UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos e Nutrição Experimental
Área de Bromatologia

Efeito dos compostos fenólicos de frutas nativas brasileiras na glicemia pós prandial

Diully Mata Balisteiro

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Maria Inés Genovese Rodriguez

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos e Nutrição Experimental
Área de Bromatologia

Efeito dos compostos fenólicos de frutas nativas brasileiras na glicemia pós prandial

Versão original da Dissertação conforme Resolução CoPgr 5890.

Diully Mata Balisteiro

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Maria Inés Genovese Rodriguez

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Balisteiro, Diully Mata
B186e Efeito dos compostos fenólicos de frutas nativas brasileiras na glicemia pós prandial / Diully Mata Balisteiro. -- São Paulo, 2013.
88p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Genovese, Maria Inés

1. Alimento : Composto fenólico : Ciência dos alimentos 2. Flavonóides : Produtos naturais 3. Diabetes mellitus : Saúde pública 4. Frutas : Brasil 5. Antioxidante : Ciência dos alimentos I. T. II. Genovese, Maria Inés, orientador.

641 CDD

DIULLY MATA BALISTEIRO

Efeito dos compostos fenólicos de frutas nativas brasileiras na glicemia pós prandial

Comissão julgadora da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

_____

Profº. Dr. Maria Inés Genovese

Orientador

_____

Presidente

_____

1º examinador

_____

2º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2013

Dedico este trabalho ao meu esposo, Davidson

e aos meus pais, Deuce e Rotchild

pelo APOIO, AMOR e ENSINAMENTOS.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado de uma longa caminhada, da qual muitas pessoas fizeram parte. Agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não ocorrer o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

De modo especial, agradeço a Deus pelo presente da vida e por todas as oportunidades que me julgou capaz de receber.

À minha orientadora Prof. Dr. Maria Inés Genovese, por te acreditado no meu potencial. Agradeço por tudo o que aprendi e por todas as oportunidades que me foram dadas. Também sou grata pelo seu exemplo como pesquisadora, pela dedicação, paciência, incentivo, confiança e amizade. Muito Obrigada!

Agradeço aos meus amigos: Maria Cecília, Marcela Roquim, Gabriella Pedrosa, Alice Fujita, Any Elisa Gonçalves, Thiago Belchior, Helena Barros, Carlos Donado, Renata Araújo, Samires, Danilo, Flávia, Alexandre, Eliane, Melina, Michele, Kátia Callou, Emídio Matos, Luciana, João Pedro. Alguns já não estão mais presentes no dia a dia, mais a contribuição de vocês é inesquecível. Obrigada pela colaboração, convívio e pelos momentos de descontração. Também agradeço à Joana Santos, Lúcia Justino, Tania Shiga, Tatiana e Aline Oliveira pelo constante auxílio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Drª. Eliana Bistriche Giuntini, ao Drº Luciano Giacaglia e a prof. Drª Silvia Cozzolino pela participação na banca do meu exame de qualificação. Não posso esquecer toda a paciência e empenho em me auxiliar. As contribuições de vocês foram muito importantes para a realização deste trabalho. Aproveito para agradecer ainda aos professores do departamento, que de certa forma, contribuíram para a minha formação.

Muito obrigada aos funcionários do departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Ao pessoal da secretaria do departamento, Cléo, Edilson Feitosa, Mônica Dellis e Roberta, e da secretaria de pós-graduação, Jorge e Elaine, pelo apoio sempre tão importante.

Agradeço ao Douglas Bello pela pronta ajuda sempre, pelo fornecimento das frutas e polpas através do sítio do bello. Muito obrigada!

Agradeço à Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo, pela concessão de bolsa de mestrado, e pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa e suporte financeiro ao laboratório.

À minha família, minha mãe, minha grande amiga, pelo apoio e amor. Sempre tão batalhadora, se fez capaz de prover o sustento da nossa família e garantir tudo o que foi necessário para a minha formação. Agradeço não somente as coisas materiais que foram conseguidas com trabalho árduo, mas principalmente as noites mal dormidas, as preocupações, os conselhos, o colo, os abraços, as conversas... Ao meu esposo, meu companheiro, pelo incentivo e amor. Agradeço por tornar possíveis meus maiores sonhos e conquistas, pelo exemplo de dedicação e trabalho árduo. Agradeço-te por não permitir que eu desista e pela compreensão dos dias ausentes. Muito obrigada meu Amor! Ao meu irmão Rotchild, pelo incentivo e carinho. Ao meu pai pelo amor e carinho. Aos meus sogros, Marise e Manoelino, aos meus cunhados, Dayana, Alain e Gleidson, pelos incentivos e sábias palavras. São tantas as coisas que preciso agradecer, mas me faltam palavras. Vocês são os meus exemplo e tudo o que sou hoje, devo a vocês! Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos flavonóides (adaptado de CROZIER et al., 2009)..... 19

Figura 2: Glicemia pós prandial nos t = 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos das refeições testes: pão + sucos clarificados (300 mL) identificados na **Tabela 1** e do controle: pão + água (300 mL). Média ± desvio padrão (n = 23). O asterisco indica diferença estatisticamente significativa p<0,05... 57

Figura 3. A: ATG – Área sob a curva glicêmica; B: Dg – incremento absoluto da glicose; C: VIG – velocidade de incremento da glicose e D: PIg – incremento percentual da glicose. Refeição-controle (pão + água (300 mL)) e refeição-teste (pão + sucos clarificados das frutas nativas brasileiras estudadas (300 mL)). Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão (n = 23). Letras diferentes são significativamente diferentes (*p*<0,05). Asterisco(s) indica(m) diferença estatística em relação ao controle, onde * = *p*<0,05, ** = *p*<0,0024 e *** = *p*<0,0001..... 59

Figura 4: Porcentagem de aceitabilidade dos sucos através de escala hedônica; número de voluntários = 23..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação botânica das frutas utilizadas no estudo sobre o efeito dos sucos clarificados de frutas nativas brasileiras sobre a glicemia pós-prandial..... 45

Tabela 2. Teores de sólidos solúveis, sólidos totais, açúcares totais, fibras totais, acidez total e pH dos sucos clarificados das frutas nativas brasileiras estudadas..... 46

Tabela 3. Teores de minerais dos sucos clarificados das frutas nativas brasileiras estudadas, expressos em mg/300 mL..... 47

Tabela 4. Teores de fenólicos totais, proantocianidinas e teor de taninos totais das frutas nativas brasileiras estudadas..... 48

Tabela 5. Capacidade antioxidante dos sucos de frutas nativas brasileiras através dos métodos de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), capacidade sequestradora do radical estável DPPH e determinação do poder redutor do ferro (FRAP)..... 49

Tabela 6. Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre os métodos empregados para determinação da capacidade antioxidante e compost6os fenólicos dos sucos clarificados de frutas nativas brasileiras estudadas..... 51

Tabela 7: Composição e teores de compostos fenólicos dos sucos clarificados das frutas nativas brasileiras determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD)..... 52

Tabela 8. Efeito inibitório dos compostos fenólicos purificados a partir dos sucos clarificados, sobre a atividade da enzima α-amilase..... 54

Tabela 9. Efeito inibitório dos compostos fenólicos purificados a partir dos sucos clarificados, sobre a atividade da enzima α-glicosidase..... 55

Tabela 10. Valores de glicose basal (GB), tempo de pico glicêmico (TPg) e valor de pico da glicose (VPg), após consumo de um pão branco (tipo francês) e 300 mL de suco clarificado ou água (controle)..... 58

Tabela 11. Capacidade antioxidante do plasma (ORAC) e poder antioxidante de redução do Fe (FRAP) dos voluntários antes e após a ingestão da refeição-controle (pão + água) e da refeição-teste (pão + suco)..... 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: por cento

® : marca registrada

µ: micro

µg: micrograma

µM: micromolar

µmoles: micromoles

ATG: área total abaixo da curva de glicose

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

et al.: e colaboradores

FRAP: Poder redutor do ferro

g: grama

GB: glicose basal

H: hora

HCl: ácido clorídrico

IMC: índice de massa corporal

Kg/m^2: quilograma por metro quadrado

Kg: quilograma

L: litros

M: molar

mg Hb: miligrama de hemoglobina

mg/dL: miligrama por decilitro

Mg: miligrama

Min.: minuto

mL: mililitro

CEAGESP: Companhia de entrepostos e armazéns gerais de São Paulo

cm: centímetro

CUPUAMA: Cupuaçu do Amazonas Com. Ind. Exp. Ltda

Dg: incremento absoluto da glicose

DM: Diabetes mellitus

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

mM: milimolar

mmHg: milímetro de mercúrio

nm: nanômetro

nM: nanomolar

º C: grau Celsius

PAC: proantocianidinas

pH: potencial hidrogeniônico

PIg: incremento percentual da glicose

TPg: tempo de pico glicêmico

Trolox: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 – tetrametilcromana-2-carboxílico

VIg: velocidade de incremento da glicose

VPg: valor de pico da glicose

SUMÁRIO

1.Introdução 15

1.1. Atividade inibitória de α-glicosidase e α-amilase 21

1.2. Glicemia pós prandial 25

2. Objetivos 27

3. Materiais e métodos 28

3.1. Materiais 28

3.2. Métodos 29

3.2.1.Composição centesimal 29

3.2.1.1. Determinação de sólidos totais 29

3.2.1.2. Determinação de sólidos solúveis 29

3.2.1.3. Determinação do pontencial hidrogeniônico (pH) 29

3.2.1.4. Determinação de açúcares totais 29

3.2.1.5. Determinação de acidez total titulável 29

3.2.1.6. Determinação de fibras totais 30

3.2.1.7. Composição de minerais 31

3.2.2. Determinação dos teores de taninos totais 31

3.2.3. Quantificação das proantocianidinas 31

3.2.4. Determinação da capacidade redutora do Folin-Ciocalteu e teor de fenólicos totais 32

3.2.5. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* 33

3.2.5.1. Sequestro do radical DPPH• 33

3.2.5.2. Determinação do poder redutor do ferro (FRAP) 34

3.2.5.3. Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC) 34

3.2.6. Determinação de flavonóides e ácido elágico livre por CLAE 35

3.2.6.1. Obtenção dos extratos para análise de flavonoides e ácido elágico livre 35

3.2.6.2. Obtenção dos extratos para análise de ácido elágico total 35

3.2.6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 36

3.2.7. Determinação do teor de ácido ascórbico 36
3.2.8. Determinação da atividade inibitória da α-amilase e α-glicosidase *in vitro* 37
3.2.8.1. Obtenção da fração fenólica dos sucos clarificados 37
3.2.8.2. Determinação da atividade inibitória da α-amilase *in vitro* 37
3.2.8.2. Determinação da atividade inibitória da enzima α-glicosidase *in vitro* 39
3.3. Determinação do efeito sobre a glicemia pós prandial 40
3.3.1. Indivíduos e modelo experimental 40
3.3.2. Refeições teste 42
3.3.3. Análise de glicemia 42
3.4. Análise dos resultados 43
4. Resultados 44
4.1. Preparo e caracterização dos sucos 44
4.2. Efeito dos compostos fenólicos purificados na atividade enzimática da α-amilase e da α-glicosidase 53
4.3. Efeito dos sucos clarificados sobre a glicemia pós prandial 55
4.4. Capacidade antioxidante do plasma após consumo de suco clarificado 61
4.5. Aceitabilidade dos sucos clarificados de frutas nativas brasileira 62
5. Discussão 64
6. Conclusões 73
7. Referências bibliográficas 74
8. Anexos 88

RESUMO

BALISTEIRO, D.M. **Efeito dos compostos fenólicos de frutas nativas brasileiras na glicemia pós-prandial.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Algumas frutas nativas brasileiras podem ser consideradas excelentes fontes de compostos bioativos de natureza fenólica. Destacamos, dentre elas, o cambuci, o araçá, o camu-camu, a cagaita, algumas espécies de maracujá silvestres e a jabuticaba. Alguns destes compostos são capazes de inibir as enzimas do metabolismo de carboidratos *in vitro*. A inibição das enzimas α-amilase e α-glicosidase retardam e prolonga o tempo de digestão de carboidratos reduzindo, assim, a proporção e a velocidade de glicose absorvida e, consequentemente, o aumento brusco de glicose pós-prandial no plasma. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito de sucos clarificados de frutas nativas brasileiras sobre a glicemia pós-prandial em seres humanos, após consumo de uma unidade de pão branco (Tipo pão francês com aproximadamente 55 g), e estudar o efeito dos compostos fenólicos purificados a partir dos sucos sobre as enzimas α-amilase e α-glicosidase *in vitro*. Os resultados obtidos mostraram que todos os sucos clarificados, excetuando-se o de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip), tiveram efeito positivo sobre a glicemia pós-prandial, causando redução da quantidade total de glicose absorvida (cambuci (*campomanesia phae* O.Berg.), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC), camu-camu (*Myciaria dúbia* Mc Vaugh) e araçá (*Psidium guineensis* Sw)), aumento no tempo para atingir a concentração sanguínea máxima de glicose (camu-camu e cambuci), diminuição na velocidade de incremento da glicose (cambuci, cagaita, camu-camu, araçá e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg)) e diminuição do incremento percentual da glicose (todos os sucos exceto o de maracujá-alho). O consumo dos sucos causou ainda aumento da capacidade antioxidante do plasma. Os compostos fenólicos purificados a partir dos sucos testados foram capazes de inibir a atividade das enzimas α-amilase e α-glicosidase *in vitro*, sendo que, excetuando-se o suco de jabuticaba, todos foram mais eficientes que a acarbose na inibição da α-glicosidase.

PALAVRAS-CHAVE: frutas nativas, compostos fenólicos, glicemia pós-prandial.

ABSTRACT

BALISTEIRO, D.M. **Efeito dos compostos fenólicos de frutas nativas brasileiras na glicemia pós-prandial.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Some native Brazilian fruit can be considered excellent sources of bioactive compounds of phenolic nature. Featuring, among them, the cambuci, the araça, camu-camu, the cagaita, some species of wild passion and jabuticaba. Some of these compounds are able of inhibiting the enzymes of carbohydrate metabolism *in vitro*. Inhibition of the enzymes α-amylase and α-glycosidase slow and prolongs the digestion of carbohydrates, thus reducing the rate and velocity of glucose absorbed and therefore the sudden increase of postprandial glucose in plasma. The objectives of this study were to evaluate the effect of fruit juices clarified Brazilian native on postprandial glycemia in humans following consumption of a unit of white bread (French bread type with approximately 55 g), and study the effect of phenolic compounds purified from the juices of the enzymes α-amylase and α-glucosidase *in vitro*. The results showed that all juices clarified, except the passion fruit garlic (*Passiflora tenuifila* Killip), had a positive effect on postprandial glycemia, causing reduction in the total amount of glucose absorbed (cambuci (*Campomanesia phae* O.Berg .), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC), camu-camu (*Myciaria dubious* Mc Vaughn) and araça (*Psidium guineensis* Sw)), increase in the time to reach maximum blood concentration of glucose (camu-camu and cambuci), decrease in speed of glucose increment (cambuci, cagaita, camu-camu, araça and jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg)) and decreased percentage increase in glucose (all except the passion garlic fruit juices). The consumption of juice also caused an increase in plasma antioxidant capacity. Phenolic compounds purified from the juices tested were able to inhibit the activity of enzymes α-amylase and α-glycosidase *in vitro*, and, except for the juice jabuticaba, all were more efficient than acarbose in inhibiting α- glycosidase.

KEYWORDS: native fruits, phenolic compounds, postprandial glycemia.

1. Introdução

As dietas ricas em frutas e vegetais, e, por conseguinte, em compostos fenólicos, diminuem o risco de doenças cardiovasculares e câncer. Contudo, a dieta atual das populações humanas é pouco diversificada e pobre em alimentos de origem vegetal, visto que existem mais de 200 mil plantas conhecidas, e que, nas eras paleolítica e neolítica, seu consumo era significativo - cerca de 3.000 e 200 espécies de plantas faziam parte da dieta humana diária, respectivamente. Atualmente, 13 vegetais destacam-se, mas apenas 8 integram a dieta habitual destas populações (CORDAIN, 1999; DIAMOND, 2002). O consumo variado de frutas e vegetais garante o aporte de micronutrientes adequado para suprir as necessidades nutricionais de um indivíduo. Os nutrientes das frutas e vegetais, principalmente os metabólitos secundários, são altamente influenciados pelo cultivo orgânico ou convencional, clima, período do ano entre outros fatores, como exemplo temos o tomate, a pimenta (CHASSY et al., 2006), a soja (BALISTEIRO, ROMBALDI e GENOVESE, 2012) entre outros alimentos.

O processo de domesticação consiste em um conjunto de medidas adotadas pelo homem para adequar as espécies às suas necessidades, de forma consciente ou não. Atualmente o homem desenvolve o trabalho de domesticação de forma científica, isto é, realiza melhoramento genético das espécies de interesse para chegar ao objetivo final de forma eficiente. Poucas plantas brasileiras foram domesticadas e grande parte das plantas cultivadas em território nacional é exótica, sendo raras as exceções. Os maiores esforços para domesticação de espécies nativas foi iniciado somente no século XX. Contudo, muitas plantas continuam a ser

exploradas de forma extrativista, como acontece com muitas frutíferas do Cerrado brasileiro (JUNQUEIRA et al., 2008; DEAN, 1991).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo. A produção brasileira de frutas é de cerca de 41,1 milhões de toneladas (IBRAF, 2007). As exportações brasileiras de frutas, polpas e sucos tiveram uma evolução, entre 2002 e 2009, de 16,6% ao ano (NOGUEIRA e SANTANA, 2009). Ainda, as condições climáticas brasileiras favorecem uma grande diversidade de espécies frutíferas tropicais nativas (BRASIL, 2007). As 20 frutas mais consumidas no Brasil são abacate, abacaxi, banana, caqui, coco-da-baía, figo, goiaba, laranja, limão, mamão, manga, maracujá, marmelo, maçã, melancia, melão, pera, pêssego, tangerina e uva, destas apenas 3 são nativas brasileiras, o abacate, a goiaba e o abacaxi (IBRAF e IBGE, 2012).

No Brasil, os sucos integrais são uma tradição, sendo envasados em garrafas de vidro, em embalagens cartonadas ou, mais recentemente, em embalagens de poliestireno tereftalato (PET). É bem conhecido que as composições de sucos de frutas variam de acordo com variedades ou espécie de fruta, com maturidade, e como resultado de efeitos ambientais e climáticos da estação de crescimento. Entre as principais características desejáveis para uma cultivar visando o mercado de frutas estão a produtividade, o tamanho e equilíbrio açúcares/acidez dos frutos (ROSA, COSENZA e LEÃO, 2006).

As frutas possuem um grande valor nutricional, com vitaminas, sais minerais, antioxidantes, açúcares naturais, compostos fenólicos que auxiliam na prevenção e no combate de doenças. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011) indicam que o consumo inadequado de frutas e hortaliças está entre os dez principais fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis (DCNT).

As frutas são fontes de vitaminas e minerais essenciais para o metabolismo, construção e reparo de tecidos, produção de energia é funcionamento do sistema nervoso. As vitaminas são classificadas como lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) e hidrossolúveis (Vitamina C e do complexo B). Os minerais são substâncias inorgânicas que ajudam a regular as funções do corpo. Podem ser classificados como eletrólitos (potássio, cloro e sódio), macrominerais (cálcio, fósforo, magnésio, enxofre), microminerais ou elementos-traço (ferro, zinco, cobre, iodo, cromo, selênio, manganês, molibdênio, níquel) e elementos ultratraços (flúor, cobalto, silício, vanádio, estanho, chumbo, mercúrio, boro, lítio, estrôncio, cádmio, arsênio) (MANGANARO, 2008).

Os compostos fenólicos, encontrados na forma de ésteres ou heterosídeos, representam a maior categoria de agentes fitoquímicos e distribuem-se abundantemente no reino vegetal, e são encontrados sob a forma de ésteres ou de heterosídeos. São derivados das vias bioquímicas do ácido chiquímico e dos fenilpropanoides. Os grupos de fenólicos mais abundantes na dieta humana são: flavonoides, polifenóis (taninos) e ácidos fenólicos. Os ácidos fenólicos incluem os ácidos benzoicos e seus derivados (hidroxibenzoico, vanílico, gálico etc.) e os ácidos cinâmicos e seus derivados (cumárico, ferúlico, cafeico etc.). Os taninos são polímeros de alto peso molecular e dividem-se em taninos hidrolisáveis (polímeros de ácido gálico ou elágico), presentes em frutas como o morango e nas nozes, e taninos condensados (polímeros de catequina ou epicatequina) (SERRANO et al., 2009; FELDMAN, 2005). Os compostos fenólicos são, em geral, antioxidantes potentes. Diversas evidências sugerem que o risco de doenças causadas pelo estresse oxidativo em sistemas biológicos pode ser diminuído pela ingestão de

antioxidantes naturais encontrados na dieta humana, principalmente compostos fenólicos (CROZIER et al., 2009; SCALBERT et al., 2005; MANACH et al., 2004).

A ação antioxidante ocorre tanto pela inibição da formação dos radicais quanto pela eliminação dos radicais formados. A neutralização se dá pela doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a cadeia reacional. O potencial antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente à primeira atuação, sequestrando radicais livres e quelando metais. Os antioxidantes, como os flavonoides, possuem diversas duplas conjugadas em ressonância e hidroxilas que são capazes de estabilizar a carga positiva oriunda da perda do próton. Quanto maior a quantidade de hidroxilas e de ligações olefínicas adicionais no anel C, mais potencializada será sua capacidade antioxidante (NAKAMURA et al., 2003).

Os compostos fenólicos apresentam estrutura química de 15 átomos de carbono, ou seja, 2 anéis de benzeno (anéis A e B) ligados por um grupo pirano (anel C). A estrutura química dos flavonóides favorece sua ação antioxidante. Os hidrogênios dos grupos hidroxilas adjacentes (orto-difenóis), localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da função oxo (-C=O) de algumas moléculas de flavonóides fornecem a estes compostos alta atividade antioxidante (TAPAS et al., 2008). Muitos ocorrem naturalmente como flavonóides glicosilados, e os carboidratos mais encontrados são D-glicose, L-ramnose, glicoramnose, galactose e arabinose (KING; YOUNG, 1999). Conforme ilustrado na **Figura 1** os compostos fenólicos dividem-se de acordo com o número de anéis fenólicos e com os elementos ligados a estes anéis (BURNS et al., 2001). Os flavonóides são subdivididos em 6 classes: flavonas, flavanóis, flavanonas, isoflavonas, flavonóis (tais como quercetina e caempferol) e antocianinas. As flavonas são as miricetina, quercetina, caempferol, isorhamnetina e

morina, as quais existem nas formas de agliconas e conjugadas com o açúcar. Os flavanóis, (+)-catequina e (-)-epicatequina e as antocianinas, por exemplo, malvidina-3-glicosídeo (MANACH et al., 2004). Os taninos são polímeros de alto peso molecular e são divididos em três classes: taninos hidrolisáveis, taninos condensados e os taninos complexos (COS et al., 2003; KING; YOUNG, 1999).

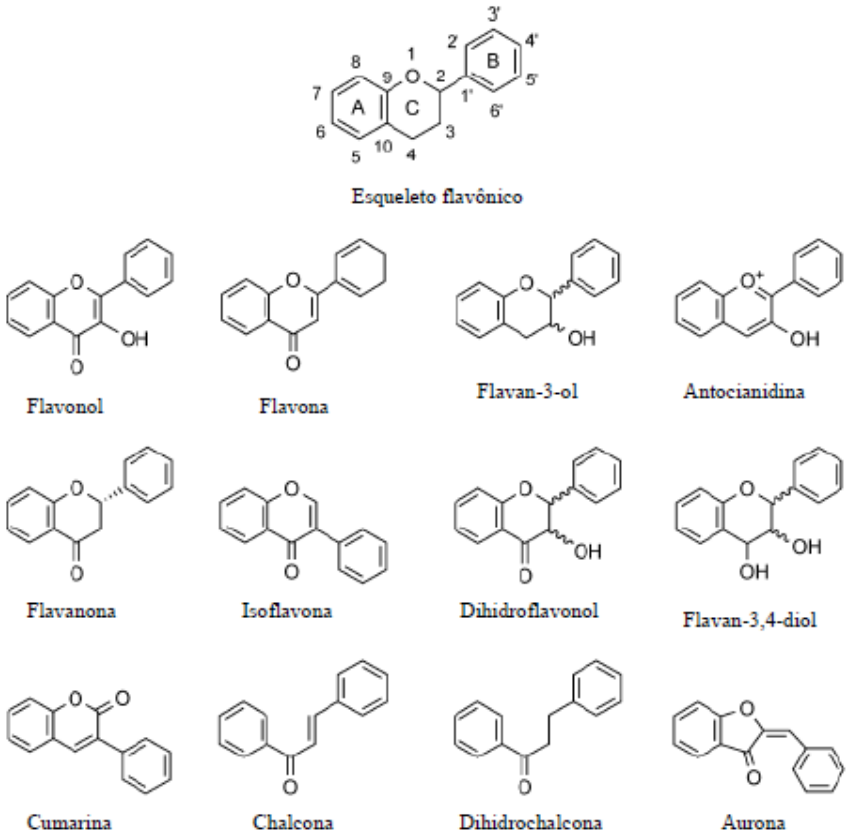

Figura 1: Estrutura química dos flavonóides (adaptado de CROZIER et al., 2009).

Proantocianidinas são oligômeros de flavonoides, especialmente os flavan-3-ol: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina e (-)-epigalocatequina galato. Grande parte da literatura de taninos condensados refere-se apenas às proantocianidinas oligoméricas, devido à dificuldade de analisar moléculas com alto grau de polimerização. A falta de dados sobre a composição de

taninos deve-se, ainda, à ausência de padrões comerciais, à distribuição irregular nos tecidos, e à variação sazonal e no processamento (COS et al., 2003).

A maior parte dos polifenóis da dieta é metabolizada pela flora intestinal antes de serem absorvidos, ao passo que alguns polifenóis são absorvidos diretamente pelo trato gastrointestinal (SELMA; ESPIN; TOMAS-BARBERAN, 2009). O metabolismo dos polifenóis ocorre via diversos mecanismos: a hidrólise, a redução, a descarboxilação, a desmetilação e a clivagem de ligações. O metabolismo pela flora intestinal é fundamental para a absorção e também para a modulação da atividade biológica do composto (LILA, 2007; LIU, 2003). Wang et al. (2011) identificaram uma ligação direta entre a flora intestinal, dieta e risco de doença cardiovascular (DCV), do mesmo modo a flora intestinal tem sido implicado no desenvolvimento de alguns fenótipos metabólicos, tais como a obesidade e a resistência a insulina. Portanto, dependendo da flora intestinal estabelecida no organismo, haverá uma maior ou menor propensão ao desenvolvimento da inflamação subclínica, da resistência à insulina e obesidade (DUMAS et al., 2006; LEY et al., 2006).

A flora intestinal possui a capacidade de extrair mais ou menos energia dos alimentos, pois contém enzimas capazes de digerir carboidratos complexos facilitando sua absorção. O amido e a sacarose são os carboidratos mais importantes da dieta, pois são considerados fontes primárias de energia para o organismo. Sua digestão, absorção e metabolismo também podem ser influenciados pelos polifenóis e seus metabólitos. Por exemplo, alguns destes compostos são capazes de inibir as enzimas do metabolismo de carboidratos *in vitro* (PINTO et al., 2008, 2009; RANILLA et al., 2008, 2009). O potencial inibitório destes na prevenção/tratamento do diabetes mellitus tipo 2 é grande e é discutido a seguir.

1.1. Atividade inibitória dos polifenóis sobre a α-glicosidase e a α-amilase

O Diabetes Mellitus é uma doença metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica e distúrbios no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios, resultado da deficiência na secreção de insulina, da insensibilidade do receptor de insulina, ou de ambos (WHO, 2011). O diabetes mellitus tipo 1 é uma doença auto-imune, caracterizada pela destruição das células beta produtoras de insulina. A existência de alguns genes que predispõe à doença ainda é controversa, uma vez que pessoas portadoras destes mesmos genes não a desenvolvem. A diabetes tipo 2 possui um fator hereditário mais efetivo do que o tipo 1, além de guardar forte relação com a obesidade e o sedentarismo (síndrome metabólica). Estima-se que 60 a 90% dos portadores de diabetes tipo 2 sejam obesos e a ocorrência é maior após os 40 anos de idade. Este tipo de diabetes é cerca de 8 a 10 vezes mais comum que o tipo 1 e responde bem ao tratamento com dieta e exercício físico (ADA, 2012).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a taxa de prevalência do diabetes é alarmante, tendo cerca de 366 milhões de pessoas em todo o mundo no ano de 2011, e estima-se que este valor se elevará para, no mínimo, 366 milhões em 2030. No Brasil, a projeção é de 4,5 milhões para 11,3 milhões, no mesmo período, tornando-se o oitavo país no mundo com maior número de pessoas com diabetes (WHO, 2011). Complicações como retinopatia, nefropatia e neuropatia, desenvolvidas por indivíduos diabéticos, resultam do estresse oxidativo gerado por episódios de hiperglicemia, causando dano celular, seguidos de peroxidação lipídica e inativação de proteínas (HUXLEY et al., 2011). Apesar de mecanismos não esclarecidos e poucos estudos relatados, as hipóteses salientam que a alta

capacidade antioxidante de compostos fenólicos, principalmente dos flavonoides, também pode ser efetiva na redução do estresse oxidativo e progressão da diabetes mellitus e hipertensão (SONG et al., 2005; KNOW et al., 2006).

Ainda no que diz respeito ao metabolismo sanguíneo, a hiperglicemia pós-prandial, quando ocorre com elevada recorrência, pode causar dano às células β. Estas células são responsáveis pela produção e liberação da insulina. O dano a estas células terá como consequência a diminuição progressiva da secreção deste hormônio (YAMAMOTO et al., 2008)

O tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) visa manter o controle glicêmico adequado através de uma dieta hipocalórica, do aumento da prática de exercícios físicos ou do uso de medicações. Devido à gravidade da doença e aos efeitos colaterais da terapia tradicional, a busca por terapias alternativas que possam ser adjuvantes ao tratamento da DM2 é imprescindível. Neste contexto, os inibidores naturais de α-amilase e α-glicosidase surgem como aliados promissores, pois são capazes de diminuir a absorção da glicose e, consequentemente, de reduzir a glicemia pós-prandial (GROVER et al., 2002; ELSENHANS e CASPARY, 1987).

A principal fonte de glicose presente no sangue são os carboidratos da dieta, como o amido, que são hidrolisados pelas duas principais enzimas digestivas, α-glicosidase e α-amilase. A α-glicosidase situa-se na membrana ciliada do intestino delgado e promove a conversão do amido e da sacarose (clivagem das ligações α-1,4 e α-1,6) em moléculas de glicose para facilitar a absorção. A α-amilase está presente na saliva e no suco pancreático e é responsável por clivar as ligações α-1,4 de amilose, liberando dextrina, maltose e maltotriose (BISCHOFF, 1994). A inibição destas enzimas retarda o tempo de digestão de carboidratos reduzindo,

assim, a proporção de glicose absorvida e, consequentemente, o aumento brusco de glicose pós-prandial no plasma (TOELLER, 1994). A acarbose é o único medicamento inibidor da α-glicosidase no Brasil, e sua ação consiste em retardar a absorção intestinal de glicose. Contudo, tem baixo potencial de redução da hemoglobina glicada e apresenta como efeito colateral a intolerância intestinal. Sua eficácia está associada ao uso pré-prandial para prevenção da hiperglicemia pós-prandial (PISTROSCH et al., 2009; BISCHOFF, 1991; ELSENHANS e CASPARY, 1987).

Vários são os mecanismos implicados na homeostase glicêmica, um destes mecanismos diz respeito aos efeitos dos hormônios incretinas *glucagon-like peptide* (GLP-1) e *glucose-dependent insulinotropic polypeptide* (GIP). As incretinas fazem parte do eixo enteroinsular, são liberadas pelo trato gastrointestinal e potenciam a ação da insulina de forma dependente da glicose. No DM2 o efeito incretina está diminuído ou mesmo abolido, havendo diminuição da secreção do GLP-1 e perda da ação glucoregulatória do GIP. As incretinas são extensa e rapidamente degradadas pela enzima *dipeptidyl peptide protease 4* (DPP-4) ubiquitária no organismo que explica a semi-vida muito curta destes hormônios (GIP: 5-7 min. e GLP: 1-2 min.). Portanto o uso das incretinomiméticos e inibidores da DPP-4 são uma nova classe terapêutica para o tratamento do diabetes, cujo mecanismo inclui o estímulo das células beta para aumentar a síntese de insulina e a ação nas células alfa do pâncreas reduzindo a produção de glucagon. Este medicamento tem um potencial médio de redução da hemoglobina glicada, não causam hipoglicemia e apresentam pouca intolerância gastrointestinal. Os incretinomimétricos são injetáveis e os inibidores da DPP-4 são para uso oral. No entanto, apesar destes agentes terem sido já aprovados para o tratamento da DM2 pelas autoridades regulatórias, eles

têm ainda um longo caminho a percorrer até que os estudos clínicos estabeleçam com mais certeza os seus reais benéficios, efeitos extra glicêmicos, perfil de segurança e as vantagens e desvantagens face aos antidiabéticos orais classicamente utilizados (SALEHI, AULINGER e D'ALESSIO, 2008; HOLST et al., 2008; DE LÉON et al., 2006; DEACON, 2005).

As plantas apresentam compostos com atividade inibitória de enzimas, entre os quais estão os polifenóis e as glicoproteínas (TUNDIS et al., 2010). Por exemplo, teaflavinas e catequinas presentes em chás verdes e pretos inibem a ação da α-glicosidase e da α-amilase *in vitro* (KOH et al., 2010). Neste contexto, McDougall e Stewart (2005) destacam as antocianinas como bons inibidores de α-glicosidase.

Os efeitos dos polifenóis sobre o controle glicêmico podem ocorrer através da inibição da atividade das enzimas α-amilase e da α-glicosidase (TADERA et al., 2006; LO PIPARO et al., 2008), da inibição da absorção da glicose no intestino (JOHNSTON, CLIFFORD, MORGAN, 2003, 2002), da proteção das células-β (KIM et al., 2007), do aumento da secreção de insulina, do aumento da captação de glicose pelos tecidos muscular (ZHANG et al., 2010) e adiposo (FANG; GAO; ZHU, 2008), da supressão da enzima de gliconeogênese (WOLFRAM et al., 2006) e da ativação da AMPK hepática (COLLINS et al., 2007). Além disso, a alta capacidade antioxidante dos flavonóides, em geral, também pode ser efetiva na redução do estresse oxidativo e da progressão e das complicações crônicas do diabetes mellitus (SONG et al., 2005; KWON et al., 2006).

1.2. Glicemia pós-prandial

Após uma refeição, a elevação dos níveis de glicose sanguínea resultante é contrabalanceada pela liberação de insulina em duas fases: uma mais rápida e outra mais lenta, a qual tem como função proporcionar atividade insulínica mais prolongada (MILECH et al., 2001). O nível de glicemia começa a aumentar dez minutos após a ingestão de alimentos, atinge os seus valores máximos em 30 minutos e habitualmente retorna aos níveis basais em 120 minutos (BRAND-MILLER et al., 2009; GROSS; FERREIRA; OLIVEIRA, 2003).

Eventos pós-prandiais, incluindo a glicemia pós-prandial, têm sido apontados como indicadores de risco cardiovascular e como fatores limitantes importantes para se atingir o bom controle metabólico em pacientes diabéticos (JOSSE et al., 2007). Estudos têm demonstrado que um dos problemas do controle primário da glicose em pacientes com DM2 encontra-se nos níveis de glicose pós-prandial. Dessa forma, os esforços são dirigidos para o controle dietético, que constitui a base da terapia desses pacientes. Entretanto, nem mesmo a rígida obediência à dieta alimentar é capaz de impedir a hiperglicemia pós-prandial a longo prazo em muitos desses pacientes. Nos pacientes com DM2, a resposta pós-prandial anormal é causada por alterações na secreção da insulina, pela utilização periférica inadequada de glicose (resistência insulínica) e pela inabilidade de supressão adequada da produção de glicose hepática (MILECH et al., 2001).

Os efeitos dos polifenóis presentes na dieta sobre a glicemia pós-prandial têm sido investigados em estudos com animais e com humanos. A estratégia utilizada para avaliar tais efeitos em animais consiste em isolar ou purificar os compostos fenólicos. Por exemplo, o uso de uma fração de compostos fenólicos da acerola,

contendo antocianinas, após a administração de maltose ou glicose, reduziu significativamente a glicose plasmática em camundongos, indicando que houve inibição da α-glicosidase (HANAMURA et al., 2006). Em estudo realizado por Johnston, Clifford e Morgan (2002) após a ingestão de 400 mL de suco de maçã contendo polifenóis e 25 g de glicose, observou-se redução significativa da concentração de glicose sanguínea (t = 15 e 30 min) em relação ao controle. Em outro estudo, uma fase de absorção intestinal de glicose mais longa foi observada, através da análise do perfil do hormônio gastrointestinal GLP-1, após o consumo de 400 mL de café contendo 350 mg de ácido clorogênico (JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2003).

Resultados prévios obtidos em nosso laboratório (GONÇALVES et al., 2010) mostraram que diversos frutos nativos brasileiros da Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado, ricos em antioxidantes fenólicos, são capazes de inibir *in vitro* as enzimas do metabolismo de carboidratos. Esses dados, em conjunto, justificam a ampliação dos estudos sobre essas frutas. A literatura científica apresenta numerosas evidências do potencial dos compostos fenólicos em reduzir a digestão e a absorção de carboidratos e de promover a redução dos episódios de hiperglicemia pós-prandial.

1. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar o efeito de sucos clarificados de frutas nativas brasileiras sobre a glicemia pós-prandial em seres humanos após o consumo de pão branco (aproximadamente 55 g);

- Caracterizar os sucos clarificados das frutas nativas brasileiras em relação ao conteúdo de fibras totais, açúcares totais, sólidos solúveis e totais, pH, acidez total, fenólicos totais, proantocianidinas, taninos totais, elagitaninos, flavonóides e capacidade antioxidante *in vitro*;

- Estudar o efeito dos compostos fenólicos purificados a partir dos sucos clarificados de frutas nativas brasileiras sobre as enzimas α-amilase e α-glicosidase *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

As frutas e as polpas congeladas, prontas para o consumo, foram adquiridas em três estabelecimentos comerciais no Brasil: na CEAGESP, no Sítio do Bello (São Paulo, Brasil) e na Cupuama® - Cupuaçu do Amazonas Comercio, Industria e exportação Ltda (Amazonas, Brasil). Foram estudadas as seguintes frutas: a jabuticaba (CEAGESP – adquirida fresca em 06/07/2011), a polpa congelada do camu-camu (Cupuama – data de fabricação: 08/03/2011), a polpa congelada do cupuaçu (Cupuama – data de fabricação: 20/03/2011), o maracujá-alho (EMBRAPA – adquirido fresco em 12/11/2010), o cambuci (Sítio do Bello – adquirido fresco em 20/05/2011), a polpa congelada da cagaita (Sítio do Bello – data de fabricação: 05/12/2010) e a polpa congelada do araçá (Sítio do Bello – data de fabricação: 20/04/2011).

A clarificação, processo que torna o suco límpido, fez-se necessária para a eliminação da fração fibra destes sucos, já que, sabidamente, as fibras solúveis como o β-glucano, pectina, inulina e goma-guar diminuem absorção dos carboidratos da dieta se administrados em doses suficientes, reduzindo a glicemia pós-prandial (SLAVIN, 2005; ANDERSON et al., 2004). Desta forma pôde-se avaliar o efeito isolado dos compostos fenólicos na glicemia pós-prandial.

3.2. Métodos

3.2.1. Composição centesimal

3.2.1.1. Determinação de sólidos totais. Amostras de aproximadamente 5 g de suco clarificado, em triplicata, foram pesadas em cadinhos de alumínio, previamente tarados, e colocadas em estufa a 105 ºC por 24 horas. Os dados foram expressos em g por 100 mL de suco clarificado.

3.2.1.2. Determinação de sólidos solúveis. O teor de sólidos solúveis foi determinado por refratometria, utilizando-se um refratômetro digital (REICHERT ANALYTICAL INSTRUMENTS). Os resultados foram expressos em º Brix.

3.2.1.3. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH). O pH dos sucos clarificados foi determinado utilizando-se um potenciômetro digital (HANNA INSTRUMENTS) calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

3.2.1.4. Determinação de açúcares totais. Os açúcares totais foram determinados segundo a metodologia descrita por Dubois et al. (1956) e modificada por Johnson et al. (1966) utilizando espectrofotômetro (HITACHI mod.U-1100). As leituras foram feitas em comprimento de onda de 490 nm. Para obtenção da curva padrão, foram utilizadas soluções de glicose (1%) em água.

3.2.1.5. Determinação da acidez total titulável. A acidez total titulável foi determinada segundo a técnica descrita pela (AOAC, 1995), por titulometria utilizando-se 10 mL de suco. A titulação foi feita com uma solução de NaOH 0,5 M e

usando fenolftaleína (1%) como indicador, sendo o resultado expresso em g de ácido cítrico por 100 mL de suco.

3.2.1.6. Determinação de fibras totais. As fibras totais foram determinadas segundo o método descrito pela AOAC (AOAC, 1995). Em um recipiente foram misturados suavemente 0,5 g de amostra seca e 25 mL de água. O recipiente foi posteriormente envolvido em papel alumínio e incubado a 37 ºC por 90 minutos. Após a incubação, 100 mL de etanol foram adicionados e a mistura permaneceu em repouso por 1 hora a temperatura ambiente (25 ºC). A mistura foi filtrada a vácuo (filter aid - CELITE) e o sedimento recolhido em cadinho previamente pesado. O sedimento foi lavado 2 vezes com 20 mL de etanol (78%), 2 vezes com 10 mL etanol e 1 vez com 10 mL de acetona. Após a lavagem, o conjunto (cadinho e sedimento) foi colocado em estufa a 105 ºC por 2 horas. Após o resfriamento em dessecador, efetuou-se a pesagem. Uma parte do sedimento foi colocada em mufla a 525 ºC por 5 horas para determinação de cinzas, resfriada e pesada. A outra parte do sedimento foi utilizada para determinação do teor de proteínas pelo método de micro Kjeldahl usando o fator %N x 6,25.

$$\% = 100 \times \left(\frac{\left\{ \frac{Pr - [(P + A) \times Pr]}{100} \right\}}{Ps} \right)$$

Onde:

Pr = mg resíduo

P = % proteína

A = % de cinzas no sedimento

Ps= mg amostra

3.2.1.7. Composição mineral. Os teores dos seguintes minerais foram determinados para definir a composição mineral das frutas e polpas comerciais estudadas: sódio, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, zinco, ferro, manganês, cobre e selênio. Para a quantificação destes minerais, as amostras, inicialmente, foram submetidas a um processo de digestão ácida por 24 horas. A quantificação de sódio e potássio foi realizada por fotometria de emissão de chamas, e os demais minerais por espectrofotometria de absorção atômica (MALAVOLTA, VITTI e OLIVEIRA, 1997).

3.2.2. Determinação dos teores de taninos totais. O conteúdo de taninos totais foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de Hagerman e Butler (1978). O ensaio é baseado na precipitação com albumina de soro bovino (BSA). Os extratos metanólicos diluídos adequadamente (1 mL) foram misturados com 2 mL de BSA (1 mg/mL) e deixados em repouso por 15 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 4 mL de uma solução de dodecil sulfato de sódio. Em seguida, 1 mL do reagente de cloreto férrico foi adicionado. Após 20 minutos, procedeu-se a leitura das absorbâncias a 510 nm utilizando-se espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os resultados foram expressos em mg ácido tânico por 300 mL de suco clarificado.

3.2.3. Quantificação das proantocianidinas – Método do butanol acidificado. O método do butanol acidificado utilizado para a quantificação das proantocianidinas foi o método cromogênico descrito por PORTER et al. (1986). Inicialmente, foi preparada uma solução de n-butanol e ácido clorídrico concentrado na proporção

3:2 , e, depois, 77 mg de sulfato de ferro hidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) foram dissolvidos em meio litro desta solução. E, seguida, uma alíquota de 2,5 mL desta solução foi adicionada a 250 µL do suco devidamente diluído em um tubo de ensaio. A curva padrão foi preparada com tanino de quebracho (QT, Unitan, Buenos Aires, Argentina) utilizando-se concentrações entre 0 e 2,4 mg/mL. Os tubos foram tampados e permaneceram em banho a 95 ºC por 15 minutos; então, após leve agitação, sua absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm em cubeta de vidro (caminho ótico de 1 cm). A concentração de proantocianidinas foi calculada com base na curva padrão e expressa em g equivalentes de tanino quebracho por 300 mL de suco clarificado.

3.2.4. Determinação da capacidade redutora do Folin-Ciocalteu e teor de fenólicos totais. Foi realizada de acordo com Singleton et al., 1999 com modificações (GENOVESE et al., 2003), utilizando-se 0,25 mL dos sucos clarificados ou diluição adequada dos mesmos, adicionados 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio, e os tubos foram colocados em banho a 37 ºC durante 30 minutos para desenvolvimento de cor. A absorbância a 750 nm foi determinada em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) e a capacidade redutora do Folin-Ciocalteu foi expressa como equivalente de catequina. O teor de fenólicos totais foi determinado descontando a participação de vitamina C da capacidade redutora do Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos foram expressos como mg equivalente de catequina por 300 mL de suco clarificado.

3.2.5. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

3.2.5.1. Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila, SIGMA) do meio de reação pelos antioxidantes presentes na amostra (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH• (0,05 mM) de forma a apresentar aproximadamente 0,4 de absorbância em 517 nm de comprimento de onda. As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (COSTAR) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade foram adicionados 200 µL da solução de DPPH•, 40 µL de água para o controle, o mesmo volume para solução padrão de Trolox e para as amostras de suco adequadamente diluídos, quando necessário. Foram efetuadas leituras de absorbância a 517 nm no tempo zero e após 20 minutos, utilizando-se de espectrofotômetro de microplaca (BIOTEK, mod. Synergy H1) a 25 ºC. Os cálculos foram efetuados com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ descoloração do DPPH} = \frac{[1 - (\text{A amostra} - \text{A branco da amostra}) \times 100]}{\text{A branco do ensaio DPPH}}$$

Onde:

A amostra = absorbância da amostra a 517 nm;

A branco da amostra = absorbância do branco da amostra a 517 nm;

A branco do ensaio DPPH = absorbância do branco do ensaio DPPH a 517 nm.

A curva padrão foi preparada com uma solução de Trolox em diferentes concentrações e suas respectivas porcentagens de descoloramento. Os resultados foram expressos em mmol equivalente de Trolox por 300 mL de suco clarificado.

3.2.5.2. Determinação do poder redutor do ferro – método FRAP. A capacidade antioxidante pelo método FRAP foi determinada de acordo com Benzie e Strain (1996), com modificações. O reagente FRAP foi preparado na proporção 10:1:1 com as seguintes soluções: (a) tampão de acetato de sódio (Dinâmica)- 300 mM, pH 3,6; (b) solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ, Flucka chemical suisse) em ácido clorídrico (VETEC) 40 mM - 10 mM e (c) solução de cloreto férrico (Synth) - 20 mM. O reagente foi preparado no momento da análise. Como padrão, foi utilizado o reagente ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (TROLOX, Flucka chemicals suisse) em concentrações de 50 a 400 µM. A leitura da absorbância foi feita a 593 nm. Os resultados foram expressos em µmol equivalentes de Trolox por 300 mL de suco clarificado.

3.2.5.3. Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC). A capacidade de absorção de radicais de oxigênio foi determinada de acordo com Dávalos et al. (2004), com modificações. As amostras devidamente diluídas, o controle e a curva padrão de TROLOX (0,002 M) foram misturados com 150 µL de uma solução de fluoresceína (40 nM) e incubados a uma temperatura de 37 ºC por 15 minutos antes da adição de 25 µL da solução do radical peroxila 2,2’-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto (AAPH) (153 mM), que dá inicio a reação. A intensidade de fluorescência (485 nm - excitação/520 nm - emissão) foi verificada em espectrofotômetro de fluorescência (BIOTEK, mod. Synergy H1) a cada 1

minuto, durante 80 minutos. A capacidade antioxidante foi determinada pela curva resultante da perda de fluorescência da fluoresceína versus a concentração de TROLOX (entre 6,25 µM 100 µM), e os resultados foram expressos em mmol equivalentes de Trolox por 300 mL de suco clarificado.

3.2.6. Determinação de flavonoides e ácido elágico por CLAE

3.2.6.1. Obtenção dos extratos para análise de flavonóides e ácido elágico livre. A identificação e quantificação de flavonóides e ácido elágico livre foi feita de acordo com Arabbi et al. (2004). Uma alíquota de 5 mL de cada amostra de suco foi passada em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co., Alemanha), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de água e a eluição dos flavonóides foi feita com 50 mL de metanol. Em seguida, ocorreu a eluição do ácido elágico livre, com o uso de 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5). Foi utilizado o *Manifold* Visiprep 24 DL (SUPELCO, Bellefonte, USA). Após a secagem completa, através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol e filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,22 µm (MILLIPORE). As extrações foram realizadas em duplicata e a quantificação dos flavonóides e do ácido elágico livre presentes nos diferentes sucos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.6.2. Obtenção dos extratos para análise de ácido elágico total. A determinação de ácido elágico total foi realizada de acordo com as condições otimizadas por Pinto et al. (2008). As amostras foram extraídas com acetona aquosa 80%, o extrato foi colocado em banho de 37 °C sob N_2 até secagem (Evaporador

Analítico Organomation, Berlin, MA) e hidrolisado em ácido trifluoroacético 2N em metanol, a 120 ºC durante 90 minutos. Após a hidrólise, os extratos foram novamente seco sob N_2, e os resíduos foram ressuspendidos em metanol grau CLAE e filtrados com filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, MA) de 0,22 □m de poro para posterior análise por CLAE.

3.2.6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise dos flavonóides foi realizada usando cromatógrafo líquido de alta eficiência mod. HP série 1100 (HEWLETT PACKARD) equipado com detector de arranjo de diodo (DAD) (HEWLETT PACKARD). Foi usada uma coluna Prodigy 5µ ODS(3) 250 x 4,60 mm (PHENOMENEX Ltd, Reino Unido). Foi utilizado um gradiente de solventes constituído por A: Água: Tetrahidrofurano:Ácido trifluoroácetico (98:2:0,1) e B: Acetonitrila nas seguintes condições de eluição: 2 min – 17% B; 7 min - 25%; 15 min - 35% B; e 20 min - 50% B (ARABBI et al, 2004). Para a limpeza da coluna, a proporção de B foi aumentada para 90% e, em seguida, para o reequilíbrio da mesma, as condições iniciais foram retomadas por 10 min. A identificação foi feita a partir dos tempos de retenção e dos espectros. As amostras foram injetadas em duplicata. Os resultados foram expressos em mg por 300 mL de suco clarificado.

3.2.7. Determinação do teor de ácido ascórbico. As análises do ácido ascórbico (AA) foram realizadas segundo Rizzolo, Forni e Poleselo (1984), com modificações. As amostras foram homogeneizadas com solução de ácido acético a 0,1% em proporção 1:10. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana MILLIPORE de 0,45 µm, e diluído 1 vez com ácido acético para a análise do AA e com ditiotreitol (DTT) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, EUA) 0,5 M para a análise do

ácido ascórbico total (AT). As amostras foram analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência utilizando uma coluna C18 (µBondapak, 300 mm de comprimento e porosidade 10 µm). A fase móvel era composta por A: acetonitrila com ácido acético (0,1%) e B: ácido acético 0,1% em água, e o fluxo adotado foi de 1,5 mL/min. A curva padrão foi obtida com padrão de AA (10 - 100 µg/mL). A detecção foi realizada com detector de UV a 254 nm e os resultados expressos como mg ácido ascórbico por 300mL de suco.

3.2.8. Determinação da atividade inibitória da α-amilase e α-glicosidase *in vitro*.

3.2.8.1. Obtenção da fração fenólica dos sucos clarificados. A purificação dos compostos fenólicos dos sucos foi realizada através da extração em fase sólida usando 1 g de poliamida e 1 g de C18 SPE (Solid-Phase Extraction - Supelco®) preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de água e a eluição dos flavonóides foi feita com 50 mL de metanol. Em seguida, ocorreu a eluição dos ácidos fenólicos, com o uso de 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5). Foi utilizado o *Manifold* Visiprep 24 DL (Supelco®). Após a secagem completa, através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 10 mL de água deionizada.

3.2.8.2. Determinação da atividade inibitória da α-amilase *in vitro*. Este ensaio foi baseado no método descrito por Ali et al. (2006) e verifica a capacidade de uma amostra em inibir a produção de maltose pela ação da enzima α-amilase sobre o amido. Para tanto, foi preparada uma solução 0,5 mg/mL da enzima α-amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI-A, Sigma Chemical Co.) dissolvida em tampão fosfato 0,2 M (pH 6,9). O substrato utilizado na reação foi amido de batata 0,5%

(m/v), também dissolvido em tampão fosfato 0,2 M, com breve aquecimento. Neste ensaio, 40 µL do extrato, 160 µL de água destilada e 400 µL da solução de amido 0,5% foram adicionados a um tubo de ensaio e incubados a 25 °C por 3 minutos. A reação foi iniciada com a adição de 200 µL de solução enzimática em tempos diferentes (0, 1, 2, 3 minutos). Uma alíquota de 200 µL da solução obtida foi retirada e adicionada em outro tubo de ensaio contendo 100 µL de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico 96 mM), o qual foi colocado imediatamente em banho a 85 °C. Após 15 minutos, a mistura foi retirada do banho e diluída com 900 µL de água destilada. A atividade da α-amilase foi determinada pela leitura a 540 nm em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) utilizando-se espectrofotômetro de microplaca (BIOTEK, mod. Synergy H1). O controle positivo da reação representava 100% da atividade enzimática e foi conduzido da mesma forma, utilizando 40 µL e água no lugar do extrato. Para o branco da reação, a solução enzimática foi substituída por água destilada e o procedimento foi realizado da mesma maneira descrita acima. No tempo zero, as amostras foram adicionadas a solução de DNS imediatamente após a adição de enzima. A produção de maltose foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Produção de maltose} = A_{540nm}\ (\text{amostra ou controle}) - A_{540nm}\ (\text{branco})$$

Onde A_{540} representa a absorbância referente à produção de maltose do controle ou do extrato. Através da absorbância de maltose produzida, pode-se calcular a porcentagem de maltose gerada pela equação da reta obtida pela curva padrão.

A porcentagem de inibição de formação de maltose foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{100 - [(\% \text{ maltose produzida no extrato no tempo 3 minutos}}{\% \text{ maltose produzida no controle no tempo 3 minutos}) \times 100]}$$

Os resultados obtidos foram expressos em mL de suco / mL do meio de reação e também em mg equivalente de catequina/mL do meio de reação necessários para inibir em 50% a formação de maltose.

3.2.8.3. Determinação da atividade inibitória da enzima α-glicosidase *in vitro*. Este ensaio foi baseado no método descrito por Watanabe et al. (1997) com algumas modificações realizadas por Yamaki e Mori (2006) e verifica a capacidade de uma amostra em inibir a produção de glicose liberada na quebra do substrato pela enzima. O substrato utilizado na reação foi o *p*-nitrofenil-α-D-glicosídeo, dissolvido em tampão fosfato (pH 7,0). Foi realizada a extração do Intestinal acetone powders from rat (I1630- Sigma) 30 mg/mL em tampão fosfato (pH 7,0), sonicado por 3 min. centrifugado por 10 min. a 8000 *g*, o sobrenadante foi utilizado como α-glicosidase. Para o ensaio, 100 µL da solução enzimática foram adicionados a 20 µL de extrato em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA), a qual foi incubada por 5 minutos a 37 °C. Após incubação, foram adicionados 100 µL de substrato. Procedeu-se outra incubação por 5 minutos a 37 °C. Foram efetuadas leituras de absorbância a 405 nm no tempo zero e após 10 minutos, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca (BIOTEK, mod. Synergy H1). Os extratos foram adequadamente diluídos. Os cálculos foram efetuados a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{Abs_{405\ nm}\text{ (controle) - } Abs_{405\ nm}\text{ (amostra)}}{Abs_{405\ nm}\text{ (controle)}} \times 100$$

Onde $Abs_{405\ nm}$ (controle) refere-se à absorbância do controle a 405 nm e $Abs_{405\ nm}$ (amostra) à absorbância da amostra a 405 nm.

Os resultados obtidos foram expressos em mL/mL do meio de reação e também em mg equivalente de catequina/mL do meio de reação necessários para inibir em 50% a formação de glicose.

3.3. Determinação do efeito sobre a glicemia pós-prandial – PROTOCOLO DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário (HU) da USP, com a ajuda da equipe técnica do HU na etapa da coleta de sangue, para a qual foi utilizado material descartável devidamente esterilizado. O projeto, assim como o termo de consentimento livre e esclarecido, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, registro CEP-HU/USP: 937/09 – SISNEP e pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Parecer CEP/FCF/166/2009, protocolo CEP/FCF/525 e CAAE: 0025.0.018.198-09) (**Anexo).**

3.3.1. Indivíduos e modelo experimental.

Os voluntários participantes do estudo foram selecionados entre os alunos de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e do Instituto de Química (IQ) da USP. Os critérios de exclusão foram: indivíduos diabéticos; indivíduos com sobrepeso (IMC maior que 25); usuários de medicação para tratamento de DM2; indivíduos em terapia de reposição hormonal ou em tratamento para redução da viscosidade do sangue; usuários de suplementos

vitamínicos/minerais ou antibióticos; fumantes; grávidas; portadores de desordens do trato gastrointestinal; indivíduos com doença hepática; indivíduos com doença renal e portadores de distúrbios de sangramento ou de hemofilia.

Os indivíduos foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose (TOTG) com 75 g de dextrosol após jejum noturno de 12 horas. A insulina e glicemia em jejum também foram avaliadas para determinação de resistência a insulina através do índice HOMA (homeostasis model assement), calculado a partir dos níveis de glicemia basal e insulinemia basal, segundo a fórmula: insulina basal x glicemia basal (mmol) / 22,5. Na véspera, foram orientados a não realizar atividade física rigorosa e a evitar alimentos fontes de compostos fenólicos, tais como frutas exóticas, chocolate, vinho ou outras bebidas alcoólicas entre outros alimentos.

A amostra do estudo foi iniciada com 26 indivíduos voluntários (n=26), porém 1 indivíduo foi excluído (pré-diabético) e 2 indivíduos desistiram de participar do estudo. Portanto, o número total de participantes foi de 23 indivíduos (n=23). A maior parte do grupo foi constituída de mulheres (17). Os voluntários apresentavam as seguintes características: idade média de 29 ± 6 anos (mínima de 23 e máxima de 43 anos), índice de massa corporal (IMC) de 24 ± 3 Kg/m^2 e pressão arterial sistólica média de 110 ± 12 mm Hg e pressão arterial diastólica 68 ± 7 mm Hg.

3.3.2. Refeições-teste

Cada refeição foi constituída de uma unidade de pão branco (pão francês de aproximadamente 55 g ± 5,5 g) (MENEZES e LAJOLO, 2006) mais um copo de 300 mL de água ou suco clarificado. As refeições foram dividias em duas categorias: refeição com pão branco acompanhado de água, sendo esta utilizada como controle, e refeição com pão branco acompanhado de suco clarificado. As refeições foram ingeridas num intervalo de tempo máximo de 10 minutos. Durante todo o período da coleta das amostras sanguíneas, os indivíduos estudados foram orientados a permanecer em repouso na posição de decúbito dorsal, em ambiente com temperatura de 22º Celsius.

3.3.3. Análises de glicemia

Foram determinados os níveis de glicemia capilar utilizando-se glicosímetro digital Accu-Chek® Performa (ROCHE) em t=0 (imediatamente antes do consumo do pão), 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min após o início da refeição-teste (Josse et al,. 2007). O sangue dos participantes foi coletado em tubos heparinizados. Para a obtenção do plasma, as amostras foram imediatamente centrifugadas a 1500 g (4ºC) por 15 min; o plasma separado foi armazenado a -80°C. Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão. A área abaixo da curva de glicemia foi calculada usando a regra trapezoidal para determinar a redução da resposta glicêmica. Foram analisadas as seguintes variáveis nas curvas de glicose: *glicose basal* (GB), obtida em t=0 min; *valor de pico da glicose* (VPg), definido como sendo o maior valor acima do basal observado após a ingestão da refeição e expresso em mg/dL; *incremento absoluto da glicose* (Dg), definido como sendo a diferença

absoluta entre o valor máximo da glicose obtido após estímulo (VPg) e o valor basal (GB) e expresso em mg/dL (Dg = VPg-GB); *incremento percentual da glicose* (PIg), definido como sendo a relação entre o incremento absoluto da glicose (Dg) e o valor basal (GB), e expresso em termos percentuais (PIg = (Dg/GB) x 100); á*rea total abaixo da curva da glicose* (ATG), definida como sendo a área abaixo da curva da glicose até o eixo das abscissas, obtida através do cálculo numérico da integral da curva usando o software Graphpad Prism v. 5,0, e expressa em mg/dL.min; *velocidade de incremento da glicose* (VIg), definida como sendo a relação entre o incremento Absoluto da Glicose (Dg) e o tempo, em minutos, onde foi registrado o valor de pico (TPG), e expressa em mg/mL min (VIP = Dg/tempo de pico). Nos pacientes cujas curvas não apresentaram incremento, ou que apresentaram valores após estímulo menores que o basal, o Dg, o PIG e a VIg foram considerados os valores de glicemia mesmo que menores que o basal (CORRÊA et al., 2007).

3.4. Análise dos resultados. Os resultados foram analisados através da comparação das médias e desvio-padrões dos valores obtidos para a triplicata de analise. Para a análise dos resultados foi utilizado, tanto dos experimentos *in vitro* como *in vivo*, foi utilizado o programa Statistica versão 10.0 (STATSOFT,Tulsa, EUA). A comparação das médias foi realizada por análise de variância (ANOVA) (P<0,05) e pelos testes LSD (*least significant difference*) e de Tukey (p<0,05) e as correlações foram avaliadas segundo o teste de Pearson.

4. RESULTADOS

4.1. Preparo e caracterização dos sucos

As frutas (ou polpas de frutas congeladas) foram adquiridas prontas para o consumo, identificadas conforme **Tabela 1**. Os sucos clarificados foram preparados homogeneizando-se a parte comestível da fruta ou a polpa congelada em liquidificador, seguido por centrifugação a 22770 *g* por 40 minutos. Inicialmente foram testados os equipamentos de mixer, centrífuga e liquidificador domésticos, sendo que os dois primeiros foram ineficientes na homogeneização de algumas das frutas avaliadas. Dessa forma, optou-se pela utilização de liquidificador e as condições foram analisadas caso a caso. A seguir foram comparados filtro de papel whatman nº6, filtro de papel Melitta® para café, rede de nylon e peneira para obtenção dos sucos clarificados, que, dada a sua ineficácia, foram substituídos por centrifugação.

Tabela 1. Classificação botânica das frutas utilizadas no estudo sobre o efeito dos sucos clarificados de frutas nativas brasileiras sobre a glicemia pós-prandial.

Frutas	Origem da fruta	Família	Nome Científico
Cambuci (Fruto)	Mata Atlântica	Myrtaceae	*Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum
Cagaita (Polpa)	Cerrado	Myrtaceae	*Eugenia dysenterica* DC.
Maracujá-alho (Fruto)	Cerrado	Passifloraceae	*Passiflora tenuifila* Killip
Cupuaçu (Polpa)	Amazônia	Sterculiaceae	*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) Schum
Camu camu (Polpa)	Amazônia	Myrtaceae	*Myrciaria dubia Mc.* Vaugh
Araçá (Polpa)	Mata Atlântica e Amazônia	Myrtaceae	*Psidium guineensis* Sw.
Jabuticaba (Fruto)	Mata Atlântica	Myrtaceae	*Myrciaria cauliflora* Berg.

Os teores de sólidos solúveis e totais, açúcares totais, fibras totais, pH e acidez total dos sucos clarificados são apresentados na **Tabela 2**. O teor de sólidos totais variou de 2,72 (suco de maracujá-alho) a 9,36 (suco de jabuticaba) g por 100 mL de suco clarificado. O suco de jabuticaba também apresentou o maior teor de sólidos solúveis (ºBrix), 13,0, ao passo que o menor valor observado foi o do suco de maracujá, 4,0. O coeficiente de correlação (r) entre essas duas variáveis foi 0,99. Com relação ao pH e a acidez total titulável, o suco de cambuci foi o mais ácido (pH = 2,75 e a acidez total titulável = 24,6 g eq. de ácido cítrico/100 mL de suco) e o suco de maracujá o menos ácido (pH = 5,06 e acidez total titulável = 1,4 g eq. de ácido cítrico/100 mL de suco). O teor de açúcares totais variou de 1,3 (suco de camu-camu) a 5,1 (suco jabuticaba) g eq.de glicose/100 mL de suco clarificado. Os fatores de correlação entre sólidos solúveis e açúcares totais e sólidos totais e

açúcares totais foram r = 0,91 e 0,92, respectivamente. Os sucos estudados não apresentaram fibras, evidenciando a eficiência da clarificação dos sucos.

Tabela 2. Teores de sólidos solúveis, sólidos totais, açúcares totais, fibras totais, acidez total e pH dos sucos clarificados das frutas nativas brasileiras estudadas.

Sucos clarificados	Sólidos solúveis	Sólidos totais	Açúcares totais	Fibras totais	Acidez total titulável	pH
	º Brix	g/100 mL	g eq. glicose/ 100 mL	g/100 mL	g eq. ácido cítrico/100 mL	
Cambuci	7,8 ± 0 [c]	5,94 ± 0 [c]	2,7 ± 0 [c]	n.d.	24,6 ± 0,3 [a]	2,7 ± 0 [g]
Cagaita	6,1 ± 0 [d]	4,33 ± 0 [e]	2,4 ± 0 [d]	n.d.	7,4 ± 0,1 [f]	3,0 ± 0 [e]
Maracujá-alho	4,0 ± 0 [f]	2,72 ± 0 [g]	1,6 ± 0 [e]	n.d.	1,4 ± 0 [g]	5,0 ± 0 [a]
Cupuaçu	7,9 ± 0 [c]	5,68 ± 0 [d]	2,9 ± 0 [c]	n.d.	13,8 ± 0 [d]	3,4 ± 0 [c]
Camu-camu	5,3 ± 0 [e]	3,96 ± 0 [f]	1,3 ± 0 [e]	n.d.	17,2 ± 0,5 [c]	2,8 ± 0 [f]
Araçá	8,5 ± 0 [b]	6,63 ± 0 [b]	4,6 ± 0 [b]	n.d.	8,9 ± 0 [e]	4,0 ± 0[b]
Jabuticaba	13,0 ± 0 [a]	9,36 ± 0 [a]	5,1 ± 0 [a]	n.d.	19,6 ± 0 [b]	3,2 ± 0 [d]

Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão (triplicata). Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). n.d. = não detectadas.

A composição de minerais dos sucos estudados é exibida na **Tabela 3.** O teor de fósforo variou de 7,1 (suco cambuci) a 31,0 (suco maracujá-alho) mg/300 mL de suco e o potássio apresentou uma variação entre 219,5 (cagaita) e 662,3 (suco araçá) mg/300 mL de suco. O suco de cambuci não apresentou teores de cálcio, o suco de jabuticaba apresentou os maiores teores de cálcio, magnésio e enxofre. Os teores de boro, zinco, cobre, ferro e manganês foram similares entre os sucos estudados. O teor de sódio variou de 0,2 (suco cagaita) a 3,5 (suco araçá) mg/300 mL de suco.

Tabela 3. Teores de minerais dos sucos clarificados das frutas nativas brasileiras estudadas, expressos em mg/300 mL de suco**.**

Minerais (mg/300 mL)	**Sucos clarificados**						
	Cambuci	Cagaita	Maracujá -alho	Cupuaçu	Camu-camu	Araçá	Jabuticaba
N	30,3	146,8	70,2	86,9	36,8	61,7	67,4
P	7,1	10,4	31,0	17,0	17,8	29,8	19,7
K	267,3	219,5	255,4	468,6	289,9	662,3	483,0
Ca	0	10,4	1,6	3,4	3,6	8,0	11,2
Mg	23,2	7,8	11,4	23,9	20,2	25,9	36,5
S	7,1	5,2	6,5	25,9	10,7	11,9	16,8
B	0,1	0,1	0,1	0,03	0,1	0,04	0,1
Zn	0,4	0,1	0,2	0,3	0,5	0,3	0,6
Fe	0,3	0,2	0,2	0,4	0,5	0,2	0,4
Mn	0,2	0,1	0,1	0,4	0,8	0,9	0,5
Cu	0,1	0,1	0,04	0,1	0,02	0,1	0,1
Na	2,2	0,2	1,0	0,2	2,7	3,5	0,3

A vitamina C foi detectada apenas no suco de camu-camu com concentração de 0,55 g de ácido ascórbico/300 mL de suco clarificado. Os sucos clarificados apresentaram uma grande variação no teor de fenólicos totais, entre 79 e 3891 mg equivalentes de catequina por 300 mL de suco clarificado (**Tabela 4**). Dentre eles, o suco com maior teor de fenólicos foi o de camu-camu, ao passo que os com menores teores foram os sucos de maracujá-alho e cupuaçu. Os sucos de cambuci e de araçá não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os teores de fenólicos totais.

Os sucos clarificados apresentaram uma grande variação no teor de fenólicos totais, entre 79 e 3891 mg equivalentes de catequina por 300 mL de suco clarificado (**Tabela 4**). Dentre eles, o suco com maior teor de fenólicos foi o de camu-camu, ao passo que os com menores teores foram os sucos de maracujá-alho e cupuaçu. Os sucos de cambuci e de araçá não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os teores de fenólicos totais. Em relação aos elagitaninos, os sucos derivados de Mirtáceas apresentaram conteúdo significativo destes polifenólicos, ausentes em cupuaçu e maracujá. Coincidentemente, taninos totais – determinados pela habilidade de precipitação com albumina de soro bovino, também não foram detectados nestes sucos, apesar do elevado teor de proantocianidinas.

Tabela 4. Teores de fenólicos totais, proantocianidinas e teor de taninos totais das frutas nativas brasileiras estudadas.

Sucos clarificados	Fenólicos totais	Proantocianidinas	Taninos totais	Elagitaninos
	mg eq. catequina / 300 mL	mg eq. de tanino (quebracho) / 300 mL	mg eq. ácido tânico/300 mL	mg/300 mL
Cambuci	507 ± 5 [c]	594 ± 4 [d]	0,46 ± 0,1 [b]	11,85
Cagaita	313 ± 5 [d]	332 ± 5 [f]	0,03 ± 0,1 [e]	5,27
Maracujá-alho	79 ± 1 [e]	337 ± 1 [f]	n.d.	n.d.
Cupuaçu	80 ± 1 [e]	403 ± 9 [e]	n.d.	n.d.
Camu-camu	3175 ± 33 [a]	910 ± 26 [c]	0,20 ± 0,1 [c]	8,9
Araçá	514 ± 12 [c]	1480 ± 18 [a]	0,54 ± 0,1 [d]	8,22
Jabuticaba	1041 ± 9 [b]	1175 ± 27 [b]	0,66 ± 0,1 [a]	23,82

Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão (triplicata). Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). n.d. = não detectados.

Os resultados de capacidade antioxidante medida pelos métodos do DPPH$^{\bullet}$, ORAC e FRAP (**Tabela 5**) mostram que os sucos de cupuaçu e de maracujá-alho foram os de menor capacidade antioxidante *in vitro*, ao passo que o do camu-camu, seguido pelo de jabuticaba, foram os de maiores capacidade antioxidante. Houve grande variação entre a capacidade antioxidante medida pelo método do DPPH$^{\bullet}$, sendo que o suco de jabuticaba apresentou o maior potencial antioxidante (4,65 mmol eq. de trolox/300 mL de suco), e os sucos de maracujá-alho e de cupuaçu os menores (0,31 e 0,16, respectivamente). Os sucos de cambuci, cagaita e araçá apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto a sua capacidade sequestradora do DPPH$^{\bullet}$.

Tabela 5. Capacidade antioxidante dos sucos de frutas nativas brasileiras através dos métodos de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), capacidade sequestradora do radical estável DPPH e determinação do poder redutor do ferro (FRAP).

Sucos clarificados	**ORAC**	**DPPH**	**FRAP**
	mmol eq. Trolox/300 mL suco	mmol eq. Trolox/300 mL suco	umol eq. Trolox/300 mL suco
Cambuci	2,9 ± 0,08 ^{d,e}	2,04 ± 0,03 ^{c}	2,28 ± 0,06 ^{d}
Cagaita	3,1 ± 0,06 ^{d}	1,18 ± 0,01 ^{e}	1,02 ± 0,01 ^{b}
Maracujá-alho	2,6 ± 0,01 ^{d,e}	0,31 ± 0,01 ^{f}	0,54 ± 0,01 ^{b,c}
Cupuaçu	2,5 ± 0,1 ^{e}	0,16 ± 0,01 ^{f}	0,27 ± 0,01 ^{c}
Camu-camu	19,2 ± 0,44 ^{a}	2,48 ± 0,15 ^{b}	17,07 ± 0,69 ^{a}
Araçá	5,2 ± 0,06 ^{c}	1,45 ± 0,03 ^{d}	1,85 ± 0,12 ^{d}
Jabuticaba	7,6 ± 0,2 ^{b}	4,65 ± 0,04 ^{a}	2,04 ± 0,07 ^{d}

Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão (triplicata). Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05).

No ensaio pelo método FRAP, o potencial antioxidante de uma amostra é estimado pela habilidade dela em reduzir o complexo TPTZ-Fe (III) para o complexo TPTZ-Fe (II). A partir da **Tabela 5**, observa-se que os sucos apresentaram grande variação do poder antioxidante de redução do ferro, entre 0,27 (suco cupuaçu) e 17,07 (suco camu-camu) µmoles eq.de trolox por 300 mL de suco. O suco de maior poder antioxidante foi o de camu-camu. As diferenças entre os potenciais antioxidantes dos sucos de cambuci, araçá e jabuticaba e entre os sucos de maracujá-alho e cupuaçu não foram significativamente diferentes (p<0,05).

O potencial antioxidante medido pelo método ORAC também variou consideravelmente, entre 2,5 (cupuaçu) e 19,2 (camu-camu) mmoles equivalentes de trolox por 300 mL de suco (**Tabela 5**). Os valores de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) dos sucos de cambuci, cagaita, cupuaçu e maracujá-alho não mostraram diferença significativa (p<0,05). Contudo, os sucos de camu-camu, araçá e jabuticaba, diferiram significativamente (p<0,05).

De modo geral, os três métodos de determinação da capacidade antioxidante permitiram a obtenção de resultados similares. O coeficiente Pearson (**Tabela 6**) mostrou elevada correlação entre o teor de fenólicos totais, FRAP e ORAC, mas não foi observada correlação significativa entre o teor de taninos totais e a capacidade antioxidante *in vitro*.

Tabela 6. Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre os métodos empregados para determinação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos dos sucos clarificados de frutas nativas brasileiras estudadas.

	Fenólicos totais	**Proantocianidinas**	**Taninos totais**	**DPPH**	**FRAP**	**ORAC**
Fenólicos totais		0,36	0,27	**0,86**	**0,97**	**0,99**
Proantocianidinas	0,36		0,38	**0,61**	0,24	0,40
Taninos totais	0,27	0,38		0,42	0,10	0,21
DPPH	**0,86**	**0,61**	0,42		0,76	**0,85**
FRAP	**0,97**	0,24	0,10	0,76		**0,96**
ORAC	**0,99**	0,40	0,21	**0,85**	**0,96**	

A **Tabela 7** exibe o perfil de compostos fenólicos dos sucos das frutas nativas brasileiras estudadas. Nos sucos de cambuci, cagaita, camu-camu, araçá e jabuticaba, foram identificados o ácido elágico livre e a quercetina. O ácido siríngico foi detectado nos sucos de cambuci, cagaita, camu-camu e araçá. Derivados de ácido elágico foram detectados em maior concentração no suco de jabuticaba, seguido pelos sucos de camu-camu, cambuci, araçá e cagaita. A proantocianidina B1 e a catequina foram encontradas em maiores quantidades no suco de araçá do que no suco de cupuaçu. Hipoaletina-3-metil éter-8-O-b-D-glucoronídeo, hipoaletina-8-O-b-D-glucoronídeo, isoscutelareina-8-O-b-D-glucoronídeo foram detectados apenas no suco de cupuaçu. A cianidina 3-glicosídeo foi detectada apenas no suco de jabuticaba. Os únicos flavonoides detectados no suco de maracujá-alho foram a homorientina e a isovitexina.

Tabela 7: Composição e teores de compostos fenólicos dos sucos clarificados das frutas nativas brasileiras determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD).

Compostos fenólicos	**Sucos clarificados (mg/300 mL de suco clarificado)**						
	Cambuci	Cagaita	Maracujá -alho	Cupuaçu	Camu-camu	Araçá	Jabuticaba
Ác. Siringico	8,78	11,1	-	-	3,5	2,85	-
Quercetina	0,56	1,19	-	-	1,37	0,13	1,60
Catequina	-	-	-	1,43	-	6,67	-
Epicatequina	-	-	-	3,22	-	-	-
Caempferol	-	0,20	-	-	-	-	-
Ác. Elágico livre	2,15	0,59	-	-	12,1	-	24,62
Ác. Elágico total	14,0	5,86	-	-	21,0	8,22	48,44
Miricetina	-	-	-	-	1,83	-	-
Proantocianina B1	-	-	-	0,32	-	3,20	-
Cianidina 3-glicosídeo	-	-	-	-	-	-	44,01
Hipoaletina-3'-metil éter-8-8-O-b-D-glucuronídeo	-	-	-	0,014	-	-	-
Hipoaletina-8-O-b-D-glucuronídeo	-	-	-	0,0038	-	-	-
Isoscutelareina-8-O-b-D-glucuronídeo	-	-	-	0,0060	-	-	-
Homorientina	-	-	23,30	-	-	-	-
Isovitexina	-	-	6,93	-	-	-	-

4.2. Efeito dos compostos fenólicos purificados na atividade enzimática da α-amilase e da α-glicosidase.

A atividade da α-amilase é avaliada através da formação de maltose resultante da ação dessa enzima sobre o amido presente no meio. A maltose, um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose (ligação α-1,4) reduz o DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) formando um produto de cor característica cuja absorbância máxima é determinada a 540 nm. Dessa forma, os açúcares, vitaminas e minerais presentes nos sucos clarificados foram eliminados e um extrato aquoso rico em compostos fenólicos foi obtido através de extração em fase sólida. Para esta purificação foi utilizado a resina de poliamida e a de C18, a primeira (Poliamida) permite avaliar o efeito dos flavonóides e ácidos fenólicos, pois esta resina retém os taninos presentes na amostra de forma irreversível (GUSTAVSON, 1954). A segunda resina (C18) permite a avaliação dos taninos presentes na amostra, além dos flavonóides e ácidos fenólicos, de modo a ter uma maior similaridade com o suco na sua forma bruta.

Todos os sucos foram capazes de inibir a atividade enzimática tanto da α-amilase quanto da α-glicosidase, em ambos extratos (Poliamida e C18). Entretanto, os compostos fenólicos de cambuci, cagaita, camu-camu e araçá foram os mais eficientes na inibição da α-amilase. Igualmente, os fenólicos de cambuci, cagaita, cupuaçu e araçá foram mais efetivos na inibição da atividade da α-glicosidase. O suco de maracujá-alho apresentou a menor redução da atividade de ambas às enzimas, além de similaridade em relação aos extratos (Poliamida e C18), o que pode ser justificado pela ausência de taninos totais e elagitaninos no maracujá-alho (**Tabela 8**).

Tabela 8. Efeito inibitório dos compostos fenólicos purificados a partir dos sucos clarificados, sobre a atividade da enzima α-amilase.

Sucos	α-amilase			
	Poliamida*		C18*	
	IC_{50} (µg eq. catequina/mL)	IC_{50} - mL suco	IC_{50} (µg eq. catequina/mL)	IC_{50} - mL suco
Cambuci	1,24 ± 0,02 [f]	**0,73**	0,49 ± 0,0 [f]	**0,29**
Cagaita	0,78 ± 0,02 [g]	**0,75**	0,21 ± 0,0 [e]	**0,20**
Maracujá-alho	2,89 ± 0,03 [d]	**11,02**	2,86 ± 0,0 [a]	**10,90**
Cupuaçu	2,50 ± 0,11 [e]	**9,40**	2,01 ± 0,0 [b]	**7,56**
Camu-camu	4,65 ± 0,05 [b]	**0,44**	0,56 ± 0,0 [d]	**0,05**
Araçá	4,23 ± 0,01 [c]	**2,47**	0,30 ± 0,0 [f]	**0,18**
Jabuticaba	7,28 ± 0,02 [a]	**2,10**	1,30 ± 0,0 [c]	**0,37**

Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão (Triplicata). Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (p< 0,05).
* Compostos fenólicos obtidos por extração em fase sólida em coluna de poliamida ou coluna de C18.

O efeito inibitório da atividade da enzima α-glicosidase pelos compostos fenólicos de todos os sucos estudados, excetuando-se o suco de jabuticaba, foi maior que o da acarbose que demonstrou um IC50 de 3,8 µg de acarbose/mL (**Tabela 9**).

É necessário um maior volume de suco clarificado de maracujá-alho e cupuaçu para obter a concentração de compostos fenólicos necessária para a inibição de ambas as enzimas. Por outro lado, o volume de suco de camu-camu necessário para obter a concentração de fenólicos capazes de inibir as enzimas α-amilase e α-glicosidase é o menor dentre todos os sucos estudados.

Tabela 9. Efeito inibitório dos compostos fenólicos purificados a partir dos sucos clarificados, sobre a atividade da enzima α-glicosidase.

Sucos	α-glicosidase			
	Poliamida*		C18*	
	IC_{50} (µg eq. catequina/mL)	IC_{50} - mL suco	IC_{50} (µg eq. catequina/mL)	IC_{50} - mL suco
Cambuci	2,0 ± 0,3 [f]	**1,18**	1,1 ± 0,0 [f]	**0,65**
Cagaita	1,4 ± 0,2 [e]	**1,34**	1,0 ± 0,0 [g]	**0,96**
Maracujá-alho	2,6 ± 0,0 [d]	**9,91**	2,4 ± 0,0 [c]	**9,15**
Cupuaçu	2,1 ± 0,0 [f]	**7,89**	1,6 ± 0,0 [d]	**6,02**
Camu-camu	6,7 ± 0,0 [b]	**0,63**	2,7 ± 0,0 [b]	**0,26**
Araçá	3,6 ± 0,1 [c]	**2,10**	1,3 ± 0,0 [e]	**0,76**
Jabuticaba	8,7 ± 0,4 [a]	**2,51**	10,7 ± 0,0 [a]	**3,08**

Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão (Triplicata). Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (p< 0,05).
* Compostos fenólicos obtidos por extração em fase sólida em coluna de poliamida ou coluna de C18.

4.3. Efeito dos sucos clarificados sobre a glicemia pós-prandial

A glicemia basal foi similar em todos os testes, com um valor médio de 86 ± 6 mg de glicose/dL. A carga de glicose ofertada aos voluntários consistia de uma unidade de pão branco tipo francês com aproximadamente 55 ± 5,5 g, contendo aproximadamente 21 ± 1,5g de carboidratos disponíveis, de acordo com a **Tabela brasileira de composição de alimentos** – FCF/USP (GIUNTINI, LAJOLO e MENEZES, 2006).

Em comparação com o controle, todos os tratamentos resultaram na redução da concentração de glicose sanguínea máxima, exceto o tratamento com o suco de maracujá-alho, cujo perfil glicêmico foi muito similar ao do controle. O suco de

cagaita apresentou a maior redução sobre a curva glicêmica pós-prandial quando comparado ao controle e aos demais sucos. Nos tratamentos com os sucos de cambuci e de araçá, observou-se uma redução acentuada da resposta glicêmica com relação ao controle. O tratamento com o suco de camu-camu reduziu a ATG. Os sucos de cupuaçu e de jabuticaba, por outro lado, resultaram em uma leve redução da resposta em comparação com o controle.

As concentrações de glicose sanguínea máximas em t =15, 30 e 45 min após o início da refeição com o suco de cambuci demonstraram diferença significativa (p<0,05) com relação ao controle. O tratamento com este mesmo suco também resultou em uma redução acentuada da ATG. As concentrações de glicose sanguínea máximas em t =30, 45 e 60 min após o tratamento com o suco de cagaita mostraram diferença significativa (p<0,05) com relação ao controle. A ATG também apresentou redução acentuada após o tratamento com este suco. Entretanto, os sucos de maracujá-alho, cupuaçu e jabuticaba não levaram a reduções das concentrações de glicose sanguínea máximas estatisticamente diferentes (p<0,05). Observa-se que houve diferença significativa (p<0,05) entre as concentrações de glicose sanguínea máxima nas curvas da refeição-teste com suco de camu-camu e da refeição controle em t = 30 min. As concentrações de glicose sanguínea máxima obtida após o consumo da refeição-teste com suco de araçá e da refeição-controle foram estatisticamente diferentes (p<0,05) em t = 30 e 45 min. Também houve atenuação da ATG durante praticamente todo o período de estudo (**Figura 2)**.

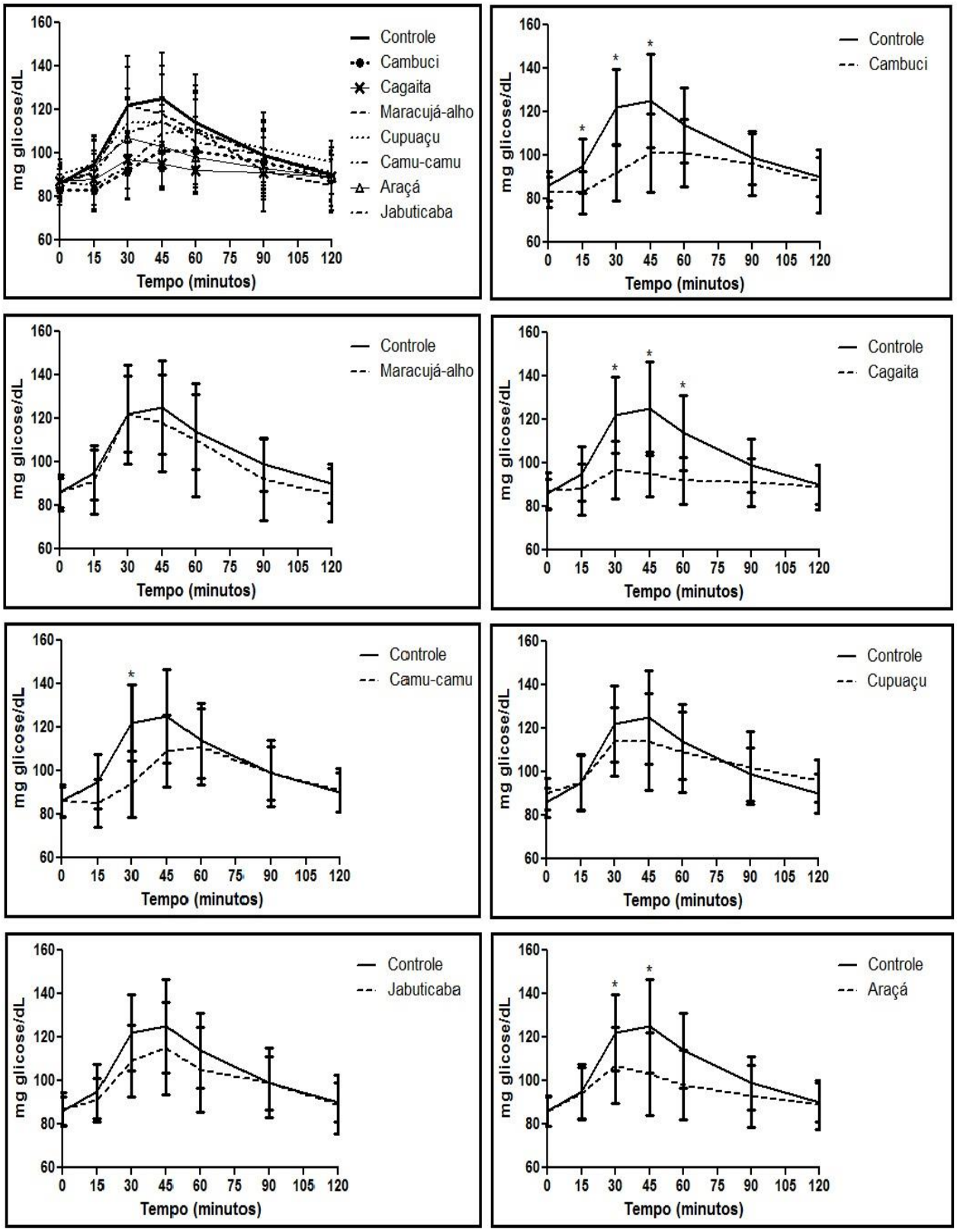

Figura 2: Glicemia pós prandial nos t = 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos das refeições testes: pão + sucos clarificados (300 mL) identificados na **Tabela 1** e do controle: pão + água (300 mL). Média ± desvio padrão (n = 23). O asterisco indica diferença estatisticamente significativa p<0,05.

Os sucos de camu-camu e cambuci foram capazes de promover a manutenção da concentração de glicose sanguínea (TPg), ou seja não causou aumento nem redução brusca da glicemia pós-prandial em comparação com os outros teste. Os sucos de cambuci, cagaita e araçá apresentaram as menores concentrações de glicose sanguínea máximas quando comparado às do controle (**Tabela 10)**.

Tabela 10. Valores de glicose basal (GB), tempo de pico glicêmico (TPg) e valor de pico da glicose (VPg), após consumo de um pão branco (tipo francês) e 300 mL de suco clarificado ou água (controle).

Tratamentos	GB	TPg	VPg
	mg de glicose/dL	Minutos	mg de glicose/dL
Controle	86 ± 6 [a]	37 ± 9 [a]	129 ± 19 [a]
Suco cambuci	84 ± 7 [a]	65 ± 27 [b]	111 ± 14 [b,c]
Suco cagaita	87 ± 9 [a]	50 ± 35 [a]	101 ± 11 [b]
Suco maracujá-alho	86 ± 8 [a]	43 ± 18 [a]	127 ± 24 [a,d]
Suco cupuaçu	90 ± 7 [a]	49 ± 26 [a]	123 ± 19 [a,c,d]
Suco camu-camu	87 ± 7 [a]	62 ± 22 [b]	117 ± 17 [a,b,c,d]
Suco araçá	86 ± 7 [a]	45 ± 24 [a]	113 ± 17 [b,c,d]
Suco jabuticaba	87 ± 8 [a]	50 ± 21 [a]	122 ± 18 [a,c,d]

Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão (n = 23). Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Na **Figura 3,** os valores de ATG (área sob a curva glicêmica) do controle e de cada tratamento, assim como os valores de Dg (incremento absoluto da glicose), de VIg (velocidade de incremento da glicose) e de PIg (incremento percentual da glicose) avaliados durante o período de estudo são comparados. O suco de maracujá-alho não mostrou diferença significativa ($p<0,05$) nas variáveis avaliadas

em relação ao controle. As áreas abaixo das curvas glicêmicas (ATG) com os sucos de cambuci, cupuaçu, camu-camu, araçá e jabuticaba foram significativamente iguais (p<0,05). No entanto, as curvas dos sucos de cambuci, cagaita, camu-camu, araçá e jabuticaba foram significativamente diferentes do controle. Contudo, o suco da cagaita apresentou a menor área abaixo da curva (ATG), sendo significativamente menor que a do controle (p<0,0001) e menor do que as dos demais sucos (p<0,05).

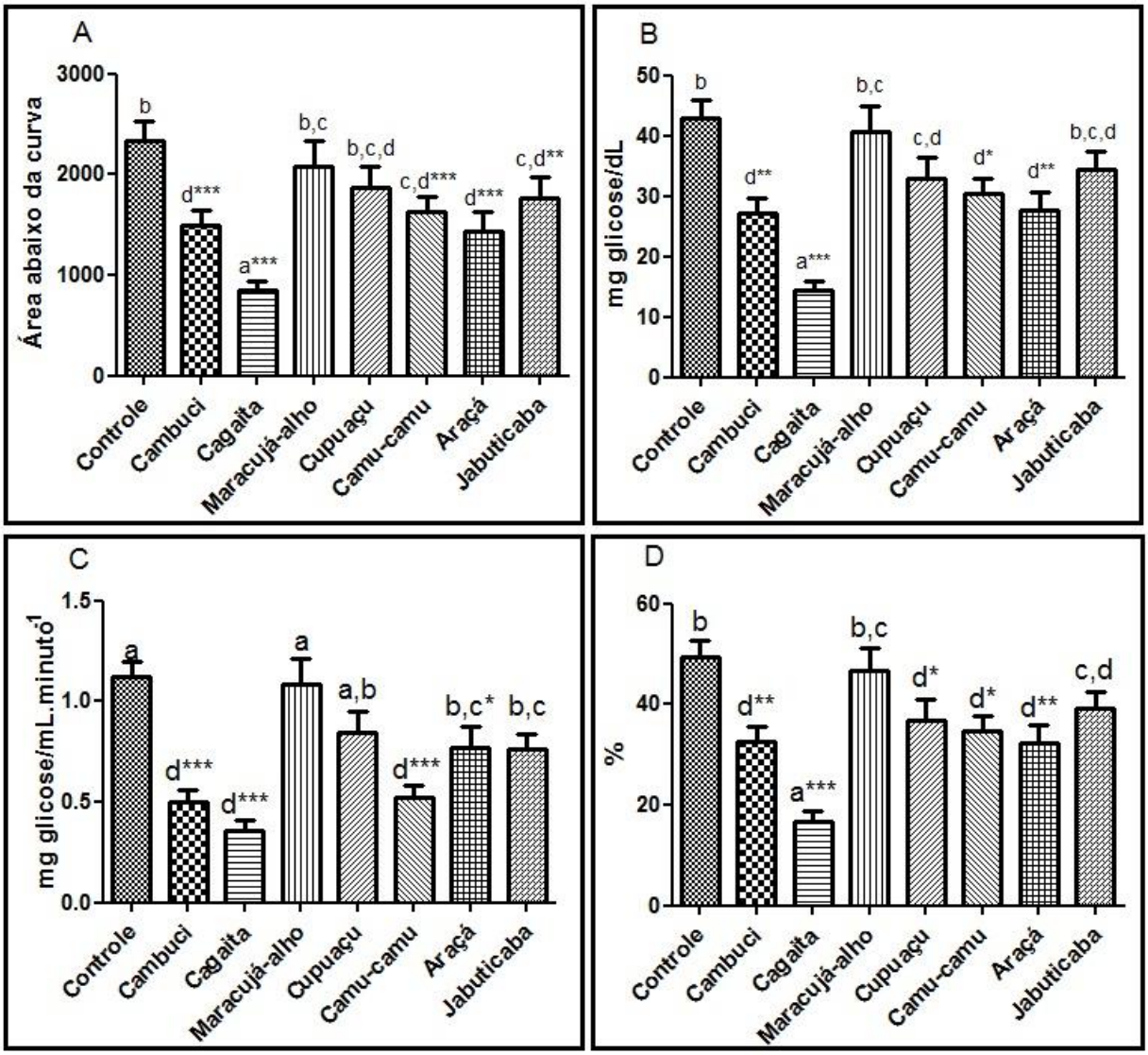

Figura 3. A: ATG – Área sob a curva glicêmica; B: Dg – incremento absoluto da glicose; C: VIG – velocidade de incremento da glicose e D: PIg – incremento

percentual da glicose. Refeiçã-controle (pão + água (300 mL)) e refeição-teste (pão + sucos clarificados das frutas nativas brasileiras estudadas (300 mL)). Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão (n = 23). Letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). Asterisco(s) indica(m) diferença estatística em relação ao controle, onde * = p<0,05, ** = p<0,0024 e *** = p<0,0001.

Os incrementos absolutos de glicose (Dg) após consumo dos sucos de cambuci, cagaita, camu-camu e araçá foram significativamente inferiores ao do controle. Comparativamente, o tratamento com o suco de cagaita exerceu o menor efeito sobre Dg (p<0,0001). Os efeitos dos sucos de cambuci, camu-camu e araçá sobre Dg foram similares, mas significativamente (p<0,0025) diferentes do controle.

Apesar de o suco do cupuaçu não ter exercido efeito significativo sobre a ATG, o Dg e a VIg, seu efeito sobre o PIg demonstrou diferença significativa em comparação com o do controle. Os sucos de cagaita, cambuci, araçá, camu-camu e cupuaçu, nesta ordem, também resultaram em um incremento percentual da glicose (PIg) significativo. Portanto, estes sucos demonstraram efeito significativo para a atenuação do aumento da glicemia pós-prandial. As velocidades de incremento da glicose (VIg) obtidas para os sucos de cambuci, cagaita, camu-camu, araçá e jabuticaba apresentaram similaridade, mas diferiram significativamente do controle, o que demonstra prolongamento e redução da concentração de glicose sanguínea máxima.

4.4. Capacidade antioxidante do plasma após consumo de suco clarificado.

A capacidade antioxidante do plasma dos voluntários foi avaliada em t = 0 min (antes da ingestão de pão branco mais água ou suco) e t = 120 min (após a ingestão de pão branco mais água ou suco) através dos métodos de ORAC e FRAP (**Tabela 11**). A capacidade antioxidante do plasma dos voluntários após o consumo dos sucos, excetuando-se o suco de maracujá-alho e o camu-camu, pelo método ORAC apresentaram aumento significativo ($p<0,05$) em t = 120 min. A capacidade antioxidante do plasma após consumo dos sucos, excetuando-se o cambuci, pelo método FRAP aumentou significativamente ($p<0,05$) em t = 120 min. Após o consumo dos sucos (t = 120 min), observou-se um aumento significativo ($p<0,05$) da capacidade antioxidante do plasma medida pelo método de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) (exceto maracujá-alho e camu-camu) e pelo poder antioxidante de redução do Fe (FRAP) (exceto cambuci).

Tabela 11. Capacidade antioxidante do plasma (ORAC) e poder antioxidante de redução do Fe (FRAP) dos voluntários antes e após a ingestão da refeição-controle (pão + água) e da refeição-teste (pão + suco).

	ORAC		**FRAP**	
	mM eq. Trolox/mL de plasma		nM eq. Trolox/mL de plasma	
	T inicial = 0'	**T final = 120'**	**T inicial = 0'**	**T final = 120'**
Controle	10,0 ± 2,7	11,2 ± 1,4	0,086 ± 0,026	0,096 ± 0,023
Cambuci	9,9 ± 2,5*	14,7 ± 3,0*	0,099 ± 0,029	0,110 ± 0,021
Cagaita	12,7 ± 2,5*	15,9 ± 2,3*	0,094 ± 0,023*	0,109 ± 0,020*
Maracujá-alho	14,3 ± 3,0	12,9 ± 6,0	0,089 ± 0,026*	0,107 ± 0,021*
Cupuaçu	10,5 ± 2,5*	14,2 ± 1,9*	0,102 ± 0,029*	0,134 ± 0,025*
Camu-camu	15,5 ± 2,2*	11,6 ± 2,4*	0,099 ± 0,026*	0,116 ± 0,018*
Araçá	12,9 ± 3,1*	16,5 ± 3,4*	0,083 ± 0,025*	0,128 ± 0,031*
Jabuticaba	9,8 ± 3,3*	13,8 ± 4,8*	0,103 ± 0,023*	0,119 ± 0,020*

Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão (n = 23). Médias na mesma linha com asterisco (*) são significativamente diferentes (p<0,05).

4.5. Aceitabilidade dos sucos clarificados de frutas nativas brasileiras.

A aceitabilidade dos sucos foi medida utilizando uma escala hedônica. Na **Figura 4**, observam-se os resultados do teste de aceitabilidade de cada suco. O suco do araçá e da jabuticaba foram os de maior aceitação, agradando mais de 50 % dos voluntários. Os sucos que apresentaram maior rejeição, entre mais de 50% dos voluntários, foram os sucos de camu-camu, maracujá-alho e cambuci. Os sucos de cagaita e cupuaçu apresentaram aceitação moderada.

Os voluntários relataram sensações indesejáveis na semana posterior à ingestão dos sucos. Todos os voluntários, após a ingestão do suco de cagaita,

relataram flatulência e aumento do trânsito intestinal de maior ou menor intensidade. Algum grau de saciedade foi alegado pelos voluntários após a ingestão dos sucos do cupuaçu e araçá. Os indivíduos testados não relataram nenhum outro efeito após a ingestão dos outros sucos estudados.

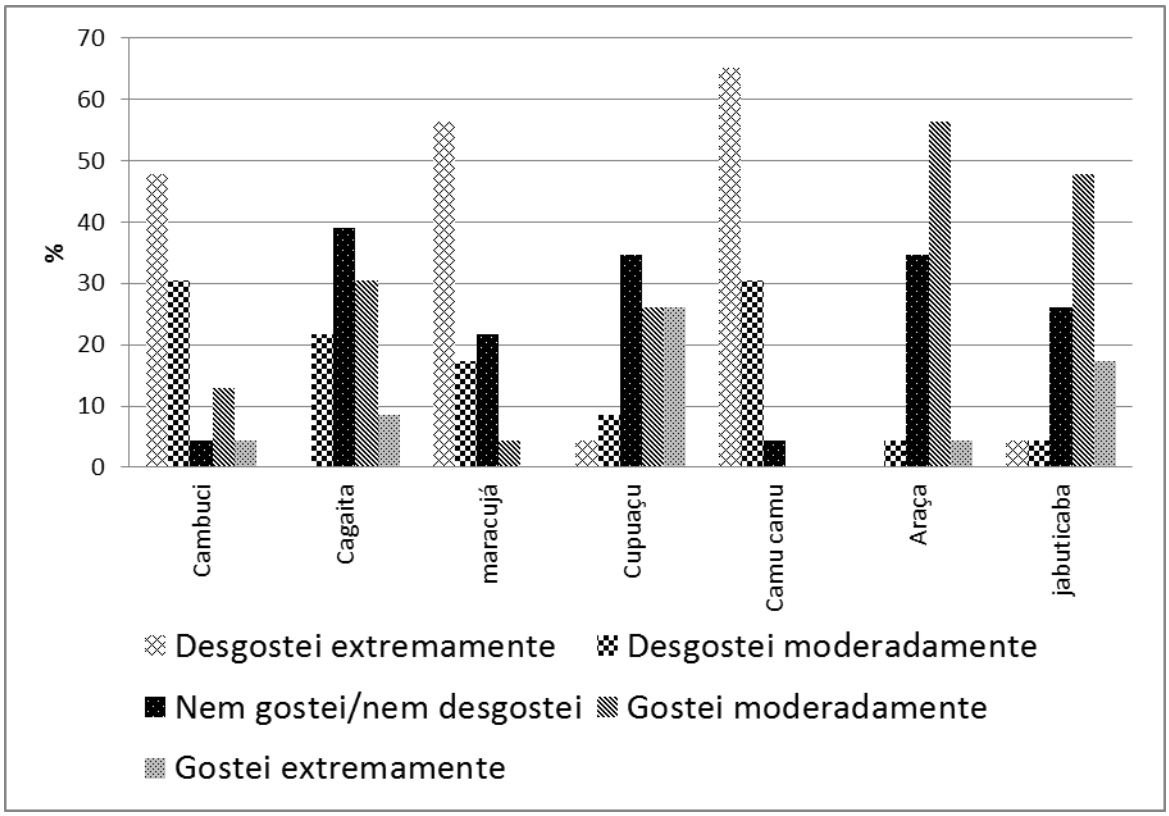

Figura 4: Porcentagem de aceitabilidade dos sucos através de escala hedônica; número de voluntários = 23.

5. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito de diferentes sucos de frutas nativas brasileiras sobre a resposta glicêmica pós-prandial após a ingestão de suco clarificado de frutas nativas brasileiras com uma unidade de pão branco (pão francês) com 55 ± 5,5 g, contendo aproximadamente 21 ± 1,5 g de carboidratos disponíveis. Os sucos de cambuci, cagaita, cupuaçu, camu-camu e araçá atenuaram a resposta glicêmica pós-prandial em indivíduos saudáveis e apresentaram os menores valores de PIg e ATG.

Os sucos de cambuci, cagaita, camu-camu, araçá e jabuticaba apresentaram uma VIg (velocidade de incremento da glicose) menor do que as dos demais sucos estudados, isto é, a concentração sanguínea máxima de glicose ocorreu mais tardiamente do que nos demais sucos estudados. Estudos anteriores mostrou que para refrigerantes e suco de fruta, observou-se um rápido aumento da concentração sanguínea máxima de glicose, o que causa uma elevada secreção insulínica seguida de uma redução brusca na concentração de glicose sanguínea máxima (BRAND-MILLER et al., 2009). A manutenção prolongada da concentração de glicose sanguínea faz parte da estratégia de redução do risco e controle da diabetes e doenças cardiovasculares. O rápido aumento dos níveis de glicemia tem como resposta um rápido aumento dos níveis de insulina. A insulina promove a utilização da glicose pelas células do fígado e músculo esquelético e a formação de glicogênio. A insulina também promove a síntese de ácidos graxos, podendo promover o acúmulo de lipídeos no músculo esquelético e fígado, o que está associado à redução da sensibilidade à insulina (BARRET; UDANI, 2011).

Josse et al. (2007) observaram que o consumo de amêndoas é capaz de atenuar a glicemia pós prandial em indivíduos saudáveis, e que seu efeito é dose

dependente. As amêndoas são fontes ricas de fitato e fenólicos, ambos reduzem a digestão do amido *in vitro* e estão associados com a redução pós prandial glicêmica *in vivo*. O suco de cranberry foi avaliado quanto à capacidade de atenuação da glicemia pós prandial, e observou-se atenuação significativa da ATG em relação ao controle, com o consumo do suco de cranberry. O suco de cranberry utilizado no estudo era rico em quercetina, miricetina e proantocianidinas (WILSON et al., 2008).

Estudos com indivíduos diabéticos e não-diabéticos demonstram que o risco de morte por doenças cardiovasculares, e o mesmo de morte por outras causas, e é maior naqueles indivíduos com alteração na glicemia de 2 horas, e que, ao mesmo tempo, apresentam glicemia de jejum normal (GROSS et al., 2003). Assim, o estudo do controle da glicemia pós-prandial, e, principalmente, a possibilidade de obtê-lo através de compostos presentes na própria dieta são passos fundamentais.

A digestão de carboidratos e a absorção de glicose são obviamente os processos-alvo para um melhor controle glicêmico depois da ingestão de refeições com alto teor de carboidratos. As enzimas digestivas α-amilase e α-glicosidase são enzimas-chave, responsáveis pela conversão dos carboidratos em glicose. A glicose liberada é absorvida através dos enterócitos via transportes específicos. A inibição das enzimas digestivas ou do transporte de glicose reduziria a disponibilidade e a absorção de glicose e, consequentemente, evitaria a hiperglicemia pós-prandial.

A absorção intestinal da glicose é mediada pelo transporte ativo dependente do sódio via SGLT1 e por transporte facilitado independente do sódio via GLUT2 (DROZDOWSKI; THOMSON, 2006). A influência dos polifenóis sobre o transporte de glicose vem sendo estudada *in* vitro, e muitos flavonoides e ácidos fenólicos mostraram efeito inibitório sobre tal processo. A quercetina e a catequina são capazes de inibir o transporte de glicose, seja via GLUT2, seja via SGLT1

(JOHNSTON et al., 2005; STROBEL et al., 2005). A quercetina e seus derivados foram identificados em abundância nos sucos de cagaita, camu-camu e jabuticaba e a catequina e seus derivados e a proantocianidina B1 foram detectados nos sucos de araçá e cupuaçu. Nesse estudo, o tratamento com estes sucos foram os que resultaram na maior redução e na manutenção prolongada da concentração de glicose sanguínea no período avaliado.

Todos os sucos estudados apresentaram inibição da atividade enzimática da α-amilase e da α-glicosidase em modelo *in vitro*. Os compostos fenólicos purificados a partir dos sucos de cambuci, cagaita, camu-camu, araçá e jabuticaba melhor inibiram a atividade enzimática da α-amilase, ao passo que os do cambuci, cagaita, cupuaçu e araçá foram os mais eficientes na inibição da enzima α-glicosidase em modelo *in vitro*. A inibição destas enzimas pode explicar a redução e a manutenção prolongada da concentração de glicose sanguínea, observadas no período avaliado após o consumo dos sucos acima.

Portanto, os compostos fenólicos presentes nos sucos de cambuci, cagaita, camu-camu, cupuaçu, araçá e jabuticaba parecem ser eficazes na atenuação da glicemia pós-prandial através da inibição da atividade enzimática da α-amilase.

A inibição destas enzimas também foi observada em estudo com os compostos fenólicos extraído de frutas nativas brasileiras utilizando de modelo *in vitro* similar ao utilizado neste estudo (GONÇALVES et al., 2010). Macdougall e Stewart (2005) atribuíram à inibição da atividade das enzimas α-amilase e α-glicosidase observada em seu estudo à presença de antocianinas e elagitaninos nas framboesas e morangos estudados, respectivamente. Em um estudo realizado por Hargrove et al. (2011), observaram que 1,5 µg de fenólicos/mL fração de taninos e 12 µg de fenólicos/mL fração de flavonóides simples (taninos livres) foram capazes

de inibir em 91% e 29 % da atividade da enzima α-amilase *in vitro,* respectivamente. No presente trabalho, comparou-se a eficiência dos compostos fenólicos extraídos dos sucos de frutas nativas brasileiras por extração em fase sólida (EFS) com poliamida e C18. De forma geral, as frações purificadas em C18 foram mais efetivas na inibição enzimática, demonstrando claramente o envolvimento dos taninos. O Maracujá-alho, que não apresenta taninos totais nem elagitaninos, não mostrou diferença entre a inibição causada pela fração C18 e fração poliamida, comprovando que seu efeito na inibição das enzimas α-amilase e α-glicosidase estão provavelmente associados aos flavonoides homorientina e vitexina.

O ácido elágico é um composto fenólico presente em algumas frutas e castanhas, tais como: morango (*Fragaria ananassa)*, framboesa (*Rubus fruticosus)*, romã (*Punica granatum*) e nozes (*Juglans regia*) (DANIEL et al., 1989). Pode ocorrer na forma livre, glicosilada ou ligado como elagitaninos, esterificado com glicose (BATE-SMITH, 1972). Os elagitaninos são compostos fenólicos solúveis em água de alto peso molecular e com capacidade de precipitação de proteínas e alcaloides (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000). Algumas atividades biológicas importantes dos elagitaninos e ácido elágico foram demonstradas: atividade antiproliferativa e indução de apoptose em cultura de células carcinogênicas do epitélio cervical (NARAYANAN et al., 1999); prevenção de câncer do trato gastrointestinal atribuída ao acúmulo seletivo de ácido elágico em células epiteliais de rato (WHITLEY et al., 2003); atividade antimicrobiana seletiva em microrganismos patogênicos para o homem (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2005); redução da incidência de morte por problemas cardíacos (ANDERSON et al., 2001). Além dessas propriedades o ácido elágico e os elagitaninos são alvo de muitas pesquisas por demonstrar alta atividade

antioxidante *in vitro* (MEYER et al., 1998). Todos os sucos, exceto os sucos de maracujá-alho e cupuaçu, apresentaram elevados teores de elagitaninos.

Todos os sucos estudados levaram à redução da área abaixo da curva glicêmica (ATG) de indivíduos saudáveis, variando entre 11% (suco do maracujá-alho) e 62% (suco da cagaita). A acarbose foi capaz de reduzir a ATG de indivíduos diabéticos em 28% (HERRMANN et al., 1998). A acarbose é um inibidor da α-glicosidase, enzima responsável pela degradação de dissacarídeos e polissacarídeos no intestino delgado e utilizado no tratamento do diabetes mellitus. Em estudo realizado por Gonçalves et al. (2010), alguns compostos fenólicos isolados foram testados (rutina, quercetina, ácido clorogênico, catequina, ácido elágico e ácido rosmarínico), assim como a acarbose em modelo *in vitro*. Entre os que estão presentes nos sucos estudados, a quercetina foi o composto com maior potencial de inibição, seguida pelo ácido elágico, e ambos foram mais eficientes que a acarbose.

Em resumo, embora os resultados indiquem que os compostos fenólicos presentes nos sucos são os responsáveis pela inibição destas enzimas, não foi possível estabelecer uma correlação com o tipo e a quantidade de flavonoides presentes. Deve-se considerar ainda, os possíveis efeitos sinergistas e/ou antagonistas entre eles podem estar implicados nos resultados encontrados.

Portanto, o efeito na atenuação da glicemia pós-prandial do suco de cagaita pode não estar relacionado apenas com a presença de compostos fenólicos, uma vez que, após sua ingestão, foi relatado aumento de trânsito intestinal, o qual, por sua vez, pode ter reduzido a absorção de carboidratos devido a um menor tempo de contato com os enterócitos. A cagaita possui um peptídeo contendo 15 resíduos de aminoácidos com propriedades laxativas. A polpa *in natura* (10 mL/Kg) e uma dose

de 6 mg/Kg de fração rica no peptídeo identificado foram capazes de aumentar significativamente o trânsito intestinal em ratos (14,8% para a polpa *in natura* e 19% para a fração rica em peptídeo em relação ao controle - água). A cagaita é capaz de aumentar o trânsito intestinal sem causar diarreia e alterações de eletrólitos, além de promover proteção às microvilosidades intestinais (LIMA et al. 2010). A microbiota intestinal tem um papel importante na absorção dos compostos fenólicos e em seu metabolismo, logo ela é fundamental para a obtenção dos benefícios dos compostos bioativos (SELMA; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2009).

O primeiro passo após a ingestão de compostos fenólicos presentes na dieta é a liberação dos mesmos de sua matriz. A deglicosilação de flavonoides, a clivagem de proantocianidinas poliméricas e a hidrólise de ácidos fenólicos esterificados são consideradas pré-requisitos para absorção dos mesmos através da barreira intestinal (MANACH, SCALBERT, DONAVAN, 2004). Os produtos desta metabolização podem entrar na corrente sanguínea e serem excretados através da urina, ou ainda, pela circulação enterohepática, uma fração considerável pode ser excretada pelo fígado como componente da bile de volta para o intestino (MCBAIN e MACFARLANE, 1997). Uma vez liberados no lúmen intestinal, estes conjugados podem ser hidrolisados por enzimas bacterianas como as β-glicuronidases, sulfatases e glicosidases (CROZIER et al., 2010; SELMA et al., 2009). Os compostos que não são absorvidos no intestino delgado vão diretamente para o intestino grosso, onde são degradados pela microbiota colônica a compostos mais simples, como ácidos fenólicos, e assim serem absorvidos pelo sistema circulatório. Uma vez no intestino grosso, os flavonoides e seus metabólitos podem apresentar benefícios a microbiota colônica por selecionar bactérias probióticas ou inibir a proliferação de células cancerígenas (DEL RIO et al., 2010).

O consumo dos sucos mostrou afetar positivamente a capacidade antioxidante do plasma dos voluntários, que foi avaliada em t = 0 min (antes da ingestão de pão branco mais água ou suco) e t = 120 min (após a ingestão de pão branco mais água ou suco) através dos métodos de ORAC e FRAP (**Tabela 6**). A capacidade antioxidante do plasma dos voluntários, pelo método ORAC, apresentou aumento significativo ($p<0,05$) após o consumo dos sucos em t = 120 min (25% para a cagaita, 28% para o araçá, 35% para o cupuaçu, 41% para a jabuticaba, e 41% para o cambuci), excetuando-se os sucos de maracujá-alho e camu-camu. A capacidade antioxidante do plasma determinada pelo método FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) também aumentou significativamente ($p<0,05$) em t = 120 min após consumo dos sucos (16-17% para jabuticaba, camu-camu e cagaita, 20% maracujá, 31% cupuaçu, 54% araçá), excetuando-se o cambuci.

Em resumo, após o consumo dos sucos (t = 120 min), observou-se um aumento significativo ($p<0,05$) da capacidade antioxidante do plasma medida pelo método de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) (exceto maracujá-alho e camu-camu) e pelo poder redutor do Fe (FRAP) (exceto cambuci). A extensão desse aumento foi variável de acordo com a propriedade medida (transferência de elétrons ou de átomos de hidrogênio) e com o tipo de composto polifenólico presente, o que era esperado, em decorrência da diferente biodisponibilidade.

Todos os sucos apresentaram incremento da capacidade antioxidante no plasma dos voluntários. O incremento no sistema de defesa antioxidante é fundamental para promover redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis. E os mecanismos pelos quais as doenças crônicas se desenvolvem, geralmente envolvem alterações oxidativas de moléculas consideradas críticas, o

que inclui proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, além das substâncias envolvidas na modulação da expressão gênica e em respostas inflamatórias (KAWANISHI et al., 2002; LAGUERRE et al., 2007). Adicionalmente, evidências científicas indicam que antioxidantes exógenos, obtidos a partir dos alimentos, são fundamentais para a resposta do organismo ao estresse oxidativo (SAURA-CALIXTO; GOÑI, 2009; VASCO et al., 2008). Snyder et al. (2011) observaram elevação da capacidade antioxidante no plasma de voluntários saudáveis após uma hora do consumo de suco de laranja em relação aos outros grupos do estudo, dos quais um recebeu uma mistura contendo ácido ascórbico e açúcar e o outro grupo recebeu uma mistura contendo os flavonóides hesperidina, naringenina e luteolina, acreditando ocorrer efeito sinérgico.

Os sucos estudados são ricos em nutrientes, principalmente minerais, considerando a definição da FDA (*Food and Drug Administration*), para um alimento pode ser considerado fonte de determinado nutriente, é necessário que ele supra 10 % do valor de ingestão diária recomendada (IDR). Portanto, os sucos de cupuaçu, jabuticaba e araçá podem ser considerados fontes de potássio nos sucos clarificados estudado, pois suprem 10, 10 e 14%, respectivamente, das necessidades diárias recomendadas (IDR). O aumento da concentração plasmática do potássio após sua absorção pelo trato gastrointestinal estimula a secreção de insulina pelo pâncreas assim como a redução deste mineral inibe a liberação deste hormônio. A insulina é o hormônio mais importante na deslocação do potássio para dentro da célula após sua ingestão em uma refeição. O potássio também está envolvido na síntese de glicogênio, metabolismo de carboidratos além do catabolismo de glicose (PITTMAN, PHILIPSON, STEINER, 2009).

Neste estudo, os sucos clarificados de frutas nativas brasileiras testados foram selecionados a partir de estudos anteriores (GENOVESE et al., 2008; GONÇALVES et al., 2010) que, excetuando-se o maracujá-alho, mostraram que estas frutas se destacaram pelo alto teor de compostos fenólicos, elevada capacidade antioxidante *in vitro* e capacidade inibitória das enzimas do metabolismo de carboidratos *in vitro*. Os resultados obtidos são bastante promissores e indicam o potencial dessas frutas em auxiliar na prevenção/tratamento de hiperglicemia pós-prandial, seja no diabético, seja no não-diabético. No entanto, a baixa aceitabilidade dos sucos de camu-camu e cambuci torna necessária a adoção de novas formas de veiculação dos compostos presentes, tais como a formulação de cápsulas contendo extrato aquoso seco. Contudo, os sucos de cagaita, araçá e cambuci tiveram excelente desempenho na atenuação da glicemia pós-prandial além de uma boa aceitabilidade pelos voluntários do estudo, de modo a facilitar sua introdução a dieta da população.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os sucos de cagaita, araçá, cambuci, camu-camu, cupuaçu e jabuticaba melhoram a resposta glicêmica pós-prandial, o que parece estar associado à inibição das enzimas responsáveis pelo metabolismo de carboidratos, α-amilase e α-glicosidase, pelos compostos fenólicos presentes. Todos os sucos, exceto maracujá-alho, também apresentaram os maiores teores de proantocianidinas e as mais elevadas capacidades antioxidantes *in vitro*. Dos sucos estudados não foram detectados quantidades de fibras, confirmando que a redução da concentração de glicose sanguínea máxima observada ocorreu pela ação dos compostos fenólicos. Todos os sucos estudados reduziram a área abaixo da curva de resposta glicêmica e aumentaram significativamente a capacidade antioxidante do plasma de indivíduos saudáveis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA – AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 35, p. S64-S71, 2012.

ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A. α-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to Phyllanthus amarus. **Journal of Ethnopharmacology**., v. 107, p. 449-55, 2006.

ANDERSON, J.W.; RANDLES, K.M.; KENDALL, C.W.C.; JENKINS, D.J.A. Carbohydrate and fiber recommendations for individuals with diabetes: A quantitative assessment and meta-analysis of the evidence. **Journal of the American college of nutrition.** v. 23, p. 5-17, 2004.

ANDERSON, K. J. ; TEUBER, S. S.; GOBEILLE, A.; CREMIN, P.; WATERHOUSE, A. L.; STEINBERG, F. M. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2837-2842, 2001.

AOAC (1995). **Official Methods of Analysis**, Association of Official Analytical Chemists. 16th ed., Washington DC., 1995.

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1124-1131, 2004.

BALISTEIRO, D.M.; ROMBALDI, C.V.; GENOVESE, M.I. Protein, isoflavones, trypsin inhibitory and *in vitro* antioxidant capacities: Comparison among convencionally and organically grown soybeans. **Food Research International**, v. 51, p. 8-14, 2012.

BARRET, M.L.; UDANI, J.K. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (Phaseolus vulgaris): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. **Nutrition Journal**, v.10(24), 2011.

BATE-SMITH, E. C. Detection and determination of ellagitannins. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1153-1156, 1972.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical biochemistry** v. 239,p. 70-76, 1996.

BISCHOFF, H. Effect of acarbose on diabetic late complications and risk factors – new animal experimental results. **Akt Endokr Stoffw**, v. 12, p. 25–32, 1991.

BISCHOFF, H. Pharmacology of α-glucosidase inhibition. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 24 (3), p.3-10, 1994.

BRAND-MILLER, J.C.; STOCKMANN, K.; ATKINSON, F.; PETOCZ, F.; DENYER, G. Glycemic index, postprandial glycemia, and the shape of the curve in healthy subjects: analysis of database of more than 1000 foods. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, p. 97-105, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL – Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. **Cadeia produtiva de frutas**. Volume: 7. Secretaria de Política Agrícula, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura; Antônio Márcio Buainain e Mário Otávio Batalha. Brasília: IICA: MAPA/SPA, 2007.

BURNS, J.; GARDNER, P.T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G.G.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines during Vinification. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 5797-5808, 2001.

CHASSY, A.W.; BUI, L.; RENAUD, E.N.C.; HORN, M.V.; MITCHELL, A.E. Three-years comparison of the content of antioxidant micronutrients and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 54, p. 8244-8252, 2006.

COLLINS, Q.F.; LIU, H.Y.; PI, J.; LIU, Z.; QUON, M.J.; CAO, W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis

through 5'-AMP-activated protein kinase. The **Journal of Biological Chemistry,** v. 282, p. 30143-30149, 2007.

CORDAIN, L. Cereal grains: humanity's double-edged sword. **World review of nutrition and dietetics**, v. 84, p. 19-73, 1999.

CORRÊA, F.H.; NOGUEIRA, V.G.; BEVILÁCQUA, M.F.; GOMES, M.B. Avaliação da Secreção e Resistência Insulínica em Indivíduos com Diferentes Graus de Tolerância à Glicose — do Metabolismo Normal ao Diabetes Mellitus. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabolismo**. v. 51, p. 1498-1505, 2007.

COS, P.; DE BRUYNE, N.; HERMANS, N.; APERS, S.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A.J. Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1345-1359, 2003.

CROZIER, A.; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 446-467, 2010.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001-1043, 2009.

DAM, R. M. Coffee and Type 2 diabetes: From beans to beta-cells. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease**, v. 16, 69-77, 2006.

DÁVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVES, C.; BARTOLOME, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 48-54, 2004.

DE LÉON, D.D.; CRUTCHOLOW, M.F.; HAM, J.; STOFFERS, DA.. Role of glucagon like peptide-1 in the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 845-859, 2006.

DEACON, C.F. What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? **Regulatory Peptides**, v.128, p. 117-124, 2005.

DEAN, W. A botânica e a política imperial: a introdução e a domesticação de plantas no Brasil. **Estudos Históricos**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 8, p. 216-228, 1991.

DEL RIO, D.; COSTA, L. G.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A., Polyphenols and health: What compounds are involved? **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, p. 1-6, 2010.

DIAMOND, J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. **Nature**, v. 418, p. 700-707, 2002.

DROZDOWSKI, L.A.; THOMSON, A.B.R. Intestinal sugar transport. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 1657-1670, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, P.A.; REBERS, F.S. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUMAS, M. E.; BARTON, R.H.; TOYE, A.; CLOAREC, O.; BLANCHER, C.; ROTHWELL, A.; FEARNSIDE, J.; TATOUD, R.; BLANC, V.; LINDON, J.C.; MITCHELL, S.C.; HOLMES, E.; MCCARTHY, M.I.; SCOTT, J.; GAUGUIER, D.; NICHOLSON, J.K. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. **Proceedings of the. National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 12511–12516, 2006.

ELSENHANS, B.; CASPARY, W.F. Absorption of carbohydrates. In: Caspary WF, editor. **Structure and Function of the Small Intestine**. Amsterdam, The Netherlands: Excerpta Medica; 1987.

FANG, X.K.; GAO, J.; ZHU, D.N. Kaempferol and quercetina isolated from Euonymus alatus improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. **Life Sciences**, v. 82, p. 615-622, 2008.

FELDMAN, K. S. Recent progress in ellagitannin chemistry. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1984-2000, 2005.

GENOVESE, M. I.; SANTOS, R. J.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39 (3), p. 67-69, 2003.

GIUNTINI, E.B.; LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. Tabela brasileira de composição de alimentos TBCA-USP: Versões 3 e 4. **Archivos Latinoamericanos de Nutritión**, v. 56, p. 183-203, 2006.

GONÇALVES, A.E.S.S.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4666-4674, 2010.

GROSS, J.L.; FERREIRA, S.R.G.; OLIVEIRA, J.E.de. Glicemia Pós-prandial. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.47 (6), p. 728-738, 2003.

GROVER, J. K.; YAVAD, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with antidiabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 81-100, 2002.

GUSTAVSON, K.H. Interaction of vegetable tannins with polyamides as proof of the dominant function of the peptide bond of collagen for its binding of tannins. **Journal of polymer science**, v. 12, p. 317-324, 1954.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 809–812, 1978.

HANAMURA, T.; MAYAMA, C.; AOKI, H.; HIRAYAMA, Y.; SHIMIZU, M.. Antihyperglycemic effect of polyphenols from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v.** 70, p. 1813-1820, 2006.

HARGROVE, J.L.; GREENSPAN, P.; HARTLE, D.K.; DOWD, C. Inhibition of aromatase and α-amylase by flavonoids and proanthocyanidins from *Sorghum bicolor* bran extracts**. Journal of Medicinal Food,** v. 14 (7/8), p. 799-807, 2011.

HERRMANN, B.L.; SCHATZ, H.; PFEIFFER, A. Continuous blood glucose monitoring: the acute effect of acarbose on blood glucose variations. **Medizinische Klinik (Munich)**, v. 15:93 (11), p. 651-5, 1998.

HOLST, J.; DEACON, C.F.; VILSBØL, T.; KRARUP, T.; MADSBAD, S. Glucagon-like peptide-1, glucose homeostasis and diabetes. **Trends in Molecular Medicine**, v. 480, 2008.

HUXLEY, R.R.; FILION, K. B.; KONETY, S.; ALONSO, A. Metaanalysis of cohort and case-control studies of type 2 diabetes mellitus and risk of atrial fibrillation. **American Journal of Cardiology**, v. 108, p. 56-62, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS – IBRAF. Produção brasileira de frutas – 2007. **Instituto brasileiro de frutas**. Disponível em: http://www.ibraf.org.br/ estatisticas/est_frutas.asp Acesso em 20/09/2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Manual técnico da vegetação brasileira. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/geociências/ recursosnaturais/vegetacao/ manual_vegetacao.shtm Acesso em: 21/09/2012.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas, 5th edn. Brussels, Belgium: **International Diabetes Federation**, 2011.

JOHNSTON, K.; SHARP, P.; CLIFFORD, M.; MORGAN, L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. **FEBS Lett**, v. 579, p. 1653-1657, 2005.

JOHNSTON, K.L.; CLIFFORD, M.N.; MORGAN, L.M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: Glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 728-733, 2003.

JOHNSTON, K.L.; CLIFFORD, M.N.; MORGAN, L.M. Possible role for apple juice phenolic compounds in the acute modification of glucose tolerance and gastrointestinal hormone secretion in humans. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** v. 82, p. 1800-1805, 2002.

JOSSE, A.R.; KENDALL, C.W.C.; AUGUSTIN, L.S.A.; ELLIS, P.R.; JENKINS, D.J.A. Almonds and posprandial glycemia - a dose-response study. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.56, p. 400-404, 2007.

JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BRAGA, M. F.; PEIXORTO, J. R. Domesticação de espécies da flora nativa do Cerrado. In: Lucília Maria Parron et al.. (Org.). Cerrado: Desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável. 1ª ed. Brasília: **Embrapa Cerrados**, v. 1, p. 125-163, 2008.

KAWANISHI, S.; MURATA, M.; TAKAHASHI, A.; SAITO, I. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, p. 822-32, 2002.

KIM, J. S.; KWON, C. S.; SON, K. H. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 11, p. 2458-61, 2007.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99(2), p. 213-218, 1999.

KOH, L.W.; WONG, L.L.; LOO, Y.Y.; KASAPIS, S.; HUANG, D. Evaluation of different teas against starch digestibility by mammalian glycosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, 1p. 48-154, 2010.

KWON, Y. I.; VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Clonal herbs of Laminaceae species against diabetes and hypertension. **Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 15, p. 424-432, 2006.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Review. **Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244-282, 2007.

LEY, R. E., TURNBAUGH, P. J., KLEIN, S. & GORDON, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, p. 1022–1023, 2006.

LILA, M.A. From beans to berries and beyond: Teamwork between plant chemicals for protection of optimal human health. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1114, p. 372-380, 2007.

LIMA, T.B.; SILVA, O.N.; OLIVEIRA, J.T.A.; VASCONCELOS, I.M.; SCALABRIN, F.B.; ROCHA, T.L.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; SILVA, L.P.; GUADAGNIN, R.V.; QUIRINO, B.F.; CASTRO, C.F.S.; LEONARDECZ, E.; FRANCO, O.L. Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: A novel strategy in the treatment of chronic constipation and bowel syndrome**. Peptides**, v. 31, p. 1326-1433, 2010.

LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. The **American Journal of Clinical Nutrition, v.** 78, p. 517S-520S, 2003.

LO PIPARO, E.; SCHEIB, H.; FREI, N.; WILLIAMSON, G.; GRIGOROV, M.; CHOU, C.J. Flavonoids for controlling starch digestion: Structural requirements for inhibiting human alpha-amylase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 3555-3561, 2008.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba; POTAFOS, ed. 2, p. 319, 1997.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-47, 2004.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p; 727-747, 2004.

MANGANARO, M.M. Nutrição aplicada à enfermagem. In: MURTA, G.F. Saberes e práticas: guia para ensino e aprendizado de enfermagem. 4º edição, volume 3, São Caetano deo Sul, 2008.

MCBAIN, A.; MACFARLANE, G. Investigations of bifidobacterial ecology and oligosaccharide metabolism in a three-stage compound continuous culture system. **Scandinavian journal of gastroenterology**. Supplement, v. 222, p. 32, 1997.

MCDOUGALL, G.J.; STEWART, D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **Biofactors**, v. 23 (4), p. 189-195, 2005.

MENEZES, E.W.; LAJOLO, F.M. marcadores *in vivo* ou *in vitro* de carboidratos. In: LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. Carbohidratos en alimentos regionales ibero-americanos. Proyecto CYTED/CNPq XI.18. **Composición, estructura, propriedades biológicas de carbohidratos y su utilización en alimentos.** EDUSP, São Paulo, p. 309-334, 2006.

MEYER, A. M. B. S.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food Chemistry**, 61, 71-75, 1998.

MILECH, A.; CHACRA, A.R.; KAYATH, M.J. Revisão da hiperglicemia pós-prandial e hipoglicemia no controle do diabetes mellitus: o papel da insulina lispro e suas pré-misturas nos picos e vales. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia& Metabologia, v.45 (5), p.423-432, 2001.

NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; MIYAKE, N.; KOHNO, H.; OSAWA, T. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p. 3309-3312, 2003.

NARAYANAN, B. A.; GEOFFROY, O.; WILLINGHAM, M. C.; RE, G. G.; NIXON, D. W. p53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. **Cancer Letters**, v. 136, p. 215-221, 1999.

NOGUEIRA, A.K.M.; SANTANA, A.C. Análise de sazonalidade de preços de varejo de açai, cupuaçu e bacaba no estado do Pará. **Revista de Estudos Sociais** - ano 11, v. 21, n. 1, p.22, 2009.

PINTO, M. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). **Food Chemistry**, v. 107, p. 1629-1635, 2008.

PINTO, M.S.; KWON, Y.I.; APOSTOLIDIS, E.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I.; SHETTY, K. Functionality of bioactive compounds in Brazilian strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars: evaluation of hyperglycemia and hypertension potential

using *in vitro* models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.** 56 (12), p. 4386-4392, 2009.

PINTO, M.S.; RANILLA, L.G.; APOSTOLIDIS, E.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I.; SHETTY, K. Evaluation of antihyperglycemia and antihypertension potential of native Peruvian fruits using *in vitro* models. **Journal of Medicinal Food,** v.12(2), p. 278-291, 2009.

PISTROSCH, F.; SCHAPER, F.; PASSAUER, J.; KOEHLER, C.; BORNSTEIN, S.R.; HANEFELD, M. Effects of the alpha glucosidase inhibitor acarbose on endothelial function after a mixed meal in newly diagnosed type 2 diabetes. **Hormone and metabolic research**, v. 41, p. 104-108, 2009.

PITTMAN, I.; PHILIPSON, L.H.; STEINER, D.F. Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships. In: LEAHY, J.L. **Diabetes and Carbohydrate Metabolism**, The endocrine source, 2009.

PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin, **Phytochemistry**, v.25, 223-230, 1986.

PUUPPONEN-PIMIA, R.; NOHYNEK, L.; HARTMANN-SCHMIDLIN, S.; KAHKONEN, M.; HEINONEN, M.; MAA TTA-RIIHINEN, K.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 991–1000, 2005.

RANILLA, L.G.; APOSTOLIDIS, E.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M.; SHETTY, K. Evaluation of indigenous grains from the Peruvian Andean region for antidiabetes and antihypertension potential using *in vitro* methods. **Journal of Medicinal Food,** v.12(4), p. 1-10, 2009.

RANILLA, L.G.; KWON, Y.I.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M.; SHETTY, K. Antidiabetes and antihypertension potential of commonly consumed carbohydrate sweeteners using *in vitro* models. **Journal of Medicinal Food**, v.11(2), p. 337-348, 2008.

RIZZOLO, A.; FORNI, E.; POLESELO, A. HPLC assay of ascorbic acid in fresh and vegetables. **Food chemistry**, v.14, p. 189-199, 1984.

ROSA, S.E.S.; COSENZA, J.P.; LEÃO, L.T.S. Panorama do setor de bebidas no Brasil. **BNDES setorial**, Rio de Janeiro, nº 23, p. 101-150, 2006.

SALEHI, M.; AULINGER, B.A.; D'ALESSIO, D.A. Targeting β-cell mass in Type 2 diabetes: Promise and limitations of new drugs based on incretins. **Endocrine Reviews**, v. 29, p. 367-379, 2008.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1094-1117, 2000.

SAURA-CALIXTO, F.; GONI, I. Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 49(2), p. 145-52, 2009.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; REÌMEÌ SY, C.; JIMEÌNEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287-306, 2005.

SELMA, M.V.; ESPIN, J.C.; TOMAS-BARBERAN, F.A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. **Journal of Agricultural and. Food Chemistry,** v. 57, p. 6485-6501, 2009.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIA., R.; DAUER, A.; AURA, A.-M.; SAURA-CALIXTO, F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition** & **Food Research**, v. 53, p. S310-S329, 2009.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SLAVIN, J.L. Dietary fiber and body weight. **Nutrition**, v. 21, p. 411-418, 2005.

SNYDER, S.M.; REBER, J.D.; FREEMAN, B.L.; ORGAD, K.; EGGET, D.L.; PARKER, T.L. Controlling for sugar and ascorbic acid, a mixture of flavonoids

matching navel oranges significantly increases human postprandial serum antioxidant capacity. **Nutrition Research**, v. 31, p. 519-526, 2011.

SONG, Y.; MANSON, J. E.; BURING, J. E., SESSO, H. D.; LIU, S**.** Associations of Dietary Flavonoids with Risk of Type 2 Diabetes, and Markers of Insulin Resistance and Systemic Inflammation in Women: A Prospective Study and Cross-Sectional Analysis. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 24 (5), p. 376-384, 2005.

STROBEL, P.; ALLARD, C.; PEREZ-ACLE, T.; CALDERON, R.; ALDUNATE, R.; LEIGHTON, F: Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. **Biochemical Journal**, v*.* 386, p. 471–478, 2005.

TADERA, K.; MINAMI, Y.; TAKAMATSU, K.; MATSUAKA, T.; Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology, v.** 52, p. 149-153, 2006.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, p. 1089-1099, 2008.

TBCAUSP. Tabela brasileira de composição de alimentos. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental **Faculdade Ciências Farmacêutica/ Universidade de São Paulo**, http://www.fcf.usp.br/tabela/resultado.asp?IDLetter =T&IDNumber=19 Acesso em: 29 outubro 2012.

TOELLER, M. Alpha-glucosidase inhibitors in diabetes: efficacy in NIDDM subjects. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 24 (3), p.31-35, 1994.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R.; MENICHINI, F. Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.10,p. 315-331, 2010.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, p. 816-823, 2008.

WANG, Z.; KLIPFELL, E.; BENNETT, B.J.; KOETH, R.; LEVISON, B.S.; DUGAR, B.; FELDSTEIN, A.E.; BRITT, E.B.; FU, X.; CHUNG, Y.; WU, Y.; SCHAUER, P.; SMITH, J.D.; ALLAYEE, H.; TANG W.H.W.; DIDONATO, J.A.; LUSIS, A.J.; HAZEN, S.L. Gut florametabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. **Nature**, v. 472, p. 57-63, 2011.

WATANABE, Y.; KOMATSU, K. Biomechanical and morphological studies on the periodontal ligament of the rat molar after treatment with a-amylase in vitro. **Connect Tissue Research**, v. 36, p. 35-49, 1997.

WHELTON, P.K.; APPEL, L.J.; SACCO, R.L.; ANDERSON, C.A.M.; ANTMAN, E.M., CAMPBELL, N.; DUNBAR, S.B.; FROHLICH, E.D., HALL, J.E.; JESSUP, M.; LABARTHE, D.R.; MACGREGOR, G.A.; SACKS, F.M.; STAMLER, J. Sodium, Blood Pressure, and Cardiovascular Disease: Further Evidence Supporting the American Heart Association Sodium Reduction Recommendations. **Journal of the American Heart Association**, novembro 2, 2012.

WHITLEY, A. C.; STONER, G. D.; DARBY, M. V.; WALLE, T. Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid--extensive binding to protein and DNA. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 907-915, 2003.

WHO – World Health Organization, 2011. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I: diagnosis and classification of diabetes mellitus.** Disponível em: http://www.who.int/diabetes/publications/en/ Acesso em 10 de setembro de 2012.

WILSON, T.; SINGH, A.P.; VORSA, N.; GOETTL, C.D.; KITTLESON, K.M.; ROE, C.M.; KASTELLO, G.M.; RASGSDALE, F.R. Human glycemic response and phenolic content of unsweetened cranberry juice. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 46-54, 2008.

WOLFRAM, S.; RAEDERSTORFF, D.; PRELLER, M.; WANG, Y.; TEIXEIRA, S.R. RIEGGER, C.; WEBER, P. Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. **Journal of Nutrition,** v. 136, p. 2512-2518, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization; 2011.

YAMAKI, K.; MORI, Y. Evaluation of alpha-glucosidase inhibitory activity in Colored Foods: A trial using slope factors of regression curves. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi in Japanese**, 53, 2006.

YAMAMOTO, M.; YAMATO, E.; SHU-ICHI, T.; TASHIRO, F.; IKEGAMI, H.; YODOI, J.; MIYAZAKI, J. Transgenic expression of antioxidant protein thioredoxin in pancreatic β cells prevents progression of type 2 Diabetes Mellitus. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.10, p. 43-50, 2008.

ZHANG, Z.F.; LI, Q.; LIANG, J.; DAI, X.Q.; DING, Y.; WANG, J.B.; LI, Y. Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) protects the insulin sensitivity in rat L6 muscle cells exposed to dexamethasone condition. **Phytomedicine**, v. 17, p. 14-18, 2010.

ANEXOS

São Paulo, 30 de novembro de 2009.

Il^mo(a)^. S^r(a)^.

Dra. Maria Inês Genovese Rodriguez
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Efeito dos compostos fenólicos de frutas nativas brasileiras na glicemia pós-prandial" - **Pesquisador(a) Responsável**: Dra. Maria Inês Genovese Rodriguez - **Co-Investigador(es):** Elizabete Wenzel de Menezes, Ant Elisa Schmidt - **Registro CEP-HU/USP**: 937/09 – **SISNEP CAAE:** 0025.0.018.198-09

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 27 de novembro de 2009, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO,** bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra "c".

O primeiro relatório está previsto para 27 de novembro de 2010.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP
Avenida Professor Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – 05508-000 São Paulo – SP
Tels.: (11) 3091-9457 – Fax: (11) 3091-9452 - E-mail: cep@hu.usp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/166/2009
Protocolo CEP/FCF/525
CAAE: 0025.0.018.198-09

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Efeito dos compostos fenólicos de frutas nativas brasileiras na glicemia pós-prandial
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Maria Inês Genovese
Instituição:	FCF/USP e HU/USP
Área Temática Especial:	Não se aplica
Patrocinadores:	FAPESP

II - Sumário Geral do Protocolo:

Algumas frutas nativas brasileiras (cambuci, açaí, camu-camu, cagaita, algumas espécies de maracujá silvestres e a jabuticaba) são consideradas excelentes fontes de compostos bioativos de natureza fenólica.Estes compostos são capazes de inibir as enzimas do metabolismo de carboidratos *in vitro*. A inibição das enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase retarda e prolonga o tempo de digestão de carboidratos reduzindo, assim, a proporção de glicose absorvida e, conseqüentemente, o aumento brusco de glicose pós-prandial no plasma.

Os objetivos do presente estudo são:
Objetivo geral
Avaliar o efeito de compostos fenólicos de frutas nativas brasileiras na glicemia pós-prandial e no estado antioxidante do plasma.

Objetivos específicos
Avaliar o efeito de sucos clarificados de frutas nativas brasileiras sobre a glicemia pós-prandial e perfil antioxidante do plasma, em seres indivíduos adultos saudáveis, após consumo de 25 g de carboidratos (pão branco)
Estudar o efeito de compostos fenólicos purificados a partir dos sucos com redução na resposta glicemica sobre enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase *in vitro*.

Tipo de estudo: Ensaio clínico do tipo aleatório cruzado em várias fases.

Descrição da Casuística:
Serão selecionados 15 indivíduos saudáveis, de ambos gêneros, com idade entre 20 a 40 anos, no Centro de Pesquisa Clinica do Hospital Universitário/USP.
Cada indivíduo participará de 10 a 12 testes de refeição com ingestão de carboidratos (1 pão branco) e 250 mL de água (controle) ou sucos de frutas, com intervalos de uma semana entre os testes.
Serão obtidas amostras de sangue venoso (10 mL) antes e após 120 min da ingestão de pão branco e liquido (água ou suco de fruta), para determinação da capacidade antioxidante do plasma e de TBARS.
Também serão coletadas seis amostras de sangue capilar por punção digital (tempos: 0, 15, 30, 45, 60 e 120 min) para analise da glicemia pré- e pós-prandial. Também serão coletados dados de peso e altura para estimativa do Índice de massa corporal, e medidas de frequencia cardíaca e pressão arterial.
Não é informado se, nas mulheres, a variabilidade hormonal pode influenciar nos resultados.

Os critérios de inclusão dos participantes são:
Serão incluídos indivíduos saudáveis, de ambos gêneros, com idade entre 20 a 40 anos.

Serão critérios de exclusão:
Serão excluídos do estudo indivíduos fumantes, com sobrepeso (Índice de massa corporal superior a 25), com doenças do trato gastro-intestinal ou de hemostasia (hemofilia ou hemorragia), em uso de medicação para o tratamento de diabete melito tipo 2 ou para diminuir a viscosidade do sangue, ou em uso de suplementos vitamínicos/minerais.

III – Situação do protocolo: APROVADO em reunião de 14/12/2009.

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
  - a ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
  - eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
  - a interrupção do projeto.

  Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

São Paulo, 14 de dezembro de 2009.

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1. INFORMAÇÕES DO SUJEITO DA PESQUISA			
Nome:			
Documento de Identidade nº:			Sexo: ( ) M ( )F
Data de Nascimento: / /	Endereço:		
	Nº:	Complemento:	
Bairro:	Cidade:		Estado:
CEP:	Telefones:		

2. Título do Projeto de Pesquisa: Efeito de compostos fenólicos de frutas nativas sobre a glicemia pós-prandial	
3. Duração da Pesquisa: 2 anos	
4. Nome do pesquisador responsável: Maria Inés Genovese	
Cargo/ Função: Professor Doutor	
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas	

Prezado participante:

Eu, Maria Inés Genovese, farmacêutica-bioquímica, Prof. Dr. do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, como responsável pelo projeto de pesquisa intitulado "Efeito de compostos fenólicos de frutas nativas sobre a glicemia pós-prandial", gostaria de convidá-lo(a) para participar deste estudo, que conta com a colaboração da mestranda Diully Mata Balisteiro, nutricionista, pertencentes ao mesmo departamento.

Hiperglicemia é o aumento de açúcar no sangue. A principal causa da hiperglicemia é o diabetes, que ocorre devido a uma alteração na função do pâncreas por ausência, diminuição ou ação inadequada da insulina, o hormônio responsável pela manutenção dos níveis de açúcar no sangue (glicemia). A glicemia aumentada é danosa para o organismo e é fundamental que se tenha um bom controle da glicemia para evitar as complicações crônicas. Isto significa ter dosagens de glicemia menor do que 100 mg/dl em jejum e até 140 mg/dl quando medimos a glicemia até 2 horas após as refeições. Este estudo visa determinar quais sucos de frutas poderiam ajudar a controlar a hiperglicemia pós-prandial (a que ocorre após as refeições) já que se sabe que algumas frutas contêm substâncias que poderiam ter esse efeito.

Para participar deste estudo o indivíduo deve vir, pela manhã, em jejum de 8 a 10 horas e em seguida será fornecido um pão francês, juntamente com um copo de suco de fruta ou água, sem adição de açúcar, que deverão ser consumidos num tempo máximo de 10 minutos. Este procedimento será realizado a cada semana, num número total de 20 semanas. O tempo máximo de permanência no local para cada teste será de 4 horas. Para medir a glicemia, serão coletadas amostras de sangue através de uma picada no dedo, antes de consumir o pão e em intervalos regulares de tempo até duas horas após a ingestão. Serão realizadas 7 picadas no dedo, com intervalos entre elas de aproximadamente 15 minutos, além de duas coletas de 10 mL de sangue das veias do seu braço (punção venosa), para a determinação de capacidade antioxidante do sangue, antes e 2 horas após a ingestão do pão e do suco. O número previsto de voluntários é de 15. Os riscos são mínimos podendo causar uma mancha roxa no local devido à picada de agulha. Serão testadas apenas frutas já consumidas pela população, e não mais que uma vez por semana. A coleta de sangue será feita por equipe treinada do *Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário* utilizando materiais estéreis e descartáveis. Se a pesquisa identificar sucos de fruta que conseguem impedir os picos de glicemia, o seu consumo será estimulado para ajudar pessoas diabéticas e/ou obesas e sedentárias a controlar a glicemia pós-prandial sem a ajuda de medicamentos.

Será garantida assistência médica em caso de eventualidades decorrentes dos procedimentos realizados na pesquisa, encaminhando o indivíduo ao Serviço de Pronto

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Atendimento do HU-USP. Não haverá ajuda de custo referente ao deslocamento do sujeito até o Centro de Pesquisa Clínica. Será garantido acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas, e liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo.

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____ _____

Assinatura do sujeito de pesquisa Assinatura do pesquisador
I (carimbo ou nome legível)

Caso você tenha qualquer dúvida em relação a esta pesquisa ou em caso de quaisquer intercorrências, entre em contato com Prof. Dr. Maria Inés Genovese (Pesquisador responsável) ou Mestranda Diully Mata Balisteiro (colaboradora), no *Depto de Alimentos e Nutrição Experimental - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP:* Av. Prof. Lineu Prestes, 580. Bloco 14. Tel 3091-3647/3624.

Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Av Prof Lineu Prestes, 580 - Bloco 13A – Butantã – São Paulo – CEP 05508-900, Telefone 3091-3677 – e-mail: cepfcf@usp.br"
CEP-HU: Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – CEP: 05508-000 – São Paulo – SP - Telefone: 3091-9457 – Fax: 3091-9452 - e-mail: cep@hu.usp.br.