração extraível (em inglês, EPPs – *Extractable polyphenols*) – ou seja, a fração obtida por extração aquo-orgânica – como representativa do total de polifenóis presentes em dada amostra. Os NEPPs, por sua vez, permanecem retidos no resíduo sólido da extração, em grande parte associados a macromoléculas e/ou a parede celular vegetal, e consequentemente ignorados ou considerados não-representativos (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2014).

PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO (2015) avaliaram a contribuição dos polifenóis não-extraíveis na composição de frutas e verduras comumente consumidas em

algumas regiões da Europa. Os resultados mostraram que essa fração contribui majoritariamente para o teor total de polifenóis, com uma média de 57% e valores chegando a 92% para alimentos como a banana e 78% para a acelga, demonstrando que a contribuição dos NEPPs está longe de ser irrelevante.

Os polifenóis não-extraíveis podem ser classificados em dois tipos: taninos condensados e polifenóis hidrolisáveis. Taninos condensados são oligômeros ou polímeros cuja unidade monomérica básica é constituída de flavan-3-ol. Essas moléculas de alto peso molecular podem estar adsorvidas à parede celular ou associadas a macromoléculas, como proteínas e carboidratos, bem como suas unidades monoméricas podem estar aciladas ou glicosiladas. Polifenóis hidrolisáveis, por sua vez, são derivados de ácidos fenólicos, como ácido gálico e ácido elágico, que também estão presentes em associação com açúcares, como glicose, e existem em tamanhos variados (DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2017). A Figura 8 exemplifica as estruturas químicas de cada tipo apresentado.

Figura 8 – Estruturas de polifenóis não-extraíveis: proantocianidina (esquerda) e ácido gálico e seu derivado (direita)

Como polifenóis em geral, a biossíntese desses compostos está relacionada à rota do ácido xiquímico e malônico. Apesar do caminho percorrido até a formação dos precursores de proantocianidinas estar bem elucidado, ainda não há consenso sobre como o processo de condensação dos oligômeros e polímeros ocorre de fato nas plantas (Figura 9). Uma das hipóteses envolve a formação de proantocianidinas via catálise ácida, sem a participação de enzimas, porém ainda existem muitas dúvidas a respeito de pontos-chave dos mecanismos propostos (HE et al., 2008).

Figura 9 – Esquema simplificado da biossíntese de proantocianidinas a partir de dihidroflavonol

DFR = dihidroflavonol 4-redutase; ANS = antocianidina sintase; ANR = antocianidina redutase; LAR = leucoantocianidina redutase

Os polifenóis estão presentes majoritariamente no vacúolo celular, portanto, na planta intacta, tais compostos e polissacarídeos não estão em contato direto. Porém, no momento em que ocorre ruptura da parede celular – via processamento térmico, mastigação, maceração, etc. – eles interagem rapidamente, formando complexos estáveis. A natureza dessa interação é não-covalente – polifenóis são adsorvidos à parede celular pela formação de ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas (RENARD et al, 2017).

LE BOURVELLEC et al. (2005) demonstraram que a afinidade entre polifenol e polissacarídeo é influenciada pela estrutura do último, sendo que a fração pectina da parede celular possui a maior afinidade quando comparada à celulose e xiloglucano, todos componentes da parede celular de frutas e vegetais. Esse efeito foi atribuído a maior flexibilidade da estrutura da pectina, bem como a presença de grupos metila e propila, os quais proporcionam uma zona hidrofóbica capaz de encapsular os compostos fenólicos em questão. Similarmente, BINDON et al. (2010) investigaram o efeito do tamanho e composição dos polifenóis na formação dos complexos com polissacarídeos. Os resultados indicam uma relação

direta entre tamanho do polifenol e afinidade para formação do complexo, ou seja, quanto maior o polifenol, maior a afinidade. Esta observação está de acordo com as definições de polifenóis extraíveis e não-extraíveis: moléculas de menor peso molecular são majoritariamente extraídas da maneira tradicional, enquanto moléculas de maior peso molecular, como proantocianidinas, ficam adsorvidas à parede celular. O efeito observado foi atribuído ao aumento de regiões disponíveis para formação de ligação de hidrogênio e aumento do caráter hidrofóbico da proantocianidina, o qual também é influenciado pelo grau de esterificação com ácido gálico dos monômeros que compõe o polímero ou oligômero.

A interação entre polifenóis e proteínas, por sua vez, ocorre de maneira similar à interação com polissacarídeos utilizando uma combinação de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Porém, enquanto a adsorção do polifenol à parede celular é tida como um processo rápido, a formação dos complexos com proteínas é um processo em etapas, que pode levar a formação de agregados e coloides, causando a precipitação da proteína. FRAZIER et al. (2010) mostraram que a interação com proteínas também depende diretamente do peso molecular dos polifenóis em questão, embora tanto monômeros quanto proantocianidinas exibirem interações de caráter exotérmico e envolvendo múltiplos pontos de ligação.

Dessa forma, devido a interação entre os polifenóis não-extraíveis e outros componentes da matriz na qual se encontram, a investigação dos NEPPs apresenta o desafio de utilizar métodos de extração apropriados para obtê-los. Os métodos mais comumente utilizados envolvem diferentes tipos de hidrólise e resultam em diferentes graus de degradação dos compostos poliméricos. De forma geral, a análise de NEPPs inclui uma etapa de *clean-up* na qual é feita uma extração aquo-orgânica convencional com o intuito de remover a fração EPP, e subsequente liofilização do resíduo obtido dessa primeira etapa para posterior utilização com os métodos de extração específicos, os quais são descritos a seguir (PÉREZ-JIMÉNEZ e TORRES, 2011; DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2017):

1. *Hidrólise ácida.* A hidrólise ácida consegue quebrar ligações glicosídicas, não tendo efeito em ligações do tipo éster. O método mais comum é a metanólise, onde os resíduos são submetidos à hidrólise com metanol e ácido sulfúrico, em uma proporção de 10:1 (v:v), respectivamente. As variáveis de maior impacto nesse método são a temperatura, tempo de reação e proporção entre resíduo e fase líquida. CHENG et al. (2014) determinaram as condições ótimas para extração de NEPPs provenientes de mirtilo: 74°C, 22,7h de reação e proporção de 1:20,7 sólido:líquido. É importante notar que diferentes matrizes terão diferentes condições ideais de extração, sendo que um dos métodos mais reconhecidos utiliza condições de 85°C

e 20h de reação (HARTZFELD et al., 2002). A hidrólise ácida pode causar perda parcial de compostos fenólicos devido à degradação, e é mais comumente utilizada para análise de polifenóis hidrolisáveis.

2. *Hidrólise básica.* A hidrólise básica age de maneira a quebrar ligações éster e solubilizar o material da parede celular. O método mais utilizado envolve o uso de hidróxido de sódio diluído, porém com grande variabilidade na concentração de base, tempo de reação e temperatura. WHITE et al. (2010) determinaram que as condições ideais para extração de NEPPs são NaOH 2M, 15 minutos de reação e 60°C. No entanto, similarmente à hidrólise ácida, diferentes matrizes requerem diferentes condições ideais de extração. A hidrólise ácida pode causar despolimerização devido à quebra de ligações interflavan e degradação via abertura do anel A dos polifenóis. A degradação pode ser minimizada consideravelmente se a solução for saturada com N₂, eliminando o oxigênio responsável pelas degradações oxidativas. A hidrólise básica é mais comumente utilizada para análise de proantocianidinas.
3. *Hidrólise enzimática.* A hidrólise enzimática envolve a utilização de enzimas como pectinase, celulase, hemicelulase, amilase, entre outras, para decompor a matriz da parede celular e, conseqüentemente, liberar os NEPPs associados aos polissacarídeos em questão. O método utiliza condições de temperatura e pH apropriados para funcionamento das enzimas. A maior dificuldade relacionada ao método é a necessidade de utilização de uma combinação de enzimas em proporção apropriada para a composição da matriz em questão. Além disso, algumas matrizes são resistentes à degradação enzimática, o que pode impactar consideravelmente o rendimento da extração. Como ponto positivo, a hidrólise enzimática não degrada ou quebra as ligações interflavan dos polifenóis, proporcionando estruturas poliméricas intactas. Todavia, a hidrólise enzimática é o método menos utilizado para análise de NEPPs, e geralmente é combinado com outro tipo de hidrólise para máxima extração.

Os métodos mais comuns de hidrólise podem ser assistidos por micro-ondas ou ultrassom, com o intuito de aumentar o rendimento da extração, diminuir tempo de reação e diminuir o consumo de solventes (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014). A Tabela 5 lista estudos sobre NEPPs e seus métodos de extração.

Tabela 5 – Estudos sobre polifenóis não-extraíveis em diferentes matrizes vegetais

Referência	Matriz vegetal	Método de extração	Rendimento
GAO et al. (2017)	Feijão-roxo	Hidrólise básica	0,59 mg/kg de amostra (base seca)
	Feijão-de-corda		9,55 mg/kg de amostra (base seca)
	Ervilha-torta		7,20 mg/kg de amostra (base seca)
MUSHTAQ et al. (2017)	Chá preto	Hidrólise enzimática	521,44 mg EAG/g de amostra
GARCÍA-VILLALBA et al. (2015)	Suco de romã	Hidrólise ácida	1370,4 mg/L
GOYENECHE et al. (2015)	Folha de rabanete	Hidrólise básica	500 mg/100 g de amostra (base seca)
	Rabanete		252 mg/100 g de amostra (base seca)
	Maçã		1062,7 mg/100 g de amostra (base seca)
PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO (2015)	Aspargos	Hidrólise ácida	305,9 mg/100 g de amostra (base seca)
	Uva		319,7 mg/100 g de amostra (base seca)
	Laranja		1124,7 mg/100 g de amostra (base seca)
CHENG et al. (2014)	Mirtilo	Hidrólise ácida	25,42 mg/g de amostra
		Hidrólise básica	54,96 mg/g de amostra
GONZALES et al. (2014)	Couve-flor	Hidrólise básica assistida por ultrassom	7,3 mg EAG/g de amostra (base seca)
	Feijão-carioca cozido		591 mg/100 g de amostra
ZURITA et al. (2012)	Banana	Hidrólise ácida	1751 mg/100 g de amostra
	Maçã com casca		55 mg/100 g de amostra
WHITE et al. (2010)	Cranberry	Hidrólise básica	1685 mg/100 g de amostra (base seca)

EAG = Equivalente de ácido gálico

Outra consequência da interação de polifenóis não-extraíveis com a matriz alimentar é o seu acúmulo no cólon, uma vez que não são absorvidos nas fases anteriores do trato gastrointestinal. Dessa forma, NEPPs estão presentes em alta concentração no lúmen intestinal, onde interagem com a microbiota, que por sua vez metaboliza tais compostos extensivamente. Essas duas características são justamente as quais se atribui os efeitos benéficos da ingestão de NEPPs. MARGALEF et al. (2015) monitoraram a detecção de compostos associados à ingestão de flavanóis no plasma de ratos. Os resultados mostraram um pico de concentração para flavanóis não-metabolizados, como catequina e epicatequina, duas horas após a ingestão do extrato. Os metabólitos relacionados à fermentação microbiana, no entanto, tiveram o seu pico detectado após 7 horas para valerolactona e 24 horas para derivados de ácido fenilpropiónico, o que contribui para a noção de que a ingestão de NEPPs tem a capacidade de produzir metabólitos que persistem no organismo e são liberados gradualmente pela ação da microbiota.

A interação da colônia de bactérias intestinal com os polifenóis ocorre em duas frentes: primeiramente, a presença dos NEPPs tem a capacidade de modular a proliferação de bactérias, notavelmente de modular positivamente a proliferação de bactérias reconhecidas como benéficas para a saúde, como as pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Essa capacidade é relacionada com um efeito prebiótico dos polifenóis, que ao chegar intactos no cólon são utilizados como substrato por determinados gêneros de bactérias, estimulando sua proliferação. Além disso, a presença dos metabólitos gerados por essa interação, como derivados de ácido fenilacético e fenilpropiónico, pode alterar o pH do lúmen intestinal, proporcionando outra forma de modulação do crescimento bacteriano (CIRES et al., 2016). De fato, enquanto concentrações de não-metabólitos no plasma não ultrapassam o limite superior de nano molar, HALLIWELL et al. (2005) encontraram concentrações substanciais de metabólitos gerados pela fermentação bacteriana nas fezes de voluntários humanos, com uma média de 409,55 $\mu\text{mol/L}$ para o ácido fenilacético e 287,05 $\mu\text{mol/L}$ para o ácido fenilpropiónico, porém com uma alta inter-variabilidade em decorrência da própria variabilidade da composição da microbiota, o que afeta sua interação com os polifenóis, além das diferenças das dietas de cada indivíduo.

Em contrapartida, a microbiota intestinal e suas enzimas possuem a capacidade de metabolizar os NEPPs extensivamente, dando origem a vários metabólitos, os quais podem então ser absorvidos pelo organismo e sofrer mais etapas de metabolização, ou desempenhar efeitos sistêmicos locais devido a sua alta concentração. As etapas de metabolização incluem de-glicosilação, de-hidroxilação, de-metilação e abertura dos anéis A e C. Os principais metabólitos ligados à proantocianidinas são derivados de ácido fenilacético e fenilpropiónico,

além de derivados de valerolactona (Figura 10). As reações químicas que dão origem aos produtos envolvem a abertura do anel C, o que produz um intermediário *quinone methide*, o qual pode sofrer duas reações distintas: a carbonila da quinona pode ser reduzida, formando o correspondente *p*-hidróxi, o qual é subsequentemente de-hidroxilado, dando origem aos derivados de ácido fenilacético/propiónico, ou o metileno sofre uma adição de hidreto e subsequente degradação do anel A, produzindo os derivados de valerolactona (STEVENS e MAIER, 2016).

Figura 10 – Estruturas químicas dos principais metabólitos provenientes de proantocianidinas e o intermediário ligado à sua obtenção

Dessa forma, os potenciais efeitos benéficos a saúde humana relacionados a ingestão de NEPPs se concentram no trato gastrointestinal, além de efeitos sistêmicos relacionados à absorção de seus metabólitos (CIRES et al., 2016). SAURA-CALIXTO et al. (2010) detectaram metabólitos de proantocianidinas no plasma de voluntários após a ingestão de extratos ricos em NEPPs, incluindo a presença de metabólitos metilados e sulfatados, o que sugere que os produtos de fermentação provenientes da interação com a microbiota foram absorvidos e submetidos a uma etapa adicional de metabolização. A Tabela 6 relaciona estudos sobre os efeitos de NEPPs na saúde.

Tabela 6 - Estudos sobre efeitos de polifenóis não-extraíveis na saúde dos últimos 5 anos

Referência	Fonte vegetal	Efeito	Tipo de estudo	Dosagem de NEPPs	Duração
Casanova-Martí et al. (2018)	Semente de uva	Modulação da microbiota	Modelo animal	500 mg/kg do animal	8 dias
Demarque et al. (2018)	Barbatimão	Efeito gastroprotetor	Modelo animal	400 mg/kg do animal	Pontual
Koutsos et al. (2017)	Maçã	Modulação da microbiota	<i>In vitro</i>	1% m/v	24 horas
Rong et al. (2017)	Lichia	Redução da expressão de NADPH oxidase mRNA	Modelo animal	100 mg/kg do animal	24 semanas
Cheng et al. (2016)	Mirtilo	Efeito anti-inflamatório através da inibição da expressão de iNOS e COX-2 mRNA	Modelo celular	10, 100, 200 e 400 µg/mL	72 horas
Masumoto et al. (2016)	Maçã	Efeito anti-obesogênico e modulação de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos	Modelo animal	0,5% em água <i>ad libitum</i>	20 semanas
Wong et al. (2016)	Cranberry	Proteção da mucosa do cólon	Modelo celular	12,5, 25 e 50 µg/mL	7 dias
Minker et al. (2015)	<i>Berries</i> variadas	Indução de apoptose em células de câncer colorretal	Modelo celular	0,25% v:v	24 e 48 horas
Fernández-Iglesias et al. (2014)	Semente de uva	Melhora no metabolismo de glutatona hepático	Modelo animal	35 mg/kg do animal	10 semanas
Terauchi et al. (2014)	Semente de uva	Melhora nos sintomas de menopausa e diminuição da pressão arterial	Intervenção em humanos	100 mg e 200 mg/dia	8 semanas

1.4 DOENÇAS CRÔNICAS NÃO-TRANSMISSÍVEIS

As doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) são amplamente associadas aos efeitos do excesso de espécies reativas nas células. São classificadas como DCNT: síndromes metabólicas como diabetes, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares e neoplasias. De forma geral, o surgimento dessas doenças está associado a um processo inflamatório crônico de caráter patológico, no qual as espécies reativas produzidas para combater a inflamação acabam tendo como alvo células e tecidos que eram saudáveis, além de outros processos relacionados com o excesso de espécies reativas provenientes de outros mecanismos (CHATTERJEE, 2016).

Atualmente, DCNT são responsáveis por cerca de 70% das mortes a cada ano, sendo que quase a metade corresponde a mortes consideradas prematuras (antes dos 70 anos) e quase 90% dessas mortes prematuras ocorrem em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (WHO, 2017). DCNT, em sua grande maioria, não tem cura e causam lesões celulares irreversíveis, levando a diferentes graus de incapacidade e morte, gerando um profundo impacto nas esferas social e econômica, além de sua carga representar um grave problema de Saúde Pública.

As DCNT possuem uma vasta complexidade causal - múltiplos fatores de risco são associados a um desfecho, da mesma forma em que um fator de risco está associado a múltiplos desfechos. Porém, de uma forma geral, alguns fatores de risco considerados modificáveis ganham destaque para o enfrentamento das DCNT - tabagismo, sedentarismo, consumo excessivo de álcool e dieta inadequada. Nesse sentido, a manutenção de uma flora intestinal saudável vem sendo reconhecida como ponto-chave para a diminuição de riscos relacionados a doenças crônicas e obesidade, e a influência da dieta como moduladora do equilíbrio da microbiota se apresenta como aspecto importante para o controle de tais doenças (SINGH et al., 2017).

Figura 11 – Representação da relação entre DCNT, microbiota e dieta

1.4.1 Diabetes, microbiota e polifenóis

Em especial, a relação entre incidência de diabetes tipo 2 (DT2) e a saúde intestinal tem sido o foco de diversos estudos. QIN et al. (2012) realizaram um estudo sobre a associação meta-genômica entre microbiota e DT2. Os resultados indicaram que pacientes com DT2 possuem a microbiota em estado de disbiose moderada, caracterizada por uma diminuição de bactérias que produzem butirato e um aumento da presença de patógenos oportunistas. Notavelmente, mudanças similares na composição da colônia de bactérias intestinal foi verificada em pacientes com câncer colorretal, apontando para uma possível relação de interesse para outras doenças além do diabetes.

A ingestão de uma dieta rica em polifenóis estimula o crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo que a última possui uma relação de *cross-feeding* com bactérias produtoras de butirato, isto é, bactérias produtoras de butirato se alimentam de metabólitos produzidos por *Bifidobacterium*, e como consequência tem um aumento em sua proliferação. Adicionalmente, algumas espécies de bactérias presentes na microbiota humana e que são capazes de utilizar flavonoides como substrato - as do gênero *Clostridium* e *Eubacterium*, por exemplo - são consideradas bactérias produtoras de butirato. Outro efeito interessante decorrente da interação da microbiota com polifenóis é a capacidade de os metabólitos produzidos agirem como moduladores de mudanças epigenéticas, em particular de inibir histona deacetilase, a qual promove repressão de genes pela condensação de cromatina (BHAT e KAPILA, 2017; RIVIERE et al., 2016; SINGH et al., 2017).

Além dos efeitos indiretos provenientes da interação com a microbiota, polifenóis também podem desempenhar um papel importante no controle de DT2 de diferentes maneiras. ANDERSON et al. (2004) isolaram proantocianidinas da canela com ação biológica similar a insulina, indicando um possível papel no controle e tratamento de diabetes e intolerância à glicose. LI et al. (2017) verificaram que a suplementação dietética de ratos diabéticos com proantocianidinas teve efeitos positivos na homeostase de glicose, metabolismo de lipídeos e níveis de insulina, os quais foram atribuídos a modulação de sinalização celular. Diversos estudos atribuem o efeito de manutenção da homeostase de polifenóis a mecanismos relacionados a diferentes tecidos-alvo, como intestino, fígado, adipócitos e pâncreas, com a ressalva de que são necessários estudos em humanos de maior duração e com design bem definido para determinar uma associação significativa entre o consumo de polifenóis e menor risco de DT2 (KIM et al., 2016).

2. JUSTIFICATIVA

O presente estudo levanta como hipótese central a ser testada o guaraná em pó como possível fonte de polifenóis não-extraíveis, notavelmente os da classe das proantocianidinas. A hipótese se baseia na característica bem demonstrada de que o guaraná possui alto teor de flavanóis, como catequina e epicatequina, presentes na fração extraível, os quais são parte constituinte dos monômeros que compõe os taninos condensados.

O estudo também tem em vista as tendências mais recentes na ampla área de estudos dos polifenóis, o crescente corpo de evidências a respeito dos efeitos benéficos associados aos NEPPs e a busca da valorização de um produto tipicamente brasileiro. A descrição química detalhada da fração não-extraível do guaraná visa auxiliar futuras pesquisas que podem partir da premissa de avaliar mais profundamente os efeitos que tal fração pode ter na saúde humana, além de disponibilizar informações de caráter inédito para a comunidade científica, já que não há informações desse tipo pertinentes ao guaraná disponíveis na literatura atualmente.

3. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo caracterizar os polifenóis não-extraíveis quanto à sua composição química e avaliar sua capacidade de inibir enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos encontrados no guaraná em pó de origem comercial.

Objetivos específicos:

- Extrair e separar as diferentes frações de polifenóis encontradas no guaraná – fração extraível e não-extraível;
- Analisar e caracterizar cada fração quanto à sua composição química utilizando os métodos de *screening*, HPLC-ECD, LC-MS e MALDI-TOF/TOF;
- Avaliar e comparar as frações quanto a sua capacidade de inibir a enzima α -glicosidase, bem como seu modo de inibição;
- Determinar a contribuição dos polifenóis não-extraíveis na composição do guaraná em pó.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

As amostras de guaraná em pó foram adquiridas no comércio local da cidade de São Paulo (SP), no ano de 2017. Elas foram mantidas em sua embalagem original e estocadas em ambiente seco, a temperatura ambiente (25°C) e em abrigo da luz. As análises foram realizadas, no mínimo, em triplicata. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Componentes Alimentares e Saúde (LACAS) da Faculdade de Saúde Pública (USP), senão diferentemente especificado. Os experimentos foram realizados em ambiente protegido da luz, com as devidas medidas de segurança e todos os resíduos gerados foram descartados apropriadamente. Toda a utilização de água mencionada na descrição dos métodos se refere a água milliQ. As análises foram feitas no período de outubro/2017 a junho/2018. O desenho geral do estudo está apresentado na Figura 12:

Figura 12 – Desenho geral do estudo

CRT = capacidade redutora total

4.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

4.2.1 Extração aquo-orgânica

As amostras de guaraná em pó foram homogeneizadas em almofariz e submetidas a extração aquo-orgânica conforme o método descrito por FONTES et al. (2014) para obtenção da fração de polifenóis extraíveis (EPP). Em balança analítica, foi pesado 0,8 g de guaraná em pó e a amostra foi transferida quantitativamente para um tubo Falcon de 50 mL. Foram adicionados 20 mL de solução aquo-orgânica composta de água, acetona e metanol, na proporção de 20:56:24 (v:v:v), respectivamente. A mistura foi homogeneizada em Ultra-Turrax por 3 minutos, em potência média (14.000 rpm/min). Em seguida, a mistura foi centrifugada por 15 minutos, a 18.000g, em temperatura ambiente (25°C). O sobrenadante foi coletado em balão volumétrico de 100 mL, passando por filtração simples para remoção de impurezas sólidas. O procedimento foi repetido da mesma forma por mais 3 vezes, totalizando 4 ciclos de extração. O volume final do extrato foi ajustado com água, o qual foi então imediatamente transferido para recipiente âmbar com tampa e batoque. O extrato final possui coloração castanho-amarelada e aspecto límpido. Parte do extrato que foi utilizado nos próximos dias foi mantido em geladeira, enquanto o restante foi mantido em freezer a -20°C.

4.2.2 Liofilização e teor de umidade

Os resíduos sólidos provenientes da extração aquo-orgânica foram secos em liofilizador por 8 horas – as amostras foram congeladas no próprio tubo Falcon utilizado na extração, que foi coberto com parafilme furado de maneira a permitir a saída da água, mas minimizando a eventual perda de amostra sólida. O resíduo seco foi homogeneizado em almofariz e guardado em tubos vedados em abrigo da luz.

O teor de umidade foi determinado para ambos o guaraná em pó e o resíduo pós-liofilização, de acordo com o método gravimétrico oficial da AOAC *International* – as amostras foram colocadas em cadinho de porcelana previamente seco em estufa e pesado, e o conjunto foi então aquecido em estufa a 105°C por 12 horas. Depois de resfriado em dessecador, o conjunto foi novamente pesado e o teor de umidade foi determinado a partir da relação a seguir:

$$Umidade (\%) = \left[1 - \frac{(P_{F(A+C)} - P_C)}{P_A} \right] \times 100$$

Onde:

$P_{F(A+C)}$ = Peso final do conjunto amostra e cadinho

P_C = Peso do cadinho seco

P_A = Peso inicial da amostra

4.2.3 Hidrólise ácida

O resíduo liofilizado foi utilizado para a obtenção da fração de polifenóis hidrolisáveis (HPP) a partir do método de hidrólise ácida descrito por HARTZFELD et al. (2002). Em balança analítica, foi pesado 50 mg do resíduo, o qual foi então transferido quantitativamente para um tubo Pyrex de 15 mL com rosca, tampa de Teflon e septo extra para evitar a evaporação do solvente durante o aquecimento. Foram adicionados 5 mL de metanol e 500 µL de ácido sulfúrico concentrado (18 M) e o tubo foi agitado brevemente antes de ser tampado e vedado com parafilme. O tubo foi colocado em bloco de aquecimento previamente estabilizado a 85 °C por 20 horas. Após o término da reação, a solução apresenta uma coloração vermelho-escuro intensa. O conteúdo do tubo Pyrex foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL e a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 5000g. O sobrenadante foi coletado em tubo de ensaio de aproximadamente 15 mL e o sólido foi lavado com 1 mL de metanol e centrifugado mais duas vezes, totalizando 3 ciclos de extração. Foram adicionados 500 µL de etanolamina divididos em 4 porções, com agitação vigorosa entre cada adição. A seguir, foram adicionados 1.250 µL de acetato de amônio 3,7 M e o tubo foi novamente agitado. Neste ponto, a solução muda de coloração avermelhada para amarronzada. Por fim, o pH da solução foi ajustado para 5,5 com solução de ácido sulfúrico diluído com o auxílio de pHmetro (GEHAKA). O extrato HPP foi transferido para balão volumétrico de 10 mL passando por filtração simples para remoção de impurezas sólidas e o volume final foi ajustado com metanol. A solução final possui coloração alaranjada e aspecto límpido. O extrato foi imediatamente transferido para recipientes âmbar e mantidos em freezer a -20°C.

4.2.4 Hidrólise básica

O resíduo liofilizado foi utilizado para a obtenção da fração de proantocianidinas (ou taninos condensados) (NEPA) a partir do método de hidrólise básica descrito por WHITE et al. (2010). Em balança analítica, foi pesado 50 mg do resíduo e este foi transferido quantitativamente para um tubo Falcon de tamanho adequado para uso posterior com o pHmêtro. Foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio 2 M e a solução foi rapidamente saturada com N₂. O tubo foi então colocado dentro de um banho ultrassom com aquecimento e com a temperatura previamente estabilizada a 60°C e os parâmetros ajustados para 37 kHz e 100 W. O ultrassom foi ligado e a reação durou 15 minutos. Após o término da reação, a solução foi neutralizada com ácido clorídrico 4 M com o auxílio de um pHmêtro (GEHAKA). Após o ajuste de pH para a faixa de 6-7, foram adicionados 2 mL de solvente composto de acetona, água e ácido acético (AWA) na proporção de 70:29,5:0,5 (v:v:v), respectivamente. A solução foi homogeneizada utilizando Ultra-Turrax em potência média (14.000 rpm/min) por 1 minuto e, em seguida, centrifugada por 10 minutos a 10.000g. O sobrenadante foi coletado diretamente em um balão volumétrico de 10 mL passando por filtração simples para remoção de impurezas sólidas. O procedimento de extração com solvente AWA foi repetido da mesma forma por mais duas vezes, totalizando 3 ciclos de extração. A solução final possui coloração amarelada e aspecto límpido. O volume final foi ajustado com solvente AWA e o extrato NEPA foi imediatamente transferido para frascos âmbar e armazenados em freezer a -20°C.

4.2.5 Extração em fase sólida (SPE)

Ambas as frações HPP e NEPA passaram por extração em fase sólida para remoção de sais, açúcares e outros possíveis interferentes. Os procedimentos foram realizados utilizando *Manifold* com *stopcock* (Waters) e bomba de vácuo (Millipore). As metodologias e cartuchos utilizados foram distintos para cada fração:

1. *Fração de polifenóis hidrolisáveis.* A fração HPP foi submetida a SPE utilizando cartucho OASIS HLB (1 cc, 30 mg, 30 µm), conforme descrito por PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO (2015). O solvente orgânico da amostra foi evaporado em concentrador (Centrivap) e a amostra foi redissolvida em 1 mL de água. O cartucho foi ativado com 1 mL de metanol e 1 mL de metanol 50%, em seguida a amostra foi

carregada e a eluição foi feita com 2 mL de metanol divididos em 2 alíquotas de 1 mL, mantendo-se um fluxo de aproximadamente 1 mL/min. A fração eluída foi coletada e imediatamente acondicionada em vial âmbar e armazenada em freezer a -20°C.

2. *Fração de taninos condensados.* A fração NEPA foi submetida a SPE utilizando cartucho OASIS SEP-PAK (3 cc, 500 mg), conforme descrito por GONZALES et al. (2010). A amostra foi diluída com água 0,1% ácido fórmico na proporção de 1:1 (v:v) para um total de 2 mL. O cartucho foi primeiramente ativado com duas alíquotas de 3 mL de metanol e equilibrado com duas alíquotas de 3 mL de água. A amostra foi carregada e, em seguida, o cartucho foi lavado com duas alíquotas de 2,5 mL de água 0,1% ácido fórmico. A eluição foi feita com duas alíquotas de 1,5 mL de metanol 0,1% ácido fórmico, mantendo-se um fluxo de aproximadamente 1 mL/min. A fração eluída foi coletada e imediatamente acondicionada em vial âmbar e armazenada em freezer a -20°C.

4.3 MÉTODOS DE *SCREENING*

4.3.1 Capacidade redutora total

A capacidade redutora total foi obtida para todas as frações utilizando o método descrito por SINGLETON e ROSSI (1965), adaptado para microplaca. Em microplaca de poliestireno transparente com 96 cavidades, foram adicionados 120 µL do extrato convenientemente diluído, se necessário. Em seguida, foram adicionados 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído com água na proporção de 1:5 (v:v) e a placa foi brevemente agitada e incubada em temperatura ambiente por 3 minutos. Após a incubação, foram adicionados 30 µL de carbonato de sódio 200 g/L e a placa foi novamente agitada e incubada a 37°C por 1 hora. A coloração azul resultante da reação foi medida em espectrofotômetro *Molecular devices* (SPECTRAmax) em 765 nm. Os valores obtidos foram calculados utilizando uma curva de calibração elaborada com ácido gálico na faixa de concentração de 0 a 25 µg/mL, e os valores foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico/g de amostra seca (mg EAG/g bs). A curva de calibração e sua equação da reta é mostrada no Apêndice dessa dissertação.

4.3.2 Quantificação de taninos condensados

O método de Porter consiste na quantificação de taninos condensados através de uma reação de despolimerização catalisada por ácido, conforme descrito por PORTER et al. (1986). Em balança analítica, foram pesados 20 mg do resíduo liofilizado proveniente da extração aquo-orgânica, o qual foi então transferido para um tubo Pyrex de 15 mL com rosca e tampa de Teflon. Foram adicionados 6 mL de n-butanol acidificado com ácido clorídrico (2,5% de HCl) e 20 µL de reagente férrico (cloreto de ferro hexahidratado 0,26 M em HCl 2M) e o tubo foi agitado vigorosamente. O tubo foi colocado em banho de água previamente aquecido a 100°C por 1 hora. Após o término da reação, a solução possui coloração rosa escuro. O conteúdo do tubo foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL e centrifugado por 10 minutos a 5.000g. O sobrenadante foi coletado diretamente em balão volumétrico de 10 mL, passando por filtração simples para remoção de impurezas sólidas. O sólido foi lavado com 1 mL n-butanol e centrifugado mais duas vezes. O volume final foi ajustado com n-butanol e alíquotas de 200 µL da solução resultante foram adicionados a placa de poliestireno transparente de 96 cavidades para leitura de absorbância em espectrofotômetro *Molecular devices* (SPECTRAmax) a 555 nm. Os valores obtidos foram calculados utilizando uma curva de calibração elaborada com cloreto de cianidina na faixa de concentração de 0 a 30 µg/mL, e os valores foram expressos em mg de equivalente de cloreto de cianidina/g de amostra seca (mg EqCl/g bs). A curva de calibração e sua equação da reta é mostrada no Apêndice dessa dissertação.

4.4 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO PERFIL DE FENÓLICOS

4.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A separação, identificação e quantificação do perfil de fenólicos da fração EPP e HPP foi realizada em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector eletroquímico (HPLC-ECD). O sistema é equipado com bomba Modelo 584, injetor automático Modelo 542, detector eletroquímico multicanal Coularray Modelo 5600A com 8 canais e detector UV-Vis Modelo 528. Foi utilizada coluna cromatográfica T3 Atlantis (4,6 x 150 mm, 5 μ m) e pré-coluna T3 Atlantis (4,6 x 20 mm). As fases móveis utilizadas foram:

- Fase móvel A: água:acetonitrila 98:2 (v:v) em 5 mM de acetato de amônio, pH 3,6 ajustado com ácido fórmico;
- Fase móvel B: água:acetonitrila 30:70 (v:v) em 5 mM de acetato de amônio, pH 3,6 ajustado com ácido fórmico.

A temperatura da bandeja do injetor automático foi mantida a 4°C e a coluna foi mantida a 30°C. O volume de injeção foi 25 μ L e o fluxo de corrida foi mantido a 0,8 mL/minuto com gradiente de concentração conforme mostrado abaixo:

Gradiente de concentração					
Minutos	0	20	80	85	95
%B	5	10	30	5	5

Os parâmetros de detecção foram:

Parâmetros de detecção								
Canal	1	2	3	4	5	6	7	8
Potencial (mV)	100	200	300	400	500	600	700	272 nm (UV-Vis)

A identificação dos compostos foi feita por meio da comparação dos tempos de retenção dos analitos com os picos obtidos por injeção de padrões comerciais. A quantificação foi

realizada a partir das curvas de calibração construídas com os padrões comerciais (Sigma-Aldrich) da catequina, epicatequina, epigallocatequina galato, proantocianidina B1 e proantocianidina B2. As curvas de calibração, equações da reta e limites de detecção e quantificação são mostrados no Apêndice dessa dissertação.

4.4.2 Espectrometria de massas

A identificação e confirmação do perfil de fenólicos das frações EPP e HPP foram realizadas em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massas (HPLC-Q-TOF). A análise foi realizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto de Química (USP).

O sistema HPLC é equipado com bomba Modelo LC-20AD, injetor automático Modelo 20A-HT e detector UV-Vis Modelo SPD-20A. Foi utilizada coluna cromatográfica Phenomenex Luna (2 x 150 mm, 5 μ m) e as fases móveis foram:

- Fase móvel A: água 0,1% ácido fórmico
- Fase móvel B: metanol 0,1% ácido fórmico

A temperatura da coluna foi mantida a 40°C, o volume de injeção foi 2 μ L e os comprimentos de onda monitorados foram 280 (detecção de ácidos hidroxibenzoicos e flavanóis) e 370 nm (detecção de ácidos hidroxicinnâmicos). O fluxo de corrida foi mantido a 0,2 mL/minuto com gradiente de concentração conforme mostrado abaixo:

Gradiente de concentração						
Minutos	0	2	15	20	23	25
%B	5	5	20	40	100	5

O espectrômetro de massas é equipado com detector microTOF-QII e os parâmetros utilizados são descritos a seguir: capillary, 3500V; nebulizer, 4 bar; dry temperature, 250°C; quadrupole ion energy, 4 eV; collision energy, 10 eV. A aquisição de dados foi feita no modo negativo, na faixa de massas de 100 a 1000 m/z.

A identificação e confirmação dos compostos foram feitas por meio da comparação dos cromatogramas no UV-Vis, cromatogramas de íons e espectros de massas dos picos encontrados nas amostras e padrões comerciais (catequina, epicatequina e epigallocatequina

galato, Sigma-Aldrich). Os cromatogramas dos padrões são mostrados no Apêndice dessa dissertação.

A identificação do perfil de fenólicos da fração NEPA foi realizada em MALDi (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization*) equipado com detector TOF (MALDi-TOF/TOF). A análise foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química (USP).

Os parâmetros utilizados foram: N₂ laser, 337 nm; laser repetition rate, 1000 Hz; number of shots, 1500. Não foi utilizado agente cationizante e, devido a faixa de absorção da amostra, não foi necessário o uso de matriz. A aquisição de dados foi feita no modo positivo refletor, com os seguintes parâmetros: reflector voltage 1, 26,55 kV; reflector voltage 2, 13,5 kV; reflector detector voltage, 2387 kV. A identificação dos compostos foi feita por meio de comparação entre m/z calculado e observado.

4.5 MÉTODO DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO

As frações EPP e NEPA foram avaliadas quanto aos seus potenciais de inibição de α -glicosidase, conforme método descrito por YAN et al. (2018), com modificações (STRELOW et al., 2012). As frações tiveram seu solvente orgânico eliminado em concentrador (Centrivap) e foram redissolvidas em água antes da análise.

4.5.1 Teste de inibição de α -glicosidase

Para a determinação dos valores de IC₅₀ das frações EPP e NEPA, em microplaca de poliestireno transparente de 96 cavidades, foram adicionados 80 μ L de amostra em diferentes concentrações normalizadas com os valores de CRT. Em seguida, foram adicionados 20 μ L de enzima α -glicosidase 0,2 U/mL e a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos. Ao fim do período de incubação, foram adicionados 100 μ L de pNPG (4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo) 4 mM em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) e a mistura foi novamente incubada a 37°C por 30 minutos. Para parar a reação, foram adicionados 100 μ L de carbonato de sódio 4 mM e a liberação de p-nitroferol foi medida em espectrofotômetro *Molecular devices* (SPECTRAMax) a 405 nm.

A porcentagem de inibição foi determinada usando a relação a seguir:

$$Inibição (\%) = \left[1 - \frac{(A_{amostra} - A_{branco})}{(A_{teste} - A_{controle})} \right] \times 100$$

Onde:

$A_{amostra}$ = absorbância do meio reacional

A_{branco} = absorbância do meio reacional, excluindo a enzima

A_{teste} = absorbância do meio reacional, excluindo a amostra

$A_{controle}$ = absorbância do meio reacional, excluindo a amostra e a enzima

Os valores de IC_{50} foram calculados a partir da construção de uma curva de concentração-resposta e regressão não-linear (software OriginPro 2016).

4.5.2 Determinação do modo de inibição

O método para determinação do modo de inibição das frações EPP e NEPA foi realizado de maneira similar ao método descrito na seção 4.4.1, porém utilizando uma ampla faixa de concentração de substrato (p-NPG) visando atingir a saturação da enzima e mantendo a concentração da enzima e do inibidor constantes. O monitoramento da reação foi feito em espectrofotômetro *Molecular devices* (SPECTRAMax) no modo cinética, com valores de absorção sendo registrados a cada minuto, por um total de 30 minutos. A temperatura da bandeja foi mantida a 37°C durante todo o experimento.

Os parâmetros de velocidade máxima (V_{max}) e constante de Michaelis (K_m) foram obtidos a partir das curvas representando a relação velocidade inicial (V_0) x concentração do substrato ($[S]$), utilizando a equação de Michaelis-Menten (1) e a linearização de Lineweaver-Burk (2) (software OriginPro 2016):

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{max}} \right) \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

O modo de inibição e as constantes de dissociação foram obtidas a partir da comparação entre K_m/K_m aparente e V_{max}/V_{max} aparente, utilizando as relações matemáticas apropriadas (NELSON e COX, 2012).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média e desvio padrão e foram avaliados pela análise de variância e teste de Tukey ou teste t de Student, com nível de significância de 5%. Os resultados são organizados e apresentados em tabelas comparativas e gráficos. A análise estatística foi feita nos softwares Microsoft Excel e Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 24.0 para Windows.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

5.1.1 *Screening*

Os métodos de *screening* possuem limitações que devem ser levadas em consideração ao interpretar seus resultados. Por se tratar de métodos gerais, possuem baixa especificidade, o que gera superestimação ou subestimação dos valores reais. Com as limitações em mente, no entanto, tais métodos são úteis e práticos para análises preliminares de amostras desconhecidas, fornecendo estimativas que podem ser utilizadas no planejamento de análises posteriores.

A determinação da capacidade redutora total (CRT) é baseada no método colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. O método se baseia na redução do complexo polimérico de íons formados por ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, e consequente formação do pigmento azul de molibdênio-tungstênio. Como toda reação redox, é dependente do potencial redox dos grupos fenólicos presentes na amostra. De uma maneira geral, tri-fenóis, como ácido gálico, são mais suscetíveis a ser oxidados do que di-fenóis, como catequina. A maior fonte de interferentes, no entanto, é a presença de outros agentes redutores, o que causa a superestimação do teor total de polifenóis presentes na amostra (ROHR et al., 2000). Dessa forma, é mais verossímil se referir ao método como CRT do que fenólicos totais, como também é comumente referido.

No caso do guaraná em pó, a provável maior fonte de interferência são os açúcares, uma vez que a amostra possui teor relativamente elevado de tais compostos (ANTUNES, 2011). Os resultados obtidos para CRT das diferentes frações estão relacionados na Tabela 7:

Tabela 7 – Capacidade redutora total das diferentes frações de polifenóis

	Fração extraível	Fração hidrolisável	Fração condensada
Capacidade redutora total			
mg EAG/g de guaraná em pó (base seca)	65,156 ± 0,193 ^c	9,235 ± 0,414 ^b	3,972 ± 0,020 ^a

EAG = equivalente de ácido gálico. ^{a,b,c} = letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Os valores de CRT reportados na literatura para a fração extraível de guaraná em pó variam consideravelmente: de 8,43 a 151,8 mg EAG/g de amostra (BASILE et al., 2005; YONEKURA et al., 2016). Essa variação é decorrente em parte do método de extração utilizado e da origem da amostra em si. Dessa forma, os valores encontrados no presente estudo estão dentro do esperado para a amostra de guaraná em pó comercial.

Quando comparado a outras matrizes alimentares, o guaraná em pó possui valores significativamente elevados de CRT na fração extraível, sendo cerca de 3,5 e 10,7 vezes maior do que o encontrado em uvas e maçãs, respectivamente (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2010). Os valores obtidos também são comparáveis com alimentos reconhecidos como fontes de polifenóis, como cacau em pó (1,2 vezes maior), chá verde (1,3 vezes menor) e vinho tinto (1,5 vezes menor) (NEVEU et al., 2010). Da mesma forma, os valores obtidos para a fração hidrolisável são significativos quando comparados a outras fontes alimentares, como maçã (1,2 vezes menor) e uva (2,9 vezes maior) (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2010).

A comparação com a fração condensada é dificultada devido ao fato de que o método de Folin-Ciocalteu não é comumente utilizado após essa forma de extração. A mistura complexa decorrente da hidrólise básica, que causa despolimerização parcial das proantocianidinas, torna o significado da CRT mais complexo de ser atribuído. Por fim, as frações não-extraíveis contribuem com 16,8% da CRT obtida para o guaraná em pó.

Por sua vez, a quantificação de taninos condensados é baseada na despolimerização oxidativa das proantocianidinas em presença de ácido. A reação de despolimerização converte as unidades monoméricas em seus respectivos cátions, isto é, antocianidinas, que por sua vez dão a coloração avermelhada típica da reação, que pode ser então medida colorimetricamente. A formação de antocianidinas é dependente de algumas variáveis, como estrutura das proantocianidinas e grau de polimerização. Proantocianidinas do tipo A são mais resistentes à quebra das ligações interflavan do que as do tipo B, por exemplo. Além disso, reações paralelas são comuns nessa reação, formando um composto polimérico conhecido como *phlobaphene* (ROHR et al., 2010).

O uso de um padrão adequado também é importante para a obtenção de uma boa estimativa. Devido ao fato de que diferentes composições de proantocianidinas influenciam o comprimento de onda máximo de absorção da solução final, a utilização de um padrão representativo não é trivial. PÉREZ-JIMÉNEZ et al. (2009) sugerem a utilização de proantocianidinas extraídas de vagem de alfarroba como o padrão que melhor representa a mistura de compostos presentes em matrizes alimentares, porém tal isolado é de difícil

obtenção, o que torna a sugestão pouco prática. Dessa forma, o padrão disponível para a quantificação de taninos condensados no guaraná em pó foi a cianidina, embora seja levado em consideração que a estimativa obtida é provavelmente menor do que a real, uma vez que a formação de produtos que absorvem na mesma faixa que a cianidina não é quantitativa. O resultado da quantificação de taninos condensados está relacionado abaixo:

Tabela 8 – Quantificação de taninos condensados não-extraíveis do guaraná em pó

	Fração não-extraível
Quantificação de taninos condensados	
mg EqCl/g de guaraná em pó (base seca)	4,626 ± 0,047

EqCl = equivalente de cloreto de cianidina

O valor obtido para o guaraná em pó também se destaca quando comparado ao obtido para outros alimentos, como maçã (6 vezes maior), uva (1,6 vezes maior) e pêsego (3,1 vezes maior) (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2010). Dessa forma, o resultado preliminar indica que o guaraná em pó é uma fonte apreciável de proantocianidinas.

5.1.2 Perfil de fenólicos individuais

A complexa mistura de polifenóis obtida na fração extraível foi separada, identificada e quantificada em HPLC-ECD e posteriormente confirmadas em HPLC-Q-TOF. A Figura 13 apresenta o Cromatograma representativo obtido para a fração extraível:

Figura 13 – Cromatograma representativo dos polifenóis extraíveis do guaraná em pó

A Tabela 9 relaciona o tempo de retenção dos analitos e sua concentração calculada a partir das curvas de calibração dos padrões (vide Apêndice):

Tabela 9 – Quantificação de fenólicos individuais da fração extraível do guaraná em pó

	Fração extraível	Tempo de retenção
	mg/g guaraná em pó	minutos
Catequina	$5,450 \pm 0,147^c$	26,75
Epicatequina	$5,947 \pm 0,219^d$	38,15
PB1	$0,013 \pm 0,001^a$	22,00
PB2	$0,275 \pm 0,003^a$	33,97
EGCG	$1,947 \pm 0,171^b$	39,72

PB1 = procianidina B1; PB2 = procianidina B2; EGCG = epigallocatequina galato. ^{a,b,c,d} = letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Somados, os polifenóis identificados – que não correspondem ao total de polifenóis presentes na fração, mas sim a parcela identificável – correspondem a cerca de 1,4% do peso total da amostra de guaraná em pó. A comparação dos valores obtidos com os valores reportados recentemente na literatura (Tabela 2) revela que os teores de catequina e epicatequina estão dentro do esperado para a amostra. As procianidinas, por sua vez, demonstram variabilidade

maior devido a sua susceptibilidade a condições ambientais (da Silva et al., 2017; Machado et al., 2018).

A presença de EGCG é inesperada, uma vez que não é comumente identificada em amostras de guaraná em pó. EGCG é um dos componentes majoritários de chás, como chá verde e chá preto, e sua formação está ligada ao processo de fermentação ao qual as folhas de chá são submetidas (JAGANATH e CROZIER, 2009). O processo de beneficiamento do guaraná também envolve uma etapa de fermentação antes da retirada da casca e despulpamento, o que pode influenciar na formação de EGCG ou outros produtos esterificados não identificados.

Subsequentemente, a amostra foi submetida a espectrometria de massas para confirmação da identidade dos compostos. A Tabela 10 relaciona os picos principais e suas respectivas identidades:

Tabela 10 – Identificação de fenólicos individuais na fração extraível do guaraná em pó

Tempo de retenção minutos	[M-H]⁻ calculado	[M-H]⁻ obtido	Composição elementar	Erro ppm	Possível identidade
2,2	341,1080	341,1099	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	5,6	Sacarose
12,9	289,0710	289,0716	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	2,1	Catequina
14,5	577,1353	577,1371	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	3,1	Dímero tipo B
15,6	289,0710	289,0716	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	2,1	Epicatequina
16,4	863,1849	863,1827	C ₄₅ H ₃₀ O ₁₈	2,5	Trímero tipo A

Os padrões utilizados na análise de HPLC-Q-TOF foram catequina, epicatequina e EGCG. Somente catequina e epicatequina foram identificados na amostra, enquanto EGCG não foi observada. O dímero do tipo B, levando em conta a ordem de eluição, provavelmente se trata da procianidina B2. A procianidina B1, já presente em níveis baixos na análise de HPLC-ECD, não foi detectada, indicando que pode ter sofrido degradação. DA SILVA et al. (2017) identificaram diversos flavanóis e proantocianidinas em amostras de guaraná em pó provenientes de diferentes regiões do Brasil. Conforme mencionado anteriormente, não foi detectado a presença de EGCG nas amostras analisadas. Porém, curiosamente, o perfil de eluição – mesmo que as condições cromatográficas tenham sido diferentes – mostrou o trímero do tipo A sendo eluído logo após a epicatequina, semelhantemente ao que foi observado na amostra de guaraná em pó analisada neste estudo. Levando em consideração a ausência de EGCG em outros estudos e na análise de espectrometria de massas, é possível concluir que provavelmente o que foi detectado na análise de HPLC-ECD não foi EGCG, mas sim o trímero

do tipo A, que foi observado no HPLC-Q-TOF com perfil de eluição semelhante. A Figura 14 representa os espectros de massas para os picos identificados.

Figura 14 – Espectros de massas dos picos identificados na fração extraível do guaraná em pó

De cima para baixo: sacarose, catequina, dímero tipo B, epicatequina, trímero tipo A

O processo de hidrólise ácida com o qual a fração hidrolisável foi obtida se baseia na quebra de ligações glicosídicas de galotaninos e elagitaninos, liberando suas agliconas (HARTZFELD et al., 2002). Na ausência de água, a reação produz metil-galatos quantitativamente, mas foi observado que nas condições da reação também pode ocorrer condensação de ácido elágico com outros compostos presentes no hidrolisado. Além disso, estruturas mais complexas são mais resistentes à metanólise do que estruturas mais simples (LEI e HELM, 2001). No presente estudo, a ausência de água no meio reacional não foi imposta, uma vez que a conversão quantitativa de ácido gálico a metil-galato não era a finalidade da reação, sendo que no método original essa etapa é crítica para a posterior reação com iodato de potássio. A modificação do método já havia sido proposta por SAURA-CALIXTO et al. (2007) com o intuito de promover uma forma de comparar os resultados obtidos com os comumente reportados para a fração extraível.

A fração HPP também foi analisada por HPLC-ECD, porém nenhum pico correspondente aos padrões injetados foi detectado, impossibilitando a identificação de fenólicos por esse método. O cromatograma representativo está apresentado na Figura 15:

Figura 15 – Cromatograma representativo dos polifenóis hidrolisáveis do guaraná em pó

Dessa forma, para elucidar sua possível composição, a fração HPP foi analisada por HPLC-Q-TOF. A Figura 15 representa o cromatograma obtido para a fração hidrolisável em 280 nm. Não houve detecção em 320 nm.

Figura 16 – Cromatograma em 280 nm da fração hidrolisável do guaraná em pó

Os picos detectados com intensidade relativamente alta tiveram tempo de retenção de 2 e 2,3 minutos. A Figura 16 representa o cromatograma de íons obtido para a fração hidrolisável:

Figura 17 – Cromatograma de íons para a fração hidrolisável do guaraná em pó

Os picos de maior intensidade exibiram espectros de massas semelhantes, indicando uma possível estrutura polimérica (Figura 17). No entanto, não é possível atribuir possíveis identidades uma vez que há indícios de que os produtos tenham sofrido algum grau de degradação. Não foram detectados picos para ácido gálico ($[M-H]^-$ calculado = 169,0135), metil-galato ($[M-H]^-$ calculado = 183,0292) ou ácido elágico ($[M-H]^-$ calculado = 300,9983).

Figura 18 – Espectro de massas correspondente ao pico eluído em 2,0 minutos

Os picos de menor intensidade foram eluídos a 16,7 e 18,3 minutos. A Figura 18 representa os espectros de massas para ambos os picos:

Figura 19 – Espectros de massas correspondentes aos picos eluídos a 16,7 (acima) e 18,3 minutos (abaixo)

O produto eluído a 16,7 minutos exibiu pico de maior intensidade com 211,0644 m/z. Levando em consideração a presença de picos a 244 e 289 m/z, é possível que seja correspondente a um produto de degradação de catequina/epicatequina, com abertura do anel C e posterior degradação do anel B (fissão de *quinone methide*). Já o produto eluído a 18,3 minutos exibiu um pico de maior intensidade com 167,0370 m/z. Uma possível identidade para esse pico seria o ácido vanílico, cuja estrutura está ilustrada na Figura 18. Porém, o erro calculado é muito superior ao aceitável (16 ppm). Dessa forma, a análise por LC-MS da fração hidrolisável foi inconclusiva – os compostos extraídos podem ter sofrido degradação durante a hidrólise ácida ou durante a estocagem, ou ainda existe a possibilidade de que o guaraná em pó não apresente quantidade apreciável de taninos hidrolisáveis como galotaninos, elagitaninos e

outros ácidos fenólicos e o valor obtido com a CRT é decorrente majoritariamente de outros compostos com capacidade redutora. De qualquer forma, seriam necessários mais experimentos com diferentes métodos de extração e hidrólise para elucidar o problema.

5.1.3 MALDi

MALDi é uma técnica de espectroscopia de massas que é usada amplamente na análise de polímeros sintéticos e naturais e misturas complexas. Seus fundamentos são baseados no uso de laser pulsado para transferir uma enorme quantidade de energia para as moléculas-alvo de maneira que não consigam dissipar a energia fornecida e sejam então ionizadas e aceleradas na direção de um detector. O uso da matriz, um material com alta capacidade de absorção de energia, auxilia na transferência de energia de modo a minimizar possíveis processos de degradação, como vaporização e destruição de compostos, provenientes da utilização do laser. Em contrapartida, a utilização da matriz limita a faixa de aquisição de dados de 500 m/z para cima, uma vez que os sinais abaixo desse valor são saturados com artefatos provenientes da ionização do material. Além da matriz, também há a possibilidade de utilização de um agente cationizante, o qual é geralmente utilizado quando a amostra não é facilmente protonada (MONAGAS et al., 2010).

O tipo de detector utilizado com MALDi é *Time of Flight* (TOF), que se baseia no princípio de que íons mais leves atingem o detector antes de íons mais pesados se ambos partirem do mesmo ponto no tempo zero. A limitação mais importante associada a esse tipo de detecção é a de que íons mais leves saturam o detector antes da chegada dos íons mais pesados, o que consequentemente diminui a sensibilidade para a detecção de moléculas de maior peso molecular. Essa limitação também afeta a capacidade de calcular a distribuição de peso molecular de polímeros, uma vez que a intensidade absoluta dos picos obtidos é influenciada por essa perda de sensibilidade do detector. Outro parâmetro importante é o modo de aquisição, que pode ser linear ou refletor. O modo linear apresenta maior sensibilidade para íons de alto peso molecular, porém possui baixa resolução, enquanto o modo refletor possui alta resolução, mas baixa sensibilidade para íons de alto peso molecular. Dessa forma, o modo de aquisição deve ser escolhido de acordo com a informação a ser obtida (MONAGAS et al., 2010).

No caso da fração NEPA proveniente do guaraná em pó, o modo de aquisição escolhido foi o refletor, uma vez que o intuito foi de determinar a massa molar de maneira mais precisa, e sua faixa de aquisição recomendada (até 10.000 u) é apropriada para a amostra proveniente

de hidrólise básica, onde já se espera que tenha ocorrido algum grau de despolimerização. As matrizes apropriadas para a análise de proantocianidinas são os ácidos *trans*-3-indoleacrílico (*t*-IAA) e 2,5-dihidroxibenzóico (DHB). A matriz disponível para a análise foi a DHB, porém foi verificado que o espectro de massas foi obtido com mais qualidade sem a matriz, por um fator tanto de concentração quanto de faixa de absorção da amostra.

Para determinar as possíveis identidades dos picos presentes no espectro, foram calculadas as massas de acordo com a seguinte fórmula:

$$[M + H]^+ = \sum M_m + (152,011 \times G) - [(DP - 1) \times L \times 1,008]$$

Onde:

M_m = massa molecular dos monômeros constituintes

G = número de substituintes *galloyl* esterificados aos monômeros

DP = grau de polimerização

L = tipo de ligação inter-flavan, A ou B. Para A, L = 4 e para B, L = 2

A massa também pode ser calculada em função de adutos com sódio ($[M+Na]^+$), o que ocorre naturalmente em amostras biológicas. Nesse caso, a massa atômica do sódio (22,99) é adicionada a fórmula utilizada. A Figura 19 representa os espectros de massas obtidos para a fração NEPA do guaraná em pó.

Figura 20 – Espectros de massas obtidos por MALDI-TOF para a fração condensada do guaraná em pó (200 – 1400 Da)

Apesar de se conseguir notar uma periodicidade no espectro de massas, os conjuntos de íons se mostram largos, o que indica uma mistura de constituintes dos oligômeros, provavelmente decorrente do próprio processo de obtenção, que promove certa despolimerização e degradação, além do efeito do laser – sem o uso de matriz, espera-se que tenha ocorrido algum grau de modificação nas moléculas estudadas, como de-hidroxilação (UCAR et al., 2013). A técnica permite distinguir entre íons com diferentes graus de hidroxilação, substituição *galloyl*, grau de polimerização e tipo de ligação, mas não permite distinção entre estereoisômeros, como é o caso da catequina e epicatequina. Dessa forma, para simplificação, as estruturas químicas foram desenhadas sem a distinção estérica dos substituintes do anel C e a nomenclatura foi abreviada. A Figura 20 representa as possíveis unidades monoméricas constituintes de proantocianidinas e os tipos de ligações A e B.

Figura 21 – Estrutura química dos monômeros constituintes de proantocianidinas e representação dos tipos de ligações A e B

A interpretação dos complexos espectros de massas foi realizada com auxílio da literatura relevante (OO et al., 2008; WEI et al., 2010; UCAR et al., 2013; ZHANG et al., 2017; DEMARQUE et al., 2018). Para tanto, foram levados em consideração outras estruturas que não as comumente referidas, além de possíveis modificações decorrentes de reações de

fragmentação e processos de aromatização. As Figuras 21 e 22 apresentam as principais estruturas e processos investigados.

Figura 22 – Estruturas químicas de flavanóis mono e di-hidroxilados

Figura 23 – Representação de reações de fragmentação e processos de aromatização

Devido a limitação estrutural, flavan-3-ol e flavan-3,4-ol, além das estruturas aromatizadas derivadas de flavanóis, não podem estar envolvidas em ligações do tipo A, mas ainda podem compor estruturas oligoméricas através de ligações do tipo B. A Figura 23 apresenta o espectro de massas na região de 200-400 Da, onde podem ser identificados os monômeros presentes no extrato. Como pode ser observado pelos incrementos de 16 Da, os picos de maior intensidade relativa podem ser atribuídos a flavan-3-ol (224,7 Da), flavan-3,4-ol (242,8/264,8 Da), cianidina (286,8 Da) e delphinidina (302,8 Da). Um pico que pode ser atribuído a catequina pode ser observado, mas sua intensidade é relativamente baixa. Apesar dessas estruturas também ocorrerem naturalmente, é provável que o processo de hidrólise básica, extração e incidência do laser tenham contribuído para a extensa modificação das unidades monoméricas originais.

Figura 24 - Espectro de massas obtidos por MALDI-TOF para a fração condensada do guaraná em pó (200 – 400 Da)

Outra consequência decorrente da hidrólise básica e o processo de despolimerização é a ocorrência de hetero-oligômeros, ou seja, oligômeros compostos de unidades monoméricas diferentes. Pode-se esperar que as unidades terminais sejam as mais modificadas, apesar de não conseguir extrair esse tipo de informação dos espectros. A Figura 24 apresenta o espectro de massas na região de 460 - 660 Da. Nesta região, podem ser identificados dímeros, sendo que são observados duas séries distintas com incrementos de 16 Da, indicando a presença de hetero-oligômeros cujos monômeros possuem diferentes graus de hidroxilação. Partindo da série que se inicia com o pico em 505 Da, os picos de maior intensidade podem ser atribuídos a dímeros compostos de trihidroxi-flavanol/afzelequina (529/522,5 Da), afzelequina/afzelequina (545 Da) e catequina/afzelequina (560,9 Da), e ainda pode-se observar um pico de menor intensidade finalizando a série com o dímero de catequina/catequina (577 Da). A segunda série de picos se inicia com o pico a 536,5 Da e termina com o pico a 645,6 Da, compreendendo oito dímeros.

Figura 25 - Espectro de massas obtidos por MALDI-TOF para a fração condensada do guaraná em pó (460 – 660 Da)

O mesmo pode ser observado para os trímeros, que podem ser identificados no espectro de massas na região de 780 – 880 Da (Figura 25). Similarmente, podem ser distinguidas duas séries com incrementos de 16 Da. Para a série que se inicia em 793 Da, os picos de maior intensidade podem ser atribuídos a trímeros de pelargonidina (809 Da) e pelargonidina/pelargonidina/cianidina (825 Da). Com menor intensidade, a série que se inicia em 815 Da compreende picos que podem ser atribuídos a afzelequina (815 Da) e catequina (862,9 Da). Com o aumento do número de monômeros, no entanto, aumentam-se também as possibilidades de posição do grupo hidróxi, tornando difícil a distinção entre unidades monoméricas.

Figura 26 - Espectro de massas obtidos por MALDI-TOF para a fração condensada do guaraná em pó (780 – 880 Da)

Os tetrâmeros podem ser identificados na região de 1080 a 1190 Da (Figura 26). Novamente, é possível fazer a distinção entre duas séries principais com incrementos de 16 Da. Porém, com o aumento das unidades monoméricas, não é possível afirmar a identidade de cada constituinte. Todavia, pode-se identificar os possíveis homo-oligômeros presentes, como o tetrâmero de afzelequina (1089 Da), cianidina (1142,9 Da) e catequina (1148,9 Da).

Figura 27 - Espectro de massas obtidos por MALDI-TOF para a fração condensada do guaraná em pó (1080 – 1190 Da)

Por fim, com intensidade relativa baixa, os picos do espectro de massas com maior relação m/z foram 1407 e 1423 Da, também com uma diferença de 16 Da (Figura 27). Eles possivelmente correspondem a pentâmeros, mas não é possível distinguir os constituintes monoméricos. Supondo que sejam pentâmeros com ligações do tipo B, teriam no total 23 grupos hidroxilas distribuídos na estrutura oligomérica.

Figura 28 - Espectro de massas obtidos por MALDI-TOF para a fração condensada do guaraná em pó (700 – 4700 Da)

A técnica MALDI se mostrou útil para elucidar os componentes da mistura complexa da fração NEPA. É preciso levar em consideração, no entanto, que a hidrólise básica certamente promoveu a despolimerização das proantocianidinas originais, que foram então detectadas como oligômeros de menor peso molecular. Outro fator que pode ter influenciado a detecção de altos níveis de dímeros é a capacidade do carbocátion gerado no processo de despolimerização de reagir com outras estruturas presentes na solução, como outras unidades monoméricas, formando então uma proporção maior de dímeros (WHITE et al., 2010). Para elucidação das estruturas poliméricas intactas, seria necessário alterar a técnica de obtenção, utilizando a hidrólise enzimática ou uma combinação da hidrólise básica e enzimática. Não obstante, a investigação permitiu confirmar que o guaraná em pó possui níveis apreciáveis de polifenóis não-extraíveis da classe das proantocianidinas, o que pode então ser investigado a

respeito de aplicações a saúde humana. A Tabela 11 sumariza alguns picos observados e suas possíveis identidades.

Tabela 11 – Possíveis identidades de picos obtidos por MALDI-TOF da fração NEPA do guaraná em pó

	$[M+H]^+$ calculado	$[M+H]^+$ obtido	Erro %	Possível identidade
<i>Monômeros</i>	242,094	242,822	-0,30	Leucoantocianidina
	287,055	286,836	0,08	Cianidina
	290,079	289,629	0,16	Catequina
	303,050	302,831	0,07	Delfinidina
<i>Dímeros</i>	544,136	545,013	-0,16	Dímero tipo A de afzelequina
	560,131	560,993	-0,15	Dímero tipo A de afzelequina/catequina
	576,126	576,969	-0,15	Dímero tipo A de catequina
<i>Trímeros</i>	809,148	809,067	0,01	Trímero tipo B de pelargonidina
	814,188	815,082	-0,11	Trímero tipo A de afzelequina
	825,143	825,040	0,01	Trímero tipo B de pelargonidina/pelargonidina/cianidina
	862,173	862,995	-0,10	Trímero tipo A de catequina
<i>Tetrâmeros</i>	1090,288	1089,061	0,11	Tetrâmero tipo B de afzelequina
	1142,172	1142,983	-0,07	Tetrâmero tipo B de cianidina
	1148,22	1148,998	-0,07	Tetrâmero tipo A de catequina

5.2 TESTE ENZIMÁTICO

5.2.1 Determinação de IC₅₀

As maiores fontes alimentares de glicose são o amido e dissacarídeos. Todavia, para que a glicose seja absorvida e atinja os tecidos-alvo, as fontes alimentares devem primeiro ser quebradas em seus monossacarídeos constituintes. Em um organismo saudável, a glicose é absorvida através da parede intestinal e entra na corrente sanguínea, atingindo altos níveis de concentração. O aumento na concentração de glicose no sangue sinaliza a liberação de insulina, a qual então facilita a absorção da glicose pelos tecidos. Dessa forma, os níveis de glicose são normalizados rapidamente após a ingestão de alimentos. Quando existe uma disfunção nesse metabolismo, no entanto, os níveis de glicose no sangue são permanentemente aumentados, mesmo em jejum, e é justamente esse desarranjo que está associado a doenças crônicas como diabetes tipo 2 (WILLIAMSON, 2013). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016), 422 milhões de adultos tem diabetes no mundo e a tendência é de contínua ascendência, principalmente devido ao aumento de incidência de diabetes tipo 2 (DT2).

Uma das possibilidades de gerenciar a doença é através de inibidores de enzimas relacionadas a digestão de carboidratos, como α -amilase e α -glicosidase. O maior exemplo dessa aplicação é o desenvolvimento do medicamento conhecido como acarbose, que não é absorvido durante seu percurso no trato gastrointestinal e, uma vez em seu local de ação, inibe a atividade de enzimas do tipo α -glicosidase. É nesse mesmo sentido que o efeito de polifenóis da dieta sobre o DT2 é atribuído – compostos fenólicos não absorvidos se acumulam no cólon, onde podem atuar na digestão e absorção de carboidratos (WILLIAMSON, 2013). Considerando o fato de que, conforme discutido anteriormente, a fração não-extraível de polifenóis é a que de fato chega intacta no cólon, a fração EPP e NEPA foram testadas e comparadas quanto a sua capacidade de inibir α -glicosidase. As curvas de dose-resposta foram ajustadas através de regressão não-linear e o valor de IC₅₀, isto é, a concentração do inibidor na qual a atividade da enzima é inibida 50%, foi obtido através da equação. As Figuras 28 e 29 apresentam os resultados obtidos para EPP e NEPA.

Figura 29 – Curva dose-resposta da atividade inibitória da fração EPP **Figura 30** – Curva dose-resposta da atividade inibitória da fração NEPA

A dose necessária para inibir a atividade da enzima em 50% foi aproximadamente 6 vezes menor para a fração NEPA em comparação a fração EPP. É importante destacar, no entanto, que os valores de CRT foram utilizados para normalizar a concentração de fenólicos nas duas frações de maneira a torna-las comparáveis, o que agrega um erro ao resultado devido as limitações da própria estimativa. YANG e KONG (2014) avaliaram a atividade de inibição de α -glicosidase de chás verde, preto e oolong, com resultados de IC₅₀ de 2,82, 2,25 e 1,38 μ g/mL, respectivamente. Similarmente, GAO et al. (2013) estudaram o efeito de chá verde na inibição da enzima, com valores de 10,019 μ g/mL. Dessa forma, o valor obtido para a fração EPP está condizente com o encontrado para outras fontes de polifenóis, como chá verde.

ADEFEGHA e OBOH (2012) compararam o efeito de polifenóis livres e não-extraíveis de cravo-da-índia na inibição de α -glicosidase e α -amilase. Apesar da fração livre ter tido maior atividade inibitória em relação a α -amilase, o inverso foi verificado para a α -glicosidase. YAN et al. (2018) avaliaram o efeito de polifenóis extraíveis e não-extraíveis provenientes do chá verde e verificaram que a fração extraível teve maior atividade inibitória em comparação com a fração não-extraível, com uma diferença de cerca de 2,5 vezes. Os dois estudos utilizaram a fração hidrolisável, portanto apesar de não-extraíveis, não contém proantocianidinas, apesar de possivelmente conter outros compostos complexos como elagitaninos.

LEE et al. (2007) compararam o efeito de proantocianidinas provenientes da casca de caqui na inibição da enzima, mas separaram a fração oligomérica da fração polimérica. Os resultados indicam que os oligômeros possuem maior atividade inibitória em comparação com os polímeros – 97,4% e 74% a 100 μ g/mL, respectivamente. Dessa forma, os resultados sugerem que o grau de polimerização influencia na capacidade inibitória. Dos resultados discutidos anteriormente, a fração NEPA possui consideravelmente mais oligômeros em sua composição quando comparada a fração EPP, o que pode ser um fator que contribua de maneira expressiva nos resultados obtidos de IC₅₀.

É importante ressaltar que, como todo teste *in vitro*, existem muitas limitações a ser consideradas, como o uso de enzimas não-humanas, o que pode influenciar em sua especificidade, o uso de substrato sintético e a ausência de outras proteínas que estariam presentes *in vivo* e que podem interagir com os polifenóis, impactando sua atividade. De todo modo, os resultados são promissores e úteis para impulsionar estudos mais aprofundados utilizando a fração não-extraível do guaraná em pó.

5.2.2 Determinação do modo de inibição

As enzimas compõem parte fundamental das condições para a vida – a capacidade de catalisar reações químicas que normalmente ocorrem de maneira extremamente lenta é vital para a manutenção da vida. Enzimas são proteínas altamente especializadas, com alto poder catalítico e grau de especificidade. Sua atividade catalítica está intimamente ligada a conformação da proteína, que é dependente do meio em qual ela se encontra, além de condições de temperatura e pH. As enzimas catalisam reações afetando sua taxa de reação e diminuindo a energia de ativação requerida para a ocorrência da reação. Essa capacidade tem base nas interações entre o sítio ativo da enzima e o substrato, que proporcionam um caminho alternativo e de menor energia para a reação. Dessa forma, a energia de ligação é utilizada para reduzir a energia de ativação uma vez que interações fracas e não-covalentes são estabelecidas entre enzima e substrato, formando complexos intermediários enzima-substrato (ES) e enzima-produto (EP) (NELSON e COX, 2012).

Com o intuito de elucidar o modo de inibição e verificar se existem diferenças significativas entre as frações, foram conduzidos testes de cinética de enzimas na ausência e na presença de inibidores, no caso EPP e NEPA. Estudos de cinética de enzimas utilizam a velocidade inicial (V_0) para medir o efeito que a concentração de substrato, $[S]$, exerce sobre a taxa de reação. Em uma reação típica, assume-se que a concentração inicial de substrato é muito maior que a concentração da enzima de modo que, no início da reação, a quantidade de substrato convertido em produto é proporcionalmente muito baixa e pode ser ignorada. Dessa forma, a concentração de substrato pode ser considerada constante e V_0 é tratada como uma função de $[S]$. Ao se construir uma curva relacionando V_0 e $[S]$, observa-se que até certo ponto, a velocidade inicial cresce de maneira quase linear com o aumento de $[S]$. Entretanto, após esse ponto, o crescimento de V_0 diminui até finalmente atingir um platô. Essa curva é conhecida como curva de saturação da enzima (NELSON e COX, 2012). A Figura 30 mostra a curva de saturação de α -glicosidase na ausência de inibidores.

Figura 31 – Curva de saturação de α -glicosidase na ausência de inibidores

A reação da enzima pode ser dividida em duas etapas. A primeira etapa (1) consiste na formação do complexo intermediário ES, uma reação rápida e reversível. Em condições nas quais a concentração de substrato (S) é baixa, existe maior quantidade de enzima (E) em sua forma livre e a taxa de reação é proporcional a [S]. Essa primeira etapa é representada pelo crescimento linear de V_0 quando [S] é mantida relativamente baixa.

A segunda etapa (2) é mais lenta do que a primeira, portanto é considerada o passo limitante da reação. Essa etapa consiste na dissociação do complexo intermediário para formação do produto (P). Em condições nas quais [S] é alta, a maior parte da enzima presente no meio reacional está em sua forma complexada. A segunda etapa é representada pelo platô observado na curva de saturação e a velocidade nessa etapa é considerada a velocidade máxima, $V_{\max}$.

A curva de saturação pode ser expressa matematicamente pela equação de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

A constante de Michaelis, K_m , é definida como a concentração de substrato na qual V_0 é igual a metade de V_{max} . K_m é função de diferentes constantes de velocidade, uma vez que a reação da enzima com o substrato pode ter vários passos. As Figuras 31 e 32 representam as curvas de saturação para a enzima na presença de EPP e NEPA.

Figura 32 – Curva de saturação de α -glicosidase na presença de EPP

Figura 33 – Curva de saturação de α -glicosidase na presença de NEPA

Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos através de regressão não-linear e são exibidos na Tabela 12. A presença do inibidor altera os valores de K_m e V_{max} obtidos para a curva de saturação da enzima sozinha, e é justamente pela maneira na qual essas constantes são alteradas que se pode determinar o modo de inibição de determinados inibidores. As constantes obtidas na presença de inibidor são referidas como K_m aparente ($K_{m(app)}$) e V_{max} aparente ($V_{max(app)}$). É possível observar que, para ambos os casos, K_m e V_{max} foram alterados de maneira similar – K_m aumentou enquanto V_{max} diminuiu.

Tabela 12 – Valores de V_{max} e K_m obtidos pela equação de Michaelis-Menten na ausência e presença de inibidores

	Km	Vmax
	mM de pNPG	OD/min
Controle	0,121	0,020
Fração extraível	0,469	0,003
Fração não-extraível	0,227	0,007

Controle = meio reacional completo (enzima e substrato) em ausência do inibidor

As enzimas podem ser inibidas reversível ou irreversivelmente. No caso da inibição reversível, a mais comum, existem três categorias: inibição competitiva, acompetitiva e mista. No caso da primeira, o inibidor compete diretamente com o substrato para se ligar ao sítio ativo da enzima, e como consequência o valor de K_m aumenta, mas o valor de V_{max} permanece o mesmo. Já no segundo caso, o inibidor se liga ao complexo ES, fora do sítio ativo da enzima, diminuindo os valores de V_{max} e K_m . Por fim, o inibidor misto se liga tanto a enzima quanto ao complexo ES, porém sempre fora do sítio ativo – nesse caso, geralmente ambos V_{max} e K_m são afetados, porém a maneira que são alterados depende dos fatores α e α' . Dessa forma, os resultados obtidos com as frações EPP e NEPA indicam que seu modo de inibição é misto. A representação esquemática da relação entre enzima, substrato e inibidor está ilustrada na Figura 33.

Figura 34 – Representação esquemática da relação enzima, substrato e inibidor no modo de inibição misto

A equação de Michaelis-Menten pode então ser reescrita da seguinte forma:

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]}$$

Os fatores α e α' se relacionam com as constantes de equilíbrio K_I e K'_I de acordo com as seguintes expressões:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I}$$

Para determinar α , α' , K_I e K_I' foi utilizado a linearização da equação de Michaelis-Menten conhecida como Lineweaver-Burk. O processo de linearização acarreta um certo grau de erro na determinação, porém é comumente utilizada por ser um recurso visual útil. A linearização de Lineweaver-Burk é expressa de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

As Figuras 34 e 35 representam a linearização das curvas de saturação da enzima na presença e ausência de inibidores. É possível observar que, em ambos os casos, a reta construída com o controle e a reta na presença de inibidor não interceptam o eixo y no mesmo ponto e nem possuem a mesma inclinação, confirmando visualmente as características do inibidor misto – a inclinação é alterada por um fator α e o ponto de intercepção é alterado por um fator α' .

Figura 35 – Lineweaver-Burk *plot* na presença de EPP

Figura 36 – Lineweaver-Burk *plot* na presença de NEPA

Os valores de α e α' foram calculados utilizando as relações a seguir:

$$V_{\max(app)} = \frac{V_{\max}}{\alpha'} \qquad K_{m(app)} = \frac{\alpha K_m}{\alpha'}$$

Por fim, os valores das constantes de equilíbrio foram calculados utilizando as relações descritas anteriormente. Os resultados estão relacionados na Tabela 13 a seguir:

Tabela 13 – Valores das constantes pertinentes a cinética de inibição para EPP e NEPA

	K_m mM de pNPG	$V_{\max}$ OD/min	K_I $\mu\text{g/mL}^1$	K'_I $\mu\text{g/mL}^1$	K'_I/K_I	Tipo de inibição
Controle	0,128	0,020	/	/	/	/
Fração extraível	0,489	0,003	0,403	1,735	4,30	Misto
Fração não-extraível	0,292	0,007	0,287	0,847	2,95	Misto

Controle = meio reacional completo (enzima e substrato) em ausência do inibidor; ¹valor de concentração referente a concentração de inibidor

As constantes de equilíbrio podem ser expressas como:

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \qquad K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Dessa forma, constantes de equilíbrio maiores que 1 indicam que existem menos complexos inibidor-enzima no meio reacional, enquanto constantes menores que 1 indicam o oposto. De uma maneira geral, quanto menor o valor da constante de equilíbrio, maior é a força com a qual a ligação entre o inibidor e a enzima ocorre, e, consequentemente, menos enzima livre está presente em solução. Dessa forma, é possível observar que os polifenóis da fração NEPA se ligam a enzima mais fortemente do que os polifenóis da fração EPP. Também é possível observar que, para ambas as frações, pode-se atribuir a maior parte de seu efeito inibitório a formação de complexo enzima-inibidor, uma vez que os valores de K_I são menores em comparação com os valores de K'_I , sendo que essa relação é mais pronunciada para a fração EPP.

A capacidade inibitória de polifenóis está correlacionada a sua estrutura. SUN et al. (2016) investigaram o efeito de componentes isolados do chá verde na inibição de α -amilase e concluíram que as estruturas que apresentaram maior capacidade inibitória tinham ácido gálico esterificado em sua estrutura, como epigallocatequina galato. Eles também verificaram que catequina e epicatequina exerceram inibição muito baixa. A ausência de estruturas esterificadas com ácido gálico pode ser um fator contribuinte para a inibição relativamente baixa da fração EPP, embora sua capacidade não seja de maneira alguma insignificante. HSU et al. (2018) verificaram a capacidade de proantocianidinas de folhas de *Chamaelcyparis obtusa*, uma árvore nativa do Japão, de inibir α -glicosidase. Interessantemente, eles observaram uma relação positiva entre a proporção de dímeros e a proporção de afzelequina em unidades terminais e a capacidade de inibição da fração. Conforme discutido anteriormente, a fração NEPA possui grande quantidade de dímeros e afzelequina, o que pode ser um fator contribuinte para sua alta capacidade inibitória. A própria variabilidade de graus de hidroxilação pode ter tido influência na interação da proteína com o polifenol, proporcionando diferentes pontos e maneiras de ligação.

De uma maneira geral, a interação de proteínas e polifenóis está relacionada com o tamanho dos polifenóis – quanto maior e mais complexo o polifenol, mais efetivamente ele interage com a proteína (BARRETT et al., 2018). Embora tenha sido verificada a presença de

oligômeros na fração EPP (dímeros e trímero), proporcionalmente a fração NEPA possui maior quantidade de oligômeros, além de oligômeros maiores e mais complexos, o que é outro fator que compõe a diferença observada na capacidade de inibição das duas frações. Dessa forma, o guaraná em pó não só pode ser considerado fonte de proantocianidinas, como essa fração de polifenóis não-extraíveis possui grande potencial para aplicações na saúde humana, como controle de glicemia pós-prandial e DT2.

6. CONCLUSÃO

Retornando à hipótese central de que o guaraná é fonte de polifenóis não-extraíveis, principalmente os da classe das proantocianidinas, é possível concluir que a hipótese foi confirmada. O guaraná em pó, de fato, possui proantocianidinas em sua composição que em grande parte permanecem no resíduo após a extração convencional. A técnica MALDi-TOF se mostrou uma ferramenta poderosa para a elucidação da mistura complexa da fração não-extraível. A hidrólise básica, apesar de útil e relativamente simples, compromete a integridade estrutural das proantocianidinas, portanto estudos futuros que visem obter a fração não-extraível de maneira íntegra devem procurar utilizar outros métodos, como a hidrólise enzimática.

Quanto aos polifenóis hidrolisáveis, sua análise foi inconclusiva. Todavia, considerando-se também que não foram detectados os maiores componentes dessa fração, ácido gálico e elágico, em nenhuma outra fração, nem a presença de ácido gálico esterificado a outros polifenóis, a presença de níveis significativos de polifenóis hidrolisáveis no guaraná em pó é improvável.

Apesar da fração condensada do guaraná em pó corresponder a apenas cerca de 7% do total de compostos fenólicos, a avaliação enzimática demonstrou que seus componentes são altamente efetivos na inibição de α -glicosidase, o que pode ter implicações para a saúde humana, principalmente para distúrbios relacionados ao metabolismo de carboidratos, como diabetes tipo 2.

Por fim, estudos futuros devem se aprofundar no mecanismo e efeitos da fração não-extraível do guaraná em pó, bem como otimizar os processos de obtenção e extração dessa fração. O guaraná, produto tipicamente brasileiro, já se mostrava com grande potencial e versatilidade para estudos relacionados a saúde e seus polifenóis não-extraíveis agora se apresentam como uma nova faceta pronta para ser explorada.

7. REFERÊNCIAS

- Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldivar SO. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*. 2014;152:46-55;
- Adefegha SA, Oboh G. In vitro inhibition activity of polyphenol-rich extracts from *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Clove) buds against carbohydrate hydrolyzing enzymes linked to type 2 diabetes and Fe²⁺-induced lipid peroxidation in rat pancreas. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012;2(10):774-81;
- Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Tulipani S, Casoli T, Di Stefano G, Gonzalez-Paramas AM, et al. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2014;25(3):289-94;
- Anderson RA, Broadhurst CL, Polansky MM, Schmidt WF, Khan A, Flanagan VP, et al. Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(1):65-70;
- Angelo P, Nunes-Silva CG, Brigido MM, Azevedo JSN, Assuncao EN, Sousa ARB, et al. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. *Plant Cell Reports*. 2008;27(1):117-24;
- Anhe FF, Roy D, Pilon G, Dudonne S, Matamoros S, Varin TV, et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*. 2015;64(6):872-83;
- Antunes PB. Análise comparativa das frações polpa, casca, semente e pó comercial do guaraná (*Paullinia cupana*): caracterização química e atividade antioxidante in vitro [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública/ Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade/ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2011;
- AOAC: Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 16^a edição. Arlington; 1995;
- Arantes LP, Machado ML, Zamberlan DC, Da Silveira TL, da Silva TC, da Cruz IBM, et al. Mechanisms involved in anti-aging effects of guarana (*Paullinia cupana*) in *Caenorhabditis elegans*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2018;51(9):7;
- Avato P, Pesante MA, Fanizzi FP, Santos CAD. Seed oil composition of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. *Lipids*. 2003;38(7):773-80;

Barrett AH, Farhadi NF, Smith TJ. Slowing starch digestion and inhibiting digestive enzyme activity using plant flavanols/tannins— A review of efficacy and mechanisms. *LWT - Food Science and Technology*. 2018;87:394–9;

Basile A, Ferrara L, Del Pezzo M, Mele G, Sorbo S, Bassi P, et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *J Ethnopharmacol*. 2005;102:32-6;

Basile A, Rigano D, Contea B, Bruno M, Rosselli S, Sorbo S. Antibacterial and antifungal activities of acetonic extract from *Paullinia cupana* Mart. seeds. *Natural Product Research*. 2013;27(22):2084-90;

Belscak-Cvitanovic A, Durgo K, Hudek A, Bacun-Druzina V, Komes D. Overview of polyphenols and their properties. In: *Polyphenols: Galanakis CM. Properties, Recovery and Applications*. Cambridge: Woodhead Publishing; 2018. 3-44;

Bhat MI, Kapila R. Dietary metabolites derived from gut microbiota: critical modulators of epigenetic changes in mammals. *Nutr Rev*. 2017;75(5):374-89;

Bindon KA, Smith PA, Kennedy JA. Interaction between Grape-Derived Proanthocyanidins and Cell Wall Material. 1. Effect on Proanthocyanidin Composition and Molecular Mass. *J Agric Food Chem*. 2010;58:2520-8;

Bittencourt LD, Zeidan-Chulia F, Yatsu FKJ, Schnorr CE, Moresco KS, Kolling EA, et al. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) Prevents beta-Amyloid Aggregation, Generation of Advanced Glycation-end Products (AGEs), and Acrolein-Induced Cytotoxicity on Human Neuronal-Like Cells. *Phytotherapy Research*. 2014;28(11):1615-24;

Boasquivis PF, Silva GMM, Paiva FA, Cavalcanti RM, Nunez CV, Oliveira RD. Guarana (*Paullinia cupana*) Extract Protects *Caenorhabditis elegans* Models for Alzheimer Disease and Huntington Disease through Activation of Antioxidant and Protein Degradation Pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018:16;

Bonadiman BDR, Cadona FC, Assmann CE, Weis GCC, Alves AD, Durte MF, et al. Guarana (*Paullinia cupana*): Cytoprotective effects on age-related eye dysfunction. *Journal of Functional Foods*. 2017;36:375-86;

Campos MPD, Riechelmann R, Martins LC, Hassan BJ, Casa FBA, Del Giglio A. Guarana (*Paullinia cupana*) Improves Fatigue in Breast Cancer Patients Undergoing Systemic Chemotherapy. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2011;17(6):505-12;

Casanova-Marti A, Serrano J, Portune KJ, Sanz Y, Blay MT, Terra X, et al. Grape seed proanthocyanidins influence gut microbiota and enteroendocrine secretions in female rats. *Food Funct*. 2018;9(3):1672-82;

Chatterjee S. Oxidative stress, inflammation, and disease. In: Dziubla T, Butterfield DA. *Oxidative Stress and Biomaterials*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2016. p. 35-58;

Cheng AW, Han CJ, Fang XX, Sun JY, Chen XY, Wan FC. Extractable and non-extractable polyphenols from blueberries modulate LPS-induced expression of iNOS and COX-2 in RAW264.7 macrophages via the NF-kappa B signalling pathway. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016;96(10):3393-400;

Cheng AW, Yan HQ, Han CJ, Chen XY, Wang WL, Xie CY, et al. Acid and Alkaline Hydrolysis Extraction of Non-Extractable Polyphenols in Blueberries: Optimisation by Response Surface Methodology. *Czech Journal of Food Sciences*. 2014;32(3):218-25;

Cires MJ, Wong X, Carrasco-Pozo C, Gotteland M. The Gastrointestinal Tract as a Key Target Organ for the Health-Promoting Effects of Dietary Proanthocyanidins. *Front Nutr*. 2016;3:57;

Collins B, Hoffman J, Martinez K, Grace M, Lila MA, Cockrell C, et al. A polyphenol-rich fraction obtained from table grapes decreases adiposity, insulin resistance and markers of inflammation and impacts gut microbiota in high-fat-fed mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016;31:150-65;

Cordero-Herrera I, Martin MA, Fernandez-Millan E, Alvarez C, Goya L, Ramos S. Cocoa and cocoa flavanol epicatechin improve hepatic lipid metabolism in in vivo and in vitro models. Role of PKC zeta. *Journal of Functional Foods*. 2015;17:761-73;

da Silva GS, Canuto KM, Ribeiro PRV, de Brito ES, Nascimento MM, Zocolo GJ, et al. Chemical profiling of guarana seeds (*Paullinia cupana*) from different geographical origins using UPLC-QTOF-MS combined with chemometrics. *Food Research International*. 2017;102:700-9;

Dalonso N, Petkowicz CLD. Guarana powder polysaccharides: Characterization and rheological properties of starch. *Starch-Starke*. 2014;66(9-10):914-22;

de Gois JS, Almeida TS, de Andrade RM, Toaldo IM, Bordignon-Luiz MT, Borges DLG. Direct solid analysis for the determination of Mn, Ni, Rb and Sr in powdered stimulant plants using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry followed by chemometric classification based on elemental composition, polyphenol content and antioxidant activity. *Microchemical Journal*. 2016;124:283-9;

Demarque DP, Callejon DR, de Oliveira GG, Silva DB, Carollo CA, Lopes NP. The role of tannins as antiulcer agents: a fluorescence-imaging based study. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2018;28(4):425-32;

Dias T, Silva MR, Damiani C, da Silva FA. Quantification of Catechin and Epicatechin in Foods by Enzymatic-Spectrophotometric Method with Tyrosinase. *Food Analytical Methods*. 2017;10(12):3914-23;

Dominguez-Rodriguez G, Marina ML, Plaza M. Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. *Journal of Chromatography A*. 2017;1514:1-15;

Espley RV, Butts CA, Laing WA, Martell S, Smith H, McGhie TK, et al. Dietary Flavonoids from Modified Apple Reduce Inflammation Markers and Modulate Gut Microbiota in Mice. *Journal of Nutrition*. 2014;144(2):146-54;

Fernández-Iglesias A, Pajuelo D, Quesada H, Díaz S, Bladé C, Arola L. Grape seed proanthocyanidin extract improves the hepatic glutathione metabolism in obese Zucker rats. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58:727-37;

Ferrini MG, Garcia E, Abraham A, Artaza JN, Nguyen S, Rajfer J. Effect of ginger, *Paullinia cupana*, *Muira puama* and L-citrulline, singly or in combination, on modulation of the inducible nitric oxide- NO-cGMP pathway in rat penile smooth muscle cells. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*. 2018;76:81-6;

Fontes LCB, Torres EAFS, Yonekura L. Optimization of the extraction of antioxidants from guarana (*Paullinia cupana*) and grape (*Vitis labrusca* var. *Izabel*) pomace using response surface methodology. *African Journal of Food Science and Technology*. 2014;5:53-9;

Frazier RA, Deaville ER, Green RJ, Stringano E, Willoughby I, Plant J, et al. Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010;51:490-5;

Gao J, Xu P, Wang Y, Wang Y, Hochstetter D. Combined Effects of Green Tea Extracts, Green Tea Polyphenols or Epigallocatechin Gallate with Acarbose on Inhibition against α -Amylase and α -Glucosidase in Vitro. *Molecules*. 2013;18(9):11614–23;

Gao Y, Ma S, Wang M, Feng XY. Characterization of Free, Conjugated, and Bound Phenolic Acids in Seven Commonly Consumed Vegetables. *Molecules*. 2017;22(11):14;

Garcia-Conesa MT, Chambers K, Combet E, Pinto P, Garcia-Aloy M, Andres-Lacueva C, et al. Meta-Analysis of the Effects of Foods and Derived Products Containing Ellagitannins and Anthocyanins on Cardiometabolic Biomarkers: Analysis of Factors Influencing Variability of the Individual Responses. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3);

Garcia-Villalba R, Espin JC, Aaby K, Alasalvar C, Heinonen M, Jacobs G, et al. Validated Method for the Characterization and Quantification of Extractable and

Nonextractable Ellagitannins after Acid Hydrolysis in Pomegranate Fruits, Juices, and Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015;63(29):6555-66;

Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Cordero MD, Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Afrin S, et al. Strawberry consumption improves aging-associated impairments, mitochondrial biogenesis and functionality through the AMP-activated protein kinase signaling cascade. *Food Chemistry*. 2017;234:464-71;

Giovannini L, Bianchi S. Role of nutraceutical SIRT1 modulators in AMPK and mTOR pathway: Evidence of a synergistic effect. *Nutrition*. 2017;34:82-96;

Gonzales GB, Smagghe G, Raes K, Camp JV. Combined Alkaline Hydrolysis and Ultrasound-Assisted Extraction for the Release of Nonextractable Phenolics from Cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) Waste. *J Agric Food Chem*. 2014;62:3371-6;

Gonzalez N, Yamazaki KG. Effects of Epicatechin on AMPK, GLUT4 and TNF-alpha in the onset of Type 2 Diabetes. *Faseb Journal*. 2015;29:1;

Goss F. Melhoramento genético aumenta em até sete vezes a produtividade do guaraná no Amazonas [internet]. Brasil: Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária; 2017 [acesso em março de 2018]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/26191362/melhoramento-genetico-aumenta-em-ate-sete-vezes-a-produtividade-do-guarana-no-amazonas>;

Goyeneche R, Roura S, Ponce A, Vega-Galvez A, Quispe-Fuentes I, Uribe E, et al. Chemical characterization and antioxidant capacity of red radish (*Raphanus sativus* L.) leaves and roots. *Journal of Functional Foods*. 2015;16:256-64;

Grosso G, Godos J, Lamuela-Raventos R, Ray S, Micek A, Pajak A, et al. A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2017;61(4):10;

Halliwel B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavanoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr*. 2005;81(suppl):268S-76S;

Halliwel B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys*. 2008;476(2):107-12;

Hartzfeld PW, Forkner R, Hunter MD, Hagerman AE. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *J Agric Food Chem*. 2002;50(7):1785-90;

Haskell CF, Kennedy DO, Wesnes KA, Milne AL, Scholey AB. A double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guarana in humans. *Journal of Psychopharmacology*. 2007;21(1):65-70;

He F, Pan QH, Shi Y, Duan CQ. Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. *Molecules*. 2008;13(10):2674-703;

Hilbig J, Policarpi PD, Grinevicius V, Mota N, Toaldo IM, Luiz MTB, et al. Aqueous extract from pecan nut *Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch shell show activity against breast cancer cell line MCF-7 and Ehrlich ascites tumor in Balb-C mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018;211:256-66;

Hollman PC, Cassidy A, Comte B, Heinonen M, Richelle M, Richling E, et al. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr*. 2011;141(5):989S-1009S;

Hsu CY, Lin GM, Lin HY, Chang ST. Characteristics of proanthocyanidins in leaves of *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* as strong α -glucosidase inhibitors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018;98(10):3806–14;

Hwang JT, Kwon DY, Yoon SH. AMP-activated protein kinase: a potential target for the diseases prevention by natural occurring polyphenols. *New Biotechnology*. 2009;26(1-2):17-22;

IBGE: Produção Agrícola Municipal [internet]. Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2017 [acesso em março agosto de 2018]. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>;

Jaganath IB, Crozier A. Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds. In: Fraga CG. *Plant Phenolics and Human Health Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. John Wiley & Sons, Inc; 2009. 1-49;

Kennedy DO, Haskell CF, Wesnes KA, Scholey AB. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2004;79(3):401-11;

Kim HS, Quon MJ, Kim JA. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology*. 2014;2:187-95;

Kim Y, Keogh JB, Clifton PM. Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*. 2016;8(1):27;

Kober H, Tatsch E, Torbitz VD, Cargnin LP, Sangoi MB, Bochi GV, et al. Genoprotective and hepatoprotective effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Drug and Chemical Toxicology*. 2016;39(1):48-52;

Koutsos A, Lima M, Conterno L, Gasperotti M, Bianchi M, Fava F, et al. Effects of Commercial Apple Varieties on Human Gut Microbiota Composition and Metabolic Output Using an In Vitro Colonic Model. *Nutrients*. 2017;9(6);

Krewer CD, Ribeiro EE, Ribeiro EAM, Moresco RN, da Rocha M, Montagner G, et al. Habitual Intake of Guarana and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. *Phytotherapy Research*. 2011;25(9):1367-74;

Krewer CD, Suleiman L, Duarte M, Ribeiro EE, Mostardeiro CP, Montano MAE, et al. Guarana, a supplement rich in caffeine and catechin, modulates cytokines: evidence from human in vitro and in vivo protocols. *European Food Research and Technology*. 2014;239(1):49-57;

Lattanzio V, Kroon PA, Quideau S, Treutter D. Plant Phenolics – Secondary Metabolites with Diverse Functions. In: Daayf F, Lattanzio V. *Recent Advances in Polyphenols Research*. Oxford: Wiley-Blackwell; 2008. v. 1, 1–35;

Lattanzio V. Phenolic compounds: Introduction. In: Ramawat KG, Merillon JM. *Natural Products*. Berlin: Springer-Verlag; 2013. 1543-80;

Le Bourvellec C, Bouchet B, Renard CMGC. Non-covalent interactions between procyanidins and apple cell-wall material. Part III : Study on model polysaccharides. *Biochimica biophysica. Acta*. 2005;1675:10-8;

Leanderson P, Faresjö AO, Tagesson C. Green tea polyphenols inhibit oxidant-induced DNA strand breakage in cultured lung cells. *Free Rad Biol Med*. 1997;23(2):235-42;

Lee YA, Cho EJ, Tanaka T, Yokozawa T. Inhibitory activities of proantho-cyanidins from persimmon against oxidative stress and digestive enzymes related to diabetes. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2007;53(3):287–92;

Lei Z, Jervis J, Helm RF. Use of Methanolysis for the Determination of Total Ellagic and Gallic Acid Contents of Wood and Food Products. *J Agric Food Chem*. 2001;49(3):1165-8;

Li X, Sui Y, Wu Q, Xie B, Sun Z. Attenuated mTOR Signaling and Enhanced Glucose Homeostasis by Dietary Supplementation with Lotus Seedpod Oligomeric Procyanidins in Streptozotocin (STZ)-Induced Diabetic Mice. *J Agric Food Chem*. 2017;65(19):3801-10;

Lima ND, Numata ED, Mesquita LMD, Dias PH, Vilegas W, Gambero A, et al. Modulatory Effects of Guarana (*Paullinia cupana*) on Adipogenesis. *Nutrients*. 2017;9(6):11;

Lima ND, Teixeira L, Gambero A, Ribeiro ML. Guarana (*Paullinia cupana*) Stimulates Mitochondrial Biogenesis in Mice Fed High-Fat Diet. *Nutrients*. 2018;10(2):12;

Liu L, Yasen M, Tang D, Ye JP, Aisa HA, Xin XL. Polyphenol-enriched extract of *Rosa rugosa* Thunb regulates lipid metabolism in diabetic rats by activation of AMPK pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;100:29-35;

Lorenz SS. Sateré Mawé – Povos Indígenas no Brasil [internet]. Brasil: Instituto Socioambiental; 2015 [acesso em março de 2018]. Disponível em: https://pib.socioambiental.org/pt/Povo:Sateré_Mawé;

Losada-Barreiro S, Bravo-Díaz C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur J Med Chem*. 2017;133:379-402;

Machado AK, Cadona FC, Azzolin VF, Dornelles EB, Barbisan F, Ribeiro EE, et al. Guarana (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. *Food Research International*. 2015;67:426-33;

Machado KN, de Freitas AA, Cunha LH, Faraco AAG, de Padua RM, Braga FC, et al. A rapid simultaneous determination of methylxanthines and proanthocyanidins in Brazilian guarana (*Paullinia cupana* Kunth.). *Food Chemistry*. 2018;239:180-8;

Margalef M, Pons Z, Bravo FI, Muguerza B, Arola-Arnal A. Plasma kinetics and microbial biotransformation of grape seed flavanols in rats. *Journal of Functional Foods*. 2015;12:478-88;

Masumoto S, Terao A, Yamamoto Y, Mukai T, Miura T, Shoji T. Non-absorbable apple procyanidins prevent obesity associated with gut microbial and metabolomic changes. *Scientific Reports*. 2016;6:1-10;

Minker C, Duban L, Karas D, Jarvinen P, Lobstein A, Muller CD. Impact of Procyanidins from Different Berries on Caspase 8 Activation in Colon Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015:1-13;

Monagas M, Quintanilla-Lopez JE, Gomez-Cordoves C, Bartolome B, Lebron-Aguilar R. MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010;51(2):358-72;

Mushtaq M, Sultana B, Akram S, Anwar F, Adnan A, Rizvi SSH. Enzyme-assisted supercritical fluid extraction: an alternative and green technology for non-extractable polyphenols. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017;409(14):3645-55;

Nazare RFR, Figueiredo FJC. Contribuição ao estudo do guaraná. Belém: EMBRAPA-CPATU; 1982;

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6ª edição. Freeman/Worth; 2012;

Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, et al. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. [database]. 2010; doi: 10.1093/database/bap024;

Oo CW, Pizzi A, Pasch H, Kassim MJ. Study on the structure of mangrovepolyflavonoid tannins with MALDI-TOF mass spectrometry. *J Appl Polym Sci*. 2008;109:963–7;

Othman AI, Elkomy MM, El-Missiry MA, Dardor M. Epigallocatechin-3-gallate prevents cardiac apoptosis by modulating the intrinsic apoptotic pathway in isoproterenol-induced myocardial infarction. *European Journal of Pharmacology*. 2017;794:27-36;

Peng W, Kuo S. Flavonoid structure affects the inhibition of lipid peroxidation in Caco-2 intestinal cells at physiological concentrations. *J Nutr*. 2003;133(7):2184-7;

Pérez-Jiménez J, Arranz S, Saura-Calixto F. Proanthocyanidin content in foods is largely underestimated in the literature data: An approach to quantification of the missing proanthocyanidins. *Food Res Int*. 2009;42(10):1381-8;

Pérez-Jiménez J, Díaz-Rubio ME, Saura-Calixto F. Non-extractable polyphenols in plant foods: Nature, isolation, and analysis. In: Watson RR. *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2014. 203-18;

Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: intake in four European countries. *Food Res Int*. 2015;74:315-323;

Pérez-Jiménez J, Torres JL. Analysis of Nonextractable Phenolic Compounds in Foods: The Current State of the Art. *J Agric Food Chem*. 2011;59:12713-24;

Portella RD, Barcelos RP, da Rosa EJF, Ribeiro EE, da Cruz IBM, Suleiman L, et al. Guarana (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. *Lipids in Health and Disease*. 2013;12:9;

Porter LJ, Hrstich LN, Chan BG. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*. 1986;25(1):223-30;

Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490(7418):55-60;

Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Edition)*; 2011, 50, 586–621;

Renard C, Watrelot AA, Le Bourvellec C. Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science & Technology*. 2017;60:43-51;

Ribani M. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27(5):771-80;

Rice-Evans C. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem Soc Symp*. 1995;61:103-16;

Riviere A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Front Microbiol*. 2016;7:979;

Rohr GE, Meier B, Sticher O. Analysis of Procyanidins. In: Atta-ur-Rahman. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier; 2000. v. 21, 497-570;

Rong S, Hu X, Zhao S, Zhao Y, Xiao X, Bao W, et al. Procyanidins extracted from the litchi pericarp ameliorate atherosclerosis in ApoE knockout mice: their effects on nitric oxide bioavailability and oxidative stress. *Food Funct*. 2017;8(11):4210-6;

Ruchel JB, Rezer JFP, Thorstenberg ML, dos Santos CB, Cabral FL, Lopes STA, et al. Hypercholesterolemia and Ecto-enzymes of Purinergic System: Effects of Paullinia cupana. *Phytotherapy Research*. 2016;30(1):49-57;

Saenz J, Santa-Maria C, Reyes-Quiroz ME, Geniz I, Jimenez J, Sobrino F, et al. Grapefruit Flavonoid Naringenin Regulates the Expression of LXR alpha in THP-1 Macrophages by Modulating AMP-Activated Protein Kinase. *Molecular Pharmaceutics*. 2018;15(5):1735-45;

Saura-Calixto F, Perez-Jimenez J, Tourino S, Serrano J, Fuguet E, Torres JL, et al. Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre from in vitro colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2010;54(7):939-46;

Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*. 2007;101:492-501;

Scarano A, Butelli E, De Santis S, Cavalcanti E, Hill L, De Angelis M, et al. Combined Dietary Anthocyanins, Flavonols, and Stilbenoids Alleviate Inflammatory Bowel Disease Symptoms in Mice. *Frontiers in Nutrition*. 2018;4:10;

Schimpl FC, da Silva JF, Goncalves JFD, Mazzafera P. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;150(1):14-31;

SEBRAE Nacional: O cultivo e o mercado de guaraná [internet]. Brasil: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas; 2016 [acesso em março de 2018]. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-do-guarana,969a9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD#>;

Sevgi K, Tepe B, Sarikurkcu C. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem Toxicol.* 2015;77:12-21;

Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med.* 2017;15(1):73;

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16:144-58;

Smith N, Atroch AL. Guarana's Journey from Regional Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2010;7(3):279-82;

Somerville VS, Braakhuis AJ, Hopkins WG. Effect of Flavonoids on Upper Respiratory Tract Infections and Immune Function: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Nutr.* 2016;7(3):488-97;

Sousa SA, Alves SF, de Paula JAM, Fiuza TS, Paula JR, Bara MTF. Determination of tannins and methylxanthines in powdered guarana (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) by high performance liquid chromatography. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 2010;20(6):866-70;

Stevens JF, Maier CS. The Chemistry of Gut Microbial Metabolism of Polyphenols. *Phytochem Rev.* 2016;15(3):425-44;

Strelow J, Dewe W, Iversen PW, Brooks HB, Radding JA, McGee J, et al. Mechanism of Action Assays for Enzymes. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92001/>;

SUFRAMA: Superintendência da Zona Franca de Manaus [internet]. Manaus; 2003 [acesso em março de 2018]. Disponível em: http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj_pot_regionais/guarana.pdf;

Sun HY, Chen YH, Cheng M, Zhang X, Zheng XJ, Zhang ZC. The modulatory effect of polyphenols from green tea, oolong tea and black tea on human intestinal microbiota in vitro. *Journal of Food Science and Technology-Mysore.* 2018;55(1):399-407;

Sun L, Warren FJ, Netzel G, Gidley MJ. 3 or 3'-Galloyl substitution plays an important role in association of catechins and theaflavins with porcine pancreatic α -amylase: The kinetics of inhibition of α -amylase by tea polyphenols. *Journal of Functional Foods*. 2016;26:144-56;

Tain YL, Hsu CN. AMP-Activated Protein Kinase as a Reprogramming Strategy for Hypertension and Kidney Disease of Developmental Origin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(6):13;

Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy E. *Plant Physiology and Development*. 6ª edição. Oxford University Press; 2014, A4-1-18;

Terauchi M, Horiguchi N, Kajiyama A, Akiyoshi M, Owa Y, Kato K, et al. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on menopausal symptoms, body composition, and cardiovascular parameters in middle-aged women: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Menopause*. 2014;21(9):990-6;

Ucar MB, Ucar G, Pizzi A, Gonultas O. Characterization of *Pinus brutia* bark tannin by MALDI-TOF MS and ^{13}C NMR. *Industrial Crops and Products*. 2013;49:697-704;

USDA Food Composition Databases [internet]. United States of America; 2018 [acesso em março de 2018]. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>;

Vazquez-Calvo A, de Oya NJ, Martin-Acebes MA, Garcia-Moruno E, Saiz JC. Antiviral Properties of the Natural Polyphenols Delphinidin and Epigallocatechin Gallate against the Flaviviruses West Nile Virus, Zika Virus, and Dengue Virus. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:8;

Veasey RC, Haskell-Ramsay CF, Kennedy DO, Wishart K, Maggini S, Fuchs CJ, et al. The Effects of Supplementation with a Vitamin and Mineral Complex with Guarana Prior to Fasted Exercise on Affect, Exertion, Cognitive Performance, and Substrate Metabolism: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients*. 2015;7(8):6109-27;

Veiga LLA, Amorim H, Moraes J, Silva MC, Raices RSL, Quiterio SL. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted guarana (*Paullinia cupana*) by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. *Food Chemistry*. 2014;152:612-8;

Vitaglione P, Mennella I, Ferracane R, Rivellese AA, Giacco R, Ercolini D, et al. Whole-grain wheat consumption reduces inflammation in a randomized controlled trial on overweight and obese subjects with unhealthy dietary and lifestyle behaviors: role of polyphenols bound to cereal dietary fiber. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2015;101(2):251-61;

Wei S, Zhou H, Lin Y, Liao M, Chai W. MALDI-TOF MS Analysis of Condensed Tannins with Potent Antioxidant Activity from the Leaf, Stem Bark and Root Bark of *Acacia confuse*. *Molecules*. 2010;15:4369-81;

White BL, Howard LR, Prior RL. Release of bound procyanidins from cranberry pomace by alkaline hydrolysis. *J Agric Food Chem*. 2010;58(13):7572-9;

WHO: World Health Organization. [acesso em julho de 2017]. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/>;

WHO: World Health Organization. Global report on diabetes. 2016;

Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*. 2004;36(7):838-49;

Williamson, G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2012;57(1):48–57;

Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*. 2008;4:278-86;

Wong X, Carrasco-Pozo C, Escobar E, Navarrete P, Blachier F, Andriamihaja M, et al. The deleterious effect of p-cresol on human colonic epithelial cells is prevented by proanthocyanidin-containing polyphenol extracts from fruits and proanthocyanidin bacterial metabolites. *J Agric Food Chem*. 2016; DOI: 10.1021/acs.jafc.6b00656;

Xu G, Huang KX, Zhou J. Hepatic AMP Kinase as a Potential Target for Treating Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Evidence from Studies of Natural Products. *Current Medicinal Chemistry*. 2018;25(8):889-907;

Yan SS, Shao HJ, Zhou ZH, Wang Q, Zhao LH, Yang XB. Non-extractable polyphenols of green tea and their antioxidant, anti- α -glucosidase capacity, and release during in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*. 2018;42:129-36;

Yang X, Kong F. Evaluation of the *in vitro* α -glucosidase inhibitory activity of green tea polyphenols and different tea types. *J Sci Food Agric*. 2016;96:777-82;

Yonekura L, Martins CA, Sampaio GR, Monteiro MP, Cesar LAM, Mito BM, et al. Bioavailability of catechins from guarana (*Paullinia cupana*) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects. *Food & Function*. 2016;7(7):2970-8;

Zhang A, Li J, Zhang S, Mu Y, Zhang W, Li J. Characterization and acid-catalysed depolymerization of condensed tannins derived from larch bark. *RSC Adv*. 2017;7:35135-46;

Zhang X, Yang Y, Wu ZF, Weng PF. The Modulatory Effect of Anthocyanins from Purple Sweet Potato on Human Intestinal Microbiota in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016;64(12):2582-90;

Zhao L, Cen F, Tian F, Li MJ, Zhang Q, Shen HY, et al. Combination treatment with quercetin and resveratrol attenuates high fat diet-induced obesity and associated inflammation in rats via the AMPK α 1/SIRT1 signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017;14(6):5942-8;

Zhao L, Zou TD, Gomez NA, Wang B, Zhu MJ, Du M. Raspberry alleviates obesity-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) α 1. *Nutrition & Diabetes*. 2018;8:8;

Zurita J, Diaz-Rubio ME, Saura-Calixto F. Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2012;63(8):936-9.

APÊNDICE

1. Curva de calibração do método de determinação da Capacidade Redutora Total

Equação da reta:

$$Absorbância = 0,0368 \times Concentração + 0,0109 \quad R^2 = 1,00$$

2. Curva de calibração da quantificação de taninos condensados

Equação da reta:

$$Absorbância = 0,0251 \times Concentração - 0,0564 \quad R^2 = 0,97$$

3. Curvas de calibração dos padrões utilizados na quantificação de fenólicos individuais

Equação da reta, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para os padrões utilizados:

Composto	Equação da reta	R²	LD (μC)	LQ (μC)
Catequina	$y = 2,84x + 23,13$	0,99	9,67	29,31
Epicatequina	$y = 2,68x + 18,56$	0,99	6,85	20,76
Epigallocatequina galato	$y = 2,86x - 8,23$	0,99	4,29	13,00
Proantocianidina B1	$y = 35,11x + 30,77$	0,99	0,86	2,61
Proantocianidina B2	$y = 19,96x + 1,75$	0,99	0,67	2,04

Os limites de detecção (1) e quantificação (2) foram calculados com base nas seguintes relações (RIBANI, 2004):

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (2)$$

Onde:

$$s = \left[\frac{\text{Residual sum of squares}}{(n - 2)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

S = inclinação da reta

4. Cromatograma representativo dos padrões injetados no HPLC-ECD

5. Espectro de massas para os padrões utilizados na identificação de fenólicos individuais

Catequina:

$[M-H]^-$ calculado = 289,070665

$[M-H]^-$ obtido = 289,0705

Epicatequina:

$[M-H]^-$ calculado = 289,070665

$[M-H]^-$ obtido = 289,0700

Epigallocatequina galato:

$[M-H]^-$ calculado = 457,076538

$[M-H]^-$ obtido = 457,0771

CURRÍCULO LATTES

Imprimir
currículo

Ana Clara da Costa Pinaffi

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5562736770897877>

Última atualização do currículo em 28/09/2018

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Química pela Universidade de São Paulo (USP). Estagiou por 2 anos no Laboratório de Compostos Porfirínicos e Dendrímeros do Instituto de Química (USP), possui inglês fluente e conhecimento de softwares como Excel, Origin, ChemDraw e Avogadro. Atualmente é aluna de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde Pública (USP), no programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde Pública.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Ana Clara da Costa Pinaffi

Dados pessoais

Filiação Edézio Pinaffi e Ana Lúcia Oliveira da Costa Pinaffi

Nascimento 23/04/1992 - Brasil

Carteira de Identidade 484602536 SSP - SP - 20/01/2012

CPF 406.543.308-83

Formação acadêmica/titulação

- 2016** Mestrado em Nutrição em Saúde Pública.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Polifenóis não-extraíveis provenientes do guaraná (*Paullinia cupana*): caracterização por MALDI-TOF/TOF e avaliação do potencial e cinética de inibição da alfa-glicosidase
Orientador: Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Palavras-chave: *Paullinia cupana*, Polifenóis não-extraíveis, MALDI, alfa-glicosidase
Áreas do conhecimento: Bioquímica da Nutrição, Ciência de Alimentos
- 2011 - 2015** Graduação em Química.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Fotodecomposição de Compostos Orgânicos Halogenados e Formação de Complexos Moleculares com a TPP (tetra-fenilporfina).
Orientador: Gianluca Camillo Azzellini

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2012 - 2012

Projetos

Outros tipos de projetos

2013 - 2013 Testes fotoquímicos com metaloporfirinas

Descrição: O projeto de continuidade à investigação da formação de complexos moleculares, desta vez utilizando metaloporfirinas.
Situação: Concluído Natureza: Outros tipos de projetos
Alunos envolvidos: Graduação (1);
Integrantes: Ana Clara da Costa Pinaffi; Gianluca Camillo Azzellini (Responsável)

2012 - 2012 Testes fotoquímicos de meso-tetrafenilporfina com haletos de alquila

Descrição: O projeto consistiu na investigação da formação de complexos moleculares entre porfirinas e compostos halogenados através da espectroscopia de UV-visível.
 Situação: Concluído Natureza: Outros tipos de projetos
 Alunos envolvidos: Graduação (1);
 Integrantes: Ana Clara da Costa Pinaffi; Gianluca Camillo Azzellini (Responsável)

Áreas de atuação

1. Química
2. Bioquímica
3. Nutrição

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
Espanhol Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **PINAFFI, A. C. C.; AZZELLINI, G. C.**
 Fotodecomposição de Compostos Orgânicos Halogenados e Formação de Complexos Moleculares com a TPP (tetra-fenilporfirina) In: 36ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2013, Águas de Lindóia. **Livro de Resumos da 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.**, 2012.
Palavras-chave: Fotocatalisadores, Porphirina, Complexos doador-aceptor, Sensores, Estabilidade de carbocátions
Áreas do conhecimento: Fotoquímica
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://www.eventoexpress.com.br/cd-36rasbq/resumos/T1469-1.pdf]

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **IX Congresso Anual ILSI Brasil**, 2018. (Congresso)
2. **Simplificando o Preparo de Amostra**, 2018. (Seminário)
3. **Segurança no Manuseio e Armazenamento de Produtos Químicos**, 2017. (Outra)
4. **Sessenta Anos do PNAE**, 2017. (Encontro)
5. **2nd Metabolic Programming Workshop**, 2016. (Oficina)
6. **Alimentos, Nutrição e Doenças Crônicas**, 2016. (Simpósio)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos	1
--	---

Eventos

Participações em eventos (congresso)	1
Participações em eventos (seminário)	1
Participações em eventos (simpósio)	1
Participações em eventos (oficina)	1
Participações em eventos (encontro)	1
Participações em eventos (outra)	1

Outras informações relevantes

- 1 Participação no Programa de Estímulo de Graduação (PEEG-USP): Monitoria da disciplina de Estrutura e propriedades de compostos orgânicos, sob coordenação do Prof. Dr. Luiz Fernando da Silva Junior.
Período de realização: primeiro semestre de 2015.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 30/09/2018 às 10:04:30.