Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública
Departamento de Nutrição

**Estudo da biodisponibilidade de compostos fenólicos
do chá mate (*Ilex paraguariensis*)**

Daniela Moura de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Nutrição
em Saúde Pública da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Nutrição em Saúde
Pública

Orientadora: Prof. Dra Deborah Helena
Markowicz Bastos

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ramos
Catharino

São Paulo

2013

Estudo da biodisponibilidade de compostos fenólicos do chá mate (*Ilex paraguariensis*)

Daniela Moura de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Nutrição
em Saúde Pública da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Nutrição em Saúde
Pública

Orientadora: Prof. Dra Deborah Helena
Markowicz Bastos

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ramos
Catharino

Versão da Tese: Corrigida

São Paulo

2013

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para o projeto (Processo 2009/14853-0) e concessão de bolsa de estudos (Processo 2009/01275-8).

À querida orientadora Professora Deborah Bastos pelos anos de orientação, confiança e ensinamentos fundamentais para minha formação.

Às Professoras Neuza Hassimoto e Alexandra Sawaya pelas sugestões fundamentais para o aperfeiçoamento do trabalho, durante a qualificação do projeto e pré-banca da Tese.

Ao Professor Rodrigo Catharino pelas orientações e importantes contribuições para este trabalho.

À Carolina Bonin, aluna de Iniciação Científica, pela participação fundamental em toda a parte experimental do trabalho, sempre com comprometimento e bom humor.

À Dra Geni Sampaio pelas inestimáveis contribuições, revisão dos trabalhos escritos, auxílio nas etapas experimentais e amizade.

Às Dras Lina Yonekura e Ana Paula Santos pela ajuda, paciência, importantes orientações e pelos “cafés sociais” no Laboratório de Bromatologia.

À Dra Susanne Henning e Dr David Heber pela oportunidade de realizar o estágio na UCLA e aos colegas do Centro de Nutrição Humana pela receptividade e convivência.

Aos funcionários da Faculdade de Saúde Pública e do Instituto de Medicina Tropical pela gentileza e prontidão.

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de Bromatologia e de Bioquímica e Análises Funcionais de Alimentos FSP pela maravilhosa convivência, alegria nos momentos de descontração, solidariedade nos momentos difíceis, almoços e cafés.

Aos meus pais, Nilcéia e Amado, por sempre primarem pela minha educação e formação, pelo apoio, amor, incentivo e exemplo. Obrigada por confiarem em mim e me deixarem “voar”.

Ao Tio Claudio pelo carinho, amizade e apoio fundamentais para essa “jornada” e pela ajuda nos experimentos com animais e correção da Tese.

Ao André, meu noivo e em breve esposo, pelo amor, compreensão e por estar ao meu lado em todos os momentos, me incentivando com bom humor e paciência, além de contribuir na correção e análise dos dados da Tese.

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma para este trabalho.

RESUMO

Oliveira DM. Estudo da biodisponibilidade de compostos fenólicos do chá mate (*Ilex paraguariensis*) [tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2013.

Introdução: O estudo da ação biológica de compostos bioativos e de nutrientes, a fim de que se possa explicar a relação entre o consumo de alimentos e a redução do risco de doenças, é uma das áreas que tem aplicação direta com a saúde pública. A erva mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta rica em compostos fenólicos (ácidos clorogênicos), extensivamente metabolizados após a ingestão. O conhecimento detalhado sobre os compostos formados pela metabolização dos mesmos, concentrações e tecidos-alvo é fundamental para o completo esclarecimento sobre os mecanismos de ação envolvidos. **Objetivo:** Avaliar a biotransformação dos ácidos fenólicos do chá mate *in vivo* em ratos Wistar. **Métodos:** Os animais foram eutanasiados 90 min (ensaio piloto) ou 30, 60, 120, 240 e 480 minutos (ensaio principal) após a administração de chá mate ou padrão de ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) por gavagem. O grupo Controle recebeu solução salina. No ensaio piloto foram analisados plasma, fígado, rins, músculo, estômago e intestino delgado para identificação dos compostos fenólicos e com base nos resultados definida a dose de 2g de chá mate solúvel/kg de peso do animal para ser usada no ensaio principal, que corresponde a 240 mg de fenólicos totais/kg peso, dose administrada ao grupo Padrão na forma de 5-CQA. Quantificação dos compostos fenólicos foi realizada no plasma, fígado, estômago, intestino grosso e urina dos animais do ensaio principal. As análises foram realizadas por UPLC/DAD-MS, após desenvolvimento e validação das metodologias para extração e análise dos ácidos fenólicos nas amostras. O chá mate foi avaliado quanto ao perfil e teor de compostos fenólicos por UPLC/DAD-MS. **Resultados:** As metodologias desenvolvidas para extração e análise dos ácidos fenólicos nas amostras biológicas apresentaram bons níveis de recuperação e precisão. Os limites de detecção e quantificação foram determinados para cada fluido/tecido. No ensaio piloto, foram detectados ácidos clorogênicos intactos em

todas as amostras, assim como uma série de metabólitos de fase I e II. No ensaio principal, os ácidos clorogênicos livres foram os principais ácidos fenólicos presentes no estômago e intestino grosso, enquanto no plasma, fígado e urina os compostos mais abundantes eram os metabólitos, em ambos os grupos, em especial o ácido caféico ligado ao ácido glicurônico/grupos sulfato e o ácido 3-hidroxifenilpropionico (livre) no grupo Erva Mate e os ácidos feruloilquínicos (FQAAs) e ácido 3-hidroxifenilpropionico no grupo Padrão. Demonstrou-se que a absorção e metabolização dos ácidos clorogênicos começa no estômago, mas a maior parte é absorvida no intestino grosso, especialmente após metabolização por bactérias. Cerca de 4,0% dos compostos ingeridos pelo grupo Erva Mate e 3,3% pelo grupo Padrão (mol/mol) estavam presentes na urina na forma de ácidos clorogênicos e dos metabólitos avaliados, 8 hs após a gavagem. **Conclusão:** A absorção e metabolização dos ácidos clorogênicos começa no estômago. Houve diferenças no tipo e quantidade dos diferentes compostos formados a partir dos fenólicos do chá mate e do 5-CQA puro, demonstrando que o perfil de ácidos clorogênicos presentes no alimento influencia qualitativamente e quantitativamente os metabólitos formados. Maior ênfase deve ser dada aos metabólitos em estudos que avaliem as propriedades biológicas e mecanismos de ação dos compostos fenólicos da erva mate e outros alimentos fonte.

Descritores: compostos fenólicos, ácidos clorogênicos, erva mate, biodisponibilidade, biotransformação.

ABSTRACT

Oliveira DM. Estudo da biodisponibilidade de compostos fenólicos do chá mate (*Ilex paraguariensis*)/Study of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) phenolic compounds bioavailability [thesis]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da USP; 2013.

Introduction: Evaluation of biological properties of bioactive compounds and nutrients, aiming to explain the relationship between food consumption and decreased risk of diseases, is a field of study directly related to public health. Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) is a plant rich in phenolic compounds (chlorogenic acids) which are extensively metabolized after ingestion. Detailed knowledge about the metabolites, its concentrations and target tissues is fundamental to clarify the action mechanisms involved in disease prevention. **Objective:** Evaluating the biotransformation of Yerba maté phenolic acids *in vivo* in Wistar rats. **Methods:** Animals were euthanized 90 min (pilot study) or 30, 60, 120, 240 and 480 (main study) after administration of maté tea or 5-caffeoylquinic acid (standard) by gavage. Control group received saline solution. In the pilot study plasma, liver, kidneys, muscle, stomach and small intestine were analyzed for identification of phenolic compounds and the dose of 2 g maté tea/kg body weight was defined for the main study, which corresponds to 240 mg of total phenolic compounds/kg bw, dose administered to the Standard group as 5-CQA. Quantification was performed in plasma, liver, stomach, large intestine and urine in the main study. Analyses were performed using UPLC/DAD-MS, after development and validation of methodologies for extraction of phenolic acids from fluids and tissues. Maté tea phenolic compounds amount and profile were evaluated by UPLC/DAD-MS. **Results:** Developed methodologies showed good levels of recovery and precision. Limits of quantification (LQ) and detection (LD) were calculated for each biological matrix. In the pilot study, chlorogenic acids and their phase I and II metabolites were detected in all biological matrices. In the main study, the main compounds in gastric large and intestinal tissues were intact chlorogenic acids, whereas in plasma, liver and urine their metabolites were present in larger quantities, specially caffeic acid,

bound to glucuronic acid and/or sulfate groups, and 3-hydroxyphenylpropionic acid in the free form on Yerba Mate group, and 3-hydroxyphenylpropionic acid and feruloylquinic acid on the group that received 5-CQA. It was demonstrated that chlorogenic acids absorption and metabolism begins in stomach, but most of the absorption takes place in the large intestine, especially after microbial metabolism. Approximately 4,0% of compounds ingested by Yerba Mate group and 3,3% by Standard group (mol/mol) were recovered in urine collected up to 8 hs after the gavage, in the form of chlorogenic acids and the evaluated metabolites.

Conclusion: The absorption and metabolism of chlorogenic acids begins in the stomach. There were differences in the amount and type of compounds formed from maté tea or pure 5-CQA, showing that the profile of chlorogenic acids on food products may influences qualitatively and quantitatively the metabolites formed on the body. Greater emphasis should be given to metabolites in studies that assess biological properties and mechanisms of action of phenolic compounds from yerba mate and other food source.

Keywords: phenolic compounds, chlorogenic acids, yerba maté, bioavailability, biotransformation,

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 ERVA MATE (<i>Ilex paraguariensis</i>)	9
1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS E BIODISPONIBILIDADE	12
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 GERAL	16
3.2 ESPECÍFICOS	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS:	17
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	17
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 PRIMEIRO ARTIGO	19
5.2 SEGUNDO ARTIGO	37
5.3 TERCEIRO ARTIGO	61
6 BIBLIOGRAFIA (INTRODUÇÃO)	125
ANEXOS	130
ANEXO 1 – CROMATOGRAMAS	130
ANEXO 2 - CARTA DE APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA ...	137
ANEXO 3 – PRIMEIRA PÁGINA DO CURRÍCULO <i>LATTES</i> DA ALUNA	138
ANEXO 4 – PRIMEIRA PÁGINA DO CURRÍCULO <i>LATTES</i> DA ORIENTADORA	139

1 INTRODUÇÃO

1.1 ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*)

A erva mate é uma árvore natural da América do Sul, encontrada em ervais nativos ou adensados, geralmente explorados por pequenos produtores que se reúnem em cooperativas para processá-la ou comercializá-la com grandes indústrias produtoras de erva mate. O maior produtor mundial é a Argentina, seguida pelo Brasil e Paraguai (BASTOS *et al.*, 2007a; HECK & MEJIA, 2007). É uma planta muito consumida nesses países e no Uruguai para o preparo de chás e infusões. Utiliza-se a erva verde seca e cancheada para o preparo de chimarrão (feito com água quente) e tererê (feito com água fria). A erva torrada para o preparo de chá mate é bastante consumida na região sudeste do Brasil (BASTOS *et al.*, 2007a).

O consumo de bebidas a base de erva mate é uma prática tradicional da população Sul Americana e remonta de centenas de anos, pois eram consumidas pelos indígenas antes da chegada dos europeus na América do Sul. Mais recentemente, o consumo tem se expandido para mercados externos como Europa e América do Norte, especialmente Estados Unidos (FOLCH, 2010), devido ao apelo comercial de bebida estimulante (HECKMAN *et al.*, 2010).

Popularmente, a erva mate é indicada para o controle de sintomas de diversas enfermidades e sintomas, como artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de líquido, hipertensão arterial sistêmica, digestão lenta e doenças hepáticas. Devido a estas propriedades, a erva mate encontra-se inclusa em importantes farmacopéias como a Martingdale e a British Herbal Pharmacopoeia (ANESINI *et al.*, 2006).

O estudo da erva mate e o seu potencial uso para a promoção de saúde, considerando-se as avaliações por meio de publicações de resultados de pesquisa na forma de artigo em revistas indexadas, é relativamente recente. Na década de 1990 foram publicados os primeiros trabalhos que demonstraram a atividade

antioxidante *in vitro* de infusões de erva mate verde (chimarrão) (GUGLIUCCI & STAHL, 1995; GUGLIUCCI, 1996; CAMPOS *et al.*, 1996). Na sequência, outros trabalhos *in vitro* também avaliaram a sua atividade antioxidante (SCHINELLA *et al.*, 2000; GUGLIUCCI & MENINI, 2002; BRACESCO *et al.*, 2003; RAMIREZ-MARES *et al.*, 2004; CHANDRA & MEJIA, 2004; BASTOS *et al.*, 2006b; MENINI *et al.*, 2007).

Vários outros estudos demonstraram propriedades benéficas da erva mate, que indicam seu potencial como coadjuvante na diminuição da ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis: efeito vasodilatador *in vitro* e *in vivo* em ratos (BAISCH *et al.*, 1998; STEIN *et al.*, 2005); efeito hipocolesterolêmico e hepatoprotetor (FILIP & FERRARO, 2003); ação colerética e de aumento da propulsão intestinal em ratos (GORZALCZANY *et al.*, 2001); inibição *in vitro* da glicação (LUNCEFORD & GUGLIUCCI, 2005); diminuição da progressão da aterosclerose em coelhos (MOSIMANN *et al.*, 2006); inibição do crescimento de células cancerígenas *in vitro* (MEJIA *et al.*, 2005); prevenção de doenças orais em ratos (FILIP *et al.*, 2007); atividade anti-inflamatória (LANZETTI *et al.*, 2008) e até mesmo melhora nos sintomas de mal de Parkinson em modelo animal (MILIOLI *et al.*, 2007).

A administração *in vivo* da erva mate foi eficaz na redução do peso, da gordura corporal e de marcadores de risco cardiometabólico em modelos animais (PANG *et al.*, 2008; ARCARI *et al.*, 2009; 2011; BORGES, 2011). Outros estudos demonstraram que o chá mate ou a erva mate verde (para chimarrão) foi capaz de prevenir danos oxidativos ao DNA em camundongos (MIRANDA *et al.*, 2008), reduzir a expressão do transportador de glicose SGLT1 intestinal em ratos, o que pode reduzir a absorção de glicose (OLIVEIRA *et al.*, 2008) e ainda aumentar a resistência do plasma ao estresse oxidativo e a expressão gênica de enzimas antioxidantes em humanos (MATSUMOTO *et al.*, 2009).

As propriedades biológicas da erva mate são atribuídas à presença de compostos bioativos, como os compostos fenólicos (ácidos clorogênicos e pequenas quantidades de quercetina e rutina), metilxantinas (cafeína e teobromina), e

saponinas. Às metilxantinas são atribuídos os efeitos estimulantes da erva mate, enquanto as saponinas podem ser responsáveis pelas propriedades coleréticas e parte dos efeitos hipocolesterolêmicos, anti-inflamatórios e anti-obesogênicos, mas a maior parte das propriedades biológicas da erva mate provavelmente são derivadas da ação dos ácidos fenólicos (BASTOS *et al.*, 2007a; HECK & DE MEJIA, 2007).

Os principais ácidos fenólicos presentes na erva mate são os ácidos mono e dicafeoilquínicos (Figura 1), pertencentes ao grupo de compostos fenólicos denominados ácidos clorogênicos, grupo caracterizado pela ligação éster entre o ácido quínico e uma ou mais moléculas de ácidos hidroxicinâmicos (ácido caféico, ferúlico, isoferúlico e *p*-cumárico) (BASTOS *et al.*, 2005; BASTOS *et al.* 2007b; HECK *et al.*, 2008; JAISWAL *et al.*, 2010). Outros ácidos clorogênicos estão presentes em quantidades menores, como os ácidos feruloilquínicos e cafeoilshiquímicos (BASTOS *et al.* 2007b; JAISWAL *et al.*, 2010).

Figura 1 - Estrutura química dos principais ácidos mono e dicafeoilquínicos da erva mate.

1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS E BIODISPONIBILIDADE

Segundo revisões bibliográficas (WILLIAMSON & HOLST, 2008; CROZIER *et al.*, 2009; 2010), os alimentos fontes de compostos fenólicos começaram a atrair a atenção de pesquisadores a partir dos anos 90, devido às evidências de seus efeitos benéficos para a saúde humana. O interesse inicial foi estimulado principalmente pela publicação de estudos epidemiológicos que indicavam uma associação inversa entre a ingestão de alimentos ricos nestes compostos e a incidência de doenças crônicas como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e câncer. Como muitos compostos fenólicos presentes em frutas e hortaliças exibem potente atividade antioxidante *in vitro*, considerava-se que o papel dos mesmos *in vivo* se daria a partir da proteção contra o estresse oxidativo (CROZIER *et al.*, 2009).

Hoje em dia sabe-se que tal abordagem não reflete o que de fato ocorre *in vivo*. Realmente, observa-se aumento na capacidade antioxidante do plasma após o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos (MANACH *et al.*, 2005), mas os compostos fenólicos ingeridos são encontrados no organismo, na forma nativa, em concentrações muito baixas, que podem ser insuficientes para promover efeitos antioxidantes significativos *in vivo* a ponto de atuarem na redução do risco de doenças crônicas por esta via (CLIFFORD, 2004). As substâncias que de fato alcançam as células e tecidos podem ser química, biológica e funcionalmente distintos dos compostos presentes nos alimentos (KROON *et al.*, 2004; CROZIER *et al.* 2010). Além da atividade antioxidante, evidências recentes sugerem que compostos fenólicos e metabólitos formados no organismo possam atuar por meio de outros mecanismos, como a modulação da atividade ou da expressão de diferentes enzimas como telomerase, lipoxigenase e cicloxigenase, interações com receptores e vias de transdução de sinais e regulação do ciclo celular (D'ARCHIVIO, 2007; CROZIER *et al.*, 2010).

A identificação dos alvos moleculares e compreensão dos mecanismos de ação dos compostos fenólicos no organismo são essenciais para a futura formulação

de estratégias nutricionais visando o controle ou mesmo redução do risco de doenças crônicas (CROZIER *et al.*, 2009). No entanto, para que estes mecanismos e alvos moleculares sejam esclarecidos é necessário quantificar e avaliar as formas químicas que os compostos fenólicos, provenientes da alimentação, são encontrados no organismo após a ingestão. Desta forma, um aspecto importante a ser considerado ao se estudar o papel compostos fenólicos na saúde humana é a avaliação de sua biodisponibilidade a partir dos alimentos (PORRINI & RISO, 2008; STALMACH *et al.*, 2009).

Biodisponibilidade é um termo proveniente da farmacologia que define a fração da dose administrada de uma substância que atinge a circulação sistêmica e a velocidade com que este processo ocorre (MORAIS & LOBATO, 2010). Esta definição abrange vários processos integrados: liberação da substância da matriz, absorção pelo organismo, distribuição, metabolismo e excreção. Tratando-se de alimentos, a biodisponibilidade é definida como a proporção de um nutriente ou substância do alimento que é digerida, absorvida e metabolizada (DARCHIVIO *et al.*, 2007).

O número de pesquisas a respeito da biodisponibilidade de compostos fenólicos tem aumentado nos últimos anos (CROZIER *et al.*, 2010). De forma geral, os mesmos começam a ser absorvidos no estômago e intestino delgado, seguindo para o cólon, onde são metabolizados pela microbiota (ZAMORA-ROS *et al.*, 2012). No organismo, os compostos fenólicos são submetidos a diversas biotransformações típicas do metabolismo de xenobióticos: oxidação, redução e hidrólise por enzimas de fase I, incluindo citocromo P450, glicosidases e esterases, além de conjugação por enzimas de fase II (glicuronação pelas UDP-glicotransferases, sulfatação pelas sulfotransferases e metilação pelas catecol-*o*-metiltransferases - COMT) (RECHNER *et al.*, 2004, MATEOS *et al.*, 2006). Estas biotransformações representam um processo metabólico de detoxificação, que facilita a eliminação biliar e urinária pelo aumento da hidrofiliabilidade dos compostos (DARCHIVIO *et al.*, 2007). A metabolização dos compostos fenólicos têm início na

mucosa intestinal e, após passagem para a corrente sanguínea, em outros tecidos, principalmente fígado e rins (LAMBERT *et al.*, 2007).

O aumento nas pesquisas sobre a biodisponibilidade de compostos fenólicos contribuiu para aumentar os conhecimentos a cerca da absorção, metabolização, distribuição e excreção desses compostos, demonstrando que a biodisponibilidade e os metabólitos formados no organismo têm grande variabilidade entre as diferentes classes de compostos fenólicos (CROZIER *et al.*, 2010). Os flavonoides, em especial a quercetina, as catequinas e as isoflavonas constituem os compostos fenólicos cujas as informações sobre a absorção e metabolismo são mais abundantes na literatura (MANACH *et al.*, 2005; SCHOLZ & WILLIAMSON *et al.*, 2007; CROZIER *et al.*, 2009). Para os ácidos clorogênicos e outros ácidos fenólicos, existe um número menor de estudos, apesar da abundância dos mesmos em frutas e hortaliças e contribuição para o *pool* de ingestão de compostos fenólicos na alimentação (LAFAY & IZQUIERDO, 2008; FERRUZI, 2010; ZHAO & MOGHADASIAN, 2010).

Alguns trabalhos sobre a biodisponibilidade de ácidos clorogênicos foram realizados com café, considerado a principal fonte destes compostos na dieta ocidental (CLIFFORD, 1999), e também com o padrão puro de ácido 5-cafeoilquínico. No entanto, os dados ainda são considerados escassos, e muitas vezes, contraditórios (WILLIAMSON *et al.*, 2011). Uma revisão sobre os estudos que avaliaram a biodisponibilidade de ácidos clorogênicos é apresentada no primeiro artigo científico que compõe esta Tese. Não há, entretanto, nenhum trabalho publicado até o momento que tenha avaliado a biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos da erva mate.

Um dos principais objetivos da avaliação da biodisponibilidade de compostos fenólicos é a busca por biomarcadores, compostos alvo que possam ser usados em trabalhos que busquem esclarecer as atividades biológicas de alimentos ricos em compostos fenólicos e os possíveis mecanismos de ação dos mesmos, ou avaliar a ingestão de alimentos fonte em populações. Para se estabelecer um biomarcador, o

conhecimento a cerca de seus parâmetros farmacocinéticos é essencial (ZAMORA-ROS *et al.*, 2012).

O aperfeiçoamento de técnicas laboratoriais para análise de compostos fenólicos em matrizes biológicas constitui um desafio dessa área de pesquisa. Para a determinação de compostos fenólicos e seus metabólitos em amostras biológicas, é necessário garantir uma extração eficiente e passível de ser reproduzida, acoplada a técnicas de separação sensíveis o suficiente para detectar baixas concentrações dos compostos nos fluidos e tecidos biológicos (MARTINEZ-HUELAMO *et al.*, 2012). Outro fator limitante para a quantificação exata dos compostos é a falta de padrões disponíveis para muitos compostos fenólicos, principalmente para os metabólitos (ZAMORA-ROS *et al.*, 2012).

O uso de espectrometria de massas representa um avanço neste campo de estudos, pois permite a análise de quantidades diminutas de compostos presentes nas amostras biológicas e é capaz de fornecer um diagnóstico da estrutura química das substâncias (DE MARIA, 2004). Além disso, é possível separar os compostos de interesse dos interferentes das amostras através da seleção das m/z dos íons de interesse, já que nem sempre é possível a separação na coluna cromatográfica (KUSSMANN *et al.*, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

A erva mate é originária da América do Sul e bastante consumida pela população brasileira, sob as formas de chimarrão, tererê e chá mate. É um alimento rico em compostos bioativos e com potencial para a promoção da saúde, conforme descrito em diversos trabalhos. Propriedades benéficas da erva mate são bem documentadas na literatura científica, sendo atribuídas principalmente aos compostos fenólicos, objetos de estudo deste trabalho. Um importante aspecto a ser considerado ao se estudar o papel dos compostos fenólicos na saúde humana é a avaliação de sua biodisponibilidade a partir dos alimentos.

Os compostos fenólicos são extensamente metabolizados após a absorção, gerando metabólitos que podem ter atividades diferentes do composto original. Dados sobre a distribuição dos ácidos fenólicos provenientes dos alimentos e seus metabólitos no organismo ainda são escassos, assim como as pesquisas focando sua resposta absorptiva. Portanto, há a necessidade de estudos que explorem a biodisponibilidade destes compostos a partir de alimentos e as formas (após a biotransformação) como serão encontrados no organismo, e que de fato exercem ação biológica, assim como as formas como são excretadas. Para isso, são necessários também métodos de extração e análise precisos e confiáveis, sendo esta uma das limitações para o estudo da biodisponibilidade de compostos fenólicos *in vivo*.

Neste trabalho, são descritos métodos para extração de compostos fenólicos a partir de matrizes biológicas e análise por cromatografia líquida de ultra eficiência (*ultra performance liquid chromatography* – UPLC) e espectrometria de massas (*mass spectrometry* – MS). Após validação das metodologias, foram realizados ensaios para avaliar a biotransformação de fenólicos da erva mate *in vivo* em animais de experimentação, após a ingestão de chá mate ou padrão de ácido 5-cafeoilquínico, um dos principais ácidos fenólicos encontrados na bebida e único com padrão comercialmente disponível.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a biodisponibilidade dos ácidos fenólicos a partir da ingestão de chá mate solúvel ou padrão de ácido 5-cafeoilquínico *in vivo* em modelo animal (ratos Wistar).

3.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar métodos adequados para extração e análise dos ácidos fenólicos dos tecidos e fluidos biológicos;
- Determinar as concentrações dos ácidos fenólicos e cafeína no chá mate solúvel;
- Verificar o perfil e concentração dos principais ácidos fenólicos da erva mate e seus metabólitos em diferentes tecidos e fluidos biológicos, após ingestão de chá mate solúvel ou de padrão isolado do ácido 5-cafeoilquinico;

4 MATERIAIS E MÉTODOS:

Esta Tese é apresentada na forma de três Artigos, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública. O primeiro artigo apresentado trata-se de revisão bibliográfica sobre a biodisponibilidade de ácidos fenólicos; o segundo descreve o desenvolvimento e validação das metodologias para extração e análise dos ácidos fenólicos dos fluidos e tecidos biológicos de ratos Wistar; o terceiro artigo descreve a biotransformação dos ácidos fenólicos do chá mate, administrados a ratos Wistar na forma da bebida ou como solução de padrão de um dos principais ácidos fenólicos do chá, o 5-cafeoilquinico (5-CQA). O detalhamento dos materiais e métodos estão incluídos nos textos dos respectivos artigos.

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Medicina Tropical/Faculdade de Medicina/Universidade de São Paulo (Protocolo 037/2009, **ANEXO 2**).

Em relação à ética ambiental, os resíduos foram acondicionados de forma adequada, em recipientes plásticos de 20 L, com tampa rosqueada, em câmara de

exaustão no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição / Faculdade de Saúde Pública, obedecendo às boas práticas laboratoriais. Em intervalos regulares, foram encaminhados à empresa especializada em descarte de resíduos químicos AMBICAMP, conforme plano de gestão de resíduos químicos da FSP. Os resíduos biológicos e materiais que entraram em contato com os mesmos foram descartados separadamente em sacos brancos e encaminhados ao Centro de Saúde Paula Souza para incineração. Este trabalho não envolveu experimentação com seres humanos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRIMEIRO ARTIGO

O artigo de revisão a seguir, intitulado “Biodisponibilidade de ácidos fenólicos”, foi publicado na Revista Química Nova (Vol. 34, No. 6, pag 1051-1056, 2011) .

Biodisponibilidade de ácidos fenólicos

Autores:

Daniela Moura de Oliveira

Deborah Helena Markowicz Bastos *

Endereço:

Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. Av Dr Arnaldo 715 CEP 01246-904, São Paulo-SP

*dmbastos@usp.br

ABSTRACT

Phenolic acids bioavailability

The daily intake of phenolic compounds does not necessarily reflect the dose at which they reach the physiological targets in the organisms. The biological activity of phenolic compounds metabolites found in blood, organs and target tissues, as a result of digestive and hepatic activity, may differ from those of the native forms of the substances. This review discusses the absorption and metabolism of phenolic acids, a class of phenolic compounds abundant in food, and the methodologies used for evaluation of bioavailability.

Key-Words: phenolic acids, bioavailability, biomarkers

INTRODUÇÃO

A ingestão insuficiente de compostos bioativos (CBAs) constitui componente de risco para as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT)^{1,2}. Estes compostos interferem em alvos fisiológicos específicos, modulando a defesa antioxidante, defesa frente a processos inflamatórios e mutagênicos, os quais estão relacionados a várias doenças e não há dúvidas de que sejam essenciais para a manutenção da saúde. CBAs podem ser provenientes de produtos de origem animal (ácido graxo da família ômega 3, ácidos graxos conjugados), vegetal (carotenóides, fitoesteróis, terpenos, compostos fenólicos) ou microrganismos.

CBAs de vegetais (fitoquímicos) compreendem uma grande variedade de classes de compostos químicos com diferentes propriedades físico-químicas (polaridade, solubilidade, capacidade de formar pontes de hidrogênio, potencial de oxido-redução) que irão determinar tanto o tipo como a eficiência de atividade dos compostos, assim como o meio e a estrutura celular em que podem atuar.

Compostos fenólicos são abundantes em frutas, hortaliças e alimentos derivados dos mesmos, são consistentemente associados à redução no risco de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas.³ A capacidade dessas substâncias em seqüestrar radicais livres e metais pró-oxidantes (ação antioxidante) explica, em parte, esta associação. Evidências recentes sugerem que estes compostos possam atuar por meio de outros mecanismos além da capacidade antioxidante, como a modulação da atividade de diferentes enzimas como telomerase, lipoxigenase e cicloxigenase, interações com receptores e vias de transdução de sinais, regulação do ciclo celular, entre outras, essenciais para a manutenção da homeostase dos organismos vivos.⁴

Para que um composto químico possa exercer atividade biológica, ele deve atingir o alvo fisiológico numa concentração mínima que determina tanto este efeito biológico quanto o mecanismo de ação. A ingestão diária de CBAs não necessariamente reflete a dose em que atingirá o alvo fisiológico, o que explica, em

parte, a falta de correlação entre os dados epidemiológicos e estudos de intervenção. Visto que estes compostos são reconhecidos pelo organismo como xenobióticos,² estimulando os mecanismos de detoxificação e defesa antioxidante, a concentração fisiológica dos mesmos é relativamente restrita e a biodisponibilidade constitui importante fator de controle. Isso explica a relação entre o consumo diário de compostos fenólicos, que atinge alguns gramas e as baixas concentrações (micromoles) desses compostos nos organismos.

A complexidade para a definição de biomarcadores de exposição a estes compostos é um dos principais fatores que dificultam atribuir-se fator de risco ou proteção à saúde em função da ingestão de alimentos fontes de compostos fenólicos. Biomarcadores, neste contexto, correspondem a “uma propriedade observável de um organismo, a qual indica mudanças em componentes celulares ou bioquímicos, em sua estrutura ou função, e que pode ser medida em sistemas biológicos”.⁵ O estabelecimento de biomarcadores é essencial para a compreensão da absorção, transporte e metabolismo de um determinado CBA que produz um determinado efeito em determinado alvo fisiológico (tecido) e em concentração estabelecida.

A validação e o desenvolvimento de biomarcadores dependem do conhecimento de fatores que envolvem a liberação do CBA da matriz do alimento, a absorção, metabolismo, distribuição e excreção, enfim, todo o caminho e transformações que ocorrem com estes compostos.

Os compostos fenólicos representam uma grande variedade de substâncias caracterizadas pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um radical hidroxila e/ou outros substitutos, podem ser divididos de acordo com o número de anéis fenólicos e com as estruturas às quais eles estão ligados.⁴ Os grupos de compostos fenólicos mais abundantes nos alimentos são os flavonóides, os ácidos fenólicos e as lignanas.^{3,4,6} Existem diversos artigos sobre os efeitos dos compostos fenólicos em sistemas biológicos *in vitro*. No entanto, a maioria não considera a biodisponibilidade e metabolização destes compostos e, desta forma,

muitos dos efeitos observados nestes estudos não necessariamente ocorrem *in vivo*. Ademais, muitas vezes são utilizados padrões puros dos compostos fenólicos, em concentrações muito superiores às encontradas nos alimentos.^{1,7,8}

O organismo não apresenta mecanismos específicos para o acúmulo ou retenção dos compostos fenólicos a curto prazo, ao contrário do que acontece com algumas vitaminas e minerais.⁸ Eles são reconhecidos e tratados pelo organismo da mesma forma que os xenobióticos, sendo metabolizados de forma a serem rapidamente excretados.^{2,8} Os metabólitos encontrados no sangue, órgãos e tecidos alvo, como resultado da atividade digestiva e hepática, podem diferir das formas nativas das substâncias com relação à atividade biológica.⁹

Além disso, os compostos fenólicos mais comuns nos alimentos nem sempre são os mais ativos biologicamente, por diferentes razões, como a baixa atividade intrínseca, baixa absorção intestinal ou rápida metabolização e excreção.¹⁰

Os flavonóides, em especial a quercetina, as catequinas e as isoflavonas constituem os compostos fenólicos sobre os quais as informações sobre a absorção e metabolismo são mais abundantes na literatura.^{8,10,11} Os ácidos clorogênicos e demais ácidos fenólicos foram menos estudados até o momento, apesar da sua abundância em frutas e hortaliças e contribuição para o *pool* de ingestão desta classe de substâncias.

Embora haja consenso de que os ácidos clorogênicos sejam importantes constituintes da dieta e representam boa parte da ingestão de compostos fenólicos, os dados disponíveis atualmente são insuficientes para que se estabeleçam Ingestões Dietéticas Referência (IDRs) para os mesmos, pois seu metabolismo e biodisponibilidade ainda não estão totalmente esclarecidos.¹² Os ácidos clorogênicos são ácidos fenólicos, subclasse de uma categoria mais ampla de metabólitos secundários de plantas, denominados compostos fenólicos ou ainda polifenóis.¹³

Esta revisão aborda a rota de absorção dos principais ácidos fenólicos presentes em alimentos de origem vegetal consumidos na dieta ocidental e os metabólitos formados, tema que constitui, hoje em dia, um gargalo para explicar a modulação de processos que podem diminuir o risco de doenças pela ingestão de alimentos funcionais e compostos bioativos.

CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA DOS ÁCIDOS FENÓLICOS

Os ácidos fenólicos apresentam um grupo funcional carboxila e são divididos em duas classes: os ácidos hidroxibenzóicos e os hidroxicinâmicos.⁴ Os primeiros são componentes das complexas estruturas dos taninos hidrolisáveis e são menos abundantes nos vegetais consumidos pelos humanos.¹⁴ Os ácidos hidroxicinâmicos estão presentes em vários alimentos e bebidas de origem vegetal, como o café, erva mate, maçã, ameixa e outras frutas, crucíferas, cereais, entre outros.¹⁵ Exemplos desta classe de compostos são o ácido caféico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico, que na maioria dos alimentos encontram-se esterificados ao ácido quínico, o ácido tartárico ou carboidratos e derivados (Figura 1).^{8,16,17} Estes ácidos hidroxicinâmicos também podem ser encontrados na forma livre em alimentos, como o tomate e a cerveja.¹⁸

Os ácidos clorogênicos (CGAs) são formados pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos *trans*-cinâmicos: o ácido caféico (3,4-dihidroxicinâmico), o ferúlico (3-metoxi, 4-hidróxi), sinápico (3,5-dimetóxi, 4-hidróxi) ou o *p*-cumárico (4-hidróxi).^{19,20} Podem ser classificados de acordo com o tipo, número e posição dos resíduos acila: mono ésteres (ácidos cafeoilquínicos, CQA; cumaroilquínicos, *p*CoQA e feruloilquínicos, FQA); di (diCQA), tri (triCQA) e tetra ésteres (tetraCQA) e ainda ésteres mistos dos ácidos caféico e ferúlico (ácidos cafeiol-feruloilquínicos, CFQA).²⁰ Os mais comuns e conhecidos são os mono ésteres do ácido cafeoilquínico, principalmente o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA). Inicialmente, o 5-CQA era designado como 3-CQA ou mesmo ácido clorogênico, no entanto estas denominações caíram em desuso e são desaconselhadas pela

IUPAC.²¹ As fórmulas estruturais dos principais ácidos hidroxicinâmicos, ácido quínico e 5-CQA estão representadas na Figura 1.

Figura 1 – Fórmula estrutural do ácido 5-CQA e dos ácidos que compõem os CGAs

A principal fonte de ácidos clorogênicos na dieta ocidental, de acordo com algumas revisões publicadas sobre o assunto, é o café.¹⁵ No entanto, outras bebidas de consumo regional, como o chimarrão, preparado com a erva mate, (*Ilex paraguariensis*), constituem a principal fonte dietética desses compostos na dieta.²²

Os mono ésteres 3, 4 e 5-CQA, correspondem a aproximadamente 10% da matéria seca dos grãos verdes de café (*Coffea canephora*)¹⁵ e a 5% da massa seca das folhas da erva mate.²³ Consumidores da bebida podem ter uma ingestão diária de até 1 g de ácidos clorogênicos, uma vez que uma xícara (200 mL) de café pode conter de 70 a 350 mg dos mesmos¹⁵ e uma cuia de chimarrão (500 mL) cerca de 1,5 g de fenólicos totais,^{24,25} dos quais 226 mg correspondem ao ácido 5-CQA.²⁶ As frutas que contêm as maiores quantidades (mirtilo, kiwi, cereja, maçã, ameixa) apresentam de 500 mg a 2 g de ácidos clorogênicos por kilo da fruta fresca.²⁷

BIODISPONIBILIDADE DOS ÁCIDOS FENÓLICOS

Biodisponibilidade é um termo proveniente da farmacologia que define a fração da dose administrada de uma substância que atinge a circulação sistêmica e a velocidade com que este processo ocorre.²⁸ Esta definição abrange vários processos integrados: liberação da substância da matriz, absorção pelo organismo, distribuição, metabolismo e excreção. Tratando-se de alimentos, a biodisponibilidade é definida como a proporção de um nutriente ou substância do alimento que é digerida, absorvida e metabolizada, e frequentemente denominada biodisponibilidade relativa.⁴

Vários fatores alteram a biodisponibilidade de compostos bioativos presentes nos alimentos: a complexidade da matriz alimentícia, a forma química do composto de interesse, estrutura e quantidade de outros compostos ingeridos concomitantemente (fatores exógenos) e ainda o tempo de trânsito intestinal, esvaziamento gástrico, metabolismo do composto e grau de conjugação, possíveis interações com proteínas na circulação sanguínea e tecidos, composição da microbiota intestinal e o perfil genético do indivíduo (fatores endógenos).^{8,11} Avaliados em conjunto, estes fatores respondem pelas variações intra e inter-individuais na biodisponibilidade de uma determinada substância.²

As primeiras evidências, embora indiretas, da absorção dos ácidos clorogênicos e de outros compostos fenólicos são provenientes de estudos que observaram um aumento na capacidade antioxidante do plasma após o consumo de alimentos ricos nestes compostos.¹⁰ Evidências adicionais foram obtidas por meio da quantificação das concentrações plasmáticas e/ou urinárias de ácidos clorogênicos após o consumo de alimentos com quantidades conhecidas dos mesmos ou da suplementação com os compostos isolados.²⁹⁻³⁴ Estes trabalhos utilizaram principalmente cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção eletroquímica, UV-Vis arranjo de diodos e detectaram baixas concentrações ou

mesmo a ausência destes compostos no plasma e urina, sugerindo que eles sejam metabolizados após a ingestão.

A hifenação de detectores do tipo espectrômetro de massas aos sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência trouxe grandes avanços para este campo de estudos, por permitir a identificação e/ou caracterização dos metabólitos formados após a ingestão,^{5,8,35-42} pois é capaz de detectar quantidades diminutas e de fornecer um diagnóstico da estrutura química dos compostos.²¹

ABSORÇÃO E METABOLISMO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS

Ensaio em animais com infusão gástrica *in situ* de 5-CQA e outros ácidos hidroxicinâmicos isolados (ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e ácido caféico) indicam que a absorção inicia no estômago, onde uma pequena parcela é absorvida intacta.^{32,43} A presença de 5-CQA – e nenhum outro metabólito – foi detectada no plasma de ratos wistar, após a ingestão de 5-CQA isolado, indicando que o mesmo seria absorvido intacto no estômago.⁴³ Ácidos fenólicos não metabolizados também foram detectados no plasma obtido da veia porta de ratos, após a infusão gástrica de diferentes compostos, na seguinte ordem de concentração: *p*-cumárico > ferúlico > caféico > 5-CQA.³² Outro ensaio em ratos, empregando o ácido 1,5-dicafeoilquínico, também identificou pequenas quantidades deste no plasma após a ingestão.⁴⁰

A absorção dos ácidos clorogênicos no trato gastrointestinal proximal é inferior a dos ácidos hidroxicinâmicos livres. A mucosa gastrointestinal humana não possui esterases capazes de hidrolisar os ácidos esterificados, o que reduz significativamente a eficiência da absorção dos ácidos clorogênicos no lúmen gástrico e no intestino delgado.^{14,34,35,44} Em indivíduos com ileostomia, foi demonstrado que 33% de um total 2,8 mmol (1g) de ácidos clorogênicos (isômeros 3,4, e 5-CQA) foram absorvidos no estômago e intestino delgado, enquanto a absorção do ácido cafeico livre, administrado na mesma dose de 2,8 mmol (500

mg), foi de 95%.³⁰ Resultados semelhantes foram encontrados em experimentos com animais.^{29,38}

Os compostos não absorvidos no estômago seguem para o intestino delgado, onde os ácidos hidroxicinâmicos livres proveniente dos alimentos são rapidamente absorvidos.^{30,45} Em cultura de células intestinais humanas Caco-2, observou-se que o fluxo transepitelial do 5-CQA é significativamente menor que o fluxo do ácido caféico, que por sua vez é menor que o do ácido ferúlico,⁴⁶ o que pode ser explicado, em parte, pela via de transporte dos compostos através das membranas celulares: os ácidos clorogênicos seriam absorvidos apenas por transporte paracelular, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos livres são absorvidos também por transporte ativo mediado por transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT).³² Estes transportadores estão presentes na mucosa gastrointestinal e em diversos tecidos corporais,⁴⁷ e portanto poderiam participar também do transporte dos ácidos fenólicos em tecidos alvo.¹⁷

O ácido ferúlico é bem absorvido na parte proximal do intestino.^{32,45} Em ratos, a concentração máxima no plasma deste ácido fenólico intacto e de metabólitos foi atingida após 30 minutos da ingestão, e a excreção urinária representou aproximadamente 40% da dose ingerida na forma do composto puro.⁴⁸

A Figura 2 ilustra os possíveis mecanismos de absorção dos ácidos clorogênicos e dos ácidos hidroxicinâmicos livres.

Figura 2 – Possível rota de absorção dos ácidos clorogênicos e ácidos hidroxicinâmicos livres⁴⁴

Com relação ao ácido caféico, em ratos que receberam uma dose única do composto puro (700 $\mu\text{mol/kg}$), foram detectados, além do próprio ácido caféico, o ácido ferúlico e seus metabólitos sulfatados e glicuronados 30 minutos após a ingestão, sendo que a concentração máxima no plasma foi observada após 2 horas.²⁹ Os ácidos hidroxicinâmicos livres representam uma pequena parcela do total de compostos fenólicos ingeridos a partir da dieta. De fato, os ácidos hidroxicinâmicos presentes nos alimentos encontram-se principalmente na forma esterificada.²⁰

Apesar da taxa de absorção inferior à dos ácidos hidroxicinâmicos livres, ácidos clorogênicos foram detectados intactos no plasma e/ou urina de humanos e animais após consumo na forma de 5-CQA isolado^{30,38,39} ou de alimentos que apresentam alta concentração destes compostos como café^{41,49} e ameixa.³⁷ Após a ingestão de café por voluntários sadios, foram detectados três ácidos monocateoilquínicos (3, 4 e 5-CQA) e três dicafecilquínicos no plasma.⁴¹ A concentração plasmática de CGA total foi em média 7,66 $\mu\text{mol/L}$, e dois picos de concentração foram identificados, entre 30 e 60 min e entre 90 e 240 min após a ingestão do café.

Por outro lado, outros trabalhos não conseguiram detectar ácidos clorogênicos no plasma ou urina após o consumo de fenólicos isolados ou alimentos ricos nestes compostos.^{29,33} É provável que os ácidos clorogênicos presentes no plasma e na urina tenham sido hidrolisados durante o tratamento das amostras visto que a enzima β -glicuronidase proveniente do molusco *Helix pomatia*, utilizada nestes estudos para hidrolisar as amostras, é capaz de degradar não só a ligação entre o ácido glicurônico e os ácidos fenólicos, mas também clivar a ligação éster entre o ácido quínico e os ácidos hidroxicinâmicos.^{10,41,49}

Uma pequena parte dos ácidos clorogênicos é absorvida sem hidrólise e aproximadamente 1% dos ácidos clorogênicos ingeridos são encontrados intactos na urina de humanos^{30,39} e animais.³⁸ A maior parte é metabolizada e absorvida no intestino grosso, onde estes compostos sofrerão hidrólise por esterases de origem

microbiana e subsequente absorção ou metabolização adicional dos ácidos fenólicos livres (quínico, cumárico, caféico e ferúlico).^{34-36,38,39,44}

Após a absorção, os ácidos clorogênicos e os ácidos hidroxicinâmicos livres podem sofrer ação de enzimas da fase II na mucosa intestinal e posteriormente no fígado ou outros tecidos, formando conjugados sulfatados, glicuronados e/ou metilados, pela ação das sulfotransferases, UDP-glicotransferases e catecol-*o*-metiltransferases (COMT), respectivamente.^{8,50} Estas conjugações representam um processo metabólico de detoxificação comum a muitos xenobióticos, que facilita a eliminação biliar e urinária pelo aumento da hidrofiliabilidade dos compostos.⁴

A flora microbiana do intestino grosso também exerce um papel essencial no metabolismo dos ácidos clorogênicos e de compostos fenólicos em geral. Após a clivagem da ligação éster, os ácidos livres podem seguir por duas rotas: absorção pela mucosa intestinal e passagem para a corrente sanguínea (na forma livre ou após conjugação por enzimas da fase II) ou podem permanecer no intestino grosso e sofrer metabolização adicional pela microbiota.⁷ A maior parte dos CGAs ingeridos é encontrada no plasma e na urina na forma de metabólitos formados pela ação da microbiota e posterior metabolização tecidual, sendo os mais abundantes os ácidos hipúrico, hidroxipúrico, *m*-cumarico, ferúlico, isoferúlico, hidroxifenilpropionico, hidroxibenzóico e vanílico.^{35,36,38,41,42}

O ácido caféico proveniente da clivagem dos ácidos cafeoilquínicos pode ser encontrado livre na corrente sanguínea,³³ mas a maior parte da parcela absorvida está na forma de conjugados glicuronados, sulfatados ou como ácido ferúlico e isoferúlico, resultantes da metilação do ácido caféico.³⁵ Os principais derivados do ácido ferúlico, proveniente do ácido caféico ou da clivagem dos ácidos feruoilquínicos, são os conjugados sulfatados e sulfoglicuronados.^{48,51}

Da parcela dos ácidos hidroxicinâmicos (caféico, ferúlico e *p*-cumárico) que não é absorvida e permanece no intestino grosso, são originados derivados hidroxilados do ácido fenilpropionico (3,4 dihidroxifenilpropionico, 3 e 4 hidroxifenilpropionico) por ação da microbiota colônica, por meio de reações de hidrogenação e

desidroxilação, assim como origina-se o ácido *m*-cumárico a partir da desidroxilação do ácido caféico.^{38,42}

O ácido fenilpropionico e os hidroxifenilpropionicos são absorvidos e, após β -oxidação nos tecidos, dão origem aos ácidos benzóicos e hidroxibenzóicos, que podem então ser conjugados com a glicina formando o ácido hipúrico e hidroxipúrico^{33,38} (Figura 3). O ácido hipúrico também pode ser formado a partir do ácido quínico, que após sofrer aromatização pelas bactérias do intestino grosso também dá origem ao ácido benzóico.³⁹ O ácido hipúrico é um dos principais metabólitos encontrados na urina após a ingestão de ácidos clorogênicos.^{35,38}

Figura 3 – Síntese do ácido hipúrico a partir do ácido benzóico

O ácido vanílico, outro metabólito encontrado no plasma e urina de humanos após o consumo de alimentos ricos em ácidos clorogênicos resulta da redução do ácido ferúlico, sendo transformado em ácido dihidroferúlico, que, ao sofrer β -oxidação, origina o ácido vanílico.^{34-36,41}

A Figura 4 ilustra a via geral de metabolização dos ácidos clorogênicos, proposta com base no conhecimento que se tem até o momento a cerca dos metabólitos formados. Muitos destes compostos são comuns ao metabolismo de flavonóides, como as catequinas, flavononas (hesperitina, naringerina), e proantocianidinas, os quais têm sua estrutura clivada pela microbiota colônica, dando origem a ácidos fenólicos.^{10,14}

Figura 4 – Representação esquemática das vias gerais de metabolismo dos ácidos clorogênicos^{33,34,36,40}

Apesar dos avanços recentes, não existe ainda um consenso sobre a biodisponibilidade relativa dos ácidos clorogênicos, ou seja, a porcentagem da quantidade ingerida que efetivamente é absorvida e metabolizada, principalmente pela falta de dados consistentes sobre seus metabólitos, mormente no que se refere à quantificação em tecidos. Em indivíduos com ileostomia, 33% de um total de 1000 mg (2,8 mmol) de 5-CQA isolado foram absorvidos, baseando-se na quantidade recuperada no fluido da ileostomia. Menos de 1% do 5-CQA absorvido

foi encontrado intacto na urina. Em outro estudo com humanos com intestino grosso intacto, 1,7% de 2 g (5,5 mmol) de 5-CQA estavam presentes na urina.³⁹ Em estudo com animais, que receberam durante 8 dias em média 73,6 mg/dia (208,7 μ mol/dia) de 5-CQA adicionado à ração, as quantidades de 5-CQA na urina foram semelhantes à dos estudos em humanos, cerca de 1%.³⁸

No entanto, quando levados em conta os metabólitos formados pela ação de enzimas endógenas e/ou da microbiota intestinal, até 36%³⁹ e 58%³⁸ destas doses ingeridas foram recuperadas na urina. Em um estudo com humanos que ingeriram 400 mg de extrato de café contendo 170 mg (451 μ mol) de ácidos clorogênicos, de 7,8 a 72% da dose ingerida foi encontrada no plasma, levando em conta alguns metabólitos.⁴² No entanto, as quantidades encontradas no plasma não corresponderam à excreção urinária,⁴² o que leva a crer que os metabólitos quantificados podem não corresponder a todos aqueles produzidos a partir dos ácidos clorogênicos presentes no extrato ingerido.

Para compreender os mecanismos de ação dos compostos fenólicos em geral, além de identificar e quantificar os metabólitos formados, é necessário identificar os tecidos alvos em que se depositam.⁸ Dados sobre concentrações teciduais de compostos fenólicos são escassos, e no caso de ácidos clorogênicos, inexistentes até o momento.

O avanço das pesquisas que avaliam a relação entre o consumo de vegetais e CBAs e a modulação de processos oxidativos, inflamatórios e mutagênicos em organismos vivos depende da elucidação da rota de metabolização desses compostos, assim como o estabelecimento de níveis necessários e/ou seguros de ingestão depende também de se estabelecer de que forma esses compostos são transformados e como se encontram nos diferentes tecidos e fluidos biológicos. O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e o acesso mais fácil a ferramentas como a espectrometria de massas está permitindo um avanço significativo nesta área. Ainda assim, é provável que mais uma década seja necessária para o estabelecimento de biomarcadores e níveis de ingestão para

compostos fundamentais para a manutenção da saúde, dado a complexidade da matriz alimento, a variabilidade individual e a decisiva ação da microbiota intestinal na metabolização de compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS

1. Bastos, D.H.M.; Rogero, M.M.; Arêas, J.A.G.; *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* **2009**, *53*, 646.
2. Holst, B.; Williamson, G.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 73.
3. Spencer, J.P.; Abd, E.I.; Mohsen, M.M.; Minihane, A.M.; Mathers, J.C.; *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 12.
4. D'Archivio, M.; Filesì, C.; Di Benedetto, R.; Gargiulio, R.; Giovannini, C.; Masella, R.; *Ann. Ist. Super Sanità* **2007**, *43*, 348.
5. Kussmann, M.; Affolter, M.; Nagy, K.; Holst, B.; Fay, L.B.; *Mass Spec. Rev.* **2007**, *26*, 727.
6. Scalbert, A.; Williamson, G.; *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073.
7. Williamson, G.; Manach, C.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 243S.
8. Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N.; *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1001.
9. Kroon, P.A.; Clifford, M.N.; Crozier, A.; Day, A.J.; Donovan, J.L.; Manach, C.; Williamson, G.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 15.
10. Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 230S.
11. Scholz, S.; Williamson, G.; *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2007**, *77*, 224.
12. Williamson, G.; Holst, B.; *Br. J. Nutr* **2008**, *99*, S55.
13. Robbins, R.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2866.
14. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jimenez, L.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727.
15. Clifford, M.N.; *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *70*, 362.
16. Lafay, S.; Gil-Izquierdo, A.; *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 301.
17. Karakaya, S.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 453.
18. Bourne, L.C.; Rice-Evans C.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *253*, 222.

19. Bastos, D.H.M.; Oliveira, D.M.; Matsumoto, R.L.T; Carvalho, P.O.; Ribeiro, M.L.; *Med. Aromatic Plant Sci. Biotechnol.* **2007**, *1*, 37.
20. Clifford, M.N.; *J. Sci. Food Agric.* **2000**; *80*, 1033.
21. De Maria, C.A.B.; Moreira, R.F.A. *Quím. Nova.* **2004**; *27*, 586.
22. Canela, M.D.; Bastos, D.H.M.; Pinheiro, M.M.; Ciconelli, R.; Ferraz, M.B.; Martini, L.; *Nutrire* **2009**, *34*, 143.
23. Bastos, D.H.M.; Fornari, A.C.; Queiroz, Y.S.; Torres, E.A.F.; *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2006**, *49*, 399.
24. Bastos, D.H.M.; Saldanha, L.A.; Catharino, R.R.; Sawaya, H.F.; Cunha, I.B.S.; Carvalho, P.O.; Eberlin, M.N.; *Molecules* **2007**, *12*, 423.
25. Oliveira, D.M.; Freitas, H.S.; Souza, M.F.F.; Arçari, D.P.; Ribeiro, M.L.; Carvalho, P.O.; Bastos, D.H.M.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10527.
26. Bastos, D.H.M.; Fornari, A.C.; Queiroz, Y.S.; Manólio, R.A.; Torres, E.A.F.; *Acta Farm. Bonaerense* **2005**, *24*, 91.
27. Macheix, J.J.; Fleuriet, A.; Billot, J.; *Fruit Phenolics*, CRC Press: Boca Raton - FL, 1990.
28. Morais, J.A.G; Lobato, M.R. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *106*, 221.
29. Azuma, K.; Ipposushi, K.; Nakayama, M.; Ito, H.; Higashio, H.; Terao, J; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5496.
30. Olthof, M.R.; Hollman, P.C; Katan, M.B.; *J. Nutr.* **2001**, *131*, 66.
31. DuPont, M.S.; Bennet, R.N.; Mellon, F.A.; Williamson, G.; *J. Nutr.* **2002**, *132*, 172.
32. Konishi, Y.; Zhao, Z.; Shimizu, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7539.
33. Nardini, M.; Cirillo, E.; Natella, F.; Scaccini, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5735.
34. Rechner, A.R.; Pannala, A.; Rice-Evans, C.A.; *Free Radic. Res.* **2001**, *35*, 195.
35. Rechner, A.R.; Spencer, J.P.E.; Kuhnle, G.; Hahn, U.; Rice-Evans, C.A.; *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 1213.
36. Rechner, A.R.; Kuhnle, G.; Bremner, P.; Hubbard, G.P.; Moore, K.P.; Rice-Evans, C.A.; *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 220.
37. Cremin, P.; Kasim-Karakas, S.; Waterhouse, A.L.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1747.

38. Gonthier, M.P.; Verny, M.A.; Besson, C.; Remesy, C.; Scalbert, A.; *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1853.
39. Olthof, M.R.; Hollman, P.C; Buijsman, M.C.N.P.; Amelsvoort, J.M.M.; Katan, M.B.; *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1806.
40. Yang, B.; Meng, Z.; Dong, J.; Yan, L.; Zou, L.; Tang, Z.; Dou, G.; *Drug. Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 930.
41. Monteiro, M.; Farah, A.; Perrone, D.; Trugo, L.C.; Donangelo, C.; *J. Nutr.* **2007**, *137*, 2196.
42. Farah, A.; Monteiro, M.; Donangelo, C.M.; Lafay, S.; *J. Nutr.* **2008**, *138*, 2309.
43. Lafay, S.; Gil-Izquierdo, A.; Manach, C.; Morand, C.; Besson, C.; Scalbert, A.; *J. Nutr.* **2006**, *136*, 1192.
44. Plumb, G.W.; Garcia-Conesa, M.T.; Kroon, P.A.; Rhodes, M.; Ridley, S.; Williamson, G.; *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 390.
45. Adam, A.; Crespy, V.; Levrat-Verny, M.A.; Leenhardt, F.; Leuillet, M.; Demigné, C.; Remesy, C.; *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1962.
46. Konishi, Y.; Kobayashi, S.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2518.
47. Iwanaga, T.; Takebe, K.; Kato, I.; Karaki, S.I.; Kuwahara, A.; *Biomed. Res.* **2006**, *27*, 243.
48. Rondini, L.; Peyrat-Maillard, M.N.; Marsset-Baglieri, A.; Berset, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3037.
49. Ito, H.; Gonthier, M.; Manach, C.; Morand, C.; Mennen, L.; Rémésy, C.; Scalbert, A.; *Br. J. Nutr.* **2005**, *94*, 500.
50. Mateos, R.; Goya, L.; Bravo, L.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**; *54*, 8724.
51. Zhao, Z.; Egashira, Y.; Sanada, H.; *J. Nutr.* **2004**, *134*, 3083.

5.2 SEGUNDO ARTIGO

O segundo artigo descreve o desenvolvimento e validação dos métodos utilizados para extração e análise dos ácidos fenólicos nos fluidos e tecidos biológicos. O mesmo é intitulado *“Development and validation of methods for extraction of phenolic acids from plasma, urine and liver and analysis by UPLC-MS”* e foi submetido ao periódico *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Development and validation of methods for extraction of phenolic acids from plasma, urine and liver and analysis by UPLC-MS

Daniela M. de Oliveira¹, Carolina B. Pinto¹, Geni R. Sampaio¹, Lina Yonekura¹, Rodrigo R. Catharino², Deborah H. M. Bastos^{1*}

¹Nutrition Department, School of Public Health, University of São Paulo. Av Dr Arnaldo 715, CEP 01246-904. São Paulo, SP – Brazil.

²INNOVARE Biomarkers Laboratory, School of Medical Sciences, University of Campinas, Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", CEP 13083-887. Campinas, SP – Brazil.

*Corresponding Author. E-mail: dmbastos@usp.br. Phone: 55-11-30617855, Fax: 55-11-30617130.

ABSTRACT

We developed and validated a method for the extraction and determination of eleven phenolic acids in rat plasma, urine and liver by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS). System Suitability Test (instrumental linearity, area and retention time precision) was performed and recovery, intra and between-day precision, detection limits (LOD) and quantification limits (LOQ) were determined for all compounds in each biological matrix. Recoveries varied between 88-117% in plasma, 87-102% in urine and 38-100% in liver. Precision was lower than 12.6% intra-day and 12.9% inter-day in all matrices, in three concentration levels. In order to demonstrate the applicability, methods were used to estimate the concentrations of phenolic acids in samples from animals that had received 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) by orally. The excellent validation results and the applicability of the methods to real samples confirmed their suitability for studies on absorption, bioavailability and pharmacokinetic of phenolic acids derived from foods rich in phenolic compounds.

Keywords: phenolic acids, solid phase extraction, plasma, urine, tissue, UPLC-MS.

INTRODUCTION

Phenolic compounds are potentially bioactive substances that occur naturally in plants and derived foods, with broad scientific evidences supporting their beneficial role on human health and prevention of degenerative diseases, summarized in review articles.^{1,2} Approximately 8000 substances belong to the category of “plant phenolics”, all of which share an aromatic ring bearing at least one phenol substituent, comprising different compounds: simple phenols, phenolic acids, coumarins, flavonoids, stilbenes, up to hydrolysable and condensed tannins, lignans, and lignins.^{2,3}

Phenolic acids are hydroxylated derivatives of benzoic or cinnamic acids.⁴ The most abundant phenolic acids in foods are the hydroxycinnamates, like caffeic, ferulic and *p*-coumaric, which occur mainly as ester conjugates with quinic acid, collectively referred to as chlorogenic acids.² These compounds are broadly present in fruits and vegetables and are the main phenolic compounds in coffee and yerba maté, contributing significantly to daily dietary intake of phenolics.^{5,6}

Although beneficial properties of plant phenolics are often attributed to antioxidant activities, emerging findings suggest a variety of potential mechanisms of action *in vivo*, beyond antioxidant functions.^{2,7} However, the compounds present in food may not reach physiological targets in their native forms, but probably as metabolites.^{8,9} It is actually known that phenolic compounds undergo several modifications due to the action of phase II enzymes and gut microflora metabolism.

In fact, following ingestion a small part of chlorogenic acids may be absorbed intact or after cleavage of ester bonds by membrane¹⁰ or microbial esterases¹¹, appearing in plasma and urine mainly as phase II conjugates of chlorogenic acids and hydroxycinnamates (methyl, glucuronide and sulfate derivatives).¹²⁻¹⁴ Metabolization of chlorogenic acids and flavonoids by colonic microflora leads to the production of other phenolic acids, like hydroxyphenylpropionic, dihydrocaffeic, hippuric and hydroxybenzoic acids,^{6,15} which are more hydrophilic and may be present in body fluids and tissues in larger quantities than the parent compounds.²

Despite the potential role of chlorogenic and other phenolic acids in human health, due to their broad presence in foods and/or potentially in the body as metabolites of other phenolic compounds, their bioavailability has not received as much attention as that of flavonoids.^{6,16} For the determination of phenolic compounds and their metabolites in biological matrices, it is necessary to ensure an efficient and reproducible extraction, coupled to separation techniques sensitive enough to detect low concentrations found in biological fluids and tissues.¹⁷

A limited number of studies have reported methods for extraction and analysis of chlorogenic acids or other phenolic acids from biological matrices. Two studies that evaluated the bioavailability of chlorogenic acids from coffee have described methodologies for liquid-liquid extraction of phenolic acids from plasma^{12,18} and urine¹², with analysis performed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The first study¹⁸ presents a validated methodology for only three hydroxycinnamic acids (caffeic, ferulic and isoferulic) and two phenolic acids formed by the gut microflora (dihydrocaffeic and dihydroferulic acids), because full enzymatic hydrolysis was applied (esterase, β -glucuronidase and sulfatase). The second study¹² evaluated twenty-one compounds, including intact chlorogenic acids, but as validation was not a main goal, the respective parameters were not fully evaluated or reported.

Recently, methods coupling solid phase extraction (SPE) or liquid-liquid extraction with LC-MS techniques have been described for analyzes of phenolic acids formed by metabolization of cocoa polyphenols in urine,¹⁹ plasma phenolic acids and polyphenols from thyme,²⁰ urinary phenolic acids formed by metabolization of polyphenols from cranberry²¹—and urine phenolic metabolites from tomato.¹⁷ However, only the two last include chlorogenic acids among the evaluated compounds. Besides, to our knowledge, there are no published studies with validated methods for extraction of chlorogenic acids and other phenolic acids from tissues.

The present work describes new methods for extraction and analysis of phenolic acids from plasma, urine and tissues (liver). The method comprises extraction from biological matrices using off-line solid phase cartridges and ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS) as analytical and separation technique. Validation was performed using eleven phenolic acids, which represent native forms broadly found in foods as chlorogenic acids (5-caffeoylquinic acid, 5-CQA), intermediate metabolites (hydroxycinnamates: caffeic, ferulic, isoferulic and *p*-coumaric acids) and also compounds that may be formed after metabolization of chlorogenic acids and polyphenols by the gut microflora (dihydrocaffeic, hydroxybenzoic, *m*-coumaric, vannilic, hippuric and hydroxyphenylpropionic acids). After validation, the method was applied to samples from rats that had received 5-CQA orally by gavage.

EXPERIMENTAL

MATERIALS

The phenolic acids 5-caffeoylquinic (5-CQA), caffeic, ferulic, isoferulic, hippuric, *p*-coumaric, *m*-coumaric, vannilic, 3-hydroxybenzoic, dihydrocaffeic and 2-hydroxyphenylpropionic acids, enzymes β -glucuronidase (Type IX from *E. coli*) and sulfatase (Type VIII from abalone entrails), MOPS, Na₂EDTA, sodium dithionite and ascorbic acid were purchased from Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland), Solid phase extraction cartridges (Oasis HLB, 1cc 30 mg) were provided by Waters (Milford, Massachusetts, USA). Formic acid (98%) and phosphoric acid (85%) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), sodium acetate and organic solvents (acetonitrile and methanol) HPLC grade from Carlo Erba (Rodano, Italy). Deionized water was obtained from a Milli-Q water purification apparatus (Millipore, Bedford, MA, USA).

STANDARD PREPARATIONS

Stock solutions (1 mg/mL) were prepared separately in methanol for each analyte. They were further diluted with methanol to obtain a work solution with all the compounds at 100 µg/mL, which was divided in small aliquots and kept at -70°C. Dilutions were prepared in water (recovery experiments) or mobile phase, after drying the methanol under nitrogen and ressuspending the solution in the same amount of deionized water.

EXPERIMENTAL ANIMALS

Twelve male Wistar rats (6 weeks old) were housed in groups of three per cage in a controlled temperature (25 °C) room with a 12/12 light/dark cycle with free access to water and a commercial feed for laboratory rats (Nuvilab CR1, Nuvital, Curitiba, PR, Brazil) for three weeks. At nine weeks of age, animals (~260 g body weight) were kept under fasting conditions overnight with access to water and were divided in two groups (6 rats each). One group received a single dose of 5-CQA (240 mg/kg of body weight) diluted in water by gavage, while the second group (Control) received the correspondent amount of water. Rats were placed in metabolic cages for urine collection for 2 hours and after this period they were anesthetized with IP ketamine and xylazine mixture, blood collected by cardiac puncture and liver excised and perfused with saline solution.

Blood was centrifuged for 10 min at 3000 x *g* (4 °C) and 40 µL sodium acetate buffer (250 mM pH 5.0, 20 mg/mL ascorbic acid, 1 mg/mL Na₂EDTA) were added to each 1 mL of plasma and urine. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C prior to analyses.

All animal procedures were in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College for Animal Experimentation according to the American Psychological Association Guidelines for Ethical Conduct in the Care

and Use of Animals. The study protocols were approved by the Ethical Committee of the Tropical Medicine Institute, University of São Paulo (Protocol 037/2009).

SAMPLE PREPARATION AND SOLID PHASE EXTRACTION

Plasma and urine

Aliquots of 200 μ L of control plasma or urine, previously treated with antioxidant solution (20 mg/mL ascorbic acid and 1 mg/mL Na₂EDTA in sodium acetate buffer 250 mM pH 5.0), were defrosted on ice in the dark, spiked with the standard solution (or corresponding amount of water) and incubated with β -glucuronidase (500 U for plasma and 1000 U for urine) and sulfatase (2.5 U for plasma and 5 U for urine). Enzymes were prepared previously in sodium acetate buffer (250 mM pH 5.0), aliquoted and kept at -70°C. For urine samples, 20 μ L of MOPS buffer (625 mM, pH 6.8) were added to adjust the pH. Samples were briefly vortexed, purged with nitrogen and incubated for 1 hour at 37°C, with shaking. At the end of incubation period, 400 μ L of 4% phosphoric acid and 200 μ L of water were added to each tube.

Liver

Liver samples were freeze-dried for 12 hours before extraction. Individual tissue weights were recorded before and after the freeze-drying process, so the results obtained using the methodology can be expressed per gram of fresh tissue.

Freeze-dried control tissue samples (30 mg) were spiked with the standard solution (or corresponding amount of water) and homogenized in 300 μ L methanol 0.2% formic acid and 300 μ L 0.3 M sodium dithionite/0.1% (w/v) Na₂EDTA in a 2 mL tube on ice.²² The homogenate was centrifuged at 5000 x *g* for 10 min (4 °C). The supernatant was collected on a glass tube containing 8 μ L of aqueous ascorbic acid (10 mg/mL) and kept on ice. Extraction was repeated with 200 μ L of each solution, sample was vortexed for 1 min and centrifuged at 10000 x *g* for 10 min (4 °C). The

combined supernatants were partially vacuum evaporated for 40 min at 35°C on a CentriVap concentrator (Labconco, Kansas City, USA). The tube was washed with 0.3 mL 625 mM MOPS buffer (pH 6.8) and samples transferred to a new 2 mL tube. After purging with nitrogen, samples were incubated at 37 °C for 30 min with β -glucuronidase (1000 U) and sulfatase (5 U) with shaking. Reaction was stopped by adding 300 μ L of 4% phosphoric acid.

Solid phase extraction

Solid phase cartridges (Oasis HLB) were conditioned sequentially with 1 mL of methanol and 0.2% formic acid in water and loaded with the previously prepared plasma, urine or liver samples. After washing the cartridge twice with 1 mL 0.2% formic acid, phenolic acids were eluted with 3 x 0.5 mL of methanol acidified with 0.2% formic acid into a tube containing 8 μ L of ascorbic acid solution (10 mg/mL). The eluate was vacuum evaporated at 33°C (~1 hour), until dryness. The residues were reconstituted with 200 μ L mobile phase (94% water / 6% acetonitrile with 0.1% formic acid) and filtered through 0.22 μ m PVDF membrane syringe filters (Millipore, Billerica, MA, USA) directly on a 96 well plate before injection into UPLC - MS.

LIQUID CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY ANALYSES

Analyses were carried out on an Agilent 1200 SL binary pump LC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), coupled to an Agilent single quadrupole mass spectrometer (6150B) equipped with electrospray ionization (ESI). Chromatographic separation was achieved on a Zorbax SB-C18 column (50 x 2.1 mm, 1.8 μ m) with a Zorbax SB-C8 guard column (12,5 x 2,1 mm, 5 μ m) (Agilent Technologies), operating at 45°C. Mobile phases were constituted with water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), both acidified with 0.1% formic acid. The best separation was achieved with the gradient program: 0-0.5 min 6% B; 0.5-8.5 min 20% B; 8.5-9.5 90% B; 9-12 held at 90%, 12-12.5 back to 6% B and a 10 min post

run re-equilibration at 6% B. Mass spectrometric data were collected between 0.5 and 8.5 min. The flow rate was 330 $\mu\text{L}/\text{min}$ and injection volume 5 μL .

MS analyses were performed in the negative mode, with nitrogen as nebulizer (35 psi) and drying gas (9 L/min) at 350°C with a capillary voltage set at -4 kV. First, a solution with all the standards in mobile phase was infused in *scan* mode, so the deprotonated molecule and the most intense product ion of each compound were recorded and selected for single ion monitoring (SIM), mode used for method optimization and quantitative analysis of samples. The cone voltage (collision induced dissociation – CID) for all compounds was 100 V. Chromatographic data were recorded and integrated using LCD/MSD ChemStation software.

SYSTEM SUITABILITY TEST (SST)

SST²³ was performed under the optimized chromatographic conditions for the separation of 11 phenolic acids. A standard solution with all the analytes in mobile phase was injected 10 times in two different days, in order to verify the instrumental precision (intra and inter-day), determined as relative standard deviation (%RSD) of retention time and peak areas. Linearity, expressed as the determination coefficient (R^2), was checked from 0.25 to 20.0 ng (50 - 4000 ng/mL) and calculated by plotting the peak area of each concentration against the respective known concentration.

METHOD VALIDATION

The validation was performed according to the International Conference on Harmonization Guidance for the Validation of Analytic Methods.²³ It was based on the following criteria: limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision (intra and inter-day variability), recovery and linearity.

LOD and LOQ were determined for each biological matrix (plasma, urine and liver) using the standard of the response method, with the following formulas:

$$\text{LOD} = (3.3\sigma) / S$$

$$\text{LOQ} = (10\sigma) / S$$

Where σ is the standard deviation of the matrix (control samples) and S the slope of the calibration curve. Standard deviation of the blank was calculated by analyzing the background (noise) of three pooled samples from the group, as close as possible to the expected retention time for each analyte, using ChemStation software. External calibration curves were built with spiked pooled control samples (for plasma and liver) or standard solutions (for urine), with different concentration levels. Curves were used for calculation of LOD and LOQ and quantification of the analytes in samples from animals that received 5-CQA by gavage.

Extraction recoveries (%R) were determined by comparing the absolute response of the analytes spiked in control samples before and after the extraction procedure, using 9 determinations (3 concentrations/3 replicates each) for all the compounds.

Method precision (intra-day and inter-day precision) was determined as the relative standard deviation (%RSD) with 3 replicates and 3 concentrations, in two different days by the same analyst. Analytes were added to samples before the extraction procedure.

RESULTS AND DISCUSSION

UPLC-MS ANALYSES AND SYSTEM SUITABILITY TEST (SST)

Phenolic acids mass spectra were determined by injection of each compound separately in negative ion mode. ESI conditions (fragmentor voltage, drying gas flow and nebulizer pressure) were optimized with a mixture of all studied compounds to improve sensitivity and reduce baseline noise (see section 2.5).

An optimized chromatographic run of 8.5 min yielded symmetric peaks for all phenolic acids. The cleaning step after each run (90% solvent B for 3 min) was

crucial for the adequate performance of repeated sample injections and to improve column lifetime.

Chromatographic peaks were separated in four main total ion count (TIC) signals (SIM mode chromatograms) with the deprotonated molecule $[M-H]^-$ and the most abundant product ion selected for each compound. Extracted ion chromatograms (EIC) of the deprotonated molecule were used to achieve additional separation for adequate quantification of 5-CQA, caffeic, *p*-coumaric, *m*-coumaric, 3-hydroxybenzoic and dihydrocaffeic acids. One of the main advantages of MS detectors is that compounds can be separated according to the different m/z , even if they co-elute. Phenolic acids and matrix interferents with same m/z were sufficiently separated chromatographically. Figure 1 presents the chromatograms of standards in mobile phase and chromatograms of control plasma, liver and urine. Hippuric acid was found in the three control matrices, and an isomer of 2-hydroxyphenylpropionic acid was also found in urine.

Figure 1 – Representative UPLC-MS chromatograms of phenolic acids standards in mobile phase (1 µg/mL) and control plasma, urine and liver.

System suitability test showed satisfactory precision for peak areas and retention times, intra and inter-day (Table 1).

Table 1 – LC-MS parameters and instrumental precision (intra and inter-day) for phenolic acids with the developed chromatographic method.

Phenolic acid	RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Product ion (m/z)	RT Precision (%RSD)			Area Precision (%RSD)		
				Intra-day (n=10)		Inter-day	Intra-day (n=10)		Inter-day
				Batch 1	Batch 2		Batch 1	Batch 2	
5-CQA	3.5	353	191	0.37	0.67	0.57	0.90	1.13	1.86
Caffeic	3.8	179	135	0.22	0.42	0.37	1.07	1.24	3.38
Ferulic	6.8	193	178	0.12	0.11	0.14	0.55	0.86	1.42
Isoferulic	7.3	193	178	0.12	0.10	0.13	0.83	1.74	2.13
m-coumaric	6.8	163	119	0.10	0.10	0.14	0.82	0.82	1.87
p-coumaric	5.6	163	119	0.11	0.16	0.18	0.54	1.25	3.18
Dihydrocaffeic	3.3	181	137	0.28	0.64	0.49	2.39	1.80	2.62
Hippuric	3.4	178	134	0.22	0.46	0.37	0.40	0.96	2.86
3-hydroxybenzoic	3.7	137	93	0.18	0.40	0.34	1.12	0.46	3.24
2-hydroxyphenylpropionic	6.9	165	121	0.09	0.11	0.13	1.37	1.26	3.22
Vannilic	3.8	167	152	0.22	0.44	0.36	4.24	2.93	3.69

Linearity of detector response was checked by linear regression. Coefficient of determination (R^2) was higher than 0.99 from 0.25 – 20.0 ng (50 – 4000 ng/mL) for 5-CQA, caffeic, hippuric, p-coumaric, isoferulic, 2-hydroxyphenylpropionic, dihydrocaffeic and 3-hydroxybenzoic acids. For ferulic and m-coumaric, linear range was from 0.25 - 10.0 ng (50 – 2000 ng/mL) and for vannilic acid from 1.0 – 20.0 ng (200 – 4000 ng/mL).

SAMPLE PREPARATION AND SOLID PHASE EXTRACTION

Plasma and urine samples were treated with ascorbic acid/Na₂EDTA antioxidant solution before freezing. Liver was freeze dried to eliminate water, thus concentrating the sample and improving the contact between solvent and tissue.²⁴ Sodium dithionite and Na₂EDTA were used as antioxidants during the homogenization instead of ascorbic acid, since the later can act as pro-oxidant in the presence of catalytic ions such Fe²⁺ and Cu²⁺, as tested by Chu *et. al.*²²

Samples were hydrolyzed with β-glucuronidase and sulfatase enzymes prior to extraction, because phenolic acids may be modified by phase II metabolism *in vivo* and appear in the body mainly conjugated with β-glucuronide acid and/or sulfate

groups.¹²⁻¹⁴ As these modified compounds are not all commercially available to date, the hydrolysis is necessary for quantification of the substances as their non-conjugated equivalents.

Enzyme activities in the presence of phosphate or MOPS (3-morpholinopropane-1-sulfonic acid) buffers were evaluated according to standard Sigma-Aldrich protocols.^{25,26} Phosphate buffer was shown to inhibit β -glucuronidase activity (data not shown), in accordance with previous observations.²⁷ MOPS buffer did not decrease enzymatic activity and was used to adjust the pH of urine and liver samples to the optimal range for enzymatic hydrolysis (pH 6.5 – 7.0). It was not necessary to adjust plasma pH, as it was already in the optimal range for β -glucuronidase. Although sulfatase has an optimal pH of 5.0, this enzyme showed good activity at pH 6.5 – 7.0, while β -glucuronidase was more sensitive to pH changes.

Enzymatic hydrolysis conditions were tested by evaluating different incubation times (30, 45, 60 min) and enzyme amounts (500, 1000 and 2000 units of β -glucuronidase and 2.5, 5 and 10 U of sulfatase). Conditions were assessed by monitoring the increase on chromatographic peak areas of 5-CQA, caffeic and ferulic acids in pooled plasma, urine and liver samples from the animals that had received 240 mg/kg body weight of 5-CQA by gavage. When larger amounts of enzymes and prolonged incubation time did not increase peak areas of the cited compounds, the smaller amount of enzymes and incubation time that resulted in similar chromatographic peak areas were chosen.

For plasma samples, 500 U of β -glucuronidase and 2.5 U of sulfatase were sufficient to hydrolyze the samples after 1 hour incubation, as no further increase in peak areas were observed with higher enzyme amounts. It was necessary to double the enzyme amounts for treatment of urine samples. Regarding the liver, recovery was dramatically reduced by the incubation step, although antioxidants were used and samples purged with nitrogen. The tests confirmed that the reduced recovery was a result of the incubation time and not the enzymes used. Therefore,

incubation period was reduced to 30 min and the amounts of enzymes were the same applied to urine (1000 U of β -glucuronidase and 5 U of sulfatase), to assure the release of all conjugates.

Following the enzymatic hydrolysis, samples were submitted to SPE for extraction of phenolic acids. Initially, two liquid-liquid extraction methods were tested with plasma samples: protein precipitation with methanol²⁸ and liquid partition using ethyl acetate,^{18,29} both followed by vacuum evaporation and re-suspension in mobile phase. Although recovery values were satisfactory for most analytes (>90%), results for 5-CQA were low with ethyl acetate method (40% recovery) and samples remained with a lot of impurities with methanol precipitation, which compromised the sub 2-micron column lifetime and the quality of chromatographic data. Therefore, SPE was the method chosen for further optimization.

Most extractions of phenolic compounds are carried out under acidic conditions because they are generally more stable in low pH and kept neutral, being readily extracted into organic solvents, while dissociated forms may remain in the aqueous phase.^{1,30} Although HCl has been used in many methods for extraction of phenolic acids from biological fluids,^{28,31} aqueous HCl has been reported to destroy hydroxycinnamic acids³. Formic acid was chosen based on literature^{12,18,19} and for being a weak acid compatible with ESI/MS interface.

The SPE procedure was based on the generic Oasis HLB protocol from Waters, which includes dilution of samples with 4% H_3PO_4 . This acid solution breaks the bonds between phenolic compounds and proteins and also modifies the pH, stopping β -glucuronidase and sulfatase activities. First, cartridges were conditioned, equilibrated and samples applied. Different washing procedures were tested to remove most of interference from the biological matrices without eluting the retained phenolic acids: 1 or 2 washings with 0.2% formic acid in water; 1 washing with 0.2% formic acid in water followed by 0.2% formic acid + 5% methanol in water. Best recoveries were obtained with two consecutive washings (1 mL each)

with 0.2% formic acid in water. Finally, samples were eluted with 0.2% formic acid in methanol into tubes containing ascorbic acid, to avoid oxidation during vacuum evaporation.

METHOD VALIDATION

Standard mixture solutions of phenolic acids were spiked in control plasma, urine and liver samples at known concentrations. After extraction, samples were analyzed by UPLC-MS and recovery, intra and inter-day precision, limits of determination and quantification were evaluated according to ICH guidelines.²³

The extraction recoveries obtained in three contamination levels are shown in Table 2. Results are among the highest in literature for extraction of phenolic acids from plasma and urine, especially for hydroxycinnamates (caffeic, ferulic, isoferlic, *p*-coumaric and *m*-coumaric acids) and 5-CQA.^{13,18,19,21,32-34}

Table 2 - Extraction recovery of phenolic acids in spiked plasma, urine and liver submitted to solid phase extraction and analyzed by UPLC- MS.

Phenolic acid	Recovery % (mean $\pm$ SD)								
	Plasma			Urine			Liver		
	250 ng/mL	500 ng/mL	1 μ g/mL	250 ng/mL	1 μ g/mL	15 μ g/mL	250 ng/mL	500 ng/mL	1 μ g/mL
5-CQA	100 $\pm$ 4.7	88 $\pm$ 2.0	98 $\pm$ 0.8	91 $\pm$ 1.0	97 $\pm$ 0.6	99 $\pm$ 1.0	38 $\pm$ 3.0	41 $\pm$ 1.5	49 $\pm$ 2.4
Caffeic	105 $\pm$ 3.2	114 $\pm$ 9.1	108 $\pm$ 2.6	94 $\pm$ 3.6	98 $\pm$ 0.6	99 $\pm$ 1.2	72 $\pm$ 4.2	64 $\pm$ 5.0	69 $\pm$ 1.9
Ferulic	95 $\pm$ 4.8	102 $\pm$ 1.5	96 $\pm$ 0.2	89 $\pm$ 5.5	96 $\pm$ 2.5	99 $\pm$ 1.1	93 $\pm$ 0.6	69 $\pm$ 1.6	75 $\pm$ 1.1
Isoferulic	100 $\pm$ 5.4	101 $\pm$ 3.2	96 $\pm$ 1.2	102 $\pm$ 8.8	99 $\pm$ 0.8	99 $\pm$ 1.7	87 $\pm$ 5.0	68 $\pm$ 5.3	77 $\pm$ 1.4
<i>m</i> -coumaric	100 $\pm$ 3.2	106 $\pm$ 1.7	102 $\pm$ 1.0	93 $\pm$ 2.9	96 $\pm$ 3.9	99 $\pm$ 0.7	85 $\pm$ 0.8	61 $\pm$ 3.0	75 $\pm$ 2.3
<i>p</i> -coumaric	101 $\pm$ 3.6	104 $\pm$ 1.9	97 $\pm$ 0.5	96 $\pm$ 1.5	101 $\pm$ 0.7	99 $\pm$ 2.1	81 $\pm$ 1.6	60 $\pm$ 3.1	76 $\pm$ 3.7
Dihydrocaffeic	106 $\pm$ 2.6	110 $\pm$ 0.5	102 $\pm$ 1.0	91 $\pm$ 0.3	98 $\pm$ 1.4	100 $\pm$ 1.4	84 $\pm$ 2.8	70 $\pm$ 4.4	68 $\pm$ 1.3
Hippuric	110 $\pm$ 1.4	117 $\pm$ 3.4	109 $\pm$ 0.8	98 $\pm$ 1.0	100 $\pm$ 1.6	102 $\pm$ 1.0	100 $\pm$ 1.8	74 $\pm$ 4.2	84 $\pm$ 0.6
3-hydroxybenzoic	108 $\pm$ 1.5	114 $\pm$ 3.4	94 $\pm$ 0.7	95 $\pm$ 1.7	94 $\pm$ 3.1	100 $\pm$ 1.4	90 $\pm$ 2.0	74 $\pm$ 9.1	78 $\pm$ 0.9
2-hydroxyphenylpropionic	107 $\pm$ 2.3	107 $\pm$ 2.6	103 $\pm$ 1.4	87 $\pm$ 3.9	96 $\pm$ 1.0	96 $\pm$ 1.0	82 $\pm$ 2.9	60 $\pm$ 2.2	74 $\pm$ 2.4
Vannilic	-	90 $\pm$ 3.6	91 $\pm$ 4.0	-	91 $\pm$ 8.0	102 $\pm$ 1.8	-	82 $\pm$ 7.7	88 $\pm$ 5.0

n=3 replicates in each level

Tissues are more complex matrices than plasma and urine, due to cellular structures with high contents of proteins, collagen and fat, depending on the tissue.²⁴ The presence of metal ions and microsomal enzymes in liver may also lead to oxidation of phenolic acids.²² As a result, recovery values for liver were lower than those obtained for plasma and urine. These results are in accordance with other authors that reported extraction recovery of different phenolic compounds

from tissues.^{22,24,35} On a recent publication²⁴, the extraction recoveries of catechin and epicatechin from rat tissues were increased when four liquid extractions were carried out instead of two, before cleanup with SPE. Therefore, performing more extractions may also be useful to increase the recoveries of phenolic acids from tissues.

Table 3 presents the LOD and LOQ obtained for plasma, urine and liver. Values varied among different compounds, but followed a similar trend in the different matrices. Vannilic acid limits were the highest among the studied compounds, which is probably a result of poor ionization on the electrospray interface, under the conditions tested.

Table 3 – Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) (ng/mL) for analysis of phenolic acids by UPLC- MS in plasma, liver and urine samples.

Phenolic acid	Plasma		Liver		Urine	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
5-CQA	16	52	10	30	14	48
Caffeic	12	38	6	20	16	50
Ferulic	16	52	10	30	30	96
Isoferulic	20	60	14	46	66	202
m-coumaric	10	30	10	30	18	54
p-coumaric	30	94	8	26	16	50
Dihydrocaffeic	24	72	6	20	12	40
Hippuric	64	200	8	28	22	68
3-hydroxybenzoic	16	46	8	26	32	102
2-hydroxyphenylpropionic	14	40	12	32	22	66
Vannilic	436	1320	390	1176	472	1430

The LOD and LOQ calculated on the present below or close to the concentration range applied to studies that quantified phenolic compounds in human plasma and urine after coffee consumption (200 ng/mL to 20 ug/mL)¹² and in urine of rats fed cranberry (50 to 2000 ng/mL)²¹. Furthermore, concentration of 5-CQA, its isomers (3 and 4-CQA) and caffeic acid in plasma of humans after coffee consumption are higher than the LOQs reported here.¹³ This indicates that the methods described in the present paper are suitable for bioavailability studies of phenolic compounds in animals and humans. Furthermore, the sensitivity of chromatographic analyzes depends not only on the conditions applied, but mainly on the equipment used. Thus, different values may be obtained with these methods when applied to different LC-MS equipment.

The intra-day and inter-day precision for each biological matrix are summarized on Table 4 and show the good precision of the proposed methods, with RSD values lower than 15% for all the compounds. These results are similar to other methods described for the analysis of phenolic acids by LC-MS techniques in different biological matrices, like faeces³⁷, plasma and urine.^{17, 34}

Table 4 – Intra-day and inter-day area precision of phenolic acids from spiked plasma, liver and urine in three levels. Samples were submitted to solid phase extraction and analyzed by UPLC-MS.

Phenolic acid	Precision (%RSD)								
	Intra-day (batch 1)			Intra-day (batch 2)			Inter-day		
	250 ng/mL	500 ng/mL	1 µg/mL	250 ng/mL	500 ng/mL	1 µg/mL	250 ng/mL	500 ng/mL	1 µg/mL
<i>Plasma</i>									
5-CQA	1.5	9.0	4.6	2.1	3.4	5.2	11.2	9.5	6.5
Caffeic	1.3	3.8	3.4	4.9	8.9	2.9	11.0	6.5	4.5
Ferulic	3.0	7.8	3.2	2.5	0.5	0.7	10.2	5.3	2.1
Isoferulic	1.5	8.1	5.7	3.9	1.3	2.3	12.1	6.7	3.9
<i>m</i> -coumaric	1.3	8.6	3.5	3.9	1.5	0.4	8.1	5.6	2.2
<i>p</i> -coumaric	1.9	5.6	0.8	4.2	1.1	1.4	7.5	4.3	1.4
Dihydrocaffeic	1.1	5.5	3.6	3.2	3.9	3.9	7.8	10.3	5.7
Hippuric	0.8	11.2	4.5	3.4	2.0	7.2	10.0	8.9	5.6
3-hydroxybenzoic	1.7	10.2	12.1	5.7	1.1	3.8	5.7	7.5	11.7
2-hydroxyphenylpropionic	2.8	6.5	2.6	2.5	0.4	2.2	9.9	4.4	2.4
Vannilic	-	9.5	6.1	-	0.6	0.7	-	8.4	3.9
<i>Liver</i>									
	250 ng/mL	500 ng/mL	1 µg/mL	250 ng/mL	500 ng/mL	1 µg/mL	250 ng/mL	500 ng/mL	1 µg/mL
5-CQA	7.9	12.9	4.9	10.0	3.7	5.0	8.1	13.5	4.8
Caffeic	5.8	10.3	2.7	10.8	6.8	8.7	9.6	9.1	10.1
Ferulic	0.6	13.3	1.4	10.3	2.3	2.7	7.7	14.0	5.1
Isoferulic	5.8	9.9	1.8	11.8	7.8	0.9	9.7	10.5	6.9
<i>m</i> -coumaric	1.0	9.5	3.1	10.9	5.0	2.5	9.5	10.9	8.1
<i>p</i> -coumaric	1.9	9.2	4.9	7.8	5.3	7.4	7.9	9.0	8.7
Dihydrocaffeic	3.4	12.2	1.9	10.5	6.4	4.6	8.2	9.7	7.8
Hippuric	1.8	13.7	0.7	2.0	5.7	5.5	2.9	12.6	7.5
3-hydroxybenzoic	2.2	11.9	1.1	5.7	12.3	5.8	5.6	11.5	6.8
2-hydroxyphenylpropionic	3.6	9.5	3.2	7.6	3.6	5.1	7.1	12.5	7.6
Vannilic	-	7.1	5.7	-	9.2	6.3	-	7.4	7.2
<i>Urine</i>									
	250 ng/mL	1 µg/mL	15 µg/mL	250 ng/mL	1 µg/mL	15 µg/mL	250 ng/mL	1 µg/mL	15 µg/mL
5-CQA	1.1	0.6	1.8	1.7	2.0	1.2	4.0	3.4	1.5
Caffeic	3.8	0.6	1.3	1.3	2.6	2.5	3.1	2.5	1.8
Ferulic	6.1	2.7	1.2	3.9	3.9	3.1	6.9	3.9	2.2
Isoferulic	8.6	0.8	2.1	4.9	2.4	2.0	9.9	3.1	2.0
<i>m</i> -coumaric	3.1	4.1	0.7	0.2	1.0	2.2	2.2	5.1	1.5
<i>p</i> -coumaric	1.5	0.7	2.4	4.0	2.0	0.6	3.2	2.1	1.6
Dihydrocaffeic	0.3	1.5	1.6	2.2	1.8	4.4	2.7	1.5	3.0
Hippuric	1.0	1.6	1.0	0.3	0.5	2.6	4.2	2.2	1.8
3-hydroxybenzoic	1.8	3.1	4.1	1.4	2.0	6.3	2.7	2.3	4.7
2-hydroxyphenylpropionic	4.4	1.0	1.0	3.8	2.4	1.1	6.3	1.8	1.1
Vannilic	-	8.0	4.5	-	12.9	9.2	-	12.0	6.5

APPLICATION OF THE DEVELOPED METHODS

The methods described above were applied to samples obtained from rats that received a single dose of 5-CQA by gavage (240 mg/kg of body weight). Samples of each animal ($n=6$) were analyzed in triplicate. The absolute amount of 5-CQA ingested was 72 ± 8 mg (mean $\pm$ SD). For comparison, a cup of coffee (200 mL) contains approximately 70 to 350 mg of chlorogenic acids.^{12,38}

Results of phenolic acids quantification in plasma, liver and urine of rats two hours after receiving 5-CQA are shown on Table 5. The concentrations were calculated with external calibration curves. Some of the studied compounds were present in control plasma (hippuric, acid) liver (hippuric acid), and urine (hippuric and hydroxyphenylpropionic acids), as shown in Figure 1. The chromatographic peak areas of these compounds in control samples were set as “zero”.

In addition to the compounds with available standards, two isomers of feruloylquinic acids were found ($[M-H]^-$ m/z 367 and product ion m/z 193),¹² with retention times of 5.9 min (isomer 1) and 6.4 min (isomer 2). An isomer of hydroxyphenylpropionic acid was also identified, with a retention time of 6.9 min. Their concentrations were estimated using the calibration curves of 5-CQA and 2-hydroxyphenylpropionic acid, respectively (Table 5).

5-CQA, feruloylquinic acids and caffeic acid were found in all samples. Feruloylquinic acids (FQAs) are methylated forms of 5-CQA. Their presence was reported in human plasma and urine after consumption of chlorogenic acids from coffee¹². Caffeic acid is a product from the cleavage of 5-CQA by esterase enzymes. The presence of this compound in the biological fluids and liver 2 hours after ingestion of 5-CQA indicates that the cleavage of 5-CQA occurred as a result of gastrointestinal esterases¹⁰ rather than esterase from microbial origin. Ferulic and isoferulic acids are methylated derivatives of caffeic acid and were present in quantifiable amounts only in urine.

Table 5 – Concentration (mean $\pm$ SEM) of phenolic acids in plasma, liver and urine of rats two hours after administration of 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) by gavage (240 mg/kg body weight)

Phenolic acid	Plasma (ng/mL)	Liver (ng/g fresh tissue)	Urine (μ g/mL)
5-CQA	1165.6 $\pm$ 28.6	360.3 $\pm$ 18.9	12.3 $\pm$ 3.8
Feruloylquinic acid (isomer 1) ^a	486.3 $\pm$ 52.6	123.3 $\pm$ 21.6	48.0 $\pm$ 12.4
Feruloylquinic acid (isomer 2) ^a	414.2 $\pm$ 47.8	388.4 $\pm$ 57.1	25.3 $\pm$ 9.1
Caffeic	217.8 $\pm$ 38.3	37.8 $\pm$ 3.9	2.8 $\pm$ 0.9
Ferulic	NQ	NQ	0.89 $\pm$ 0.14
Isoferulic	ND	ND	0.36 $\pm$ 0.03
<i>m</i> -coumaric	ND	ND	ND
<i>p</i> -coumaric	ND	ND	ND
Dihydrocaffeic	NQ	NQ	0.09 $\pm$ 0.03
Hippuric	NQ	65.2 $\pm$ 5.5	40.9 $\pm$ 3.5
3-hydroxybenzoic	NQ	ND	ND
2-hydroxyphenylpropionic	ND	ND	ND
hydroxyphenylpropionic (isomer) ^b	NQ	NQ	0.39 $\pm$ 0.06
Vannilic	ND	ND	ND

^a Quantified relative to 5-CQA, ^b quantified relative to 2-hydroxyphenylpropionic acid, ND: not detected, NQ: not quantified

Regarding the metabolites originated by activity of colonic microflora, hippuric acid was quantified in urine and liver, but not in plasma, because its concentration was between the LOD and LOQ. Dihydrocaffeic and a hydroxyphenylpropionic isomer were quantified in urine and detected in plasma and urine, while 3-hydroxybenzoic, vannilic and *m*-coumaric acids were not detected in any of the samples. The fact that the animals were euthanized 2 hours after the gavage explains the low concentrations or absence of these microbial metabolites in the samples.

Previous studies showed that higher concentrations of compounds formed by the colonic microflora are found in human plasma and/or urine after 8 hours of coffee ingestion.^{12,39,40} In the present work, besides the microbial metabolites, the aim was to test the application of the developed methods on the quantification of 5-CQA and other metabolites formed earlier in the body, so a smaller time interval after the gavage (two hours) was chosen for collection of biological samples.

In conclusion, the assays described feature efficient sample preparation procedures by SPE with good recovery rates and a relatively short chromatographic

run time for the separation and quantification of eleven phenolic acids, which can be formed in the body after consumption of foods rich in chlorogenic acids or other phenolic compounds. The application of the methods to samples from animals that received 5-CQA by gavage showed that the methods described can be used for absorption, pharmacokinetic and bioavailability studies of phenolic acids in rodents and also in humans.

ABBREVIATIONS USED

5-CQA, 5-caffeoylquinic acid; ESI, electrospray ionization; EIC, extracted ion chromatogram; HCl, hydrochloric acid; IP, intraperitoneal; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; Na₂EDTA, disodium ethylenediaminetetraacetate dehydrate; MOPS, 4-Morpholinepropanesulfonic acid; H₃PO₄, orthophosphoric acid; R², determination coefficient; %RSD, relative standard deviation; SD, standard deviation; SEM, standard error of the mean; SIM, single ion monitoring; SPE, solid-phase extraction; SST, System Suitability Test; TIC, total ion count; UPLC-MS, ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry;

ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank FAPESP for financial support (grant 2009/14853-0 and 2008/10308-4) and PhD fellowship to DMO (Process 2009/01275-8).

REFERENCES:

1. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2010**, *2*, 1231-1246.
2. Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1001–1043.
3. Stalikas, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3268-3295.
4. Spacil, Z.; L. Novakova, L.; Solich, P. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta* **2008**, *76*, 189-199.
5. Clifford, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 362-372.
6. Lafay, S., & Gil-izquierdo, A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 301-311.
7. Zhao, Z.; Moghadasian, M.H. Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 133–145.
8. D'Archivio, M.; Filesi, C.; Di Benedetto, R.; Gargiulio, R.; Giovannini, C.; Masella, R.; Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanità* **2007**, *43*, 348-361.
9. Zimmermann, B.F.; Papagiannopoulos, M.; Brachmann, S.; Lorenz, M.; Stangl, V.; Galensa, R. A shortcut from plasma to chromatographic analysis: Straightforward and fast sample preparation for analysis of green tea catechins in human plasma. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 823-826.
10. Andreasen, M.F.; Kroon, P.A.; Williamson, G.; Garcia-Conesa, M.T. Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5679–5684.
11. Rechner, A.R.; Kuhnle, G.; Bremner, P.; Hubbard, G.P.; Moore, K.P.; Rice-Evans C. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 220-235.
12. Stalmach, A.; Mullen, W.; Barron, D.; Uchida, K.; Yokota, T.; Cavin, C.; Steiling, H.; Williamson, G.; Crozier, A. Metabolite Profiling of Hydroxycinnamate Derivatives in Plasma and Urine after the Ingestion of Coffee by Humans: Identification of Biomarkers of Coffee Consumption. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 1749–1758.
13. Monteiro, M.; Farah, A.; Perrone, D.; Trugo, L.C.; Donangelo, C. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 2196–2201.

14. Farah, A.; Monteiro, M.; Donangelo, C. M.; Lafay, S. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 2309–2315.
15. Rechner, A.R.; Smith, M.A.; Kuhnle, G.; Gibson, G.R.; Debnam, E.S.; Srai, S.K.; Moore, K.P.; C.A. Rice-Evans, Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products *Free Radical Biol. Metab.* **2004**, *36*, 212–225.
16. Ferruzzi, M.G. The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiology & Behavior* **2010**, *100*, 33–41.
17. Martínéz-Huelamo, M.; Tulipani, S.; Torrado, X.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Validation of a new LC-MS/MS method for the detection and quantification of phenolic metabolites from tomato sauce in biological samples. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 4542–4549.
18. Guy, P.A.; Renouf, M.; Barron, D.; Cavin, C.; Dionisi, F.; Kochhar, S.; Rezzi, S.; Williamson, G.; Steiling, H. Quantitative analysis of plasma caffeic and ferulic acid equivalents by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. B* **2009**, *877*, 3965–3974.
19. Urpi-Sarda, M.; Monagasb, M.; Khana, N.; Lamuela-Raventos, R.M.; Santos-Buelga, C.; Sacanella, E.; Castell, M.; Permanyer, J.; Andres-Lacueva, C. Epicatechin, procyanidins, and phenolic microbial metabolites after cocoa intake in humans and rats. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1545–1554.
20. Rubió, L.; Aida Serra, A.; Macià, A.; Borràs, X., Romero, M.P.; Motilva, M.J. Validation of determination of plasma metabolites derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. B* **2012**, *905*, 75–84.
21. Prior R.L.; Rogers, T.R.; Khanal, R.C.; Wilkes, S.E.; Wu, X., Howard, L.; Urinary excretion of phenolic acids in rats fed cranberry. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3940–3949.
22. Chu, K.O.; Wang, C.C.; Chu, C.Y.; Rogers, M.S.; Choy, K.W.; Pang, C.P.; Determination of catechins and catechin gallates in tissues by liquid chromatography with coloumetric array detection and selective solid phase extraction. *J. Chromatogr. B* **2004**, *810*, 187–195.
23. International Conference on Harmonization (ICH). Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, 1996.
24. Serra, A.; Macià, A.; Romero, M.P.; Pinol, C.; Motilva, M.J. Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1519–1528.
25. Sigma-Aldrich, Enzymatic Assay of β –glucuronidase (EC 3.2.1.31). <http://www.sigmaaldrich.com/technical->

- documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-b-glucuronidase-from-ecoli.html . (January 3rd, 2013)
26. Sigma-Aldrich, Enzymatic Assay of Sulfatase (EC 3.1.6.1). <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-sulfatase.html>. (January 3rd, 2013)
 27. Wu, X.; Loganathan, D.; Linhardt, R.J. Sensitive method for the quantification of beta-glucuronidase activity in human urine using capillary electrophoresis with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* **1998**, *708*, 61-66.
 28. Gonthier M.P.; Verny, M.A.; Besson, C.; Remesy, C.; Scalbert, A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1853-1859.
 29. Henning, S.M.; Niu, Y.; Lee, N.H.; Thames, G.D.; Minutti, R.R.; Wang, H.; Go, V.L.; Heber, D. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 1558–1564.
 30. Zafra-Gómez, A.; Luzón-Toro, B.; Jiménez-Díaz, I.; Ballesteros, O.; Navalón, A. Quantification of phenolic antioxidants in rat cerebrospinal fluid by GC-MS after oral administration of compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *53*, 103-108.
 31. Lafay, S.; Gil-Izquierdo, A.; Manach, C.; Morand, C.; Besson, C.; Scalbert, A. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 1192-1197.
 32. Cremin, P.; Kasim-Karakas, S.; Waterhouse, A. L. LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1747-1750.
 33. Bolarinwa, A.; Linseisen, J.; Validated application of a new high-performance liquid chromatographic method for the determination of selected flavonoids and phenolic acids in human plasma using electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* **2005**, *823*, 143-151.
 34. Ito, H., Gonthier, M., Manach, C., Morand, C., Mennen, L., Révész, C., Scalbert, A. Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. *Br. J. Nutr.* **2005**, *94*, 500-509.
 35. Talavera, S.; Felgines, C.; Texier, O.; Besson, C.; Gil-Izquierdo, A.; Lamaison, J.L.; Remesy, C. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3902-3908
 36. Serra, A.; Macia, A.; Romero, M. P.; Salvadó, M. J.; Bustos, M.; Fernández-Larrea, J.; Motilva, M. J. Determination of procyanidins and their metabolites in plasma samples by improved liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 1169-1176.

37. Sanchez-Patán F.; Monagas, M.; Moreno-Arribas V.; Bartolome, B. Determination of Microbial Phenolic Acids in Human Faeces by UPLC-ESI-TQ MS. *J. Agric. Food Chem.* 2011, *59*, 2241–2247.
38. Clifford, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 1999, *79*, 362-372.
39. Rechner, A.R.; Spencer, J.P.E.; Kuhnle, G.; Hahn, U.; Rice-Evans, C.A. Novel biomarkers os the bioavailability and metabolism of caffeic acid derivatives in humans. *Free Radic Biol Med* **2001**, *11*, 1213-1222.
40. Duarte, G.S.; Farah, A. Effect of Simultaneous Consumption of Milk and Coffee on Chlorogenic Acid's Bioavailability in Humans. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7925–7931.

5.3 TERCEIRO ARTIGO

O terceiro artigo apresenta os resultados dos experimentos para avaliação da biodisponibilidade dos fenólicos do chá mate e do padrão de ácido 5-cafeoilquínico em ratos Wistar. O mesmo ainda não foi submetido à nenhuma revista, de acordo com as normas do programa de pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública da FSP-USP.

1. INTRODUÇÃO

A erva mate é uma árvore natural da América do Sul, encontrada em ervais nativos ou adensados, geralmente explorados por pequenos produtores que se reúnem em cooperativas para processá-la ou comercializá-la com grandes indústrias produtoras de erva mate. O maior produtor mundial é a Argentina, seguida pelo Brasil e Paraguai (BASTOS *et al.*, 2007a; HECK & MEJIA, 2007). É uma planta muito consumida nesses países e no Uruguai para o preparo de chás e infusões e mais recentemente, o consumo tem se expandido para mercados externos como Europa e América do Norte, especialmente Estados Unidos (FOLCH, 2010), devido ao apelo comercial de bebida estimulante (HECKMAN *et al.*, 2010).

Diversos estudos demonstraram propriedades benéficas da erva mate, que indicam seu potencial como coadjuvante na diminuição do risco de doenças crônicas não transmissíveis: efeito vasodilatador *in vitro* e *in vivo* em ratos (BAISCH *et al.*, 1998; STEIN *et al.*, 2005); efeito hipocolesterolêmico e hepatoprotetor (FILIP & FERRARO, 2003); ação colerética e de propulsão intestinal em ratos (GORZALCZANY *et al.*, 2001); inibição *in vitro* da glicação (LUNCEFORD & GUGLIUCCI, 2005); diminuição da progressão da aterosclerose em coelhos (MOSIMANN *et al.*, 2006); inibição do crescimento de células cancerígenas *in vitro* (MEJIA *et al.*, 2005); prevenção de doenças orais em ratos (FILIP *et al.*, 2007); atividade anti-inflamatória (LANZETTI *et al.*, 2008) e até mesmo melhora nos sintomas de mal de Parkinson em modelo animal (MILIOLI *et al.*, 2007).

A administração *in vivo* da erva mate foi eficaz na redução do peso, da gordura corporal e marcadores de risco cardiometabólico em modelos animais (PANG *et al.*, 2008; ARCARI *et al.*, 2009; 2011; BORGES, 2011). Trabalhos demonstraram que o chá mate ou a erva mate verde (para chimarrão) foi capaz de prevenir danos oxidativos ao DNA em camundongos (MIRANDA *et al.*, 2008), reduzir a expressão do transportador de glicose SGLT1 intestinal em ratos, o que pode reduzir a absorção de glicose (OLIVEIRA *et al.*, 2008) e ainda aumentar a resistência

do plasma ao estresse oxidativo e a expressão gênica de enzimas antioxidantes em humanos (MATSUMOTO *et al.*, 2009).

Muitas das propriedades biológicas da erva mate são atribuídas à presença de ácidos fenólicos, sendo os principais os ácidos mono e dicafeoilquínicos, pertencentes ao grupo de compostos fenólicos denominados ácidos clorogênicos (BASTOS *et al.*, 2005; BASTOS *et al.* 2007b; JAISWAL *et al.*, 2010). Outros ácidos clorogênicos estão presentes em quantidades menores, como os ácidos feruloilquínicos e cafeoilshiquímicos (BASTOS *et al.* 2007b; JAISWAL *et al.*, 2010).

Os ácidos clorogênicos (CGAs) são compostos formados pela esterificação do ácido quínico com uma ou mais moléculas de ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido caféico, ferúlico e p-cumárico (CROZIER *et al.*, 2009). Além da erva mate, os CGAs são amplamente encontrados em frutas e hortaliças e contribuem significativamente para a ingestão diária de compostos fenólicos na dieta ocidental, sendo os principais fenólicos presentes no café (CLIFFORD, 1999; LAFAY & IZQUIERDO, 2008).

Alguns trabalhos sobre a biodisponibilidade de ácidos clorogênicos foram realizados com café ou o padrão de ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) isolado. Sabe-se que uma pequena parte dos CGAs pode ser absorvida intacta (LAFAY *et al.*, 2006a; STALMACH *et al.*, 2009) ou após clivagem por esterases endógenas (ANDREASEN *et al.*, 2001) ou de origem microbiana (RECHNER *et al.*, 2002), aparecendo no plasma e urina na forma de conjugados de fase II dos CGAs ou de ácidos hidroxicinâmicos (derivados sulfatados, glicuronados e/ou metilados) (STALMACH 2009; MONTEIRO *et al.*, 2007; DUARTE & FARAH, 2011). No entanto, a maior parcela dos CGAs ingeridos é metabolizada pela microbiota intestinal, levando à formação de outros ácidos fenólicos como os hidroxifenilpropionínicos, dihidrocaféico, hipúrico e hidroxibenzóicos (GONTHIER *et al.*, 2003; RECHNER *et al.*, 2004; LAFAY & IZQUIERDO, 2008; PRIOR *et al.*, 2010; STALMACH *et al.*, 2009).

Desta forma, assim como ocorre com compostos fenólicos em geral, as substâncias que de fato alcançam as células e tecidos após a ingestão de alimentos ricos em ácidos clorogênicos podem ser química, biológica e funcionalmente distintos dos mesmos (KROON *et al.*, 2004; CROZIER *et al.* 2010).

A identificação dos alvos moleculares e compreensão dos mecanismos de ação dos ácidos fenólicos no organismo são essenciais para a futura formulação de estratégias nutricionais visando o controle ou mesmo redução do risco de doenças crônicas (CROZIER *et al.*, 2009). No entanto, para que estes mecanismos e alvos moleculares sejam esclarecidos é necessário saber o quanto e em que formas químicas os compostos fenólicos provenientes da alimentação estão presentes no organismo, após a ingestão. Desta forma, um aspecto importante a ser considerado ao se estudar o papel dos compostos fenólicos na saúde humana é a avaliação de sua biodisponibilidade a partir dos alimentos (PORRINI & RISO, 2008; STALMACH *et al.*, 2009).

Em comparação com outros compostos fenólicos como catequinas e isoflavonas, os dados sobre as biotransformações dos ácidos clorogênicos ainda são considerados escassos, e muitas vezes, contraditórios (WILLIAMSON *et al.*, 2011). Não existem trabalhos publicados sobre a biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos da erva mate.

Este trabalho descreve a biodisponibilidade dos ácidos fenólicos do chá mate *in vivo* em ratos Wistar, em comparação com a ingestão de padrão isolado de 5-CQA. Foi realizada a identificação de ácidos clorogênicos e metabólitos em diversos tecidos e fluidos (plasma, urina, fígado, rins, estômago, intestino delgado, intestino grosso e músculo esquelético), analisados os perfis de concentração versus tempo e parâmetros farmacocinéticos no plasma, fígado, estômago e intestino grosso e a excreção urinária.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. PADRÕES E CHÁ MATE

Chá mate solúvel foi obtido diretamente de entreposto comercial. Todos os ensaios foram realizados com um único lote do chá.

Os seguintes padrões de ácidos fenólicos foram adquiridos da Sigma ou Fluka: ácido 5-cafeoilquinico (5-CQA), ácido caféico, ácido ferúlico, ácido isoferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido *m*-cumárico, ácido hipúrico, ácido dihidrocaféico, ácido 3-hidroxibenzóico, ácido 2-hidroxifenilpropionico e ácido vanílico.

2.1.1. Quantificação e identificação de compostos fenólicos e cafeína

As análises do perfil de compostos fenólicos e cafeína do chá mate foram realizadas em cromatógrafo líquido Agilent modelo 1200 SL, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas quadrupolo com fonte de íons eletrospray à pressão atmosférica (API-ESI), modelo Agilent 6150, utilizando coluna Agilent Zorbax SB-C18 (50 x 2,1 mm, 1.8 µm).

O chá mate foi preparado em triplicata, com diluição 100 mg do chá solúvel em 100 mL de água deionizada em balão volumétrico. Alíquotas de 1 mL foram filtradas com filtro para seringa 0,22 µm (Millipore) e o volume de injeção 5 µL.

A fase móvel foi constituída de ácido fórmico 0,1% (v/v) em água deionizada (A) e metanol grau HPLC (B). Os solventes foram filtrados com membrana 0,45 µm nylon e degazeificados em ultrassom antes de serem acoplados ao sistema cromatográfico. Antes do início da análise, o sistema foi equilibrado com uma mistura de 85:15 dos eluentes A e B, respectivamente. A programação do gradiente foi a seguinte: 15% de B até 1,8 minutos, 15 - 30% B até 5 minutos, 35% de B de 6 a 12 minutos, retorno a 15% de B aos 13 minutos e mantendo por mais 7 minutos

nesta condição para equilibrar a coluna. O fluxo de fase móvel foi de 320 $\mu\text{L}/\text{min}$ e temperatura do forno mantida a 40°C.

As condições do espectrômetro de massas foram: voltagem na fonte de ionização ± 3000 V, fluxo de gás secante (nitrogênio) a 12 L/min, temperatura na fonte de ionização 350 °C, pressão de nebulização (nitrogênio) a 30 psi e voltagem de fragmentação no cone de amostragem (dissociação induzida por colisão) de 100 V. A análise dos compostos fenólicos foi realizada no modo de ionização negativo e a análise de cafeína no modo positivo, na mesma corrida cromatográfica. Inicialmente foi realizada análise *scan* em ambos os modos e as razões massa/carga (m/z) da molécula desprotonada e dos fragmentos (obtidos pela dissociação induzida pela colisão na fonte eletrospray) mais abundantes de cada pico foram selecionados para análise do modo SIM (*single ion monitoring*).

A identificação do 5-CQA e da cafeína foram realizadas com base no tempo de retenção, espectro de absorção UV e espectro de massas, em comparação com os padrões de referência. A identificação dos demais compostos fenólicos, sem padrão de referência, foi realizada pelos espectros de absorção UV (similaridade com espectro do 5-CQA superior a 90%) e de massas, com base nos resultados anteriormente descritos por BASTOS *et al.* (2007b) e JAISWAL *et al.* (2010). A quantificação foi realizada pelo DAD, através de curva de calibração externa de 5 pontos com o padrão referência ($r^2 > 0,99$): cafeína a 272 nm (5 a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 5-CQA a 324 nm (5 a 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os demais compostos fenólicos foram quantificados pela curva do 5-CQA e os resultados somados ao do 5-CQA para estimativa do teor de fenólicos totais.

A metodologia foi validada com o detector de arranjo de diodos, utilizado para quantificação dos compostos do chá. Foi determinada a precisão das áreas e tempo de retenção dos picos cromatográficos do 5-CQA e da cafeína, através da análise de oito replicatas do chá intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base nos parâmetros das curvas de calibração do 5-CQA e cafeína, conforme

metodologia proposta pela ICH (*International Conference on Harmonisation*, 1996) e avaliada por RIBANI *et. al* (2004): $LD = 3,3*(s/S)$ e $LQ = 10*(s/S)$, sendo s o desvio padrão residual da equação de regressão e S o coeficiente angular.

O teor de fenólicos totais do chá também foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, 1965). A quantidade total de fenólicos foi calculada empregando-se curva analítica do padrão de 5-CQA em concentrações de 0,01 a 0,08 mg/mL ($r^2=0,998$). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de placas a 750 nm e os resultados foram expressos em equivalentes de 5-CQA/g de amostra.

2.2. ENSAIO BIOLÓGICO

2.2.1. Ensaio piloto

Foi realizado ensaio piloto para:

- a) Determinar a quantidade de chá mate solúvel a ser empregada no ensaio biológico principal;
- b) Obtenção do perfil dos compostos fenólicos e seus metabólitos dos fluídos e tecidos biológicos.

Foram utilizados 10 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos com 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Os animais, adquiridos com 4 semanas de idade, foram transferidos para o Biotério do Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT/FM/USP), onde permaneceram durante 4 semanas.

Os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno em grupos de 4. Receberam ração comercial Nuvilab CR1 (Nuvital, Brasil) e água *ad libitum*, mantidos em um período claro/escuro de 12 horas (acendimento das luzes às 7:00 h) em atmosfera com umidade relativa de $55 \pm 10\%$ e temperatura média de $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Após este período, os mesmos foram alocados aleatoriamente em um dos seguintes grupos:

- Grupo Controle (solução fisiológica) - $n=2$
- Grupo Erva Mate (chá mate solúvel)
 - 0,5 g/kg ($n=2$)
 - 2,0 g/kg ($n=2$)
- Grupo Padrão (5-cafeoilquinico)
 - 0,16 g/kg ($n=2$)
 - 0,64 g/kg ($n=2$)

A quantidade de 5-CQA administrada aos animais do grupo Padrão corresponde ao teor de compostos fenólicos totais do chá mate, calculado pelo método de Folin-Ciocalteu, em cada dose de chá testada (0,5 e 2 g/kg/dia).

As bebidas correspondentes foram administradas aos animais em dose única por gavagem. Após 90 minutos, os animais foram anestesiados com uma associação de xilazina e quetamina. Primeiramente, o sangue foi coletado por punção cardíaca em seringa heparinizada. Em seguida, os animais receberam uma dose de heparina direto no coração, para eutanásia. O fígado e os rins foram retirados e perfusionados com solução salina. O tecido estomacal, intestino delgado e uma amostra de músculo esquelético da pata direita anterior (bíceps femural) foram retirados e lavados com solução salina. A urina seria coletada diretamente da bexiga, porém não foi possível a coleta de todos os animais em quantidades suficientes para realização das análises. Por este motivo, optou-se por coletar a urina em gaiolas metabólicas no ensaio principal.

Para a obtenção do plasma, o sangue foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. Todas as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e acondicionadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.2. Ensaio principal

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos com 8 a 9 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Os animais, adquiridos com 4 a 5 semanas de idade, foram transferidos para o Biotério do Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT/FM/USP), onde permaneceram durante o período de crescimento e adaptação (4 semanas). Após este período, foram divididos da seguinte forma:

- Grupo Controle (solução fisiológica) - $n=6$
- Grupo Erva Mate (chá mate solúvel) – $n=6$ por tempo de eutanásia, totalizando 30 animais.
- Grupo Padrão (5-cafeoilquínico) - $n=6$ por tempo de eutanásia, totalizando 30 animais.

O peso dos animais foi aferido em balança analítica no dia da eutanásia, para cálculo das quantidades de bebida a ser administrada. Após jejum de 12 a 16 horas, as bebidas foram administradas aos animais no mesmo dia da eutanásia, realizada 30, 60, 120, 240 ou 480 min após a gavagem. Os animais do grupo Controle foram eutanasiados 60 minutos após a administração de solução salina. A dosagem de chá do grupo Erva Mate foi de 2,0 g/kg de peso do animal, e os animais do grupo Padrão receberam 5-CQA em quantidade correspondente ao teor de compostos fenólicos totais desta dose de chá mate (240 mg/kg de peso = 686 $\mu\text{mol/kg}$ de peso), estimado pelo método cromatográfico descrito anteriormente.

A coleta de sangue e tecidos foi realizada conforme descrito no item anterior (2.2.1). Além dos tecidos citados para o ensaio piloto, foi retirado também o tecido do intestino grosso dos animais do ensaio principal. A coleta de urina foi feita em gaiola metabólica com os animais dos tempos 120, 240 e 480 min dos grupos Erva Mate e Padrão. Logo após a gavagem, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas, onde permaneceram até 30 min antes do horário da eutanásia. A

coleta de urina dos animais dos tempos 30 e 60 min não foi possível pelo pouco espaço de tempo entre a administração das bebidas e a eutanásia. A coleta de urina do grupo Controle foi realizada três dias antes da eutanásia, sendo os animais submetidos a jejum de 16 horas antes de serem alocados nas gaiolas metabólicas, onde permaneceram durante 4 horas. O volume de urina de cada animal foi aferido.

Às amostras de plasma e urina adicionou-se 40 µL/mL de solução antioxidante (20 mg/mL de ácido ascórbico e 1 mg/mL de EDTA em tampão acetato de sódio 250 mM, pH 5,0) antes do congelamento.

2.3. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NOS FLUIDOS E TECIDOS

2.3.1. Ensaio Piloto

Em um primeiro momento, a análise para identificação dos compostos fenólicos e metabólitos no plasma foi realizada em laboratório terceirizado (CEMSA), utilizando cromatógrafo líquido Agilent modelo 1200 acoplado a espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo híbrido *ion trap* linear, modelo 3200 Qtrap da marca AB/Sciex.

As análises foram realizadas no modo MRM (*multiple reaction monitoring*) utilizando as seguintes razões massa/carga (m/z) dos íons de cada substância de interesse (padrões disponíveis e compostos sem padrão): m/z 353,1/191,1 (5-CQA); m/z 178,9/135,1 (ácido caféico); m/z 192,9/134,1 (ácido ferúlico); m/z 192,9/178,0 (ácido isoferúlico); m/z 163,0/119,3 (ácido *m*-cumárico); m/z 163,0/119,3 (ácido *p*-cumárico); m/z 181,0/109,1 (ácido dihidrocaféico); m/z 178,0/134,1 (ácido hipúrico); m/z 193,9/121 (ácidos 3 e 4-hidroxipúrico – sem padrão); m/z 121 (ácido benzóico); m/z 137,0/93,1 (ácido 3-hidroxibenzóico); m/z 137,0/93,1 (ácido 4-hidroxibenzóico – sem padrão); m/z 165,0/121,0 (ácido 2-hidroxifenilpropionico); m/z 167,0/108,0 (ácido vanílico); m/z 191,1/147,1 (ácido quínico – sem padrão).

Foram realizadas também análises MRM de possíveis biotransformações de fase II dos compostos 5-CQA e ácido caféico (derivados sulfatados, metilados e glicuronados). Por último, foi realizada análise no modo *neutral loss* para verificar a perda neutra da molécula de glicuronídeo, com objetivo de confirmar os resultados obtidos no modo MRM de biotransformações de fase II.

Após padronização das metodologias, a identificação dos compostos fenólicos foram realizadas em nosso laboratório por UPLC/DAD-MS com os tecidos e plasma dos animais do ensaio piloto. As amostras do fígado, estômago, intestino delgado, rins, músculo e plasma dos animais Controle e daqueles que ingeriram a maior dose de chá mate ou 5-CQA foram preparadas por extração em fase sólida e analisadas conforme métodos descritos anteriormente (segundo Artigo que compõe esta Tese), sem incubação com as enzimas β -glicuronidase e sulfatase. Uma segunda injeção de cada amostra foi realizada com a seleção das *m/z* dos íons de compostos fenólicos ligados a grupos sulfato ou ácido glicurônico, para os quais não se tinha padrões. Estas *m/z* foram escolhidos com base em trabalhos anteriores que avaliaram a biodisponibilidade de ácidos clorogênicos na forma pura (LAFAY *et al.*, 2006a) ou via alimentos como o café (STALMACH *et al.*, 2009). Quando possível, o espectro de absorção UV foi utilizado para confirmar a identidade do composto e verificar possíveis semelhanças com os compostos identificados no chá mate.

Não foi realizada análise quantitativa nesta etapa, mas com base na área dos picos encontrados cromatográficos em cada amostra foi feita uma classificação em três faixas: área entre o LD e o LQ; igual e até 10x superior ao LQ ou mais de 10x o LQ.

2.3.2. Ensaio Principal

Os fluidos (plasma e urina, 200 μ L) e tecidos (fígado, estômago e intestino grosso, 30 mg de tecido liofilizado) do Ensaio Principal foram submetidos à extração de fase sólida e análise por UPLC/DAD-MS, conforme métodos descritos anteriormente (segundo Artigo que compõe a Tese). O volume de injeção foi de 10

μL para as amostras de plasma, 20 μL para fígado e 5 μL para urina, estômago e intestino grosso. Quando possível, os espectros de absorção UV dos compostos foram usados para confirmação da identidade dos mesmos e identificação de isômeros e compostos semelhantes (similaridade do espectro do padrão de referência superior a 90%).

As amostras foram preparadas em triplicata, com e sem a incubação com as enzimas β-glicuronidase e sulfatase. Para o plasma, urina e fígado foram analisadas triplicatas das amostras de cada animal. Para o estômago e intestino grosso foram analisadas triplicatas do *pool* das amostras dos animais de cada tempo, dentro do mesmo grupo (Erva Mate ou Padrão).

Os compostos identificados nas amostras foram quantificados através de curvas de calibração externa obtidas pela contaminação de cada matriz biológica (amostras do grupo Controle) com os padrões de referência, com exceção da urina, cujas curvas foram obtidas pela injeção de soluções aquosas dos padrões, uma vez que se verificou a presença de compostos de interesse em concentrações maiores também nas amostras Controle, que puderam ser então estimadas e comparadas às quantidades dos compostos dos dois grupos tratados. Para os demais tecidos, as concentrações dos compostos presentes na matriz (grupo Controle) se tornam o ponto zero das curvas de calibração.

Além dos compostos para os quais padrões de referência estavam disponíveis, foram pesquisados nas amostras os ácidos fenólicos identificados no chá mate e também isômeros de alguns dos padrões disponíveis (ácidos 4-hidróxibenzóico, 3 e 4-hidroxifenilpropiónico), sendo a identificação tentativamente realizada com base nos espectros de massas e de absorção UV (quando possível). As concentrações destes compostos foram estimadas pela curva dos respectivos isômeros (3-hidróxibenzóico e 2-hidroxifenilpropiónico). Para os compostos presentes no chá mate, as curvas de calibração do 5-CQA foram usadas para a estimativa.

A recuperação (%R) dos compostos fenólicos com a metodologia previamente validada com o fígado foi verificada também para o estômago e intestino grosso, na menor concentração (250 ng/mL). Os resultados foram utilizados como fator de correção das concentrações estimadas dos compostos fenólicos nos tecidos.

2.4. ANÁLISE DOS DADOS

A análise de todas as informações coletadas nesta pesquisa foi inicialmente feita de forma descritiva. Os dados foram expressos como média e desvio padrão (DP) ou erro padrão (EP). Os pesos dos animais nos diferentes grupos (Controle, Erva Mate e Padrão) foram avaliados por ANOVA com teste *post hoc* de Tukey. As demais variáveis analisadas estatisticamente foram submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal Wallis e as diferenças significativas avaliadas pelo Teste de Comparações Múltiplas de Dunn, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal nem satisfizeram a suposição de homocedasticidade entre os grupos (Teste de Levéne para homogeneidade de variâncias). Em todas as conclusões obtidas através das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância α igual a 5%.

A concentração máxima ($C_{\max}$) foi determinada pela avaliação das médias de concentração dos diferentes compostos no plasma e fígado dos animais sacrificados em cada tempo. O tempo ($T_{\max}$) para atingir a $C_{\max}$ foi determinado conforme observado. Para cálculo da área abaixo da curva (AAC) para os perfis de concentração plasmática *versus* tempo, do zero (grupo Controle) ao tempo final de amostragem (480 min), foi obtida uma função representativa do gráfico experimental e calculada a integral desta função.

As análises dos dados foram realizadas com os softwares R (Bell Laboratories, EUA) e Statistica versão 10.0 (Statsoft, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DO CHÁ MATE

Com base nos espectros de absorção UV e espectro de massas, foram identificados onze compostos fenólicos nas amostras de chá mate solúvel, sendo quatro isômeros do ácido cafeoilquínico, três do ácido dicafeoilquínico, dois do ácido cafeoilshiquimico e ainda o ácido feruloilquínico e a rutina. Não foram detectados os ácidos caféico, ferúlico e *p*-cumárico nas formas livres. O perfil dos compostos é apresentado no cromatograma (Figura 1) e tabela abaixo (Tabela 1). Os espectros de absorção ultravioleta (UV) dos compostos são apresentados na Figura 2.

Figura 1 – Cromatograma UPLC-DAD ($\lambda = 324$ nm) com compostos fenólicos presentes no chá mate

Tabela 1 – Perfil e quantificação de compostos fenólicos do chá mate

Composto	Pico	TR (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íons produto (m/z)	Quantidade (média±DP) ^a	
					mg/g	μmol/g
Ácido 3-cafeoilquínico	1	1,1	353	191, 179	23,16 ± 0,07	65,28 ± 0,21
Ácido cafeoilquínico (isômero)	2	1,7	353	191, 179	1,00 ± 0,05	2,83 ± 0,15
Ácido 5-cafeoilquínico	3	2,2	353	191	28,53 ± 0,12	80,42 ± 0,34
Ácido 4-cafeoilquínico	4	2,4	353	179	24,36 ± 0,10	68,68 ± 0,29
Ácido cafeoilshiquimico	5	4,5	335	160	0,70 ± 0,01	1,96 ± 0,03
Ácido feruloilquínico	6	6,2	367	173	1,10 ± 0,01	3,10 ± 0,01
Ácido cafeoilshiquimico	7	6,4	335	161	0,52 ± 0,01	1,47 ± 0,03
Ácido di-cafeoilquínico (isômero)	8	9,4	515	353	10,28 ± 0,21	28,97 ± 0,60
Ácido di-cafeoilquínico (isômero)	9	9,6	515	353	11,86 ± 0,06	33,44 ± 0,16
Rutina	10	9,8	609	301	1,28 ± 0,02	3,60 ± 0,05
Ácido di-cafeoilquínico (isômero)	11	10,8	515	353	18,94 ± 0,10	53,41 ± 0,27
TOTAL	-	-	-	-	121,73 ± 0,39	343,17 ± 1,10
TOTAL – Método de Folin	-	-	-	-	320 ± 8	903 ± 22

TR, tempo de retenção (detector de arranjo de diodos); ^a: Em equivalentes do 5-CQA;

Figura 2 – Espectros de absorção UV (λ de 200 a 400 nm) dos compostos encontrados no chá mate

Os isômeros mais abundantes do 5-CQA (picos 1 e 4) foram tentativamente identificados como 3-CQA e 4-CQA, baseado na ordem de eluição descrita em colunas cromatográficas e fases móveis similares (JAISWAL *et al.*, 2010; STALMACH *et al.*, 2009; RECHNER *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos mais abundantes na amostra de chá mate foram os CQAs, cuja soma corresponde a 64% do total de fenólicos quantificados, seguidos pelos diCQAs (34%). Os demais compostos, somados, correspondem a apenas 2% do total de fenólicos do chá mate.

O cromatograma com a identificação da cafeína é apresentado na Figura 3. A confirmação da identidade do composto no espectrômetro de massas foi realizada utilizando m/z 195 e 138, no modo de ionização positivo. O teor de cafeína da amostra foi de $15,22 \pm 0,05$ mg/g de chá mate solúvel.

Figura 3 – Cromatograma UPLC-DAD ($\lambda = 272$ nm) com identificação da cafeína presente no chá mate

Os parâmetros de validação da metodologia de identificação e quantificação por UPLC-DAD são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros de validação do método analítico (UPLC-DAD) para caracterização do chá mate solúvel: precisão intra e inter-dia para tempo de retenção (TR) e área dos picos cromatográficos, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ):

Composto	Precisão intra-dia(n=8)*		Precisão inter-dia (n=8)*		LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
	TR	Área do pico	TR	Área do pico		
5-CQA	0,25%	0,08%	0,62%	1,98%	0,62	1,89
Cafeína	0,21%	0,68%	0,64%	1,65%	0,36	1,10

*: Resultados expressos como coeficiente de variação (CV%).

3.2. ANIMAIS

Os animais do ensaio piloto apresentaram peso médio de 273 ± 20 g e os animais do ensaio principal de 299 ± 33 g. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais (Controle, Erva Mate e Padrão), em ambos os ensaios.

Com a dose de chá empregada foi 2g/kg de peso e a dose de 5-CQA 240 mg/kg de peso, no ensaio principal os animais do grupo Erva Mate receberam em média 613 ± 62 mg de chá mate solúvel, o que corresponde a 75 ± 8 mg (210 ± 21 µmol) de fenólicos totais, em equivalentes do 5-CQA. Os animais do grupo padrão receberam em média $72 \text{ mg} \pm 8 \text{ mg}$ (203 ± 22 µmol) de 5-CQA.

Uma dose de 2 g de chá mate solúvel/kg de peso dos animais equivale à ingestão de aproximadamente 3 L de chá mate/dia por um humano adulto (MIRANDA *et al.*, 2008). Com relação à quantidade absoluta ingerida pelos animais, uma xícara de café (200 mL) contém de 70 a 350 mg de ácidos clorogênicos (CLIFFORD *et al.*, 1999; STALMACH *et al.*, 2009) e a ingestão diária de compostos fenólicos na dieta humana pode variar entre 100 mg a 2 g de compostos fenólicos totais por dia (CLIFFORD *et al.*, 2004).

3.3. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS *IN VIVO* - ENSAIO PILOTO

Nas análises iniciais com o plasma realizadas em laboratório terceirizado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (*high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry* - HPLC-MS/MS), foi encontrado 5-CQA intacto no plasma dos animais que ingeriram o padrão de 5-CQA e dos animais que receberam chá mate, nas duas concentrações administradas. Nos animais do grupo Erva Mate foi encontrado ainda o ácido *p*-cumárico. Nenhuma das substâncias pesquisadas foi detectada no plasma dos animais Controle. Os demais compostos não foram detectados em nenhum dos 3 grupos.

Quanto às biotransformações de fase II, foi detectado ácido caféico ligado a glicuronídeo no plasma dos animais do grupo 5-CQA e do grupo Erva Mate. Para confirmação destes resultados, pesquisou-se a perda da molécula neutra no ácido glicurônico no modo *Neutral Loss*. Os resultados confirmaram a perda neutra do glicuronídeo proveniente do íon com m/z 179, correspondente ao ácido caféico. Não foram detectados derivados sulfatados ou metilados.

Embora não tenha sido realizada análise quantitativa, pôde-se notar que a altura dos picos nos cromatogramas dos compostos encontrados foi maior no plasma dos animais que receberam as doses mais altas de 5-CQA e chá mate. Mesmo nestes últimos, os sinais dos compostos detectados foram relativamente baixos, principalmente para os animais que receberam chá mate (sinal/ruído próximo ou inferior a 10, pelo método visual). Por este motivo, a dosagem de chá mate selecionada para ser administrada no grupo Erva Mate do ensaio principal foi a de 2 g/kg de peso.

Na segunda etapa das análises, os tecidos (fígado, rins, músculo esquelético, estômago e intestino delgado) e plasma dos animais do ensaio piloto, que receberam as doses mais altas de chá (2 g/kg) e padrão (640 mg/kg), foram

analisados por UPLC-DAD/MS para verificar a presença dos ácidos fenólicos do chá mate e possíveis metabólitos. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Identificação de compostos fenólicos em tecidos e plasma de ratos Wistar após 90 minutos da ingestão de chá mate (EM), padrão de ácido 5-cafeoilquinico (PD) ou solução salina (CT).

Composto	Íons (m/z)	TR (min)	Fígado			Rins			Estômago			Intestino Delgado			Músculo			Plasma		
			CT	EM	PD	CT	EM	PD	CT	EM	PD	CT	EM	PD	CT	EM	PD	CT	EM	PD
Compostos presentes no chá mate																				
5-CQA	353; 191	3.5	-	+	+	-	++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+	++	-	++	+++
3-CQA*	353; 191	1.8	-	+	-	-	++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+	-	-	++	-
4-CQA*	353; 191	3.7	-	+	-	-	++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+	-	-	++	-
Di-CQA1*	515; 353	8.7	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Di-CQA2*	515; 353	9.0	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Di-CQA3*	515; 353	9.9	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Ácidos fenólicos livres																				
Ácido Caféico	179; 135	3.8	-	+	-	-	+	+	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+	-	-	+	-
Ácido Hipúrico	178; 134	3.4	+	++	++	+	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+++	++
Ácido Ferúlico	193; 178	6.8	-	+	+	-	+	+	+	+++	+	-	++	+	-	-	-	-	+	-
Ácido Isoferulico	193; 134	7.3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido m-cumárico	163; 119	6.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido p-cumárico	163; 119	5.6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Ácido Dihidrocaféico	181; 137	3.3	-	-	-	+	++	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Ácido 3-hidroxibenzóico	137; 93	3.7	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Ácido 2-hidroxifenilpropionico	165;121	6.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido hidroxifenilpropionico (isômero)	165; 121	5.9	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Vanílico	167; 152	3.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FQA-1*	367; 353	5.7	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
FQA-2*	367; 353	5.9	-	-	++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	-	++	-	+	++
FQA-3*	367; 353	6.3	-	-	+	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	-	+	-	+	++
Ácidos fenólicos conjugados*																				
CQA glicuronídeo	529; 353	3.0	-	+	++	-	++	+++	-	+	-	-	+++	+++	-	+	+	-	++	+++
CQA sulfato	433; 353	3.3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CQA glicuronídeo sulfato	609; 529	7.6	-	+	-	-	-	-	-	+++	+	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Ác. Cafeico glicuronídeo	355; 179	3.4	-	+++	++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	++	-	+++	+++
Ác. Cafeico sulfato	259; 179	2.6	-	+++	++	-	+++	+++	-	+++	-	-	+++	+++	-	++	++	-	-	-
Ác. Cafeico glicuronídeo sulfato	435; 179	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ác. Ferulico/ Isoferulico glicuronídeo	369; 193	6.1	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	++	++
Ác. Ferulico/ Isoferulico sulfato	273; 193	4.5	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	++	++	-	-	-
Ác. Ferulico/ Isoferulico glicuronídeo sulfato	449; 369	4.8	-	-	++	-	+	++	-	+	+	-	++	++	-	-	-	-	-	-

+, área dos picos cromatográficos entre o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ); ++= área 1 a 10x o valor do LQ; +++= área mais que 10x o valor do LQ; *composto sem padrão, considerou-se LQ do composto livre/isômero; TR = tempo de retenção

Foram detectados ácidos fenólicos em todas as amostras dos grupos Erva Mate e Padrão, inclusive compostos que não haviam sido detectados no plasma nas análises anteriores, realizadas em laboratório terceirizado.

Dos compostos fenólicos quantificados no chá mate, foram identificados o 5-CQA e seus isômeros (3 e 4-CQA) na forma livre em todos os tecidos e no plasma do grupo Erva Mate e 5-CQA nas amostras do grupo Padrão, assim como formas dos CQAs conjugadas ao ácido glicurônico e/ou grupos sulfato. Três isômeros de ácidos di-cafeoilquínicos, diferenciados com base nos tempos de retenção e aqui denominados diCQA1, diCQA2 e diCQA3, estavam presentes no estômago e intestino grosso do grupo Erva Mate, mas não nos demais tecidos.

Foram identificados três isômeros do ácido feruloilquínico, também diferenciados com base nos tempos de retenção e aqui denominados FQA1, FQA2, e FQA3, nas amostras de estômago, intestino delgado e rins do grupo Erva Mate. No grupo Padrão, dois destes isômeros (FQA2 e FQA3) foram identificados em todas as amostras, inclusive no plasma, fígado e músculo.

Outros ácidos fenólicos que não estavam presentes nas bebidas administradas aos animais e que foram detectados nas amostras incluem os ácidos caféico, ferúlico, isoferúlico e derivados glicuronados e/ou sulfatados destes compostos e dos CQAs. Alguns metabólitos formados pela ação da microbiota intestinal (ácidos hipúrico, dihidrocaféico e hidroxifenilpropiónico) foram detectados em algumas amostras, enquanto outros (ácidos *m*-cumárico, vanílico e hidroxibenzóico) não estavam presentes em quantidades detectáveis pelo método usado em nenhuma das amostras analisadas.

Os compostos fenólicos derivados das primeiras fases de metabolização dos ácidos clorogênicos, como o ácido caféico, ferúlico e suas formas glicuronadas e/ou sulfatadas, foram encontrados na maioria dos tecidos e os picos cromatográficos apresentaram áreas superiores ao LQ, enquanto os metabólitos originados pela ação da microbiota intestinal (ácidos hipúrico, *m*-cumárico, dihidrocaféico e hidroxifenilpropiónico) apresentaram pequenas áreas ou não foram detectados

(Tabela 3), provavelmente em decorrência do tempo entre a administração das bebidas e a eutanásia dos animais (90 minutos), que não foi suficiente para que houvesse a produção de quantidades maiores de tais compostos.

3.4. ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS *IN VIVO* – ENSAIO PRINCIPAL

3.4.1. Sistema Digestivo - Estômago e Intestino Grosso

Curvas de concentração *versus* tempo de cada composto identificado e quantificado no estômago dos grupos Erva Mate e Padrão por UPLC/DAD-MS são apresentadas nas Figuras 4 e 5, respectivamente. As concentrações na forma livre correspondem às encontradas nas amostras incubadas sem as enzimas β -glicuronidase e sulfatase e as concentrações totais com a incubação enzimática.

O perfil dos compostos fenólicos no estômago foi semelhante ao resultados obtido nas análises deste tecido no ensaio piloto. Os principais ácidos clorogênicos do chá mate (5-CQA, 3-CQA, 4-CQA, diCQA1, diCQA2 e diCQA3) estavam presentes em maior concentração nos tecidos dos animais eutanasiados 30 e 60 min após a gavagem. Suas concentrações decaíram a partir dos 120 min, não sendo detectados aos 480 min. Os metabólitos FQA1, FQA2, FQA3, ácidos caféico, ferúlico e isoferúlico apresentaram perfis de concentração *versus* tempo semelhantes aos compostos presentes no chá. O ácido hipúrico e 3-hidroxifenilpropiónico foram encontrados em pequenas quantidades, provavelmente decorrentes da presença de tais compostos na circulação sanguínea que irriga o tecido. Para estes compostos, não foi possível determinar a C_{max} , pois não foi observado decaimento das curvas de concentração.

Nas amostras de estômago do grupo Padrão foram quantificados o 5-CQA, FQA2, FQA3 e o ácido caféico (Figura 5), que apresentaram perfis de concentração *versus* tempo semelhantes ao grupo Erva Mate. Os ácidos ferúlico, hipúrico, 3-

hidroxifenilpropionico foram detectados em quantidades inferiores ao LQ, os dois últimos somente nos estômagos dos animais eutanasiados aos 480 min.

O ácido dihidrocaféico foi detectado abaixo do LQ em ambos os grupos (T=480 min) e os ácidos 3-hidroxibenzóico e *p*-cumárico no grupo Erva Mate, mas não no Padrão. Os ácidos *m*-cumárico e vanílico não foram detectados em nenhuma das amostras. No grupo Controle (tempo = 0) foi detectado apenas o ácido hipúrico, em quantidades inferiores ao LQ.

Figura 4 – Curvas de concentração *versus* tempo de compostos fenólicos no tecido estomacal de ratos Wistar, após ingestão de chá mate (2 g/kg). Amostras com (Total) ou sem (Livre) tratamento enzimático com β -glicuronidase e sulfatase. Valores expressos como média $\pm$ EP (triplicata do *pool* de 6 animais por tempo).

Figura 5 – Curvas de concentração *versus* tempo de compostos fenólicos no tecido estomacal de ratos Wistar, após ingestão de padrão de 5-CQA (240 mg/kg). Amostras com (Total) ou sem (Livre) tratamento enzimático com β -glicuronidase e sulfatase. Valores expressos como média $\pm$ EP (triplicata do *pool* de 6 animais por tempo).

As curvas com perfis de concentração *versus* tempo dos compostos quantificados no intestino grosso são apresentadas na Figura 6 (Erva Mate) e 7 (Padrão). Assim como no estômago, no grupo Erva Mate estavam presentes todos os compostos presentes no chá mate. Os metabólitos FQA1, FQA2, FQA3, ácidos caféico, ferúlico, hipúrico, dihidrocaféico e 3-hidroxifenilpropionico também foram quantificados (Figura 6).

No grupo Padrão, foram quantificados o 5-CQA e os metabólitos FQA2, FQA3, ácidos caféico, dihidrocaféico e 3-hidroxifenilpropionico (Figura 7). As concentrações dos ácidos ferúlico e hipúrico estavam abaixo do LQ. No tecido do grupo Controle foi detectado somente o ácido 3-hidroxifenilpropionico, em quantidades inferiores ao LQ. Não foram detectados em nenhuma das amostras os ácidos vanílico, *m*-cumárico e *p*-cumárico.

Figura 6 – Curvas de concentração versus tempo de compostos fenólicos no tecido intestinal (intestino grosso) de ratos Wistar, após ingestão de chá mate (2 g/kg). Amostras com (Total) ou sem (Livre) tratamento enzimático com β -glicuronidase e sulfatase. Valores expressos como média $\pm$ EP (triplicata do *pool* de 6 animais por tempo).

Figura 7 – Curvas de concentração *versus* tempo de compostos fenólicos no tecido intestinal (intestino grosso) de ratos Wistar, após ingestão de padrão de 5-CQA (240 mg/kg). Amostras com (Total) ou sem (Livre) tratamento enzimático com β -glucuronidase e sulfatase. Valores expressos como média $\pm$ EP (triplicata do *pool* de 6 animais por tempo).

Em ambos os grupos, os CQAs, di-CQAs e os metabólitos que não necessitam da atividade bacteriana para sua formação (FQAs, ácido caféico e ferúlico), apresentaram concentrações elevadas aos 30 min após a gavagem, seguida de queda e um novo aumento da concentração observado nos animais eutanasiados a partir dos 120 min no grupo Erva mate e 240 min no grupo Padrão.

Os parâmetros farmacocinéticos para os compostos fenólicos quantificados no estômago são apresentados na Tabela 4 e no intestino grosso na Tabela 5.

Tabela 4 – Parâmetros farmacocinéticos dos compostos fenólicos no tecido estomacal de ratos Wistar, após ingestão de chá mate (2 g/kg, grupo EM) ou 5-CQA (240 mg/kg, grupo PD). Amostras com (Total) ou sem (Livre) tratamento enzimático com β -glucuronidase e sulfatase.

Composto	Grupo	$C_{\max}^a$ nmol/g		$T_{\max}$ min	AAC_{0-8h} nmol.min/g (%) ^b	
		Livre	Total		Livre	Total
5-CQA	EM	104,6	131,2	30	12.563,3 (25,3%)	15.044,3 (24,1%)
	PD	1125,7	1142,6	30	77.330,9 (95,2%)	82.161,6 (94,7%)
3-CQA	EM	120,3	163,3	30	12.885,6 (26,0%)	15.928,7 (25,5%)
	PD	nd	nd	-	-	-
4-CQA	EM	121,5	178,9	30	13.303,4 (26,8%)	16.907,2 (27,1%)
	PD	nd	nd	-	-	-
Ác. Caféico	EM	4,3	5,2	30	639,7 (1,3%)	732,9 (1,2%)
	PD	1,0	1,0	30	91,5 (0,1%)	103,8 (0,1%)
Ác. Ferúlico	EM	5,1	5,3	30/60	772,1 (1,6%)	844,8 (1,4%)
	PD	<LQ	<LQ	-	-	-
Ác. Isoferúlico	EM	0,6	0,9	30	85,7 (0,2%)	104,9 (0,2%)
	PD	nd	nd	-	-	-
Ác. Dihidrocaféico	EM	<LQ	<LQ	-	-	-
	PD	<LQ	<LQ	-	-	-
Ác. Hipúrico	EM	0,7*	0,8*	≥480	99,3 (0,2%)	113,0 (0,2%)
	PD	<LQ	<LQ	-	-	-
Ác. 3-hidroxifenilpropionico	EM	0,7*	0,7*	≥480	127,2 (0,3%)	132,9 (0,2%)
	PD	<LQ	<LQ	-	-	-
FQA1	EM	4,5	5,6	30/60	593,6 (1,2%)	755,4 (1,2%)
	PD	nd	nd	-	-	-
FQA2	EM	5,9	8,1	30	894,1 (1,8%)	1.087,0 (1,7%)
	PD	16,0	16,8	30	2.295,9 (2,8%)	2.639,9 (3,0%)
FQA3	EM	1,7	2,6	30	348,7 (0,7%)	463,8 (0,7%)
	PD	6,3	6,5	30	1.502,2 (1,8%)	1.798,7 (2,1%)
diCQA1	EM	48,0	80,2	30	4.927,1 (9,9%)	7.445,5 (11,9%)
	PD	nd	nd	-	-	-
diCQA2	EM	30,8	34,1	30	2.685,8 (5,4%)	3.322,2 (5,3%)
	PD	nd	nd	-	-	-
diCQA3	EM	21,1	29,2	30	1.716,4 (3,5%)	2.734,1 (4,4%)
	PD	nd	nd	-	-	-
Total de fenólicos	EM	-	-	-	49.585,0	62.364,5
	PD	-	-	-	81.234,3	86.739,8

^a dados são a maior média de concentrações encontrada no(s) $T_{\max}$ observado(s); ^b valores em parênteses indicam a contribuição do composto para o total de fenólicos encontrados no tecido, em porcentagem; CQA, ácido cafeoilquinico; FQA, ácido feruloilquinico; nd = não detectado; <LQ = detectado abaixo do limite de quantificação; * não foi possível determinar o $C_{\max}$, valor é a maior concentração observada.

Somando-se as AAC_{0-8h} dos compostos presentes no chá mate (mono e di-CQAs), os mesmos representaram 98,3% dos ácidos fenólicos quantificados no estômago dos animais do grupo Erva Mate, enquanto no grupo Padrão a área do 5-CQA correspondeu a 94,7% dos compostos quantificados. Neste tecido, os

metabólitos formados a partir do 5-CQA e outros compostos fenólicos do chá mate representaram uma pequena parcela dos ácidos fenólicos presentes, com os FQAs representando cerca de 3,6% do total de fenólicos no grupo Erva Mate, seguido pelos ácidos ferúlico (1,4%) e caféico (1,2%). No grupo Padrão, os FQAs representaram 5,1% dos compostos encontrados e as demais substâncias somaram apenas 0,2% do total.

Tabela 5 – Parâmetros farmacocinéticos dos compostos fenólicos no tecido intestinal (intestino grosso) de ratos Wistar, após ingestão de chá mate (2 g/kg, grupo EM) ou 5-CQA (240 mg/kg, grupo PD). Amostras com (Total) ou sem (Livre) tratamento enzimático com β -glicuronidase e sulfatase.

Composto	Grupo	$C_{\max}^a$ nmol/g		$T_{\max}$ min	AAC_{0-8h} nmol.min/g (%) ^b	
		Livre	Total		Livre	Total
5-CQA	EM	179,0	259,2	30	39.567,6 (13,2%)	43.789,8 (12,2%)
	PD	1674,0	2080,7	240	379.351,5 (72,1%)	469.547,1 (73,5%)
3-CQA	EM	285,2	605,3	30	54.907,8 (18,3%)	69.224,2 (19,3%)
	PD	nd	nd	-	-	-
4-CQA	EM	300,5	509,5	30	58.568,8 (19,5%)	70.782,5 (19,7%)
	PD	nd	nd	-	-	-
Ác. Caféico	EM	27,5	46,7	30	3.317,6 (1,1%)	4.383,6 (1,2%)
	PD	5,3	5,9	240	1.589,0 (0,3%)	1.853,4 (0,3%)
Ác. Ferúlico	EM	1,3	2,3	30/60	258,2 (0,1%)	346,5 (0,1%)
	PD	<LQ	<LQ	-	-	-
Ác. Dihidrocaféico	EM	174,6	210,4	240	48.735,6 (15,4%)	57.663,5 (16,2%)
	PD	390,8	480,0	240	61.164,8 (11,6%)	65.927,7 (10,3%)
Ác. Hipúrico	EM	2,4*	2,5*	≥ 480	485,9 (0,2%)	524,8 (0,1%)
	PD	<LQ	<LQ	-	-	-
Ác. 3-hidroxifenilpropionico	EM	159,9*	194,2*	≥ 480	42.132,6 (14,0%)	47.360,1 (13,2%)
	PD	150,4*	171,1*	≥ 480	22.500,2 (4,3%)	25.865,9 (4,0%)
FQA1	EM	19,5	24,5	240	6.190,2 (2,1%)	7.852,3 (2,2%)
	PD	nd	nd	-	-	-
FQA2	EM	25,3	34,6	30	7.141,9 (2,4%)	7.902,5 (2,2%)
	PD	114,7	143,9	240	34.811,5 (6,6%)	42.418,8 (6,6%)
FQA3	EM	24,4	25,1	120	6.440,0 (2,2%)	7.275,0 (2,0%)
	PD	84,0	103,7	240	26.890,8 (5,1%)	32.637,2 (5,1%)
diCQA1	EM	102,1	157,9	30	12.446,5 (4,1%)	15.119,3 (4,2%)
	PD	nd	nd	-	-	-
diCQA2	EM	30,0	80,6	30	6.017,0 (2,0%)	7.159,9 (2,0%)
	PD	nd	nd	-	-	-
diCQA3	EM	131,9	201,0	30	16.695,7 (5,6%)	19.277,8 (5,4%)
	PD	nd	nd	-	-	-
Soma total de fenólicos	EM	-	-	-	303.106,4	358.559,3
	PD	-	-	-	526.381,8	638.613,5

^a dados são a maior média de concentrações encontrada no(s) $T_{\max}$ observado(s); ^b valores em parênteses indicam a contribuição do composto para o total de fenólicos encontrados no tecido, em porcentagem; CQA, ácido cafeoilquinico; FQA, ácido feruloilquinico; nd = não detectado; <LQ = detectado abaixo do limite de quantificação; * não foi possível determinar o $C_{\max}$, valor é a maior concentração observada

No intestino grosso, a proporção de metabólitos na soma total dos compostos quantificados foi maior que no estômago, especialmente o ácido dihidrocaféico – cuja AAC_{0-8h} representou 16,2% dos compostos fenólicos no grupo Erva Mate e 10,3% no grupo Padrão – e 3-hidroxifenilpropionico (13,% no grupo Erva Mate e 4% no grupo Padrão). Para ambos, as concentrações apresentaram acentuado aumento nos tecidos dos animais eutanasiados a partir dos 120 min no Grupo Erva Mate e a partir dos 240 min no grupo Padrão (Figuras 4 e 5).

Mesmo com aumento relativo nas concentrações dos metabólitos, somando-se as AAC_{0-8h} , os CQAs e DiCQAs ainda representaram 62,8% dos compostos quantificados no grupo Erva Mate e o 5-CQA 73,5% no grupo Padrão, levando-se em consideração as concentrações totais, ou seja, após tratamento das amostras com β -glicuronidase e sulfatase. Os CQAs e diCQAs foram os compostos que apresentaram as C_{max} mais elevadas no grupo Erva Mate, tanto no estômago quanto no intestino grosso, sendo que o mesmo foi observado para o 5-CQA no grupo Padrão.

A soma total das AAC_{0-8h} dos ácidos fenólicos quantificados no intestino grosso foi cerca de 5 a 7 vezes superior à soma dos compostos quantificados no estômago, nos dois grupos. Em ambos os tecidos, as quantidades encontradas no grupo Padrão foram superiores às daquelas do grupo Erva Mate, sendo que no intestino grosso a diferença foi mais acentuada.

3.4.2. Plasma e Fígado

As curvas de concentração versus tempo dos compostos fenólicos no plasma são apresentados nas Figuras 8 (grupo Erva Mate) e 9 (grupo Padrão). Dos compostos presentes nas bebidas administradas aos animais, foram encontrados em quantidades detectáveis apenas três isômeros de CQAs no grupo Erva Mate e o 5-CQA no grupo Padrão. Os diCQAs presentes no chá mate e encontrados no estômago e intestino grosso dos animais não foram detectados no plasma do grupo Erva Mate.

Os outros ácidos fenólicos quantificados no grupo Erva Mate foram os ácidos caféico, hipúrico, dihidrocaféico, ferúlico e isoferúlico. Para os dois últimos, foram construídas apenas as curvas para a concentração total, uma vez que as quantidades dos compostos na forma livre estavam abaixo do LQ (Figura 8). Foram detectados ainda o ácido 3-hidroxibenzóico e *p*-cumárico, em quantidades abaixo do LQ, o ácido vanílico não foi detectado. Os três isômeros de FQA anteriormente quantificados no estômago e intestino grosso estavam presentes no plasma do grupo Erva Mate em quantidades abaixo do LQ.

No grupo Padrão, foram quantificados os ácidos caféico, dihidrocaféico, 3-hidroxifenilpropionico, FQA2 e FQA3. Concentrações dos ácidos ferúlico, hipúrico e *m*-cumárico estavam abaixo do LQ. Nenhum dos outros compostos pesquisados foi detectado.

Nas amostras do grupo Controle, correspondentes ao T=0, foi encontrado apenas o ácido hipúrico.

Figura 8 – Curvas de concentração *versus* tempo de compostos fenólicos no plasma de ratos Wistar, com (Total) ou sem (Livre) tratamento enzimático com β -glucuronidase e sulfatase, após ingestão de chá mate (2 g/kg). Valores expressos como média $\pm$ EP, n = 6 animais por tempo.

Figura 9 – Curvas de concentração *versus* tempo de compostos fenólicos no plasma de ratos Wistar, com (Total) ou sem (Livre) tratamento enzimático com β -glicuronidase e sulfatase, após ingestão de padrão de 5-CQA (240 mg/kg). Valores expressos como média $\pm$ EP, $n = 6$ animais por tempo.

Para as amostras de tecido hepático, cujas curvas de concentração *versus* tempo do grupo Erva Mate são apresentadas na Figura 10 e do grupo Padrão na Figura 11, são apresentados os resultados das amostras incubadas com as enzimas β -glicuronidase e sulfatase, ou seja, as concentrações totais dos ácidos fenólicos, uma vez que as quantidades dos compostos na forma livre ficaram abaixo dos LQs.

Figura 10 – Curvas de concentração *versus* tempo de compostos fenólicos em amostras de fígado de ratos Wistar, tratadas com as enzimas β -glicuronidase e sulfatase, após ingestão de chá mate (2 g/kg). Valores expressos como média $\pm$ EP, n = 6 animais por tempo.

Figura 11 – Curvas de concentração *versus* tempo de compostos fenólicos em amostras de fígado de ratos Wistar, tratadas com as enzimas β -glicuronidase e sulfatase, após ingestão de padrão de 5-CQA (240 mg/kg). Valores expressos como média $\pm$ EP, $n = 6$ animais por tempo.

No grupo Erva Mate, foram identificados e quantificados o 5-CQA, 3-CQA, 4-CQA, ácidos caféico, ferúlico, 3-hidroxifenilpropiônico e hipúrico. O FQA2 e FQA3 estavam presentes em quantidades quantificáveis e o FQA1 foi detectado abaixo do LQ. Os ácidos *m*-cumárico, isoferúlico, e dihidrocaféico, quantificados no plasma, não foram detectados no tecido hepático.

No grupo Padrão, foram identificados e quantificados o 5-CQA, FQA2, FQA3, ácido caféico, hipúrico e 3-hidroxifenilpropiônico. O ácido ferúlico foi detectado abaixo do LQ. Nos animais controle, foi detectado o ácido hipúrico.

Não foram detectados, em nenhuma das amostras, os ácidos 3-hidróxibenzóico, *p*-cumárico, vanílico, isoferúlico e os diCQAs.

Nas amostras de plasma e fígado, o 5-CQA e isômeros foram quantificados já aos 30 min após a ingestão das bebidas. Nos animais sacrificados após 120 min, a concentração decresceu gradativamente, sendo que aos 480 min estes compostos não foram mais detectados no grupo Erva Mate e apenas pequenas quantidades de 5-CQA estavam presentes nas amostras de plasma do grupo Padrão. O mesmo comportamento foi observado para os metabólitos ácido ferúlico, isoferúlico e FQAs.

A curva de concentração *versus* tempo do ácido caféico diferiu entre os grupo Erva Mate e Padrão. No primeiro, as concentrações do ácido caféico estavam próximas à C_{max} no plasma e fígado dos animais eutanasiados aos 30 minutos e se mantiveram altas nos animais dos tempos 60 e 120 min. No grupo as concentrações aumentaram gradativamente e a C_{max} foi observada nas amostras coletadas dos animais eutanasiados aos 120 min., sendo que nos dois grupos o composto não foi mais detectado no tempo 480 min.

As concentrações dos ácidos hipúrico, *m*-cumárico, dihidrocaféico e 3-hidroxifenilpropionico tiveram aumento acentuado a partir dos 120 ou 240 minutos após a gavagem, a exemplo do observado nos tecidos do trato gastrointestinal.

As Tabelas 6 e 7 apresentam os parâmetros farmacocinéticos dos compostos no plasma e tecido hepático, respectivamente. Observam-se diferenças nos perfis de ácidos fenólicos entre os dois grupos, assim como nas quantidades de cada composto, tanto do plasma como no tecido hepático.

No plasma, a soma das AAC_{0-8h} do 3, 4 e 5-CQA totais (livres + conjugados) representam cerca de 7% de todos os compostos encontrados, enquanto para o grupo padrão o 5-CQA corresponde a 41,5%. O composto mais abundante no grupo Erva Mate foi o ácido 3-hidroxifenilpropionico, que representou cerca de 44% do total de fenólicos, seguido pelo ácido caféico (25%) e hipúrico (12%). Já no grupo

Padrão, além do 5-CQA, o ácido 3-hidroxifenilpropionico representou cerca de 16,7%, o FQA2 14,1% e o FQA3 12,3%, enquanto o ácido caféico representou 9,5% do total de compostos quantificados. As C_{max} mais elevadas também foram as observadas para estes compostos citados.

Tabela 6 – Parâmetros farmacocinéticos dos compostos fenólicos no plasma de ratos Wistar, após ingestão de chá mate (2 g/kg, grupo EM) ou 5-CQA (240 mg/kg, grupo PD). Amostras com (Total) ou sem (Livre) tratamento enzimático com β -glicuronidase e sulfatase.

Composto	Grupo	C_{max}^a nmol/mL		T_{max} min	AAC_{0-8h} nmol.min/mL (%) ^b	
		Livre	Total		Livre	Total
5-CQA	EM	0,18	0,35	30/60	29,88 (1,8%)	56,65 (1,8%)
	PD	3,45	5,24	30	522,86 (46,6%)	1001,23 (41,5%)
3-CQA	EM	0,14	0,38	30/60	36,46 (2,1%)	80,58 (2,5%)
	PD	nd	nd	-	-	-
4-CQA	EM	0,23	0,43	30/60	43,88 (2,6%)	81,97 (2,6%)
	PD	nd	nd	-	-	-
Ác. Caféico	EM	0,14	3,45	60	35,02 (2,1%)	783,10 (24,7%)
	PD	0,03	1,21	120	4,65 (0,4%)	228,76 (9,5%)
Ác. Ferúlico	EM	<LQ	0,47	30	-	105,15 (3,3%)
	PD	nd	<LQ	-	-	-
Ác. Isoferúlico	EM	<LQ	0,60	30	<LQ	123,76 (3,9%)
	PD	nd	nd	-	-	-
Ác. <i>m</i> -cumarico	EM	0,23*	0,32*	≥480	27,77 (1,6%)	47,10 (1,5%)
	PD	<LQ	<LQ	-	-	-
Ác. Dihidrocaféico	EM	0,37*	0,58*	≥480	81,68 (4,8%)	120,55 (3,8%)
	PD	0,40*	0,51*	≥480	60,77 (5,4%)	74,15 (3,1%)
Ác. Hipúrico	EM	2,15*	2,59*	≥480	315,38 (18,6%)	370,96 (11,7%)
	PD	<LQ	<LQ	-	-	-
Ác. 3-hidroxifenilpropionico	EM	7,12*	9,35*	≥480	1118,61 (35,2%)	1389,02 (43,8%)
	PD	2,50*	3,00*	≥480	338,65 (30,2%)	402,31 (16,7%)
FQA1	EM	<LQ	<LQ	-	-	-
	PD	nd	nd	-	-	-
FQA2	EM	<LQ	<LQ	-	-	-
	PD	0,46	1,46	60	90,73 (8,1%)	340,44 (14,1%)
FQA3	EM	<LQ	<LQ	-	-	-
	PD	0,30	1,31	60	55,53 (4,9%)	295,70 (12,3%)
Total de fenólicos	EM	-	-	-	1698,03	3173,96
	PD	-	-	-	1122,47	2412,57

^a dados são a maior média de concentrações encontrada no(s) T_{max} observado(s); ^b valores em parênteses indicam a contribuição do composto para o total de fenólicos encontrados no plasma, em porcentagem; CQA, ácido cafeoilquinico; FQA, ácido feruloilquinico; nd, não detectado; <LQ, detectado abaixo do limite de quantificação; * não foi possível determinar o C_{max} , valor é a maior concentração observada.

Tabela 7 – Parâmetros farmacocinéticos dos compostos fenólicos no fígado de ratos Wistar, após ingestão de chá mate (2 g/kg, grupo EM) ou 5-CQA (240 mg/kg, grupo PD). As amostras foram incubadas com β -glicuronidase e sulfatase.

Composto	Grupo	C_{max}^a nmol/g	T_{max} min	AAC_{0-8h} nmol.min/g (%) ^b
5-CQA	EM	0,31	30	35,26 (4,3%)
	PD	0,77	30/60	122,61 (18,5%)
3-CQA	EM	0,26	30	30,81 (3,8%)
	PD	nd	-	-
4-CQA	EM	0,33	30	38,63 (4,7%)
	PD	nd	-	-
Ác. Caféico	EM	0,36	120	94,20 (11,5%)
	PD	0,14	120	34,17 (5,1%)
Ác. Ferúlico	EM	0,18	30	47,04 (5,7%)
	PD	<LQ	-	-
Ác. Hipúrico	EM	1,21*	≥480	302,98 (36,9%)
	PD	0,47*	≥480	183,10 (27,6%)
Ác. 3-hidroxifenilpropionico	EM	1,33*	≥480	201,47 (24,5%)
	PD	0,54*	≥480	71,42 (10,8%)
FQA1	EM	<LQ	-	-
	PD	nd	-	-
FQA2	EM	0,13	30/60	16,84 (2,0%)
	PD	0,39	30	53,68 (8,1%)
FQA3	EM	0,34	30/60	54,34 (6,6%)
	PD	1,32	30	182,88 (27,6%)
Total de fenólicos	EM	-	-	821,62
	PD	-	-	663,78

^a dados são a maior média de concentrações encontrada no(s) T_{max} observado(s); ^b valores em parênteses indicam a contribuição do composto para o total de fenólicos encontrados no tecido, em porcentagem; CQA, ácido cafeoilquinico; FQA, ácido feruloilquinico; nd = não detectado; <LQ = detectado abaixo do limite de quantificação; * não foi possível determinar o C_{max} , valor é a maior concentração observada

A soma das AAC_{0-8h} dos compostos presentes no chá mate (3,4 e 5-CQA) representaram 11,9% do total de compostos fenólicos quantificados no fígado do grupo Erva Mate. Os compostos mais abundantes neste grupo foram os ácidos hipúrico (36,9% dos compostos quantificados), 3-hidroxifenilpropionico (24,5%) e caféico (11,5%). No grupo Padrão, a AAC_{0-8h} do 5-CQA correspondeu a 18,5% dos compostos quantificados e os compostos mais abundantes foram o ácido hipúrico e o FQA3, ambos contribuindo com 27,6% do total de compostos.

Comparando as somas das AAC_{0-8h} e as C_{max} dos compostos quantificados no plasma e fígado com os resultados obtidos para estômago e intestino grosso, as concentrações dos compostos no fígado e plasma foram bem menores, sendo que o fígado foi o tecido com as menores concentrações dos ácidos fenólicos.

3.4.3. Urina

Os resultados das análises cromatográficas das amostras de urina são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Excreção urinária total (nmoles)* de ácidos fenólicos por ratos Wistar, em diferentes faixas de tempo após ingestão de chá mate (2 g/kg, EM), 5-CQA (240 mg/kg, PD) ou solução salina (CT). Amostras com (totais) ou sem (livres) tratamento enzimático com β -glicuronidase e sulfatase.

Composto	CT	0-2 hs		0-4 hs		0-8 hs	
		EM	PD	EM	PD	EM	PD
Ácidos fenólicos livres							
5-CQA	nd	2,1±0,7 ^a	23,4±6,8 ^b	11,4±1,3 ^b	73,9±23,4 ^c	11,4±3,1 ^b	146±54 ^d
3-CQA	nd	2,3±1,6 ^a	nd	9,9±1,6 ^b	nd	11,7±4,1 ^b	nd
4-CQA	nd	3,5±0,9 ^a	nd	17,9±2,5 ^b	nd	21,3±6,7 ^b	nd
Ác. Caféico	nd	13,9±6,9 ^a	6,8±4,8 ^a	35,8±4,9 ^b	24,5±15,8 ^b	41,3±7,3 ^b	35,7±14,2 ^b
Ác. Ferúlico	2,4±0,9 ^a	35,9±13,0 ^b	1,4±0,4 ^a	32,8±10,7 ^b	9,3±2,7 ^c	158,5±56,4 ^d	31,1±6,9 ^b
Ác. Isoferúlico	nd	20,8±7,9 ^a	1,7±0,3 ^b	56,9±8,3 ^c	10,5±1,3 ^d	81,4±18,2 ^e	15,9±1,6 ^d
Ác. <i>m</i> -cumarico	8,3±2,0 ^a	nd	nd	6,7±1,7 ^a	nd	50,6±18,2 ^b	31,9±9,3 ^b
Ác. <i>p</i> -cumarico	nd	7,0±1,9 ^a	nd	24,3±3,8 ^b	nd	27,7±6,3 ^b	5,4±1,4 ^a
Ác. Dihidrocaféico	nd	nd	nd	48,5±11,6 ^a	6,1±1,7 ^b	85,8±28 ^c	30,3±8,6 ^a
Ác. Hipúrico	429±67 ^a	398±96 ^a	403±106 ^a	1762±388 ^b	644±108 ^a	5330±1530 ^c	2257±447 ^d
Ác. 3-hidroxifenilpropionico	19,8±7,8 ^a	2,6±0,4 ^b	3,5±1,1 ^b	155±42 ^c	42,6±14,2 ^d	1311±548 ^e	396±122 ^f
FQA-1	nd	9,4±2,9 ^a	nd	43,4±6,0 ^b	nd	47,4±13,5 ^b	nd
FQA-2	nd	13,5±4,3 ^a	168±29 ^b	57,5±5,5 ^c	433±63 ^d	64,6±17,5 ^c	849±151 ^e
FQA-3	nd	11,5±3,4 ^a	117±19 ^b	51,4±6,5 ^c	305±50 ^d	48,8±13,1 ^c	555±93 ^e
TOTAL EXCRETADO	460±75 ^a	528±107 ^a	726±138 ^a	2343±457 ^b	1550±196 ^b	7308±2167 ^c	4355±568 ^{bc}
% da quantidade ingerida (mol / mol)	-	0,23 ± 0,04 ^a	0,35±0,06 ^a	1,07±0,21 ^b	0,70±0,09 ^b	3,39±0,99 ^c	2,12±0,27 ^{bc}
Ácidos fenólicos totais							
5-CQA	nd	4,9±1,2 ^a	43,9±9,9 ^b	31,8±5,7 ^{bd}	203±34 ^c	20,4±4,5 ^d	393±120 ^c
3-CQA	nd	3,9±0,6 ^a	nd	26,6±5,3 ^b	nd	20,6±4,6 ^b	nd
4-CQA	nd	5,6±1,1 ^a	nd	37,6±7,6 ^b	nd	29,8±8,0 ^b	nd
Ác. Caféico	nd	97,1±17,6 ^a	20,1±5,6 ^b	587±146 ^c	105±15,8 ^{ad}	371±87 ^c	194±38 ^d
Ác. Ferúlico	3,5±1,4 ^a	79,5±17,1 ^b	6,4±1,0 ^a	319±59 ^c	26,8±2,4 ^d	288±78 ^c	62,8±8,2 ^b
Ác. Isoferúlico	nd	34,3±7,5 ^a	2,9±0,6 ^b	151±28 ^c	12,4±1,3 ^d	156±39 ^c	26,8±3,2 ^a
Ác. <i>m</i> -cumarico	10,4±3,4 ^a	nd	nd	9,0±2,6 ^a	nd	67,2±28,7 ^b	46,9±12,4 ^b
Ác. <i>p</i> -cumarico	nd	9,0±2,9 ^a	nd	27,7±4,6 ^b	nd	30,6±7,6 ^b	6,6±1,6 ^a
Ác. Dihidrocaféico	nd	nd	<LQ	66,9±16,9 ^a	8,1±2,3 ^b	92,19±31,3 ^c	50,2±14,4 ^a
Ác. Hipúrico	545±86 ^a	404±95 ^a	409±114 ^a	1768±375 ^b	659±112 ^a	6021±1772 ^c	2842±554 ^b
Ác. 3-hidroxifenilpropionico	25,3±9,9 ^a	2,7±0,5 ^b	3,9±1,2 ^b	155±43 ^c	48,2±17,7 ^d	1358±562 ^e	549±174 ^f
FQA-1	nd	11,6±3,3 ^a	nd	54,4±8,9 ^b	nd	57,6±15,7 ^b	nd
FQA-2	nd	15,3±4,8 ^a	182±30 ^b	78,2±9,3 ^c	548±68 ^d	83,5±22,2 ^c	1416±232 ^e
FQA-3	nd	15,6±4,1 ^a	134±22 ^b	84,9±16,5 ^{bd}	471±65 ^c	81,0±21,9 ^d	1207±197 ^e
TOTAL EXCRETADO	585±98 ^a	691,89 ^a	804±150 ^a	3447±653 ^b	2083±193 ^b	8701±261 ^d	6798±812 ^d
% da quantidade ingerida (mol/mol)	-	0,31±0,04 ^a	0,39±0,07 ^a	1,58±0,30 ^b	0,94±0,08 ^b	4,03±1,19 ^d	3,31±0,41 ^d

* quantidade dos compostos no total de urina excretada (média ± EP); CQA, ácido cafeoilquinico; FQA, ácido feruloilquinico; nd, não detectado; <LQ = detectado abaixo do limite de quantificação; letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas (Kruskal Wallis e *post hoc* Dunn).

Considerando os ácidos fenólicos totais (livres + conjugados a ácido glicurônico e/ou grupos sulfato) ao final do período de 8 horas, o ácido hipúrico foi o metabólito mais abundante na urina, representando 69% dos compostos quantificados no grupo Erva Mate e 42% no grupo Padrão, seguido dos ácidos 3-hidroxifenilpropionico (cerca de 16% do total de compostos), caféico (4%), ferúlico (3%) e isoferúlico (2%) no grupo Erva Mate e do FQA2 (21%), FQA3 (18%), 3-hidroxifenilpropionico (8%) e do próprio 5-CQA (6%) no grupo Padrão.

Na urina do grupo Controle foram quantificados os ácidos ferúlico, hipúrico, *m*-cumárico e 3-hidroxifenilpropionico. A quantidade de ácido hipúrico do grupo Controle não diferiu significativamente nas amostras coletadas até 2 horas após a gavagem no grupo Erva Mate e até 2 ou 4 horas no grupo Padrão.

Os CQAs foram detectados na urina em todos os intervalos de tempo avaliados, livres ou ligados a grupos sulfato e/ou ácido glicurônico. Os ácidos cafeoilquínicos na forma livre ou ligados aos transformadores de fase II, incluindo os FQAs, foram eliminados rapidamente na urina, não havendo diferença significativa entre as quantidades excretadas até 4 hs ou 8 hs após a ingestão do chá mate. No grupo Padrão, grande parte do 5-CQA e FQAs foram excretados após 4 hs, mas as quantidades presentes na urina dos animais eutanasiados após 8 hs foram significativamente maiores que os períodos anteriores. Os mesmos comportamentos foram observados para o ácido caféico e seus derivados metilados, ácido ferúlico e isoferúlico, e para o ácido *p*-cumárico, encontrado em pequenas quantidades.

Quanto aos demais metabólitos, os ácidos hipúrico, *m*-cumárico, 3-hidroxifenilpropionico e dihidrocaféico, estavam ou presentes em menores quantidades ou não foram detectados na urina coletada até 2 hs após a gavagem e as concentrações aumentaram nos períodos de coleta seguintes, especialmente na urina coletada até 8 hs após a gavagem. Não foram detectados em nenhuma das amostras os ácidos vanílico, 3-hidroxibenzóico e os diCQAs.

O total de ácidos fenólicos excretados pelos animais foram semelhantes entre os grupos dentro de cada faixa de tempo, mas diferiram entre as faixas de tempo de coleta, sendo o total na urina de 0 a 8 hs significativamente maior que o total na urina coletada de 0 a 4 hs, que por sua vez foi maior que na urina de 0 a 2 hs. O total de compostos excretados de 0 a 2 hs em ambos os grupos não diferiu da quantidade excretada pelos animais do grupo Controle.

Considerando a soma total das médias dos compostos excretados na urina de 0 a 8 hs após a administração das bebidas e o total de compostos fenólicos, em equivalente do 5-CQA, ingeridos pelos animais, as taxas de absorção hipotéticas para os compostos fenólicos são de cerca de 4,0% do total (mol/mol) de fenólicos ingerido pelos animais do grupo Erva Mate e 3,3% do 5-CQA administrado aos grupo Padrão (Tabela 8), sendo que a diferença entre os grupos não foi significativa. Considerando só o 5-CQA, 0,02% da quantidade presente no chá mate administrado (média de 50,6 nmol) foi recuperado na urina na forma livre, ou 0,04% considerando também as formas glicuronadas e/ou sulfatadas. No grupo padrão, 0,07% do 5-CQA administrado (média de 205 nmol) foi encontrado na urina, ou 0,21% considerando-se os glicuronídeos e/ou sulfatos.

3.4.4. Conjugação dos ácidos fenólicos ao ácido glicurônico e/ou grupos sulfato

Padrões dos metabólitos de ácidos fenólicos conjugados não estão disponíveis comercialmente e, para estimativa das concentrações totais (porção livre + conjugada) dos ácidos fenólicos, as amostras foram submetidas a tratamento enzimático com β -glicuronidase e sulfatase. Este procedimento permitiu também avaliar a extensão da conjugação dos ácidos fenólicos nos diferentes tecidos e fluidos, através da diferença nas concentrações dos compostos nas amostras incubadas com e sem as enzimas. Na Figura 12, observa-se a porcentagem de cada

ácido fenólico na forma livre, ou seja, sem ligação a ácido glicurônico e/ou grupos sulfato, nos diferentes tecidos nos quais foram quantificados.

Figura 12 – Porcentagem de compostos fenólicos na forma livre (sem ligação a ácido glicurônico e/ou grupos sulfato) em diferentes tecidos de ratos Wistar após a ingestão de chá mate (2 g/kg, grupo EM) ou 5-CQA (240 mg/kg, grupo PD). Letras diferentes indicam diferenças significativas (Kruskal Wallis e *post hoc* Dunn). IG, Intestino Grosso; CQA, ácido cafeoilquínico; FQA, ácido feruloilquínico.

No estômago e intestino grosso, o 5-CQA e seus isômeros se apresentavam em sua maioria na forma livre, com valores de 78 a 92%. Uma vez absorvidos, cerca de 56% do 5-CQA estava presente na forma livre no plasma do grupo Padrão e 52% no plasma do grupo Erva Mate, sendo que os valores foram estatisticamente semelhantes. A porcentagem livre do 3-CQA e 4-CQA no plasma do grupo Erva Mate foi em média 41 e 53%, respectivamente. Um pequeno aumento foi observado na

porcentagem livre do 4-CQA na urina (62%) e um pequeno decréscimo no 5-CQA presente na urina no grupo Padrão (40%).

O ácido caféico, ferúlico e os FQAs, todos compostos formados nas etapas iniciais da metabolização dos CQAs, também se encontravam em sua maioria na forma livre no estômago e intestino grosso. Os valores encontrados para o três isômeros de FQA não diferiram entre estes dois tecidos, em ambos os grupos. Já a porcentagem livre dos ácidos caféico nos dois grupos e ferúlico no grupo Erva Mate foram significativamente maiores no estômago que no intestino grosso. Comparando os tecidos digestivos com o plasma e urina, a porção livre destes compostos foi significativamente menor no plasma e urina para o ácido caféico e ferúlico e somente no plasma para os FQAs, em ambos os grupos (quando presentes). O ácido caféico foi o composto com maior porcentagem de conjugação, apenas 5 a 20% do mesmo estavam presentes no plasma e urina na forma livre, em ambos os grupos.

Os diCQAs foram quantificados apenas no estômago e intestino grosso dos animais do grupo Erva Mate, e de 64 a 77% estavam na forma livre nestes tecidos. Não foram observadas diferenças estatísticas para a porcentagem livre de nenhum dos três isômeros entre os dois tecidos.

Os demais compostos quantificados (ácidos *m*-cumárico, 3-hidroxifenilpropionico, hipúrico e dihidrocaféico) se encontravam majoritariamente na forma livre (66 a 98%), tanto nos tecidos gastrointestinais quanto no plasma e urina, em ambos os grupos, quando presentes. Destes compostos, o único que apresentou valores estatisticamente diferentes entre os grupos e/ou tecidos foi o ácido dihidrocaféico (Figura 12).

4. DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO CHÁ MATE

O chá mate solúvel utilizado nos ensaios biológicos foi analisado por UPLC/DAD-MS quanto ao teor e perfil de compostos fenólicos e cafeína, apresentando $28,53 \pm 0,12$ mg/g de ácido 5-cafeoilquínico e $15,22 \pm 0,05$ mg/g de cafeína. O teor de fenólicos totais, calculado pela soma do teor de 5-CQA com os demais fenólicos quantificados como equivalentes ao 5-CQA, foi de $121,73 \pm 0,39$ mg/g, enquanto o teor de fenólicos totais determinado pelo método de Folin-ciocalteau foi de 320 ± 8 mg/g, em equivalentes ao 5-CQA. O método de Folin-ciocalteau é menos específico que a determinação por UPLC, uma vez que são quantificados quaisquer compostos com atividade redutora e que, portanto, reajam com o reagente de Folin. Desta forma, foram utilizados os dados de fenólicos totais por UPLC para cálculo da quantidade de 5-CQA a ser administrada aos animais do grupo Padrão do ensaio *in vivo* principal.

Os teores de 5-CQA e estimativa de fenólicos totais por UPLC e pelo método de Folin-ciocalteau foram inferiores a teores encontrados anteriormente em chá mate solúvel: 42,17 mg/g de 5-CQA, 280,88 mg/g de fenólicos totais por HPLC e 375 mg/g por Folin (MATSUMOTO *et al.*, 2009); 32,25 mg/g de 5-CQA e 348 mg/g de fenólicos totais por Folin (ARÇARI *et al.*, 2009). Já com relação à cafeína, os valores encontrados neste estudo foram superiores aos relatados nos dois estudos citados, de 10,20 mg/g e 5,82 mg/g, respectivamente. Tais diferenças provavelmente são decorrentes de variações na composição da planta que originou o chá. Sabe-se que o teor de substâncias bioativas da erva mate difere de acordo com as condições de processamento e outros parâmetros como a variabilidade genética e tipo de solo em que é cultivada (BASTOS *et al.*, 2007a).

4.2. ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS *IN VIVO* APÓS INGESTÃO DE CHÁ MATE OU PADRÃO DE 5-CQA

Foram realizados dois ensaios *in vivo* com objetivo de analisar a biotransformação dos ácidos fenólicos presentes no chá mate. No primeiro ensaio (piloto), os compostos do chá mate e possíveis metabólitos foram identificados por UPLC/DAD-MS no plasma e diversos tecidos (estômago, intestino delgado, rins e músculo) de ratos Wistar, 90 min após administração de solução salina (Controle), duas dosagens de chá mate (0,5 e 2 g/kg de peso corporal) ou padrão 5-CQA (0,16 e 0,64 g/kg de peso). No segundo ensaio (principal) os animais foram eutanasiados 30, 60, 120, 240 ou 480 min após administração das bebidas (2 g/kg de chá mate ou 0,24 g/kg de 5-CQA) e analisados os perfis de concentração *versus* tempo e parâmetros farmacocinéticos (C_{max} , T_{max} e AAC_{0-8hs}) dos diversos ácidos fenólicos no plasma, fígado, estômago e intestino grosso dos animais, assim como os compostos presentes na urina, coletada em gaiola metabólica.

Foram pesquisados nas amostras biológicas, em ambos os ensaios, os principais ácidos clorogênicos encontrados no chá mate solúvel (CQAs e diCQAs) e compostos que poderiam ser formados após metabolização dos mesmos por enzimas endógenas de fase I e II (metabólitos primários) – ácidos feruloilquínicos, caféico, ferúlico, isoferúlico e derivados glucuronados e/ou sulfatados – ou enzimas provenientes da microbiota intestinal (metabólitos secundários) – ácidos *p*-cumárico, *m*-cumárico, hipúrico, hidroxifenilpropiónico, hidroxibenzóico, dihidrocaféico e vanílico (RECHNER *et al.*, 2002, 2004; GONTHIER *et al.*, 2003; LAFAY *et al.*, 2006a; FARAH *et al.*, 2008; STALMACH *et al.*, 2009).

Os ácidos feruloilquínicos (FQAs) são formados pela metilação dos CQAs. STALMACH *et al.* (2009) foram os primeiros a relatar a presença dos isômeros 3, 4 e 5-FQA no plasma e urina em um estudo que avaliou a biodisponibilidade de café em humanos. Neste estudo, os FQAs estavam presentes em quantidades superiores aos CQAs nos fluidos analisados. Como os três isômeros estavam presentes no café,

representando 16% do total de fenólicos, os autores não conseguiram determinar se a aparição dos mesmos nos fluidos era decorrente da absorção de FQAs intactos, que teriam uma taxa de absorção muito superior à dos outros ácidos clorogênicos, ou da metilação dos CQAs. Porém, no presente trabalho fica evidente que os FQAs advêm da metilação dos CQAs. Apesar de um isômero de FQA ter sido quantificado no chá mate, em pequena quantidade (1,1 mg/g de chá, em um total de 121 mg/g de fenólicos), a presença dos três isômeros de FQA nas amostras do grupo Erva Mate e dois no Padrão indicam que estes compostos foram formados no organismo, através da metilação dos ácidos monocateoilquínicos (3, 4 e 5-CQA), pela atividade da enzima de fase II COMT, presentes no fígado e outros tecidos (MATEOS *et al.*, 2006).

O ácido caféico é produto direto da clivagem dos mono e diCQAs por enzimas esterases. O ácido ferúlico e isoferúlico são derivados metilados do ácido caféico (STALMACH *et al.*, 2009), cuja metabolização por bactérias do intestino também dá origem ao ácido *m*-cumárico (dehidroxilação) e dihidrocaféico (redução da dupla ligação na cadeia lateral) (RECHNER *et al.* 2002; GONTHIER *et al.*, 2003; FARAH *et al.*, 2008). Este último pode sofrer reações de dehidroxilação por bactérias, dando origem aos ácidos hidroxifenilpropionícos, que por sua vez originam os ácidos hidroxibenzóicos (RECHNER *et al.*, 2004). O ácido hipúrico é formado pela posterior metabolização hepática dos ácidos hidroxibenzóicos (β -oxidação e glicinação), mas pode também originar-se do ácido quínico (GONTHIER *et al.*, 2003; RECHNER *et al.*, 2002; LAFAY *et al.*, 2006) ou a partir dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, o que explica sua presença nos fluidos e tecidos dos animais Controle. Por último, o ácido vanílico pode ser formado pela redução e posterior β -oxidação do ácido ferúlico (RECHNER *et al.*, 2001). A via de metabolização dos ácidos cafeoilquínicos da erva mate (CQAs e DiCQAs), proposta com base nos dados observados neste estudo, é apresentada na Figura 13.

Figura 13 – Representação esquemática da possível rota metabólica dos ácidos cafeoilquínicos (CQA) e dicafeoilquínicos (diCQA).

Dentre os compostos pesquisados nas amostras, o único ácido fenólico não detectado em nenhuma delas foi o ácido vanílico. O ácido *p*-cumárico e o 3-hidroxibenzóico foram detectados em quantidades abaixo do LQ no plasma e estômago dos animais do grupo Erva Mate, sendo o *p*-cumárico também excretado em pequenas quantidades na urina (Tabela 8). O ácido vanílico apresentou os piores valores de precisão e LDs e LQs mais altos dentre as substâncias avaliadas na validação do método. Portanto, o mesmo pode estar presente nas amostras, em quantidades não detectáveis. As baixas concentrações do ácido *p*-cumárico são justificadas por sua ausência, livre ou esterificado, nas bebidas administradas aos animais e as pequenas quantidades encontradas podem ter origem na

dehidroxilação do ácido caféico na posição 3 do anel aromático (RECHNER *et al.*, 2002). O ácido 3-hidroxibenzóico é um metabólito intermediário na síntese do ácido hipúrico a partir do 3-hidroxifenilpropionico (RECHNER *et al.*, 2004), dois metabólitos encontrados em abundância no plasma e urina dos animais, portanto é provável que a conversão do 3-hidroxibenzóico a ácido hipúrico seja rápida o suficiente para que o primeiro não se acumule no organismo.

Os ácidos monocateoílicos presentes nas bebidas administradas aos animais (3, 4 e 5-CQA no grupo Erva Mate e 5-CQA no Padrão) foram detectados, na forma livre e/ou nas formas glicuronadas e/ou sulfatadas, no plasma, urina e em todos os tecidos analisados. A presença dos CQAs no tecido estomacal e já aos 30 min após a absorção no plasma e fígado dos animais, indicam que a absorção começa no estômago. Experimentos que avaliaram a infusão gástrica de 5-CQA *in situ* em ratos Wistar (LAFAY *et al.*, 2006a) e o transporte através de células do epitélio gástrico *in vitro* (FARREL *et al.*, 2011) demonstraram que o 5-CQA é absorvido do estômago, o que corrobora o resultado observado no presente estudo, comprovando que a ligação éster entre o ácido caféico e o ácido quínico não impede a absorção. Outros estudos com modelos de absorção *in situ* ou *ex vivo* demonstraram que ácidos hidroxicinâmicos livres (não esterificados com ácido quínico) como os ácidos caféico, ferúlico e *p*-cumárico também podem ser absorvidos no estômago (ZHAO *et al.*, 2004; KONISHI *et al.* 2006) intestino delgado (SPENCER *et al.*, 1999) e cólon de ratos (POQUET *et al.*, 2008).

Três isômeros de diCQAs também estavam presentes no chá mate administrado aos animais e foram detectados no estômago e intestino delgado dos animais do grupo Erva Mate no ensaio piloto e quantificados no estômago e intestino grosso no ensaio principal. No entanto, estes compostos não foram detectados no plasma, urina e demais tecidos analisados. Outros estudos de um grupo de pesquisadores que avaliaram a biodisponibilidade de ácidos clorogênicos do café relataram a presença dos diCQAs em quantidades traço (<LD) na urina (DUARTE & FARAH, 2011) ou em pequenas quantidades no plasma (MONTEIRO *et*

al., 2007;) de humanos. Devido ao tamanho da molécula, o transporte dos diCQAs da membrana gastrointestinal para a circulação possivelmente seja menor que o transporte dos CQAs e parte dos diCQAs presentes na mucosa gastrointestinal sejam devolvidos ao lúmen (KONISHI & KOBAYASHI, 2004) ou sofram a ação de esterases, sendo transportados para a corrente sanguínea na forma de CQAs, ácido caféico e respectivos metabólitos de fase II ou ainda após metabolização pela microbiota colônica.

Com a passagem pelo organismo, os CQAs e diCQAs presentes no chá e o 5-CQA administrado ao grupo Padrão foram metabolizados e as parcelas correspondentes aos mesmos no *pool* de fenólicos foram reduzidas gradativamente, entre a absorção e excreção dos compostos. Somando-se as AAC_{0-8hs}, os CQAs e diCQAs do chá ou suas formas glicuronadas e sulfatadas representavam cerca de 98,3% dos fenólicos quantificados no tecido estomacal do grupo Erva Mate, valor que caiu para 62,8% no intestino grosso, 11,9% no fígado, 7% no plasma e apenas 0,8% na urina, sendo que nestes três últimos tecidos/fluidos a porcentagem corresponde à soma dos três isômeros de CQAs, uma vez que os diCQAs não foram detectados. No grupo Padrão, o 5-CQA (Total) correspondia a 94,7% do total de fenólicos quantificados no estômago, 73,5% no intestino grosso, 18,5% no fígado, 41,5% no plasma e 5,8% na urina.

Sabe-se que o metabolismo dos ácidos clorogênicos e hidroxicinâmicos livres pode ocorrer no fígado, mucosa intestinal, rins e pela ação da microbiota microbiana (ZHAO & MOGHADASIAN, 2010). No entanto, demonstra-se no presente trabalho que não apenas a absorção como também a metabolização dos ácidos clorogênicos começa no estômago, pois, além dos CQAs, foram detectados no tecido gástrico suas formas glicuronadas e/ou sulfatadas, metiladas (FQAs) e também o ácido caféico, ferúlico e isoferúlico, este último somente no grupo Erva Mate. Apenas um outro trabalho recente (FARREL *et al.*, 2011) havia verificado a formação de compostos originados pela ação de enzimas de fase I e II da mucosa gástrica a partir de ácidos cafeoilquínicos *in vitro*.

A presença do ácido caféico nos tecidos do trato gastrointestinal, especialmente no estômago, e a rápida aparição no plasma dos animais de ambos os grupos são indicativos da atividade de esterases na membrana gastrointestinal, capazes de clivar as ligações éster entre o ácido quínico e o ácido caféico das moléculas de CQAs e diCQAs. Embora alguns autores tenham afirmado que a membrana gastrointestinal não possua tais enzimas, e que, portanto, a clivagem da ligação éster dos ácidos clorogênicos fosse realizada somente por esterases de origem microbiana (RECHNER *et al.*, 2002; AZUMA *et al.*, 2000), outros trabalhos relataram a presença de atividade das esterase ao longo do trato gastrointestinal de mamíferos (ANDREASEN *et al.*, 2001) e a hidrólise do 5-CQA por culturas de células do cólon Caco2 (KERN *et al.*, 2003), que condizem com os resultados aqui encontrados.

Da mesma forma, os derivados metilados dos CQAs (FQAs) no tecido estomacal dos animais de ambos os grupos e de ácido ferúlico e isoferúlico no grupo Erva Mate indicam a atividade de enzimas COMT na mucosa gástrica. De fato, já foi demonstrado que as COMT estão presentes no estômago de ratos (KARHUNEN *et al.*, 1994) e humanos (TAHARA *et al.*, 2009).

As quantidades totais de ácidos fenólicos presentes no estômago e intestino grosso dos animais eram bastante superiores às encontradas no plasma e fígado, em ambos os grupos, como pode ser observado nas Tabelas 4 a 7, indicando uma possível saturação do transporte dos compostos pela barreira gastrointestinal. Os compostos fenólicos presentes no interior das células do trato gastrointestinal não necessariamente são encaminhados para a corrente sanguínea, podem também ter sofrido efluxo para o lúmen, onde serão metabolizados por bactérias ou ainda excretados nas fezes (LAFAY *et al.*, 2006b).

De todos os compostos quantificados no estômago e intestino grosso, as maiores diferenças entre as concentrações dos tecidos gastrointestinais e aquelas do plasma, fígado e urina foram observadas para os CQAs. No grupo Erva Mate, a C_{max} para o 5-CQA foi 131,2 nmol/g no estômago e 259,2 nmol/g no intestino

grosso, enquanto no plasma foi de 0,35 nmol/mL e no fígado 0,31 nmol/g. No grupo Padrão, a $C_{\max}$ do 5-CQA foi 1142 nmol/g no estômago, 2080 nmol/g no intestino grosso, 5,24 nmol/mL no plasma e 0,77 nmol/g no tecido hepático.

Além da evidente metabolização extensiva dos CQAs e consequente formação dos demais compostos fenólicos, outro fator que pode contribuir para a diminuição entre as quantidades de CQAs presentes nos tecidos gastrointestinais e aquelas encontradas no plasma e fígado é a menor taxa de absorção dos CQAs, em relação à taxa de absorção dos metabólitos que estavam presentes no estômago e intestino grosso ao mesmo tempo (FQAs, ácidos caféico, ferúlico e isoferúlico, sendo os dois últimos quantificados apenas no grupo Erva Mate).

Foi demonstrado em estudos anteriores que o ácido caféico livre possui maior taxa de absorção que os CQAs. Em cultura de células intestinais humanas Caco-2, observou-se que o fluxo transepitelial do 5-CQA é significativamente menor que o fluxo do ácido caféico, que por sua vez é menor que o do ácido ferúlico (KONISHI & KOBAYASHI, 2004). O mesmo comportamento foi observado em trabalhos *in situ* em modelo animal com perfusão dos ácidos fenólicos no sistema gastrointestinal: a taxa de absorção do 5-CQA foi quase a metade da observada para o ácido caféico (LAFAY *et al.*, 2006b), que por sua vez foi menor que a do ácido ferúlico (ADAM *et al.*, 2002). Portanto, duas transformações na molécula dos CQAs que parecem aumentar a transferência através da barreira gastrointestinal são a quebra da ligação éster com o ácido quínico e a metilação.

O mecanismo exato de transporte dos ácidos clorogênicos e demais ácidos fenólicos através do epitélio gastrointestinal ainda não foi totalmente esclarecido. Alguns experimentos indicam que transporte dos CGAs (FARREL *et al.*, 2011) e ácidos hidroxicinâmicos livres (POQUET *et al.*, 2008) sejam realizados por difusão passiva. Segundo revisão de ZHAO & MOGHADASIAN (2010), estudos sugeriram a existência de um mecanismo de transporte mediado por H^+ para os ácidos hidroxicinâmicos (WOLFFRAM *et al.*, 1995 ; KONISHI & SHIMIZU, 2003; ITAGAKI *et al.*, 2005 ; POQUET *et al.*, 2008), no entanto tais transportadores não foram

identificados (ITAGAKI *et al.*, 2005). Outros artigos demonstraram que os ácidos hidroxicinâmicos podem ser transportados através das células do epitélio intestinal por transportadores do ácido monocarboxilílico (MCT) (KONISHI *et al.*, 2003, 2004, 2006). Desta forma, enquanto os CQAs seriam absorvidos apenas por transporte passivo, os ácidos hidroxicinâmicos livres poderiam também ser absorvidos também por transporte ativo.

Em todas as amostras biológicas avaliadas no ensaio principal, foram observadas diferenças no perfil de ácidos fenólicos entre o grupo Erva Mate e o grupo Padrão. No grupo Erva Mate, um número maior de ácidos fenólicos foi quantificado e/ou identificado, não só devido à maior variedade de compostos advindos do chá mate (3 isômeros de CQAs e 3 de diCQAs), mas também pelo maior número de compostos formados a partir da metabolização do ácido caféico (ácidos ferúlico, isoferúlico, *m*-cumárico, 3-hidroxifenilproiônico, dihidrocaféico e hipúrico). Quantitativamente, o ácido caféico e seus metabólitos foram mais abundantes no grupo Erva Mate que no grupo Padrão, em todos os tecidos e fluidos biológicos analisados.

Estas diferenças entre os dois grupos podem ser explicadas pela presença dos ácidos dicafeoilquínicos no chá mate, que representam cerca de 34% dos fenólicos do lote utilizado neste estudo. Os diCQAS fornecem duas moléculas de ácido caféico e uma de ácido quínico, enquanto o 5-CQA possui uma molécula de cada. Desta forma, os animais do grupo Erva Mate ingeriram relativamente mais ácido caféico do que os animais do grupo Padrão, gerando também mais compostos provenientes da metabolização do mesmo. Além disso, é possível que as ligações éster dos ácidos caféicos nas moléculas de diCQAs sejam clivadas mais facilmente que a ligação éster dos CQAs, liberando maior quantidade relativa de ácido caféico no lúmen e interior das células gastrointestinais, que seria então encaminhado para a corrente sanguínea na forma livre ou após metabolismo por enzimas endógenas de fase 2 e/ou microbiota intestinal.

Conforme citado anteriormente, os três isômeros de CQAs e diCQAs no grupo Erva Mate e o 5-CQA no grupo Padrão foram os principais compostos presentes nos tecidos do estômago e intestino grosso dos animais, quantitativamente. No plasma, fígado e urina, os compostos formados pela metabolização desses compostos, quando somados, foram mais abundantes que os próprios.

Nos três tempos iniciais de eutanásia dos animais (30, 60 e 120 min), o composto mais abundante no plasma e fígado do grupo Erva Mate foi o ácido caféico (Figuras 8 e 10), cuja C_{max} foi 3,45 nmol/mL no plasma (60 min) e 0,36 nmol/g no fígado (120 min). Nos animais eutanasiados nos tempos posteriores (240 e 480 min), o ácido caféico e demais compostos encontrados nos tempos iniciais deram lugar às substâncias formadas após metabolização do ácido caféico pela microbiota intestinal, como o ácido dihidrocaféico, 3-hidroxifenilpropionico e hipúrico. Para estes compostos, não foi possível definir a C_{max} , uma vez que não se observou o decaimento da curva de concentração, mas as maiores concentrações foram observadas nos animais eutanasiados aos 480 min (Tabelas 6 e 7). A mesma tendência foi observada na urina, com os CQAs e seus metabólitos iniciais sendo excretados rapidamente, uma vez que não houve diferença significativa entre as quantidades destes compostos na urina coletada de 0 a 4 hs com as quantidades na urina coletada de 0 a 8 hs, enquanto os produtos da metabolização bacteriana foram excretados principalmente após 4 hs da ingestão do chá mate (Tabela 8).

No grupo Padrão, o composto com maior concentração no plasma dos animais eutanasiados 30, 60 ou 120 min após a administração do 5-CQA foi o próprio 5-CQA, livre ou ligado ao ácido glicurônico e/ou grupos sulfato, com C_{max} de 5,34 nmol/mL no plasma (30 min). No fígado, o composto mais abundante no tempos iniciais foi o FQA3, com C_{max} de 1,32 nmol/g (30 min), seguido pelo 5-CQA (0,77 nmol/g). Já nos animais eutanasiados aos 240 e 480 min, os compostos mais abundantes foram o ácido dihidrocaféico, hipúrico e 3-hidroxifenilpropionico, como no grupo Erva Mate. Porém, as concentrações destes metabólitos foram

visivelmente menores no grupo Padrão (Tabelas 6 e 7, Figuras 8 a 11). Na urina deste grupo, embora boa parte do 5-CQA tenha sido excretada até 4 hs após a gavagem, não só os compostos formados por bactérias, como também metabólitos formados por enzimas endógenas de fase I e II (FQA2 e FQA3, ácido caféico, ferúlico e isoferúlico) estavam presentes em quantidades significativamente maiores na urina coletada até 8 hs, em comparação com a coletada até 4 hs após a gavagem (Tabela 8). Estes resultados estão de acordo com as concentrações observadas no intestino grosso, pois no grupo Padrão a $C_{\max}$ do 5-CQA, FQAs e ácido caféico foram observadas 240 min após a gavagem, enquanto no grupo Erva Mate as $C_{\max}$ dos mesmos compostos ocorreram aos 30 min (Tabela 5).

No grupo Erva Mate, o composto mais abundante na urina coletada até 8 hs após a gavagem foi o ácido hipúrico (6021 ± 1772 nmol), seguido do ácido 3-hidroxifenilpropionico (1358 ± 562 nmol). No grupo Padrão, o composto mais abundante também foi o ácido hipúrico (2842 ± 554 nmol), seguido do FQA2 (1416 ± 568 nmol), FQA3 (1207 ± 197 nmol) e ácido 3-hidroxifenilpropionico (549 ± 174). Um outro estudo com ratos (GONTHIER *et al.*, 2003) também identificou o ácido hipúrico e o 3-hidroxifenilpropionico como os principais metabólitos presentes na urina após ingestão de padrão de 5-CQA, mas os FQAs não foram analisados.

Os compostos fenólicos encontrados na urina coletada de 0 a 8 hs após a gavagem representam cerca de $4,03 \pm 1,19\%$ do total ingerido no grupo Erva Mate e $3,31 \pm 0,41\%$ no grupo Padrão. Alguns estudos em humanos, que avaliaram a biodisponibilidade de fenólicos do café, encontraram valores maiores, de 29,1% (STALMACH *et al.*, 2009) até 68% (DUARTE & FARAH, 2011). No entanto, em tais estudos a urina foi coletada durante 24 hs e a maior parte dos fenólicos encontrados foram justamente aqueles provenientes da metabolização por bactérias do intestino grosso, após 8 horas da ingestão da bebida. Portanto, provavelmente uma parcela maior de compostos seria absorvida pelos animais do presente estudo, uma vez que naqueles eutanasiados 8 hs (480 min) após a

gavagem a concentração de alguns metabólitos no plasma e tecidos era crescente. Além disso, os estudos citados também identificaram o ácido dihidroferulico e suas formas glicuronadas e/ou sulfatadas como um dos principais metabólitos dos ácidos clorogênicos na urina, mas tal composto não foi quantificado no presente estudo.

Considerando só o 5-CQA, livre e ligado ao ácido glicurônico e/ou grupos sulfato, menos de 1% da quantidade presente no chá mate administrado foi recuperado na urina na forma livre, nos animais dos dois grupos, resultados semelhantes aos de estudos anteriores com humanos após a ingestão de café (MONTEIRO *et al.*, 2007; DUARTE & FARAH 2011) ou 5-CQA (OLTHOF *et al.*, 2001, 2003) e animais após ingestão de 5-CQA (GONTHIER *et al.*, 2003), evidenciando que a urina não é a principal rota de eliminação dos CQAs.

Juntos, os isômeros de FQAs, que são as formas metiladas dos CQAs, representaram cerca de 39% dos compostos fenólicos encontrados na urina até 8 horas após a gavagem no grupo Padrão e 2,5% no grupo Erva Mate. Ao analisar a razão CQA/FQA nos tecidos, plasma e urina, nota-se que a quantidade de FQAs foi aumentando, à medida que as quantidades de 5-CQAs foram diminuindo. No grupo Erva Mate a razão entre CQAs:FQAs era de 30:1 no estômago, 8:1 no intestino grosso, 1,5:1 no fígado e 1:3 na urina. Não foi possível calcular a razão do plasma, uma vez que os FQAs não foram quantificados (<LQ). No grupo Padrão, a razão 5-CQA:FQAs era de 18:1 no estômago, 6:1 no intestino grosso, 1,5:1 no plasma, 1:2 no fígado e 1:7 na urina. Portanto, estes resultados indicam que a metilação pode ser a principal forma de metabolização dos CQAs que ultrapassam a barreira gastrointestinal intactos.

Além da metilação, outras duas modificações nas moléculas dos ácidos fenólicos que puderam ser observadas no presente estudo são a glicuronação e conjugação grupos sulfato. Através da análise das diferenças nas concentrações dos compostos quando as amostras foram incubadas com e sem as enzimas β -glicuronidase e sulfatase, foram obtidos resultados a respeito das formas em que os compostos se encontram nos diferentes tecidos e fluidos estudados. Conforme

esperado, no estômago e intestino grosso a maior parte dos compostos estava ainda na forma livre (Figura 12). Apesar da membrana gastrointestinal apresentar enzimas de fase 2, os principais locais de ação das mesmas são o fígado e, em menor grau, os rins e outros tecidos internos (MATEOS *et al.*, 2006).

No plasma de ambos os grupos, as porcentagens dos CQAs e seus metabólitos primários (FQAs, ácido caféico e ferúlico) na forma livre foram significativamente menores que no estômago e intestino grosso, assim como na urina, com exceção dos FQAs, cujas porcentagens livres na urina foram semelhantes às encontradas nos tecidos gastrointestinais. O composto mais extensivamente conjugado dentre os avaliados foi o ácido caféico, visto que as concentrações na forma livre no plasma e urina representaram apenas 5 a 20% das concentrações totais.

Com relação aos metabólitos secundários formados pela ação da microbiota (ácidos *m*-cumárico, dihidrocaféico, hipúrico e 3-hidroxifenilpropionico), as diferenças da parcela livre entre o plasma, urina, estômago e intestino grosso foram menores e os compostos se encontravam majoritariamente na forma livre em todas as amostras biológicas, indicando menor atividade das enzimas de fase 2 UDP-glicotransferases e sulfotransferases, em comparação com os CQAs e seus metabólitos primários.

Vários fatores podem alterar o grau de conjugação e metabolismo dos ácidos fenólicos e outros compostos bioativos de alimentos em geral, como a forma química dos compostos de interesse, tempo de trânsito gastrointestinal, composição da microbiota intestinal, polimorfismos nos genes que expressam as enzimas de fase I e II, entre outros (CROZIER *et al.*, 2009). A quantidade de fenólicos ingerida também pode alterar quais compostos serão formados em maiores concentrações: a ingestão de quantidades maiores em único momento favorece a formação de metabólitos primários e maior porcentagem de compostos não conjugados, enquanto a ingestão de pequenas quantidades leva à maior produção relativa de metabólitos originados pela ação de bactérias (RECHNER *et al.*, 2004;

ANDRES-LACUEVA *et al.*, 2012). Portanto, apesar dos resultados do presente estudo fornecerem informações a cerca do grau de conjugação dos ácidos fenólicos do chá mate e seus metabólitos, são necessários mais estudos para estabelecer de fato quais as formas predominantes em humanos após o consumo da bebida.

Até o momento, não foram encontrados outros trabalhos científicos que tenham avaliado a biodisponibilidade e biotransformação dos ácidos fenólicos da erva mate. Alguns trabalhos foram realizados com o café, também rico em ácidos clorogênicos, em humanos (DUARTE & FARAH, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2007, FARAH *et al.*, 2008, STALMACH *et al.*, 2009, 2010; RENOUF *et al.*, 2010) ou 5-CQA isolado com humanos (OLTHOF *et al.*, 2001, 2003) e animais (AZUMA *et al.*, 2000; GONTHIER *et al.*, 2003; LAFAY *et al.*, 2006a, 2006b).

No entanto, a comparação entre os diferentes estudos nem sempre é possível, em razão das diferentes quantidades administradas e metabólitos avaliados. Além disso, notam-se diferenças entre os perfis de ácidos clorogênicos do café nos trabalhos citados e da erva mate avaliada no presente estudo; enquanto o café apresenta maior proporção de ácidos monocateoilquínicos (cerca de 72%) seguidos pelos ácidos feruloilquínicos (12 a 16%), sendo pequena a quantidade de ácidos dicafeoilquínicos (cerca de 3% a 10%), no chá mate há predominância de ácidos monocateoilquínicos (62%) e dicafeoilquínicos (34%). Como demonstrado neste estudo pela comparação da biotransformação dos ácidos clorogênicos provenientes da erva mate com a mesma quantidade de padrão de 5-CQA, os perfis e quantidades dos compostos formados diferem de acordo com o perfil de ácidos clorogênicos ingeridos. A presença de maior quantidade de diCQAs na erva mate levou à maior concentração de metabólitos formados a partir do ácido caféico nos fluidos e tecidos, incluindo suas formas metiladas (ácidos ferúlico e isoferúlico), glicuronadas e/ou sulfatadas, além daqueles formados a partir da fermentação por bactérias da flora intestinal, em comparação com a ingestão de 5-CQA isolado.

Os resultados aqui apresentados indicam que o ácido caféico, principalmente glicuronado e/ou sulfatado, e seus derivados microbianos,

especialmente o ácido 3-hidroxifenilpropionico, podem ter importância significativa na atividade biológica da erva mate nos tecidos posteriores à barreira gastrointestinal, considerando suas concentrações no fígado e plasma, além da presença nos demais tecidos analisados no ensaio piloto (rins e músculo). Os ácidos feruloilquínicos também devem ser considerados, uma vez que grande parte dos CQAs absorvidos foi rapidamente convertida à FQAs, embora estes compostos sejam rapidamente excretados na urina.

Apesar de apenas uma pequena parcela dos ácidos clorogênicos ser efetivamente encaminhada para a corrente sanguínea, os CQAs e diCQAs provenientes da erva mate são absorvidos pelas células do trato gastrointestinal e podem atuar localmente nestes tecidos. Além disso, alguns compostos fenólicos podem estimular o crescimento e/ou atividade da microbiota intestinal, conferindo um tipo de efeito probiótico (LANDETE, 2012).

Mais estudos são necessários para verificar se os compostos formados em humanos correspondem àqueles encontrados neste estudo e verificar as concentrações em que estarão presentes após o consumo por humanos de quantidades habituais de bebidas à base da erva mate.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho relata, pela primeira vez, a metabolização dos ácidos clorogênicos do chá mate *in vivo*, em comparação com quantidade similar do 5-CQA puro, um dos principais fenólicos encontrados no chá. Demonstrou-se que não somente a absorção, mas também a transformação dos ácidos cafeoilquínicos por esterases e enzimas de fase II começa no estômago, e não no intestino delgado. A presença dos CQAs intactos e seus metabólitos de fase II foi demonstrada no estômago, intestino delgado, intestino grosso, fígado, rins, músculo, plasma e urina. Os metabólitos formados pela microbiota colônica representaram a maior parcela dos compostos no plasma, fígado e urina, quantitativamente. Houve diferenças no tipo e quantidade dos diferentes compostos formados a partir dos fenólicos do chá

mate e do 5-CQA puro, o que demonstra que o perfil de ácidos clorogênicos presentes no alimento influencia qualitativamente e quantitativamente os metabólitos formados. Maior ênfase deve ser dada aos metabólitos dos ácidos clorogênicos em ensaios que tenham como objetivo esclarecer os benefícios da erva mate e outros alimentos fontes de ácidos clorogênicos ou que pretendam elucidar os mecanismos de ação dos mesmos nos tecidos pós-barreira absorptiva, enquanto os ácidos clorogênicos intactos podem ser avaliados em estudos que avaliem as atividades biológicas nos tecidos do trato gastrointestinal.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Adam A, Crespy V, Levrat-Verny MA, Leenhardt F, Leuillet M, Demigne C, Remesy C. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J Nutr* 2002; 132(7):1962–1968
2. Andreasen, M.F.; Kroon, P.A.; Williamson, G.; Garcia-Conesa, M.T. Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 5679–5684.
3. Andres-Lacueva C, Macarulla MT, Rotches-Ribalta M, Boto-Ordóñez M, Urpi-SardaM, Rodrígue VM, Portillo MP. Distribution of Resveratrol Metabolites in Liver, Adipose Tissue, and Skeletal Muscle in Rats Fed Different Doses of This Polyphenol. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60: 4833–4840.
4. Arçari DP, Bartchewsky W, Santos TW, Oliveira KA, DeOliveira CC, Gotardo EM, *et al.* Anti-inflammatory effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011; 335(2):110-5.
5. Arçari DP, Bartchewsky W, Santos TW, Oliveira KA, Funckarvalho PO, Ribeiro ML, Antiobesity Effects of yerba maté Extract (*Ilex paraguariensis*) in High-fat Diet-induced Obese Mice. *Obesity* 2009, 17(12): 2127–2133.
6. Azuma, K., Ipposushi, K., Nakayama, M., Ito, H., Higashio, H., Terao, J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem* 2000; 48:5496-5500.
7. Baisch ALM, Johnston FL, Stein P. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. *J Ethnopharmacol* 1998; 60: 133-139

8. Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Manólio RA, Torres, EAF. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. *Acta Farm Bonaerense* 2005; 24(1): 91-95
9. Bastos DHM, Oliveira DM, Matsumoto RLT, Carvalho PO, Ribeiro ML. *Yerba maté*: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 2007a; 1(1):37-46.
10. Bastos DHM, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya HF, Cunha IBS, Carvalho PO, Eberlin MN. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules* 2007b; 12: 423-432.
11. Borges MC. Efeito da ração hiperlipídica e do extrato aquoso de erva mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a composição corporal e sobre a resposta inflamatória de macrofagos peritoniais de ratos Wistar [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2011.
12. Clifford MN. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med.* 2004; 70(12):1103-14.
13. Clifford, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 1999; 79:362-372.
14. Crozier A, Del Rio D, Clifford MN. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine* 2010; 31:446–467.
15. Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26, 1001–1043.
16. Duarte GS, Farah A. Effect of Simultaneous Consumption of Milk and Coffee on Chlorogenic Acid's Bioavailability in Humans. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 7925–7931.
17. Farah, A.; Monteiro, M.; Donangelo, C. M.; Lafay, S. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *J. Nutr.* **2008**, 138, 2309-2315.
18. Farrell TL, Dew TP, Poquet L, Hanson P, Williamson G. Absorption and Metabolism of Chlorogenic Acids in Cultured Gastric Epithelial Monolayers. *Drug Metabolism And Disposition* 2011; 39:2338–2346.
19. Filip R, Ferraro GE. Researching on new species of “Mate”: *Ilex brevicuspis* – Phytochemical and Pharmacology study. *European Journal of Nutrition.* 2003;42(1):50-54.
20. Filip R, Sebastian T, Ferraro G, Anesini C. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. *Food Chem Toxicol* 2007; 45:649-655.

21. Folch C. Stimulating consumption: Yerba Mate myths, markets, and meanings from conquest to present. *Comparative Studies in Society and History*. 2010;52:6-36.
22. Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Remesy C, Scalbert A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr* 2003; 133:1853-9.
23. Gorzalczany S, Filip R, Alonso MR, Mino J, Ferraro GE, Acevedo C. Choleretic effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *J Ethnopharmacol* 2001; 75(2-3):291-4.
24. Heck CI and Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *J Food Sci* 2007; 72(9):138-151.
25. Heckman MA, Sherry K, de Mejia G. Energy drinks: an assessment of their market size, consumer, demographics, ingredient profile, functionality, and regulations in the United States. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2010; 9:303-317.
26. International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, 1996.
27. Itagaki S, Kobayashi Y, Otsuka Y, Kubo S, Kobayashi M, Hirano T, Iseki K. Food-drug interaction between ferulic acid and nateglinide involving the fluorescein/H⁺ cotransport system. *J Agric Food Chem* 2005; 53(7):2499–2502
28. Jaiswal R, Sovdat T, Vivan F, Kuhnert N. Profiling and Characterization by LC-MSⁿ of the Chlorogenic Acids and Hydroxycinnamoylshikimate Esters in Mate' (*Ilex paraguariensis*). *J Agric Food Chem* 2010; 58: 5471–5484.
29. Karhunen T, Tilgmann C, Ulmanen I, Julkunen I, Panula P. Distribution of catechol-O-methyltransferase enzyme in rat tissues. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 1079.
30. Kern SM, Bennett RN, Needs PW, Mellon FA, Kroon PA, Garcia-Conesa MT Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the in vitro model of human small intestinal epithelium caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 2003; 51(27):7884–7891
31. Konishi Y, Shimizu M Transepithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in caco-2 cell monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67(4): 856–862
32. Konishi Y, Zhao Z, Shimizu M. Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *J Agric Food Chem* 2006; 54:7539-7543.
33. Konishi, Y., Kobayashi, S. Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem*. 2004; 52:2518-2526.

34. Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* 2004; 80:15-21.
35. Lafay S, Gil-Izquierdo A, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *J Nutr* 2006a; 136:1192-1197.
36. Lafay S, Morand C, Manach C, Besson C, Scalbert A. Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *Br J Nutr* 2006b; 96(1):39–46.
37. Lafay, S & Gil-izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem. Rev.* 2008; 7:301-311.
38. Landete JM. Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2012; 52:10, 936-948
39. Lanzetti M, Bezerra FS, Romana-Souza B, Brando-Lima AC, Koatz VLG, Porto LC, Valença SS. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Nutrition* 2008; 24:375–381.
40. Lunceford N & Gugliucci A. *Ilex paraguariensis* inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia* 2005; 76:419-427.
41. Mateos R, Goya L, Bravo L. Uptake and metabolism of hydroxycinnamic acids (chlorogenic, caffeic, and ferulic acids) by HepG2 cells as a model of the human liver. *J Agric Food Chem* 2006; 54(23):8724-8732
42. Matsumoto RLT, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky W, Ribeiro ML, Patrícia O Carvalho PO, Bastos DHM. Effects of maté tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and total antioxidant status in healthy young women. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 1775-1780.
43. Mejia EG, Song Y, Ramirez-Mares MV, Kobayashi H. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Proliferation. *J Agric Food Chem* 2005; 53:1966-1973
44. Milioli EM, Cologni P, Santo CC, Marcos TD, Yunes VM. Effect of Acute Administration of Hydroalcohol Extract of *Ilex paraguariensis* St Hilaire (Aquifoliaceae) in Animal Models of Parkinson's Disease. *Phytother Res* 2007; 21:771–776.
45. Miranda DDC, Arçari DP, Pedrazzoli Jr J, Carvalho PO, Cerutti SM, Bastos DHM, Ribeiro ML. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis* 2008; 23: 261–265.

46. Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, Donangelo C. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *J Nutr* 2007; 137:2196–2201.
47. Mosimann AL, Wilhelm-Filho D, Silva EL. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Biofactors* 2006; 26: 59-70
48. Oliveira DM, Freitas HS, Souza MF, Arçari DP, Ribeiro ML, Carvalho PO, Bastos DHM. Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic wistar rats. *J Agric Food Chem* 2008; 56:10527-10532.
49. Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 2001;131:66-71.
50. Olthof MR, Hollman PCH, Buijsman MCNP, Amelsvoort, JMM, Katan, MB. Chlorogenic acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols are Extensively Metabolized in Humans. *J Nutr* 2003; 133: 1806-1814.
51. Pang J, Cho Y, Park T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Arch Biochem Biophys* 2008; 476, 178-185.
52. Poquet L, Clifford MN, Williamson G. Investigation of the metabolic fate of dihydrocaffeic acid. *Biochemical Pharmacology* 2008; 75: 1218-1229.
53. Porrini M, Riso P. Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2008; 18:647-650.
54. Prior RL, Rogers TR, Khanal RC, Wilkes SE, Wu X, Howard L. Urinary excretion of phenolic acids in rats fed cranberry. *J. Agric. Food Chem* 2010; 58:3940–3949.
55. Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans C. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:220-235.
56. Rechner AR, Spencer JPE, Kuhnle G, Hahn U, Rice-Evans CA. Novel biomarkers of the bioavailability and metabolism of caffeic acid derivatives in humans. *Free Radic Biol Med* 2001; 1213-1222.
57. Rechner, A.R.; Smith, M.A.; Kuhnle, G.; Gibson, G.R.; Debnam, E.S.; Srai, S.K.; Moore, K.P.; C.A. Rice-Evans, Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products *Free Radical Biol. Metab.* 2004; 36: 212-225.
58. Renouf M, Guy PA, Marmet C, Fraering AL, Longet K, Moulin J, Enslen M, Barron D, Dionisi F, *et al.* Plasma appearance of phenolic acids after ingestion of coffee in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2010; 54:1–7.

59. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 2004; 27 (5): 771-780.
60. Singleton VL & Rossi JA, Jr. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965;16:144-158.
61. Spencer JP, Abd El Mohsen MM, Minihaane AM, Mathers JC. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J Nutr.* 2008;99(1):12-22.
62. Stalmach A, Mullen W, Barron D, Uchida K, Yokota T, Cavin C, Steiling H, Williamson G, Crozier A. Metabolite Profiling of Hydroxycinnamate Derivatives in Plasma and Urine after the Ingestion of Coffee by Humans: Identification of Biomarkers of Coffee Consumption. *Drug Metabolism and Disposition*; 2009; 37:1749–1758.
63. Stalmach A, Steiling H, Williamson G, Crozier A. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. *Arch. Biochem. Biophys.* 2010; 501(1):98-105.
64. Stein FLP, Fellow BS , Furlong EB, Soares AAS Soares MCF, Vaz MRC, Baisch ALM. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biol Res Nurs* 2005; 7(2):146-156.
65. Tahara T, Shibata T, Arisawa T, Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nagasaka M, Iwata M, Takahama K, Watanabe M, Hirata I. Impact of Catechol-O-methyltransferase (COMT) Gene Polymorphism on Promoter Methylation Status in Gastric Mucosa. *Anticancer Research* 2009; 29: 2857-2862.
66. Williamson G, Dionisi F, Renouf M. Flavanols from green tea and phenolic acids from coffee: Critical quantitative evaluation of the pharmacokinetic data in humans after consumption of single doses of beverages. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011; 55: 864–873.
67. Wolfram S, Weber T, Grenacher B, Scharrer E (1995) A Na(+)-dependent mechanism is involved in mucosal uptake of cinnamic acid across the jejunal brush border in rats. *J Nutr* 1995; 125(5):1300–1308.
68. Zhao Z, Egashira Y, Sanada H. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. *J Nutr* 2004; 134(11):3083–3088
69. Zhao Z, Moghadasian MH. Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. *Phytochem Rev* 2010; 9:133–145.

6 BIBLIOGRAFIA (Introdução)

1. Anesini C, Ferraro G, Filip R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. Food Chem 97 (3): 459-464, 2006.
2. Arçari DP, Bartchewsky W, Santos TW, Oliveira KA, DeOliveira CC, Gotardo EM, *et al.* Anti-inflammatory effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. Molecular and Cellular Endocrinology. 2011; 335(2):110-5.
3. Arçari DP, Bartchewsky W, Santos TW, Oliveira KA, Funckarvalho PO, Ribeiro ML, Antiobesity Effects of yerba maté Extract (*Ilex paraguariensis*) in High-fat Diet-induced Obese Mice. Obesity 2009, 17(12): 2127–2133.
4. Baisch ALM, Johnston FL, Stein P. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. J Ethnopharmacol 1998; 60: 133-139
5. Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Manólio RA, Torres, EAF. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. Acta Farm Bonaerense 2005; 24(1): 91-95
6. Bastos DHM, Ishimoto EY, Marques MOM, Ferri AF, Torres EAFS. Essential oil and antioxidant activity of green Mate and Mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. J Food Comp Anal 2006b; 19:538–43.
7. Bastos DHM, Oliveira DM, Matsumoto RLT, Carvalho PO, Ribeiro ML. Yerba maté: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology 2007a; 1(1):37-46.
8. Bastos DHM, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya HF, Cunha IBS, Carvalho PO, Eberlin MN. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) extracts. Molecules 2007b; 12: 423-432.
9. Borges MC. Efeito da ração hiperlipídica e do extrato aquoso de erva mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a composição corporal e sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoniais de ratos Wistar [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2011.
10. Bracesco N, Dell M, Rocha A, Behtas S, Menini T, Gugliucci A, Nunes E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. J Altern Complement Med 2003; 9: 379-387
11. Campos AM, Escobar J, Lissi EA. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguariensis* extracts and red wine. J Braz Chem Soc 1996; 7(1): 43-49.

12. Chandra S, Mejia EG. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex Paraguariensis*) and Green (Camellia sinensis) Teas. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 3583-3589.
13. Clifford MN. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med.* 2004; 70(12):1103-14.
14. Clifford, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 1999; 79:362-372.
15. Crozier A, Del Rio D, Clifford MN. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine* 2010; 31:446–467.
16. Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 2009, 26, 1001–1043.
17. D'Archivio M, Filesì C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità* 2007; 43:348-361.
18. De Maria CAB, Moreira RFA. Analytical methods for chlorogenic acid. *Quím. Nova.* 2004; 27: 586-592.
19. Ferruzzi MG. The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiology & Behavior* 2010; 100:33–41.
20. Filip R, Ferraro GE. Researching on new species of “Mate”: *Ilex brevicuspis* – Phytochemical and Pharmacology study. *European Journal of Nutrition.* 2003;42(1):50-54.
21. Filip R, Sebastian T, Ferraro G, Anesini C. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. *Food Chem Toxicol* 2007; 45:649-655.
22. Folch C. Stimulating consumption: Yerba Mate myths, markets, and meanings from conquest to present. *Comparative Studies in Society and History.* 2010;52:6-36.
23. Gorzalczy S, Filip R, Alonso MR, Mino J, Ferraro GE, Acevedo C. Choleretic effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *J Ethnopharmacol* 2001; 75(2-3):291-4.
24. Gugliucci A, Menini T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides*. *Life Sci* 2002; (71): 693-705.
25. Gugliucci A, Stahl AJC. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Mol Biol Int* 1995: 35:47-56.
26. Gugliucci A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidizability of human LDL in vivo. *Biochem and Biophys Res*, 1996; 224:338-344.

27. Heck CI and Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *J Food Sci* 2007; 72(9):138-151.
28. Heckman MA, Sherry K, de Mejia G. Energy drinks: an assessment of their market size, consumer, demographics, ingredient profile, functionality, and regulations in the United States. *Comprehensive reviews in food science and foos safety*. 2010; 9:303-317.
29. Jaiswal R, Sovdat T, Vivan F, Kuhnert N. Profiling and Characterization by LC-MSn of the Chlorogenic Acids and Hydroxycinnamoylshikimate Esters in Mate' (*Ilex paraguariensis*). *J Agric Food Chem* 2010; 58: 5471–5484.
30. Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* 2004; 80:15-21.
31. Kussmann M, Affolter M, Nagy K, Holst B, Fay LB. Mass spectrometry in nutrition: understanding dietary health effects at the molecular level. *Mass Spectrometry Reviews* 2007;26: 727– 750.
32. Lafay S, Gil-Izquierdo A, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *J Nutr* 2006; 136:1192-1197.
33. Lafay, S & Gil-izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem. Rev.* 2008; 7:301-311.
34. Lambert JD, Sang S, Lu AYH, Yang CS. Metabolism of dietary polyphenols and possible interactions with drugs. *Curr Drug Metab.* 2007;8:499–507.
35. Lanzetti M, Bezerra FS, Romana-Souza B, Brando-Lima AC, Koatz VLG, Porto LC, Valença SS. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Nutrition* 2008; 24:375–381.
36. Lunceford N & Gugliucci A. *Ilex paraguariensis* inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia* 2005; 76:419-427.
37. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 230S-242S.
38. Martínez-Huelamo M, Tulipani S, Torrado X, Estruch R, Lamuela-Raventós RM. Validation of a new LC-MS/MS method for the detection and quantification of phenolic metabolites from tomato sauce in biological samples. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60: 4542-4549
39. Mateos R, Goya L, Bravo L. Uptake and metabolism of hydroxycinnamic acids (chlorogenic, caffeic, and ferulic acids) by HepG2 cells as a model of the human liver. *J Agric Food Chem* 2006; 54(23):8724-8732

40. Matsumoto RLT, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky W, Ribeiro ML, Patrícia O Carvalho PO, Bastos DHM. Effects of maté tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and total antioxidant status in healthy young women. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 1775-1780.
41. Mejia EG, Song Y, Ramirez-Mares MV, Kobayashi H. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Proliferation. *J Agric Food Chem* 2005; 53:1966-1973
42. Menini T, Heck C, Shulze J, Mejia E, Gugliucci A. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high density lipoprotein. *Planta Med* 2007; 73: 1141-1147.
43. Milioli EM, Cologni P, Santo CC, Marcos TD, Yunes VM. Effect of Acute Administration of Hydroalcohol Extract of *Ilex paraguariensis* St Hilaire (Aquifoliaceae) in Animal Models of Parkinson's Disease. *Phytother Res* 2007; 21:771-776.
44. Miranda DDC, Arçari DP, Pedrazzoli Jr J, Carvalho PO, Cerutti SM, Bastos DHM, Ribeiro ML. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis* 2008; 23: 261-265.
45. Morais JAG, Lobato MR. The European Medicines Agency Guideline on the Investigation of Bioequivalence. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2010; 106: 221-225.
46. Mosimann AL, Wilhelm-Filho D, Silva EL. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Biofactors* 2006; 26: 59-70.
47. Oliveira DM, Freitas HS, Souza MF, Arçari DP, Ribeiro ML, Carvalho PO, Bastos DHM. Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic wistar rats. *J Agric Food Chem* 2008; 56:10527-10532.
48. Pang J, Cho Y, Park T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Arch Biochem Biophys* 2008; 476, 178-185.
49. Porrini M, Riso P. Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2008; 18:647-650.
50. Ramirez-Mares MV, Chandra S, Mejia EG. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinesis*, *Ilex paraguariensis* and *Adisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutat Res* 2004; 554: 53-65.
51. Rechner, A.R.; Smith, M.A.; Kuhnle, G.; Gibson, G.R.; Debnam, E.S.; Srai, S.K.; Moore, K.P.; C.A. Rice-Evans, Colonic metabolism of dietary polyphenols:

- influence of structure on microbial fermentation products *Free Radical Biol. Metab.* 2004; 36: 212-225.
52. Schinella GR, Troiani G, Dávila V, Buschiazzi PM, Tournier HA. antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem and Biophys Res Commun* 2000; 269:357-360.
 53. Stalmach A, Mullen W, Barron D, Uchida K, Yokota T, Cavin C, Steiling H, Williamson G, Crozier A. Metabolite Profiling of Hydroxycinnamate Derivatives in Plasma and Urine after the Ingestion of Coffee by Humans: Identification of Biomarkers of Coffee Consumption. *Drug Metabolism and Disposition*; 2009; 37:1749–1758.
 54. Stein FLP, Fellow BS, Furlong EB, Soares AAS, Soares MCF, Vaz MRC, Baisch ALM. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biol Res Nurs* 2005; 7(2):146-156.
 55. Williamson G, Dionisi F, Renouf M. Flavanols from green tea and phenolic acids from coffee: Critical quantitative evaluation of the pharmacokinetic data in humans after consumption of single doses of beverages. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011; 55: 864–873.
 56. Williamson G, Holst B. Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *British Journal of Nutrition* 2008; 99:S55-S58.
 57. Zamora-Ros R, Rabassa M, Llorach R, González CA, Andres-Lacueva C. Application of Dietary Phenolic Biomarkers in Epidemiology: Past, Present, and Future. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60: 6648–6657.
 58. Zhao Z, Moghadasian MH. Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. *Phytochem Rev* 2010; 9:133–145.

ANEXOS

ANEXO 1 – Cromatogramas

Cromatograma representativo UPLC-MS (Sinal 1, EIC m/z 353) dos fluidos e tecidos de ratos Wistar após ingestão de chá mate (2 g/kg). 1 = 3-CQA, 2=5-CQA, 3 = 4-CQA.

Cromatograma representativo UPLC-MS (Sinal 1, EIC m/z 353) dos fluidos e tecidos de ratos Wistar após ingestão de padrão de 5-CQA (240 mg/kg). 1 = 5-CQA.

Cromatograma representativo UPLC-MS (Sinal 1, EIC m/z 179) dos fluidos e tecidos de ratos Wistar após ingestão de chá mate (2 g/kg). 1= ácido caféico.

Cromatograma representativo UPLC-MS (Sinal 1, EIC m/z 179) dos fluidos e tecidos de ratos Wistar após ingestão de padrão de 5-CQA (240 mg/kg). 1 = ácido caféico.

Cromatograma representativo UPLC-MS (Sinal 2, TIC m/z 178, 193 e 134) dos fluidos e tecidos de ratos Wistar após ingestão de chá mate (2 g/kg). 1= ácido hipúrico, 2= ácido ferúlico, 3= ácido isoferúlico.

Cromatograma representativo UPLC-MS (Sinal 2, TIC m/z 178, 193 e 134) dos fluidos e tecidos de ratos Wistar após ingestão de padrão de 5-CQA (240 mg/kg). 1= ácido hipúrico, 2= ácido ferúlico.

Cromatograma representativo UPLC-MS (Sinal 3, TIC m/z 167, 152, 163 e 119) dos fluidos e tecidos de ratos Wistar após ingestão de chá mate (2 g/kg). 1= ácido m-cumárico, 2= ácido p-cumárico.

Cromatograma representativo UPLC-MS (Sinal 3, TIC m/z 167, 152, 163 e 119) dos fluidos e tecidos de ratos Wistar após ingestão de padrão de 5-CQA (240 mg/kg). 1= ácido p-cumárico, 2= ácido m-cumárico.

Cromatograma representativo UPLC-MS (Sinal 4, TIC m/z 181, 137, 93, 165 e 121) dos fluidos e tecidos de ratos Wistar após ingestão de chá mate (2 g/kg). 1= ácido 3-hidroxifenilpropiónico.

Cromatograma representativo UPLC-MS (Sinal 4, TIC m/z 181, 137, 93, 165 e 121) dos fluidos e tecidos de ratos Wistar após ingestão de padrão de 5-CQA (240 mg/kg). 1= ácido 3-hidroxifenilpropiónico.

Cromatograma representativo UPLC-MS (Sinal 1, EIC m/z 367) dos fluidos e tecidos de ratos Wistar após ingestão de chá mate (2 g/kg). 1= ácido feruloilquínico isômero 1 (FQA1), 2= ácido feruloilquínico isômero 2 (FQA2), 3= ácido feruloilquínico isômero 3 (FQA3) .

Cromatograma representativo UPLC-MS (Sinal 1, EIC m/z 367) dos fluidos e tecidos de ratos Wistar após ingestão de padrão de 5-CQA (240 mg/kg). 1= ácido feruloilquínico isômero 2 (FQA2), 2= ácido feruloilquínico isômero 3 (FQA3).

Cromatograma representativo UPLC-MS (Sinal 1, EIC m/z 515) dos fluidos e tecidos de ratos Wistar após ingestão de chá mate (2 g/kg) ou padrão de 5-CQA (240 mg/kg). 1= ácido dicafeoilquínico isômero 1 (diCQA1), 2= ácido dicafeoilquínico isômero 2 (diCQA2), 3= ácido dicafeoilquínico isômero 3 (diCQA3) .

ANEXO 2 - Carta de Aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 1º de abril de 2009.

Ilmo (a)

Daniela Moura de Oliveira

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número 037/2009 e intitulado “Estudo da biodisponibilidade de compostos fenólicos da erva mate (*Ilex paraguariensis*) in vitro e in vivo”, sob a orientação da Dra. Deborah H. Markowicz Bastos.

Atenciosamente,

Dr. Paulo Cotrim

Coordenador da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT

ANEXO 3 – Primeira página do currículo *lattes* da aluna

3/31/13

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Daniela Moura de Oliveira)

Daniela Moura de Oliveira

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8349871550457116>
 Última atualização do currículo em 11/01/2013

Possui graduação em Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa, é Mestre e Doutoranda pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, atuando principalmente nos seguintes temas: bioquímica da nutrição, propriedades funcionais de alimentos, assuntos regulatórios e suplementação dietética. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome Daniela Moura de Oliveira
Nome em citações bibliográficas OLIVEIRA, Daniela Moura de

Endereço**Formação acadêmica/titulação**

2011	Doutorado em andamento em Center for Human Nutrition, University of California, Los Angeles.
com período sanduíche em University of California, Los Angeles (Orientador: Susanne M. Henning).
Orientador: Susanne M. Henning.
Co-orientador: David Heber.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
2009	Doutorado em andamento em Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Estudo da biodisponibilidade dos compostos bioativos da erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>).
Orientador: Deborah Helena Markowicz Bastos.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
Palavras-chave: <i>Ilex Paraguariensis</i> ; Biodisponibilidade; ácidos clorogênicos.
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Bioquímica da Nutrição.
Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos.
2006 - 2008	Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 5).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Influência da ingestão de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>) sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus e metabolismo de glicose em ratos wistar, Ano de Obtenção: 2008.
Orientador: Deborah Helena Markowicz Bastos.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição.
Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos / Especialidade: Valor Nutritivo de Alimentos.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Bioquímica da Nutrição.
2001 - 2006	Graduação em Nutrição.

ANEXO 4 – Primeira página do currículo *lattes* da orientadora

3/31/13

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Deborah Helena Markowicz Bastos)

Deborah Helena Markowicz Bastos

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2399624390092442>

Última atualização do currículo em 10/03/2013

Graduada em Engenharia Agrônoma pela Universidade de São Paulo (1982), mestrado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (1989) e doutorado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (1996). Atualmente é Professor Associado da Universidade de São Paulo (obteve o título de Livre-Docente em dezembro de 2007). É docente colaborador do Mestrado Erasmus Mundus- FIPDes. É editor associado do periódico *Molecules* desde 2007. Atua como revisor de vários periódicos da área e como Assessor Científico de várias Instituições de fomento à pesquisa (FAPESP, FAPEMAT, CNPq). Tem experiência na área de Nutrição, com ênfase em Composição de Alimentos, atuando principalmente nos seguintes temas: análise e composição de alimentos, alimentos funcionais e compostos bioativos. Tem desenvolvido ações junto à FAO para a avaliação dos indicadores da biodiversidade da dieta. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Deborah Helena Markowicz Bastos
Nome em citações bibliográficas	Bastos, D.H.M.; Markowicz Bastos, D.H.; Bastos, D.M.; Bastos, Deborah H. Markowicz

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. Av. Dr. Arnaldo, 715 Cerqueira César 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617855 Ramal: 244 Fax: (11) 30626748
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2007	Livre-docência. Faculdade de Saúde Pública -USP. Título: Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>): compostos bioativos e funcionalidade, Ano de obtenção: 2007.
2008 - 2008	Pós-Doutorado. Touro University. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Alimentos Funcionais / Especialidade: Avaliação de atividade biológica de compostos bioativos de alimentos.
1993 - 1996	Doutorado em Engenharia de Alimentos (Conceito CAPES 7). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil. Título: Compostos voláteis de méis de eucalipto e laranja, Ano de obtenção: 1996. Orientador: Maria Regina Bueno Franco.