UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área: Bromatologia

Compostos bioativos com potencial ação no controle da homeostase glicêmica.

Ana Marla Duarte de Souza

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Orientação:

Prof^o. Dr. Franco Maria Lajolo

São Paulo
2017

Ana Marla Duarte de Souza

Compostos bioativos com potencial ação no controle da homeostase glicêmica.

Dissertação apresentada ao
Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do grau e MESTRE em
Ciências dos Alimentos.

Área de Concentração:
Bramatologia

Orientador: Profº. Dr. Franco Maria Lajolo

São Paulo
2017

Ana Marla Duarte de Souza

Compostos bioativos com potencial ação no controle da homeostase glicêmica.

Comissão julgadora
da
dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profº Drº Franco Maria Lajolo
Orientador / Presidente

Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia
1o. examinador

Profa. Dra. Maria Luiza Faria Salatino
2o. examinador

São Paulo, de 2017

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

Souza, Ana Marla Duarte de
S729c Compostos bioativos com potencial ação no controle da
homeostase glicêmica / Ana Marla Duarte e Souza. -- São
Paulo, 2017.
108p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental.

Orientador: Lajolo, Franco Maria

1. Bromatologia 2. Flavonoides 3. Frutas I. T. II. Lajolo,
Franco Maria, orientador.

641 CDD

Dedico este trabalho

aos meus amados pais, Luiz Otávio e Haidêe, e a minha irmã Bárbara (Babá).

Meus amores pra sempre e todo sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos anos que resultaram nesta dissertação, pessoas e instituições me apoiaram; não podendo assim, deixar de reconhecê-las. Início a lista de agradecimentos pelas fontes inspiradoras que indiscutivelmente me sustentaram nesta empreitada, minha família: Minha mamãe, meu papai e minha irmã. Agradeço também aos meus tios e tias, primos e primas, avôs e avós, que me possibilitam uma vida plena de afetos e amor!

Agradeço aos amigos/irmãos de Belém: vocês sempre participaram desta caminhada nunca deixando me esquecer as origens. Tendo neste contexto todos os profissionais que estiveram ao meu lado no processo de educação, em especial aos professores/amigos de graduação. Não esquecendo as amigas que carrego no peito e que sempre me apoiaram em tudo Danielle Barbosa e Vanessa Bezerra, obrigada!

Ao Prof^o Tit. Dr. Franco Maria Lajolo, agradeço imensamente a oportunidade de tornar esse sonho realidade. A atenção e a paciência que teve durante esse breve tempo, ensinando e dividindo todo o seu conhecimento. Obrigada por me orientar!

Agradeço a Prof^a. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto, pela disponibilidade que sempre teve em me ensinar e dispor do seu tempo para me orientar na trajetória de construção deste trabalho.

Aos professores do departamento, agradeço por poder contar com vocês em momentos de dúvidas e possibilitar a troca de experiências. Aos queridos técnicos; Lúcia Justino, Elias Araújo e Aline Santos, muito obrigada pela ajuda em todas as situações: desde como ligar e desligar um equipamento até os puxões de orelha necessários.

Agradeço também a oportunidade de ingressar no Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos. A todos que direta ou indiretamente possibilitaram a continuidade de minha formação. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aproveito para agradecer igualmente ao Prof^o Dr. William Tadeu Lara Festuccia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP, pela colaboração e paciência em todos os momentos que me recebeu em seu laboratório para prosseguirmos os ensaios da pesquisa. Thiago Belchior e Juliana Magdalon, e todo o grupo do laboratório vocês

foram 10, que me auxiliaram nos experimentos nos “quarenta e cinco do segundo tempo”.

Agradeço do fundo do meu coração aos meus amigos do laboratório, aos quais divido minha vitória. Obrigada por poder contar sempre com vocês em qualquer situação, pelas gargalhadas mesmo em situações de alto estresse, pelos almoços do bandex e muito mais que não caberiam em um pedaço de papel, eternamente grata: pelas conversas sem ponto final com Fernanda Peroni, Gabriela Schmitz, Vanessa Bonato, Mayra Crystiane, Ingrid Campos e Renata Shitakubo flor de maracujá; pelas reuniões pós trabalho com Samira Prado, Victor Castro-Alves, Eric Tobaruela; conversas e músicas cantadas com Ana Sansone e Marcelo Sansone; pelas conversas e almoços regados de risadas com José Augusto, Amanda Romero, Illana Louise e a amadinha Luciana Tedesco.

Aos meus amigos do grupo dos flavonoides/Sushibar, Manuela Brito flor de maracujá 2, Afonso Maia, Luciane Teixeira, Elisa Brasili, Daniela Seixas, José Thiago, Mayara Adja e Mariana Souto (minha quase irmã, obrigada por tornar cada momento especial; e claro por me aturar). Muito obrigada por terem tornado toda essa caminhada mais leve, pela ajuda profissional e pessoal.

As pessoas que sempre estiveram ao meu lado desde o momento que nos conhecemos na República, André Madella (*in memoriam*), Maria Cardoso e Marcin Wozniak, em especial ao meu amigo e irmão Bruno Viana, sou eternamente grata por todos os momentos vividos, pois apesar das dificuldades, sempre tornávamos cada minuto único.

E acima de tudo sou eternamente grata a Deus, por ser a origem de tudo e por nos proporcionar o dom da vida.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As
facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as
críticas nos auxiliam muito”.

Francisco Cândido Xavier.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS (DCNT)	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. FLAVONOIDES	19
2.1.1. Características estruturais.....	19
2.2. PROPRIEDADES DOS FLAVONOIDES.....	21
2.2.1. Atividade antioxidante	22
2.2.2. Compostos bioativos e homeostase glicêmica	23
2.2.3. Atividade inibitória da alfa glicosidase.....	25
2.2.4. Compostos bioativos e captação de glicose	30
3. OBJETIVO	34
3.1. Objetivo geral	34
3.2. Objetivos específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. MATERIAL.....	35
4.2. MÉTODOS	37
4.2.1. Extração de compostos fenólicos	37
4.2.2. Determinação de fenólicos totais	37
4.2.3. Capacidade antioxidante	37
4.2.4. Determinação de Antocianinas Monoméricas.....	39
4.2.5. Quantificação de Ácido Elágico Total	39
4.2.6. Extração para Quantificação e Identificação de Flavonoides	40
4.2.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência –DAD.....	40
4.2.8. LC-qTOF-MS/MS.....	41
4.2.9. Inibição da Alfa-Glicosidase.....	41
4.2.10. Preparo dos extratos para o ensaio explante.....	42
4.2.11. Animais e coleta de amostra.....	42
4.2.12. Captação de glicose em tecido adiposo.....	43
4.2.13. Ensaio de Lipólise	43
4.2.14. Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45

5.1. QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS EM FRUTOS.....	45
5.2. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	47
5.2.1. Método Oxygen radical assay capacity (ORAC)	47
5.2.2. Método 2,2- <i>diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> (DPPH).....	49
5.3. ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS	51
5.4. CONTEÚDO DE ÁCIDO ELÁGICO TOTAL.....	54
5.5. QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES	57
5.5.1. Identificação e quantificação de flavonoides no morango	57
5.5.2. Identificação e quantificação de flavonoides presentes na amora-preta e framboesa vermelha	62
5.6. INIBIÇÃO DA ALFA-GLICOSIDASE.....	67
5.7. CAPTAÇÃO DE GLICOSE.....	69
5.8. ENSAIO DE LIPÓLISE	72
5.9. ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) DAS AMOSTRAS E ENSAIOS.....	74
6. CONCLUSÃO.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
8. ANEXOS	90

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA Carboxilase (ACC)

Amostragem 1 (A1)

Amostragem 2 (A2)

Ácido Elágico (AE)

Ácido Gálico (AG)

Ácido Graxo Sintase (FAS)

Ácido Trifluoracético (TFA)

Ácidos Graxos Livres (AGL)

Adenosina Monofosfato (AMP)

Análise de componente principal (PCA)

Antocianinas Monomérica (AM)

Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP)

Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de massa em tempo de voo Q (LC-qTOF-MS)

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Desvio Padrão (DP)

Diabetes Mellitus (DM)

Dicloreto de 2,2- azobis (2-amidinopropano) (AAPH)

Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT)

Elagitaninos (ETs)

Extração em fase sólida (SPE)

Fator Nuclear Eritróide (Nfr2)

Fenólicos Totais (FT)

Fosfatidilinositol-3-qinase (PI3K)

Glicerol- 3 fosfato (G3P)

Gliceroquinase (GyK)

High performance liquid chromatography (HPLC)

Linha celular derivada de rato (3T3-L1)

Linhagem de camundongos (C57BL/6)

Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC-MS)

Morango Camarosa (MC)

Morango Camino Real (MCR)

Morango Oso Grande (MO)

Morango Toionoca (MT)

NF- κ B (NF-Kb)

Organização Mundial da Saúde (OMS)

Oxygen radical assay capacity (ORAC)

Proteína Ativadora-1 (AP-1)

Proteína Quinase A (PKA)

Proteína Quinase Ativada (AMPK)

Proteína de ligação do ácido graxo 2 (aP2)

Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos gama (PPAR γ)

Serina/Treonina Quinase (AKT)

Substratos do Receptor de Insulina (IRS)

Tecido Adiposo Branco (TAB)

Transportadores de Glucose de Tipo 1 (GLUT1)

Transportadores de Glucose de Tipo 1 (GLUT2)

Transportadores de Glucose de Tipo 4 (GLUT4)

Trato Gastrointestinal Superior (GIT)

Triacilglicerol (TAG)

World Health Organization (WHO)

α,α -difenil- β -picrilhidrazina (DPPH)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides e estrutura química dos principais tipos de flavonoides.	20
Figura 2. Potenciais efeitos biológicos relacionados ao consumo de berries.	22
Figura 3. Mecanismo de ação para os antioxidantes primários	23
Figura 4. Regulação da glicemia plasmática. Adaptado de (WARDLOW et al., 2012).	24
Figura 5. Sítio de hidrólise da enzima alfa-glicosidase sobre o amido.	28
Figura 6. Fontes e vias de glicerol-3-fosfato (G3P) produzidos no adipócito branco. Fonte Hanson; Reshef (2004).	31
Figura 7. Análises química e de atividade biológica desenvolvidas para os extratos de frutas.	36
Figura 8. Conteúdo de fenólicos totais de extrato metanólico das cv. de morangos Oso Grande (MO), Camarosa (MC), Camino Real (MCR) e Toionoca (MT).	46
Figura 9. Conteúdo de fenólicos totais de extrato metanólico de amora e framboesa.	47
Figura 10. Capacidade antioxidante de extrato metanólico de morango cv. Oso Grande (MO), Camarosa (MC), Camino Real (MCR) e Toionoca (MT), avaliada pelos métodos ORAC.	48
Figura 11. Capacidade antioxidante de extrato metanólico de amora e framboesa, avaliada pelos métodos ORAC.	49
Figura 12. Capacidade antioxidante de extrato metanólico de morango cv. Oso Grande, Camarosa, Camino Real e Toionoca, avaliada pelos métodos DPPH.	50
Figura 13. Capacidade antioxidante de extrato metanólico de amora e framboesa, avaliada pelos métodos DPPH.	51
Figura 14. Concentração de antocianinas monoméricas de extrato metanólico de diferentes cv. de morango, Oso Grande, Camarosa, Camino Real e Toionoca.	52
Figura 15. Concentração de antocianinas monoméricas de extrato metanólico de amora e framboesa.	54
Figura 16. Conteúdo de ácido elágico total de diferentes cv. de morango, Oso Grande, Camarosa, Camino Real e Toionoca.	55

Figura 17. Conteúdo de ácido elágico total de amora-preta e framboesa vermelha.	56
Figura 18. Cromatograma obtido por CLAE-DAD. Picos são numerados de acordo com as Figura A;a (cv. Toionoca), Figura B;b (cv. Camarosa). Letras maiúscula $\lambda = 525$ nm e minúscula $\lambda = 270$ nm.	60
Figura 19. Cromatograma obtido por CLAE-DAD. Picos são numerados de acordo com as Figura D;d (cv. Camino Real), Figura F;f (cv. Oso Grande). Letras maiúscula $\lambda = 525$ nm e minúscula $\lambda = 270$ nm.	61
Figura 20. Cromatograma obtido por CLAE-DAD. Picos são numerados de acordo com as Figura A;a (Amora-preta), Figura D;d (Framboesa). Letras maiúscula $\lambda = 525$ nm e minúscula $\lambda = 270$ nm.	66
Figura 21. Curva de calibração da inibição da alfa-glicosidase pela acarbose.	69
Figura 22. Captação de glicose em tecido explante tratada com extrato fenólico de amora-preta, framboesa vermelha e cv. de morangos (MT, MC, MCR e MO).	71
Figura 23. Liberação de glicerol em condições basal e estimulada por isoproterenol em tecido explante em amora-preta, framboesa e cv. de morangos (MT, MC, MCR e MO).	73
Figura 24. Análise de componente principal (PCA) para os dados referentes apresentados para amora-preta, framboesa e cv. de morangos (MT, MC, MCR e MO).	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inibição da enzima alfa-glicosidase por extratos de frutos.	27
Tabela 2. Espectro de massas, obtido por LC-ESI-MS/MS, de compostos fenólicos identificados em diferentes cultivares de morango.	58
Tabela 3. Concentração de flavonoides em cultivares de morango.	62
Tabela 4. Espectro de massas, obtido por LC-ESI-MS/MS, de compostos fenólicos identificados em amora-preta e framboesa.	64
Tabela 5. Concentração de flavonoides em cultivares de amora-preta e framboesa.	66
Tabela 6. Atividade inibitória da α -glicosidase, de extratos metanólicos e em extratos SPE de frutas obtidas em dois períodos de amostragem no ano de 2014.	67

RESUMO

DE SOUZA, A. M. D. **Compostos bioativos com potencial ação no controle da homeostase glicêmica**. 2017. 108f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Diversos estudos buscam identificar novas moléculas com ações regulatórias sobre a via de sinalização da insulina e consequentemente na homeostase da glicose. Assim, este trabalho visa avaliar o potencial de extratos de frutos no controle da homeostase glicêmica. Os frutos avaliados foram o morango (cv. Toianoca, Camarosa, Oso Grande e Camino Real), a amora-preta e a framboesa vermelha, em dois tempos de amostragem, sendo considerado como tempo A1 e tempo A2. As amostras foram caracterizadas quanto ao seu conteúdo de fenólicos totais, conteúdo de antocianinas monoméricas, capacidade antioxidante, avaliada pelos métodos DPPH e ORAC, ácido elágico total, capacidade de inibição da alfa-glicosidase e captação de glicose e lipólise em tecido adiposo de camundongos (ensaio explante). Dentre os frutos, no primeiro tempo de amostragem, a amora-preta e o morango, cv Oso Grande, foram os que apresentaram maior conteúdo de fenólicos totais (62,36 e 34,89 mg AG/g, respectivamente) no entanto não foram mantidos esses valores no segundo tempo de amostragem, com concentração 30% e 60% inferior, respectivamente; e maior concentração de antocianinas monoméricas (45,33 mg/g e 3,09 mg/g, respectivamente). Em relação a inibição da enzima alfa-glicosidase, avaliado em extrato metanólico, o fruto framboesa vermelha e o morango cv. Camino Real foram as que apresentaram alto potencial inibitório nos dois tempos de amostragem (IC_{50} 0,47 mg FT e IC_{50} 0,57 mg FT para framboesa vermelha e IC_{50} 0,50 mg FT e IC_{50} 0,46 mg FT para Camino Real). Quando avaliado os extratos enriquecidos em fenólicos, o valor de IC_{50} com maior potencial dentre os frutos avaliados foi da amora-preta, nos dois tempos A1 e A2 (0,0023 mg FT e 0,0021 mg FT, respectivamente). Para captação de glicose em tecido adiposo explante, ao utilizar a insulina para estimular a captação de glicose juntamente com o tratamento (extrato), esse estímulo foi efetivo no aumento da captação de glicose somente com as amostras cv. Camino Real e cv. Oso Grande. Isso pode ser explicado pela alta correlação encontrada de antocianinas identificadas no fruto, como pelargonidina-3-O-glicosídeo. Por outro lado, somente a amora-preta A1 aumentou a lipólise em condição basal, mas nenhuma fruta foi eficiente para reduzir a lipólise em condição estimulada pelo isoproterenol. Sendo assim, frutas vermelhas podem ser boas fontes de compostos bioativos, principalmente antocianinas, as quais podem ter corroborado positivamente com os resultados.

Palavras-chave: antocianinas, frutas vermelhas, captação de glicose, inibidor de alfa-glicosidase.

ABSTRACT

DE SOUZA, A. M. D. **Bioactive compounds with potential action in the control of glycemic homeostasis.** 2017. 108f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Several studies seek to identify new molecules with regulatory actions on the insulin signaling pathway and consequently on glucose homeostasis. Thus, this work aims to evaluate the potential of fruit extracts in the control of glycemic homeostasis. The fruits evaluated were strawberry (cv. Toianoca, Camarosa, Oso Grande and Camino Real), blackberry and red raspberry, in two sampling times, being considered as time A1 and time A2. Fruits were evaluated for total phenolic, monomeric anthocyanins and contents, antioxidant capacity, evaluated by DPPH and ORAC methods, alpha-glycosidase inhibition capacity and glucose uptake and lipolysis in adipose tissue of mice (explant assay). Among the fruits, in the first sampling period, blackberry and strawberry, cv. Oso Grande, showed the highest total phenolic content (62.36 and 34.89 mg AG / g, respectively), with a decrease of the 30% and 60%, respectively, in the second sampling time; and higher monomeric anthocyanins concentration (45.33 mg/g and 3.09 mg/g, respectively). The methanolic extracts of raspberry and the strawberry cv Camino Real (A1 and A2) presented the highest alpha-glucosidase inhibitory potential. Otherwise, the enriched-polyphenol extract of blackberry (A1 and A2) presented the highest potential among the evaluated fruits. Adipose tissue treated with strawberry cv. Camino Real and cv. Oso Grande was effective in increasing glucose uptake stimulated by insulin. This can be explained by the high correlation with the anthocyanins pelargonidin-3-*O*-glycoside identified in this fruit. In addition, blackberry A1 was the only sample to increase the lipolysis in basal condition, but all other fruits were not effective to decrease lipolysis in stimulated condition. Thus, berries could be a good sources of bioactive compounds to maintain the glucose homeostasis.

Keywords: anthocyanins, berries, glucose uptake, alpha-glycosidase inhibitor.

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS (DCNT)

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), tais quais doenças cardiovasculares, câncer, doenças crônicas respiratórias e diabetes, são responsáveis pela maior causa de morte no mundo. Em 2014 a organização mundial da saúde (OMS) projetou um aumento de 52 milhões de mortes devidas a DCNT até 2030 (WHO, 2014).

No Brasil, apesar de índices ainda preocupantes de doenças infecciosas, desnutrição, causas externas e condições maternas e perinatais, as doenças crônicas representam em torno de 66% do índice de doenças (OMS, 2011; BRASIL, 2011). Sendo assim, perspectivas projetam que em 2025, o Brasil ocupará uma posição entre os 10 países no mundo com maior número de casos de diabetes. A doença é crescente também na população jovem, acompanhando o aumento da epidemia de obesidade entre crianças e adolescentes no país (TAO et al, 2015).

O Diabetes Mellitus (DM) tipo 2 é um importante fator de risco para DCNTs, tal como as doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Compreender as causas e os fatores determinantes de seu incremento epidêmico torna-se imprescindível na busca de soluções para retardar ou reverter a progressão desta alarmante realidade epidemiológica (ROPELLE et al, 2013). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, 33% da população brasileira dos 60 aos 79 anos de idade têm diabetes ou alguma alteração relacionada à glicose (OMS, 2011; BRASIL, 2011).

Sendo assim, estudos apontam a importância da homeostase glicêmica, atuando como um fator no não desencadeamento de DM2. Nesse sentido, diversos estudos são realizados visando identificar novas moléculas com ações regulatórias sobre a via de sinalização da insulina e consequentemente na homeostase da glicose (ROPELLE et al, 2013; MOURA, 2015).

Com base na tabela 1 e dados de literatura, foram selecionadas frutas com potencial controle na homeostase glicêmica. Dentre elas foram escolhidas, morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) sendo quatro cultivares (Camino Real, Oso Grande, Camarosa e Toionoca), framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.) e amora preta (*Rubus fruticosus* L.).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FLAVONOIDES

2.1.1. Características estruturais

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos entre os vegetais, os quais apresentam funções como fotoproteção, pigmentação e defesa contra agentes externos nos mesmos. Estes compostos pertencem a um grande grupo, que auxiliam na dieta de indivíduos, sendo os ácidos fenólicos, os estilbenos, os taninos e os flavonoides (DORNAS et al. 2007; ZUANAZZI; MONTANHA, 2010).

Dentre os compostos fenólicos, encontra-se o grupo dos flavonoides, os quais têm uma expressiva presença na natureza. (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; ZUANAZZI; MONTANHA, 2010). Os flavonoides estão presentes em uma grande variedade de alimentos, como frutas, hortaliças, sementes e diversas bebidas, como o vinho. Alguns estudos estimam que a ingestão diária de flavonoides esteja na faixa de 1 g por indivíduo ao dia, dos quais aproximadamente 200 mg só de antocianinas (ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

Os flavonoides são compostos por 15 átomos de carbono (Figura 1), formando dois anéis aromáticos (anel A e B) ligados por uma ponte com três carbonos, que pode se apresentar ciclizado (anel C) apresentando estrutura geral C₆-C₃-C₆. Eles são os mais numerosos dos compostos fenólicos e são encontrados em todas as partes da planta, particularmente na epiderme de folhas e na casca de frutos (WILLIAMS, 1995).

Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides e estrutura química dos principais tipos de flavonoides.

As principais subclasses dos flavonoides podem ser diferenciadas com base na oxidação do anel pirano central (anel C) e também pela posição do anel B em: flavonóis, flavonas, flavanol ou flavan-3-ol, flavanonas, antocianidinas e isoflavonas (CROZIER et al., 2009).

Os flavonoides podem ser encontrados como agliconas ou sob a forma de glicosídeos e/ou derivados acilados (SIMÕES et al., 2004). O esqueleto básico dos flavonoides pode ter numerosos substituintes entre eles grupos hidroxilas e metila. Na presença de ambos, açúcares e grupos hidroxila aumentam a solubilidade dos flavonoides, enquanto que outros substituintes, tais como grupos metila e unidades isopentila, comparativamente, os tornam mais lipofílicos (ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

Dentre as diversas subclasses, os flavonóis são os mais difundidos dos flavonoides, sendo encontrados por todo o reino vegetal, com a exceção de algas, sendo também ausentes no reino Fungi (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006). Os principais flavonóis (canferol, quercetina, isoramnetina e miricetina) são mais comumente encontrados como *O*-glicosídeos, com a conjugação ocorrendo mais frequentemente na posição-3 do anel C, podendo também ocorrer nas posições 5 -, 7 -, 4' -, 3' - e 5', localizados nas principais fontes vegetais, como chá-verde, maçãs, frutas vermelhas e outros (ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

As antocianidinas pertencem a uma classe com característica pigmentada e ocorrem naturalmente nas plantas sob a forma de glicosídeos, em que a molécula é conjugada a um açúcar e assim denominada de antocianina. Diferencia-se dos demais flavonoides pela presença do cátion flavilium (anel C). Há pelo menos seis principais tipos de antocianidinas mais frequentes na dieta, que são a pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina e a malvidina (TSUDA, 2012), encontradas na uva e frequentemente em frutas denominadas de frutos *baga* ou *berries*, entre elas o morango, mirtilo, cereja e amora-preta, além de alimentos processados como o vinho (MALACRIDA; MOTTA, 2005).

2.2. PROPRIEDADES DOS FLAVONOIDES

Os flavonoides estão relacionados a compostos que apresentam atividade antioxidante e a esta propriedade foi, por muito tempo, atribuído o efeito protetor à saúde e ainda, apresenta propriedades relacionadas ao metabolismo de carboidratos (ZADERNOWSKI; CZAPLICKI; NACZK, 2009; ROBERFROID, 2002).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os polifenóis possuem atividades (Figura 2) anticancerígena (ROLEIRA et al. 2015), anti-inflamatória (PARHIZ et al. 2015), antibacteriana (WIDSTEN et al. 2014), antivirais (PANCHAL et al. 2012), cardioprotetora (TINKEL et al. 2012) e propriedade neuroprotetora (DANTA; PIPLANI, 2014). Há também evidências na potencial utilização terapêutica de antioxidantes sobre a diabetes (MARRAZZO et al. 2014), osteoporose (YAN et al.,

2014), artrite (VYSAKH et al. 2014) e cataratas (SUNKIREDDY et al. 2013). Muitos destes efeitos benéficos são associados à capacidade antioxidante por inibir o estresse oxidativo e o dano molecular associado. Crescentes evidências indicam que os polifenóis na dieta também influenciam o metabolismo da glicose e lipídios (SCALBERT et al, 2005).

Figura 2. Potenciais efeitos biológicos relacionados ao consumo de berries.

2.2.1. Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante apresentada pelos flavonoides pode, eventualmente, colaborar com o efeito benéfico à saúde observado pela ingestão regular de frutas e hortaliças, entretanto, outros mecanismos explicam melhor este efeito, principalmente a modulação da cascata de sinalização celular, entre outros mecanismos (LU et al., 2013).

As características físico-químicas dos flavonoides lhes atribuem capacidade antioxidante. O átomo de hidrogênio do grupamento hidroxila presente na estrutura pode ser doado ao radical livre, neutralizando-o (ROSS; KASUM, 2002).

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres com maior facilidade do que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Assim,

formam-se espécies inativas para a reação procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (Figura 3) (RAMALHO; JORGE, 2006).

Figura 3. Mecanismo de ação para os antioxidantes primários. $\text{ROO}^\bullet$ e $\text{R}^\bullet$, radicais livres; AH, antioxidante como um átomo de hidrogênio ativo; $\text{A}^\bullet$, radical inerte.

Diversos são as propostas da ação antioxidantes dos flavonoides. Estes podem estar envolvidos de maneira direta nas reações de oxirredução o que poderia acarretar na conservação das enzimas antioxidantes endógenas (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) e, conseqüentemente, incrementando o sistema antioxidante do organismo ao deixá-las livres para participar de processos posteriores. Além disso, os flavonoides podem se complexar a íons metálicos, tal como ferro, formando quelatos (KUMARAPPAN, THILAGAM; MANDAL, 2012).

Além disso, modulam a expressão de genes, atuando nas vias sinalização celular, de enzimas antioxidantes endógenos como a glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase, (FERNANDEZ-PANCHÓN et al., 2004; KUMARAPPAN, THILAGAM; MANDAL, 2012).

Estudos mais recentes mostram que os polifenóis poderiam se ligar às proteínas e afetar a atividade de enzimas, estimular a síntese de glutathione (antioxidante endógeno) e regular a transdução de sinal por meio da modulação de fatores de transcrição, tais como Nfr2, NF- κ B e AP-1 (JAKOBS et al., 2006; ANDREADI et al., 2006; VIRGILI; MARINO, 2008).

2.2.2. Compostos bioativos e homeostase glicêmica

Os carboidratos dietéticos são de suma importância para o fornecimento energético. A sua digestão, absorção e metabolismo podem ser influenciados por polifenóis e os seus metabólitos. Sendo assim, a maior parte do carboidrato dietético é

digerida no trato gastrointestinal superior para monossacarídeos que são então, absorvidos. A concentração elevada de glicose no sangue promove a secreção de insulina a partir das células beta no pâncreas, o qual medeia a captação de glicose em tecidos periféricos, incluindo músculo e tecido adiposo; promove o armazenamento de glicose no fígado como glicogênio, e inibe a lipólise no tecido adiposo (Figura 4) (HANHINEVA et al, 2010).

Figura 4. Regulação da glicemia plasmática. Adaptado de (WARDLOW et al., 2012).

A manutenção da homeostase da glicose é de extrema importância para a fisiologia humana, ocorrendo alguma falha deste sistema hormonal pode resultar na síndrome metabólica, uma desordem de multi-sintomas da homeostase de energia que engloba a obesidade, hiperglicemia, tolerância à glicose diminuída, hipertensão e dislipidemia (ECKEL et al, 2005).

Hábitos alimentares vêm sendo apontados por auxiliar no controle da homeostase glicêmica, consequentemente na redução do risco de desenvolvimento da diabetes bem como de doenças relacionadas, tais como hipertensão arterial sistêmica, hipercolesterolêmica, doenças cardiovasculares, câncer e doenças crônicas respiratórias (GESCHER et al, 1998; BRASIL, 2010).

Entre estes hábitos alimentares, o consumo de frutas e verduras está diretamente ligado a um menor risco de desenvolvimento de DCNT (GESCHER et al, 1998; SKROVANKOVA et al, 2015).

Os compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides, ácidos fenólicos e polímeros como os taninos, formam um grande grupo de compostos bioativos com potencial para a promoção e manutenção da saúde (WILLIAMS, C. L., 1995). Os flavonoides estão ligados à estimulação da captação e metabolismo da glicose e também regulam a atividade de enzimas do metabolismo de carboidratos, atuando como protetores das células beta (RODRIGUES et al, 2010).

Assim, duas abordagens são utilizadas para auxiliar no controle da homeostase glicêmica a partir da dieta: (a) controle ou redução na absorção de glicose; (b) aumento da captação de glicose pelos tecidos periféricos (FERNANDES, 2013)

2.2.3. Atividade inibitória da alfa glicosidase

Diversos estudos em modelo *in vitro* e modelo animal demonstram a relação entre os efeitos benéficos dos flavonoides e a homeostase da glicose e de lipídeos, atuando em diversas vias de sinalização em células β -pancreáticas e miofibrilas (BABU; LIU; GILBERT, 2013).

O aumento dos níveis de glicose pós-prandial está diretamente relacionado à absorção de carboidratos dietéticos, tais como a maltose e a sacarose, que são hidrolisados pela α -glicosídase intestinal antes de entrar em circulação sanguínea através da absorção na porção epitelial no intestino (DE SALES et al. 2012).

Uma estratégia terapêutica efetiva seria reduzir a hiperglicemia pós-prandial retardando a absorção de glicose. Isto poderia ser alcançada através da inibição de enzimas responsáveis pela hidrólise de carboidratos no sistema digestório, entre eles a

alfa-glicosidase e a alfa-amilase, que hidrolisam o amido liberando a glicose e os oligossacarídeos (Figura 5). As inibições destas enzimas podem retardar e prolongar o tempo de digestão de carboidratos reduzindo assim, a quantidade de glicose absorvida e, conseqüentemente, o aumento brusco da glicemia e insulinemia pós-prandial (TOELLER, 1994; DE SALES et al. 2012).

A alfa-glicosidase pertence a um grupo de exo-glicosídeo hidrolases capazes de clivar os resíduos α -glicosil das extremidades não reduzidas dos substratos α -ligados para liberar α -D-glicose. São enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 de dissacarídeos ou oligossacarídeos liberando unidades de glicose (OTA et al, 2009). As glicosidases são classificadas de acordo com a especificidade da clivagem da ligação glicosídica, dependendo do número, posição ou configuração do grupo hidroxila na molécula do açúcar (MELO; GOMES; CARVALHO, 2006; OTA et al, 2009; VAN DER MAAREL et al, 2002).

Tabela 1. Inibição da enzima alfa-glicosidase por extratos de frutos.

Frutas	Origem	Nome Científico	Extrato	Inibição da atividade α -glicosidase
Cambuci¹	Mata atlântica	<i>Campomanesia phaea</i> Berg.	X	X
Araça¹	Mata atlântica e Amazônia	<i>Psidium guineensis</i> Sw.	X	X
Bacuri^{1;5}	Amazônia	<i>Scheelea phalerata</i>	X	X
Laranja^{3;6}	Ásia	<i>Citrus sinensis</i>	X	X
Banana⁴	Ásia	<i>Musa paradisiaca</i> L.	X	X
Chá verde²	Extremo Oriente	<i>Camellia sinensis</i> L.	X	X
Chá preto²	Extremo Oriente	<i>Camellia sinensis</i> L.	X	X
Morango^{1;6}	Europa	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	X	X (↑)
Framboesa^{1;6}	Ásia e Europa Oriental	<i>Rubus idaeus</i> L.	X	X
Amora preta¹	Asia, Europa e América,	<i>Rubus fruticosos</i> L.	X	X
Mirtilo¹	América do Norte	<i>Vaccinium corymbosum</i>	X	X

Fonte: GONÇALVES, 2008¹; WANG et al.², 2014; BERGAMIM³, 2012; BORGES⁴, 2011; RUFINO⁵, 2009; COPETTI⁶, 2010.

(↑) Alto potencial inibitório.

Alfa-glicosidase

Figura 5. Sítio de hidrólise da enzima alfa-glicosidase sobre o amido.

Alguns pesquisadores têm observado que a ingestão de inibidores de α -glicosidase podem melhorar a hiperglicemia bem como complicações do diabetes (WANG et al., 2004). A acarbose e a voglibose são drogas inibidoras das α -glicosidases usadas terapeuticamente para o tratamento de pacientes diabéticos não dependentes de insulina, o diabetes mellitus tipo II. Em recente estudo observou-se que a voglibose inibe 20 a 30 vezes mais do que a acarbose, deste modo ocorre um aumento da tolerância à glicose por inibição da digestão e da absorção pelo intestino, especialmente depois das refeições (MELO; LIMA; MACIEL, 2006). Diferentes respostas a esses dois inibidores de α -glicosidase pode ser explicado por diferenças farmacológicas entre os agentes (FUJISAWA et al., 2005).

Muitas espécies de plantas e compostos purificados de plantas têm sido experimentalmente estudadas na redução dos níveis de glicose pós-prandial através da inibição destas duas enzimas (GROVER et al., 2002; MARLES; FARNSWORTH, 1994). A Tabela 1 apresenta a ação de alguns extratos de frutos sob a atividade das enzimas α -glicosidase. De Souza et al. (2010) em um estudo realizado com frutas nativas brasileiras observou que extratos de frutas como o bacuri e uxi apresentaram significativa inibição da atividade alfa-glicosidase, também importante no metabolismo de carboidratos. Como esses frutos não apresentaram flavonoides e ácidos hidroxycinâmicos em sua composição pode ser possível que outros compostos bioativos estejam implicados nesta atividade inibitória (PINTO, 2008).

McDougall e Stewart (2005) relataram efeitos inibitórios sob enzimas do sistema digestivo dos compostos polifenólicos presentes em frutos ricos em antocianinas e

elagitaninos tais como framboesa e morango. As antocianinas inibiram significativamente a atividade da enzima alfa-glicosidase, levando à uma diminuição da glicemia após a ingestão de uma dieta rica em carboidratos. Esses autores sugeriram esses frutos como potenciais candidatos a futuros estudos clínicos no que diz respeito ao controle da glicemia pós-prandial.

Os polifenóis, dentre eles as antocianinas, abundantes em *berries* (frutas vermelhas), são capazes de modular a disponibilidade de nutrientes por meio da inibição das enzimas envolvidas na digestão de lipídeos e de degradação do amido, o que poderia acarretar efeitos benéficos sobre a ingestão de calorias e obesidade e o controle de glicose no sangue, respectivamente, segundo McDougall et al, (2008); McDougall et al, (2009); em um trabalho anterior realizado pelo mesmo grupo, observou-se que os extratos ricos em polifenóis de bagas poderia inibir as duas principais enzimas envolvidas na digestão do amido, α -amilase e α -glicosidase, in vitro, mas em níveis facilmente alcançáveis no trato gastrointestinal superior (GIT) (McDOUGALL et al, 2005).

Diferentes espécies de *berries* como *cranberry*, morango e mirtilo foram abordadas por possuírem capacidade de reduzirem a glicose circulante, e os estudos na maioria das vezes focada na classe metabólito antocianina. Da mesma forma, os produtos de cereais integrais são intensivamente estudados não apenas para o alto teor de fibra, mas também para o repertório rico composto fenólico que pode ter um efeito benéfico sobre a homeostase de glicose (GHOSH; KONISHI, 2007; BONDIA-PONS et al, 2009)

Em um estudo realizado por Torronen et al (2009) em doze indivíduos saudáveis, foi conduzida com a ingestão de sacarose (35 g) com bagas (150 g de purê feito de mirtilos, groselhas negras, cranberries e morangos que fornecem cerca de 800 mg de polifenóis), produziu uma resposta glicêmica pós-prandial diferente em comparação com o controle sem *berries*, mas com perfil comparável de carboidratos disponíveis. Foi observada uma curva de glicose no plasma com concentrações reduzidas na fase precoce e uma concentração ligeiramente elevada na fase posterior o que indicou uma resposta atrasada devido ao consumo de frutas vermelhas (*berries*). As *berries* também diminuíram significativamente o aumento do pico glicêmico. As taxas reduzidas de digestão de sacarose e / ou a absorção a partir do trato gastrointestinal são os mecanismos mais prováveis subjacentes à resposta glicêmica atenuada e retardada.

Foi observado em outro trabalho que extratos de *berries* foram capazes de inibir α -glicosidase in vitro, podendo existir um potencial evidente de sinergia na inibição da digestão do amido no GIT. Desta forma encontrar um equilíbrio entre α -amilase e inibição α -glicosidase tornam-se importantes para limitar os efeitos secundários gastrointestinais associados com o amido não digerido ao atingir o cólon. No entanto, existem inúmeros problemas previsíveis; como por exemplo, a presença de outros componentes alimentares, tais como proteínas, polissacáridos, secreções biliares, podendo proteger contra a inibição por polifenóis. Em última análise, serão necessários mais estudos em humanos para descobrir se estes efeitos podem ser transferidos para a situação in vivo (WHITSON et al, 2010; GONÇALVES et al, 2011).

2.2.4. Compostos bioativos e captação de glicose

Compostos bioativos na dieta também podem influenciar no metabolismo da glicose, estimulando a captação de glicose periférica em tecidos sensíveis à insulina e não insulina. As vias de transporte de glicose podem ser classificadas como vias de insulina ou não insulina-dependentes. Na via não insulina dependente, a captação de glicose ocorre em todos os tecidos e é responsável pelo transporte da glicose nas células em estado pós-absortivo. Em contrapartida, na insulina dependente, a captação de glicose ocorre apenas em tecidos sensíveis à insulina. A insulina estimula a captação de glicose no músculo esquelético, que é o maior local de absorção de glicose, e no tecido adiposo, ao passo que no fígado a insulina diminui a taxa de produção de glicose hepática, aumentando o armazenamento de glicose em forma de glicogênio (HANHINEVA et al, 2010).

Estudos recentes têm utilizado modelos *ex vivo* com adipócitos no estudo do metabolismo energético, visto que os mesmos apresentam como principal função a mobilização ou estocagem de energia na forma de triacilglicerol (TAG) (MORENO; BRITO, 2012).

Os tecidos periféricos utilizam preferencialmente a glicose e os ácidos graxos livres (AGL) para a sua produção energética, sendo assim os TAG do tecido adiposo branco (TAB) são continuamente hidrolisados para atender às necessidades energéticas. O conteúdo de TAG armazenado é dependente do balanço entre a velocidade de

degradação (lipólise) e a velocidade de síntese (lipogênese). A lipólise é estimulada, em períodos de balanço energético negativo (jejum), com o objetivo de liberar AGL e glicerol que serão utilizados como fonte de energia em diversos tecidos corporais como o fígado, o músculo esquelético e o cardíaco. Em períodos de balanço energético positivo (após a ingestão alimentar), a lipogênese é estimulada, direcionando parte da energia obtida da dieta para a síntese e armazenamento de TAG no TAB (MORENO; BRITO, 2012)

O TAB obtém G3P (Glicerol- 3 fosfato) de três formas: fosforilação direta do glicerol (pela ação da enzima glicerocinase -GyK); pela síntese a partir de carbonos de glicose, através de um intermediário da via glicolítica (diidroxiacetona) e pela via gliceroneogênica, formação de G3P por reversão parcial da via glicolítica (Figura 6) (CHAVES et al., 2006).

Figura 6. Fontes e vias de glicerol-3-fosfato (G3P) produzidos no adipócito branco. Fonte Hanson; Reshef (2004).

O extrato da casca de *Citrus sunki* (rutina 17,02 mg/g, hesperidina 17,11 mg/g, sinensetina 4,23 mg/g, nobiletina 38,83 mg/g e tangeretina 55,13 mg/g) acarretou em diminuição do ganho de peso, massa de tecido adiposo, colesterol total e triglicerídeos em camundongos obesos (C57BL/6) e células 3T3-L1 (KANG et al., 2012). Resultados semelhantes aos observados por Lai et al. (2013).

A suplementação com o extrato aumentou os níveis de proteína quinase ativada por adenosina monofosfato a AMP (AMPK) e acetil-CoA carboxilase (ACC) relacionadas à β -oxidação, tanto nos animais quanto nos adipócitos 3T3-L1. Nos adipócitos também foi observado o aumento da lipólise pela fosforilação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) e do hormônio sensível a lipase (HSL), sugerindo que o extrato cítrico de *Citrus sunki* foi capaz de prevenir a obesidade, elevando à β -oxidação e a lipólise no tecido adiposo (KANG et al., 2012).

Alterações na adipogênese e na diferenciação de células 3T3-L1 (modelo para estudo da conversão de pré-adipócitos em adipócitos) também foram observados com extratos de *Citrus aurantium* (KIM et al., 2012). Entre os constituintes mais abundantes desse destacam-se a hesperidina, naringenina e nobiletina. As células foram analisadas com duas diferentes concentrações do extrato cítrico (0,10 ou 0,50 μ g/mL), sendo que a maior concentração do extrato inibiu mais intensamente o acúmulo de lipídios durante a adipogênese, contribuiu para a lipólise dos adipócitos e inibiu a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos. Isto ocorreu, segundo os autores, devido à redução nos níveis da expressão de reguladores chave na diferenciação de adipócitos como C/EBP β , C/EBP α e PPAR γ . Além disso, observou-se uma diminuição na proteína de ligação do ácido graxo 2 (aP2), ácido graxo sintase (FAS) e na serina/treonina quinase (AKT), a qual desempenha papel central na diferenciação dos adipócitos.

Estudos com compostos bioativos como caempferol e quercetina, isolado da planta medicinal *Euonymus alatus*, melhorou a captação de glicose estimulada por insulina em adipócitos 3T3-L1 maduros. Os resultados indicaram que ambos os flavonoides poderiam melhorar a resistência à insulina periférica, similares a um agonista de PPAR γ , tais como a rosiglitazona. Caempferol-3-neohesperidosido, um glicosídeo isolado do *Cyathea phalerata*, estimulou a captação de glicose no músculo

soleus de ratos, especialmente através da via PI3K (FANG et al, 2008; ZANATTA, et al, 2008).

Extratos de plantas têm sido relatados por estimularem a absorção de glicose *in vitro*. Extrato de *Camellia sinensis* regulou a expressão de genes envolvidos na captação de glicose e vias de sinalização da insulina no tecido muscular de ratos com síndrome metabólica induzida por uma dieta com alto teor de frutose (CAO et al, 2007; PINENT, et al, 2004).

Um estudo mais detalhado com mesma abordagem recentemente mostrou que o extrato de semente de uva interage com o receptor de insulina induzindo a fosforilação e, conseqüentemente, levando ao aumento da captação de glicose pela via Akt. Portanto concluíram que o tratamento conduziu a fosforilação das proteínas da via de sinalização da insulina (MONTAGUT et al, 2009).

Noutro estudo, suco de mirtilo, fermentado com uma nova estirpe de bactérias isoladas da flora mirtilo (*Serratia vaccinii*), aumentou a fosforilação da AMPK e a absorção de glicose em ambas as células musculares e adipócitos, e também inibiu a adipogênese (VUONG et al, 2007).

Evidências científicas sobre o tema compostos bioativos cuja ênfase é retardar a digestão de carboidratos e absorção para suprimir a hiperglicemia no estado pós-prandial torna-se promissor. No entanto, esses resultados são baseados em simples estudos *in vitro* e em modelos animais. As evidências atuais de estudos em humanos sugerem que as bebidas, como suco de maçã, vinho tinto e café descafeinado, bem como bagas podem melhorar o controle glicêmico a curto prazo. Para fundamentar os benefícios dos polifenóis no controle da homeostase da glicose pós-prandial, são necessários mais estudos clínicos envolvendo pacientes com metabolismo normal e à glicose diminuída; novos estudos devem ser direcionados aos efeitos dos polifenóis na dieta sobre as respostas glicêmicas induzidas por amido e sacarose, os principais carboidratos de alto índice glicêmico em nossa dieta (HANHINEVA et al, 2010).

3. OBJETIVO

Assim,

- considerando que os flavonoides podem auxiliar na homeostase da glicose;
- que diferentes classes de flavonoides atuam em diferentes mecanismos;
- que os alimentos vegetais apresentam diferentes composições de flavonoides;

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de extratos de frutas no controle da homeostase glicêmica.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar os frutos com relação a fenólicos totais, capacidade antioxidante, antocianinas monoméricas e ácido elágico total;
- Avaliar a atividade inibitória in vitro de diferentes frutos sobre a enzima alfa glicosidase;
- Avaliar captação de glicose e lipólise em tecido adiposo de camundongo C57BL/6;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Quatro cultivares de morango (*Fragaria x ananassa* Duch), cv. Toionoca (MT), Camarosa (MC), Oso Grande (MO) e Camino Real (MCR), da amora-preta (*Rubus* spp. Cv.) e framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.) foram adquiridas no comércio local, na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), em dois tempos distintos de amostragem (A1 e A2) no ano de 2014, com intervalo de três meses. Para a amora-preta e a framboesa, foram adquiridas 10 caixas contendo 100 g de cada fruta. Já para os morangos foram obtidas 4 caixas de 1 kg cada. As frutas foram primeiramente higienizadas em água corrente e preparadas para posterior liofilização. Após o processo de liofilização das amostras, as mesmas foram trituradas em um moedor (A10 S2 Analytical Mill) e passadas em Tamis (Granutest) com abertura de 0,210 mm. As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente em dessecador e ao abrigo da luz.

Um resumo de todas as análises está demonstrado na Figura 7;

Figura 7. Análises química e de atividade biológica desenvolvidas para os extratos de frutas vermelhas. (A) Camino Real; (B) Oso Grande; (C) Camarosa; (D) Toionoca; (E) Framboesa vermelha; (F) Amora preta.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Extração de compostos fenólicos

Quantidades de 1,5 g de material liofilizado foram homogeneizados por um minuto utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça) em metanol 70%. O extrato obtido foi posteriormente mantido sob agitação a 200 rpm/2horas/4 °C e filtrado, obtendo-se assim o extrato fenólico.

Os extratos foram utilizados para as análises de fenólicos totais, capacidade antioxidante, antocianinas monoméricas, ácido elágico total e atividade inibitória da enzima α -glicosidase. As extrações e todos os métodos subsequentes foram realizados em triplicata.

4.2.2. Determinação de fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais foi realizada pelo método de Swain e Hillis (1959), utilizando o reagente de Folin-ciocalteau e ácido gálico (AG) como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Hewlett Packard, modelo 8453) no comprimento de onda de 765 nm. Os resultados foram expressos como mg AG/g (base seca).

4.2.3. Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada pelos métodos *Oxygen radical assay capacity* (ORAC) segundo protocolo descrito por Davalos et al. (2004) e pelo método sequestro do radical α,α -difetil- β -picrilhidrazina (DPPH) proposto por Brand -Williams et al. (1995).

4.2.3.1. Método *Oxygen radical assay capacity* (ORAC)

As solução de fluoresceína 40 nM (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e 2,2'-azobis 153 mM (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foram preparadas em tampão fosfato 75 mM, pH 7,1. Foram utilizadas alíquotas de 25 μ L de tampão (branco) ou 25 μ L de solução Trolox (curva de

calibração) ou 25 µL de amostra, devidamente diluídas e distribuídas em placa de 96 poços seguidas da adição de 150 µL de solução de fluoresceína e incubada a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, a reação foi iniciada pela adição de 25 µL de AAPH. A leitura da intensidade de fluorescência (485 nm_{ex} / 525 nm_{em}) foi realizada a cada 1 minuto durante 60 minutos de reação, utilizando-se leitor de microplaca multidetecção Synergy H1 (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

A capacidade antioxidante foi calculada pela área abaixo da curva de uma amostra subtraindo-se a área correspondente à do branco (solução tampão). Foi utilizada curva de calibração tendo o Trolox como padrão, efetuada a cada ensaio, nas concentrações de 12,5 a 100 µM. Os resultados foram expressos em µmol Trolox equivalente/g (base seca).

4.2.3.2. Método 2,2- *diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH)

Para o método DPPH, foi preparada uma solução metanólica de DPPH (0,05 mM) e a análise foi realizada em microplaca de com 96 poços, no qual cada poço foi preenchido com 200 µL da solução de DPPH, 40 µL de metanol (branco) ou o mesmo volume para a solução de Trolox (curva de calibração), nas concentrações entre 20-70 µM, ou extratos das amostras, devidamente diluídos, quando necessário. Foram realizadas leituras de absorbância a 517 nm, após 20 minutos de incubação ao abrigo da luz, utilizando-se espectrofotômetro Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

A capacidade antioxidante foi calculada segundo fórmula abaixo:

$$\% \text{ descolorimento do DPPH} = \frac{A(\text{Branco}) - A(\text{Amostra})}{A(\text{Branco})} \times 100$$

onde, A (Branco) refere-se à absorbância do branco (metanol) A-(Amostra) refere-se à absorbância da amostra. Os resultados foram expressos em µmol Trolox equivalente/g amostra.

4.2.4. Determinação de Antocianinas Monoméricas

As amostras foram diluídas em tampão cloreto de potássio (pH 1,0) e acetato de sódio (pH 4,5). As leituras foram feitas seis vezes para cada amostra, em dois comprimentos de onda: 520 e 700 nm (este para eliminar os interferentes da reação) (LEE, J. 2005).

A absorbância foi então calculada de acordo com a Equação abaixo:

$$\text{Antocianinas} = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

A: (A520nm – A700nm) em pH 1,0 – (A520nm – A700nm) em pH 4,5;

MW: (molecular weight) = 449,2g/mol para cianidina-3-glicosídeo;

DF: fator de diluição estabelecido;

l: caminho ótico percorrido (cubeta do espectrofotômetro);

ϵ : 26900, coeficiente mola, para cianidina-3-glicosídeo;

10^3 : fator de conversão de grama para miligrama.

A concentração de antocianinas monoméricas (MA) final foi expressa em mg de cianidina-3-glucosídeo/g (b. s).

4.2.5. Quantificação de Ácido Elágico Total

A determinação de ácido elágico total foi realizada de acordo com as condições otimizadas por Pinto et al. (2008). Amostras previamente liofilizadas (1,5 g) foram extraídas com 25 mL de acetona 80%, utilizando-se Ultra-Turrax (Polytron® Kinematica GnbH, Kriens-Luzern, Sweden), por 1 minuto em velocidade 5, em banho de gelo. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman n. 6. O resíduo foi re-extraído com mais duas porções de 25 mL de acetona 80%. Alíquotas de 2 mL do extrato obtido foram transferidas para vial, evaporadas até secagem completa em evaporador analítico (Organomation, Berlin, MA) e hidrolisadas com 2 mL de TFA (ácido trifluoracético) 2N a 120°C por 90 min. Após a hidrólise, foram adicionados 2 mL de álcool butílico terciário e os vials foram novamente evaporados. Após a secagem, foram ressuspensos com 1 mL de metanol e filtrados em filtros de

polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 µm de poro. As extrações foram realizadas em triplicata e a quantificação de ácido elágico total foi realizada por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.2.6. Extração para Quantificação e Identificação de Flavonoides

Quantidades de aproximadamente 2 g para as cv. de morango e 1 g para a framboesa e amora-preta foram homogeneizadas utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça) em 100 mL metanol/água/ácido acético (70:30:5 v/v), filtradas à vácuo em funil de Buchner, utilizando papel filtro qualitativo de 80g/m². O sedimento foi recuperado e realizado mais duas re-extrações com 50 mL de metanol acidificado. Os extratos assim obtidos foram agrupados e concentrados em rotaevaporador (Rotavapor® 120, Büchi, Flawil, Suíça) à temperatura de 40 °C até a remoção do metanol para a etapa de separação em fase sólida. As extrações foram realizadas em duplicata.

4.2.6.1. Extração de fase sólida

A amostra livre de metanol foi passada em coluna de 1 g de poliamida (CC 6, Macherey-Nagel, Germany), condicionada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology) e pré-condicionada pela passagem de metanol e de água destilada. Após aplicação do extrato, a coluna foi lavada com água e a eluição dos flavonoides realizada com metanol acidificado com 0,1% ácido clorídrico (PRICE et al., 1999). Os eluatos assim obtidos foram secos completamente em rotaevaporador a 40 °C sob vácuo e ressuspensos em metanol: ácido acético (95:5 v/v), filtrados com filtro de PTFE para análise por CLAE-DAD e LC-qTOF-MS/MS.

4.2.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência –DAD

A quantificação e a identificação parcial dos flavonoides foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência. O cromatógrafo utilizado foi o modelo Infinity 1120 (Agilent), equipado com injetor automático, bomba quaternária e detector com arranjo de diodo (DAD), controlado pelo software próprio da Agilent. A

coluna utilizada foi a Prodigy 5 μ ODS₃ (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido) com fluxo de 1 mL/min, 25 °C e a eluição sendo realizada com gradiente de solventes constituído por A: ácido fórmico 0,5 % em água e B: 0,5% ácido fórmico em acetonitrila. O gradiente de concentração dos solventes consistiu em 8% de B no início, 10% em 5 min, 17% em 10 min, 25% em 15 min, 50% a 25 min, de 90% em 30 min, 50% em 32 minutos, 8% em 35 minutos (tempo de corrida, 35 min). A corrida foi monitorada nos comprimentos de onda de 270 e 525 nm. A identificação dos picos foi realizada por comparação do tempo de retenção, quando possível, e similaridade dos espectros de absorção em comparação a padrões comerciais, além de espectros contidos na biblioteca do próprio equipamento, previamente inseridos no método. Para quantificação foram utilizados os padrões dos flavonoides cianidina, cianidina-3-*O*-glucosídeo, pelargonidina, pelargonidina-3-*O*-glucosídeo, quercetina-3-*O*-glucosídeo, (Extrasynthese, Genay France) e ácido elágico (Sigma, Chemical Co. St. Louis, EUA Extrasynthese, Genay France) (HASSIMOTTO et al.2008).

4.2.8. LC-qTOF-MS/MS

A identificação de flavonoides e outros compostos fenólicos foram conduzidos em aparelho de cromatografia líquida modelo Prominence (Shimadzu, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas do tipo íon trap, modelo Esquire HCT (Bruker Daltonics, Alemanha) (LC-MS, do inglês Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) e interface de ionização por electrospray (ESI, do inglês Electron spray Ionization). As condições de separação foram as mesmas utilizadas para a CLAE-DAD, descrito no item 4.2.7. O qTOF foi mantido em modo positivo para antocianinas e modo negativo para os demais flavonoides. O detector de massas foi programado para realizar full scan entre m/z 100-1000. A energia de ionização foi de 3.000-3.500 V. Os compostos foram identificados pela comparação do espectro de massas obtidos e a comparação com o de padrões comerciais e/ou dados de literatura.

4.2.9. Inibição da Alfa-Glicosidase

O ensaio foi realizado de acordo com o manual de enzima Worthington (1993), com algumas modificações. O extrato em diferentes diluições e volume final de 50 μ L,

contendo 100 µL de tampão de fosfato 0,1 M (pH 6,9) com solução de alfa-glucosidase (1 U/mL) foi incubado em placas de 96 poços a 25 °C durante 10 minutos. Após pré-incubação, 50 µL de solução de p-nitrofenil-alfa-D-glucopiranosídeo 5 mM em tampão fosfato 0,1 M (6,9) foi adicionada a cada poço. A mistura foi incubada a 25 °C durante 5 minutos. Antes e após a incubação, as leituras de absorbância foram registradas a 405 nm utilizando leitor de microplacas (Thermomax, Molecular Devices Co. Sunnyvale, CA) e comparadas com um controle preparado com 50 µL de solução tampão no lugar do extrato. As análises foram realizadas em triplicata. A atividade inibitória de alfa-glucosidase foi calculada como percentagem de inibição e calculada pela equação abaixo.

$$\% \text{ Inibição} = (\Delta\text{Abs controle} - \Delta\text{Abs}_{\text{amostra}}) / (\Delta\text{Abs controle} \times 100)$$

A dose-resposta para acarbose, inibidor desta enzima, foi constituída com concentrações variando entre 20 e 140 µg/mL, e calculado o seu IC50 utilizando diferentes concentrações de extratos para construção da curva de calibração. Para avaliar a inibição deste fármaco, foi utilizado o mesmo procedimento para a inibição da alfa-glicosidase, no entanto na etapa inicial para o extrato, colocou-se o padrão de acarbose.

4.2.10. Preparo dos extratos para o ensaio explante

O extrato foi preparado segundo protocolo descrito no item 4.2.6. Os extratos foram secos em CentriVap (Benchtop Vacuum Concentrators).

4.2.11. Animais e coleta de amostra

Oito camundongos fêmeas C57BL/6 de 14 semanas foram obtidas no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da Universidade de São Paulo/USP. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP)

(Protocolo nº 115/2016). A captação de glicose e lipólise foram medidas em fragmentos de tecido adiposo retroperitoneal, inguinal e perigonadal (50 mg) de camundongos C57BL6/J mantidos à 37°C por 2 horas em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (mmol/l): 118 NaCl, 4,8 KCl, 1,25 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, pH 7,4, contendo 2% albumina, 6 mmol/l de glicose, 0,2 µCi/mL 2-deoxi-D-[2,6-³H]-glicose, na presença e ausência de insulina 7 mmol/L ou isoproterenol 2 uM. Acondicionados em quatro tubos de ensaio identificados por:

- Basal: Krebs/ albumina/glicose/2-desoxi-D-[3 H]-glucose
- Insulina: Krebs/albumina/glicose/2-desoxi-D-[3 H]-glucose/insulina
- Isoproterenol: Krebs/ albumina/glicose/isoproterenol
- Controle: Krebs/ albumina/glicose/insulina ou isoproterenol

Os mesmos foram levados ao banho-maria à 37°C com um tempo de incubação de duas horas sob agitação constante contendo também o tratamento (extrato) com 2 mg cada. Com o término do tempo de incubação, os tecidos foram lavados e submetidos à análise de captação de glicose e lipólise.

4.2.12. Captação de glicose em tecido adiposo

Os explantes adiposos, foram submetidos à digestão com 0,5 mL de NaOH 1M em banho seco por 1 hora, a 60 °C. Ao término do tempo, coletou-se 0,4 mL e adicionado 1 mL de líquido de cintilação para posterior quantificação da captação de glicose no equipamento (1450 LSC, Couter MicroBeta, Trilux, PerkinElmer).

4.2.13. Ensaio de Lipólise

A determinação da concentração de glicerol no meio foi realizada usando o reagente Free Glycerol Reagent (Sigma®). Para isso 10 µL do sobrenadante descrito no item 4.2.11 foi incubado com 200 µL do reagente para determinação durante 15

min. Em seguida, procedeu-se a leitura da absorbância em 540 nm e a concentração de glicerol no extrato foi determinada pela média da absorção dividido pela média da absorção do padrão e multiplicado pela concentração do padrão em mg/mL. Esses valores foram normalizados pelo peso dos explantes contidos individualmente em cada tubo e os resultados expressos como mg glicerol/ g tecido.

4.2.14. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Para análise dos dados foi realizada Análise de Variância simples (One way ANOVA) seguida de teste de Tukey para comparação de médias. O teste-t de Student's também foi realizado quando necessário. As análises foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad Software®, La Jolla, CA, EUA) sendo estabelecido $p < 0,05$ para significância estatística. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada através do programa R versão 3.2.2 (R Core Team, 2015), usando um pacote R depositado em <http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR>.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos anteriores destacaram o alto teor de antocianinas encontrado em frutas vermelhas, como por exemplo, morango, framboesa e amora-preta (MCDOUGALL; STEWART, 2005; HASSIMOTTO, et al, 2005). Porém, a relação destas frutas na inibição da enzima alfa-glicosidase ainda é pouco estudada, sendo esta atividade relatada por Gonçalves (2008) em relação ao morango. Desta forma, estudos visando investigar a ação destas frutas sobre a inibição da atividade da alfa-glicosidase, assim como sua ação na captação de glicose e lipólise, se fazem necessários.

5.1. QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS EM FRUTOS

A concentração de fenólicos totais (FT) para as cultivares de morango (Figura 8) variou entre $20,69 \pm 0,69$ a $34,89 \pm 1,25$ mg AG eq/g b.s. A maior concentração foi observada na cv. Oso Grande $34,89$ mg AG/g b.s (A1), com concentração 30% inferior no tempo A2 de amostragem. Estes valores estão de acordo com o encontrado para a mesma cv. (230 ± 5 mg AG/100g b.u), ou de aproximadamente 23 mg AG/g b.s, considerando 90% de umidade (PINTO, 2008).

O mesmo foi observado por Aaby et al (2005), em que a concentração de FT em cv. de morangos variaram na faixa de 23-34 mg AG /g b.s. Meyers et al (2003) destacaram as concentrações de FT encontradas em oito cultivares de morango entre $20,2$ mg AG /g b.s a $27,3$ mg AG /g b.s.

De acordo com estudo de Copetti (2010), foi observada a concentração de FT de $161,66$ mg AG/100g em cultivares de Albion e Aroras, valores esses superiores ao relatado por Bordignon-Júnior (2008), com a cultivar Oso Grande (153.66 mg AG/100g).

Já para a cv. Toionoca apresentou concentração de FT de $27,80$ mg AG/g b.s em A1, porém não foi possível a realização de uma segunda amostragem, uma vez que a safra para essa cultivar apresentou apenas um período de colheita no ano de coleta.

Não se observou diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de FT nas cv. Camarosa e Camino Real quando comparado os dois tempos de coleta.

Figura 8. Conteúdo de fenólicos totais de extrato metanólico das cv. de morangos Oso Grande (MO), Camarosa (MC), Camino Real (MCR) e Toionoca (MT). 1 e 2 referem-se ao primeiro e segundo tempo de amostragem, coletas no ano de 2014. Resultados expressos como média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatística entre as amostras (ANOVA e Teste de Tukey como *post-hoc*, $p < 0,05$).

A amora-preta apresentou alta concentração de FT (62,36 mg AG/g b.s) em A1, com redução de 60% em A2 (Figura 9). O alto teor de compostos fenólicos totais encontrado em amora-preta no presente estudo no tempo A1 de amostragem, foi superior ao reportado por diversos autores para amoras de cultivares diferentes encontradas nos Estados Unidos, Brasil e Itália, com valores de 19 a 49 mg AG/g b.s (WANG; LIN, 2000; SELLAPPAN et al., 2002; BENVENUTI et al., 2004; HASSIMOTTO et al., 2008; WANG et al., 2008).

A framboesa apresentou valores similares no conteúdo de FT de 16,83 mg AG/g b.s e 23,73 mg AG/g b.s, para A1 e A2, respectivamente (Figura 9)

A diferença encontrada no conteúdo de FT nos diferentes tempos de amostragem, para alguns frutos, já é esperado e pode ser causado por fatores ambientais, como solo, temperatura, estágio de maturação e outros (SILVA, 2003).

Figura 9. Conteúdo de fenólicos totais de extrato metanólico de amora e framboesa, 1 e 2 referem-se ao primeiro e segundo tempo de amostragem, coletas no ano de 2014. Resultados expressos como média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatística entre as amostras (ANOVA e Teste de Tukey como post-hoc, $p < 0,05$).

5.2. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

5.2.1. Método Oxygen radical assay capacity (ORAC)

Entre as cv. de morango, a capacidade antioxidante avaliada pelo método ORAC (Figura 10), a cv. Camarosa apresentou o menor valor (480 $\mu\text{mol Trolox eq./g b.s.}$ e 595,6 $\mu\text{mol Trolox eq./g b.s.}$) nos dois tempos de amostragem (A1 e A2), respectivamente. Por outro lado, a cv. Oso Grande e a cv. Camino Real foram os que apresentaram os maiores valores de capacidade antioxidante, nos dois tempos de amostragem.

Para o morango, as antocianinas estão presentes em concentrações elevadas o que contribui significativamente para a capacidade antioxidante total (MEYERS et al., 2003; CAPOCASA et al., 2008; PINTO; LAJOLO; GENOVESE, 2008). Assim sendo

valores encontrados na cv. Oso Grande, tanto por antocianinas monoméricas quanto para atividade antioxidante (ORAC) mostraram uma boa correlação.

Figura 10. Capacidade antioxidante de extrato metanólico de cultivares de morango. Cultivar Oso Grande (MO), Camarosa (MC), Camino Real (MCR) e Toionoca (MT), avaliada pelo método ORAC. Resultados expressos como média $\pm$ DP. 1 e 2 referem-se ao primeiro e segundo tempo de amostragem, respectivamente, coletas no ano de 2014. Letras diferentes representam diferença estatística entre as amostras (ANOVA e Teste de Tukey como *post-hoc* $p < 0,05$).

A amora (Figura 11) apresentou elevada capacidade antioxidante (1.694,02 $\mu\text{mol Trolox eq/g b.s.}$) em A1, valor este aproximadamente 3 vezes maior ($p < 0,05$) quando comparada ao A2 (653,96 $\mu\text{mol Trolox eq/g b.s.}$).

Com exceção da amora-preta, em A1, as demais *berries* não apresentaram diferença significativa na capacidade antioxidante (617,2 $\mu\text{mol Trolox eq/g b.s.}$ a 839,5 $\mu\text{mol Trolox eq/g}$, para amora-preta A2 e framboesa A2, respectivamente).

Observou-se uma boa correlação de Pearson entre o método ORAC e o conteúdo de FT ($r=86$), porém uma baixa correlação entre o conteúdo de FT e o método DPPH ($r=59$). Wang; Lin (2000) também encontraram correlação positiva entre valores de capacidade antioxidante, determinados pelo método ORAC, e o teor total de fenólicos para amora-preta, framboesa e morango. Isto porque frutas ricas em antocianinas se destacam por apresentar valores elevados de capacidade antioxidante.

Figura 11. Capacidade antioxidante de extrato metanólico de amora e framboesa, avaliada pelo método ORAC. Resultados expressos como (média $\pm$ DP). 1 e 2 referem-se ao primeiro e segundo tempo de amostragem, respectivamente, coletas no ano de 2014. Letras diferentes representam diferença estatística entre as amostras (ANOVA e Teste de Tukey como *post-hoc* $p < 0,05$).

5.2.2. Método 2,2- *diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH)

Os resultados de capacidade antioxidante total avaliada pelo método DPPH mostraram que não foi observado diferença significativa ($p < 0,05$) entre as cv. de morango e entre os tempos de amostragem (Figura 12). A capacidade antioxidante avaliada pelo método DPPH variou entre 92,88 $\mu\text{mol Trolox eq./g b.s.}$ a 130,3 $\mu\text{mol Trolox eq./g b.s.}$

Resultados relatados por Copetti (2010), em que foram analisados tempos de amostragens diferentes em cv de morangos, foram observados também pouca variação quanto aos períodos avaliados, (setembro e dezembro) 1.369,21 $\mu\text{mol Trolox eq./100g b.u.}$ e 1.101,54 $\mu\text{mol Trolox eq./100g b.u.}$

Pinto, Lajolo e Genovese (2008), realizaram um estudo com diferentes cultivares brasileiras de morango, e observaram que houve variação significativa nos

conteúdos de antocianinas e atividade antioxidante total avaliado pelo método DPPH nos frutos estudados.

Figura 12. Capacidade antioxidante de extrato metanólico de cv. de morangos. Cultivar Oso Grande (MO), Camarosa (MC), Camino Real (MCR) e Toionoca (MT), avaliada pelo método DPPH. Resultados expressos como média $\pm$ DP. 1 e 2 referem-se ao primeiro e segundo tempo de amostragem, respectivamente, coletas no ano de 2014. Estatística entre as amostras ANOVA e Teste de Tukey como *post-hoc* $p < 0,05$.

Para os resultados encontrados no método DPPH não foi observado diferença significativa entre as amostras de amora preta e framboesa (Figura 13), com valores de capacidade antioxidante entre 112,7 μ mol Trolox eq/g b.s. a 140,9 μ mol Trolox eq/g b.s.

A capacidade antioxidante apresentada por Kuskoski et al. (2005) para frutas foram abaixo do que observado no trabalho. A capacidade antioxidante da polpa de amora-preta apresenta-se superior as relatadas para polpas de uva (161,5mg de trolox/100g), açaí (163, mg de trolox/100g), manga (224,7mg de trolox/100g) e goiaba (120mg de trolox/100g), e inferiores as relatadas para polpas de acerola (1198,9 mg de trolox/100g), demonstrando que a amora-preta é uma fonte rica em compostos antioxidantes, o que é demonstrado pelo seu elevado conteúdo de compostos fenólicos e antocianínicos.

Além disso, a cianidina 3- O glucosídeo, antocianina majoritária em amora-preta, também foi citada como responsável pela atividade antioxidante nestas frutas (WANG et al., 2008), e por sua eficiência em prevenir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade em humanos (SATUÉ-GRACIA et al., 1997).

Figura 13. Capacidade antioxidante de extrato metanólico de amora e framboesa, avaliada pelos métodos DPPH. Resultados expressos como média $\pm$ DP. 1 e 2 referem-se ao primeiro e segundo tempo de amostragem, respectivamente, coletas no ano de 2014. Letras diferentes representam diferença estatística entre as amostras (ANOVA e Teste de Tukey como *post-hoc* $p < 0,05$).

5.3. ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS

Nos últimos anos, estudos têm mostrado que as antocianinas exibem uma ampla gama de atividade biológica: antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticancerígena. Além disso, elas exibem uma variedade de efeitos sobre os vasos sanguíneos, plaquetas e lipoproteínas sendo capazes de reduzir o risco de doenças cardíacas (MAZZA, 2007).

Com relação a concentração de antocianinas monoméricas nas cultivares de morango, foi observado que a cv. Oso Grande apresentou a maior concentração em ambos os tempos de amostragem ($3,09 \pm 0,02$ e $2,24 \pm 0,26$ mg/g b.s em A1 e A2,

respectivamente) e a cv. Toionoca apresentou a menor concentração ($0,63 \pm 0,08$ mg/g b.s.). Estes valores são de aproximadamente 2 vezes superior ao encontrado para a cv. Toionoca de $0,11 \pm 1,0$ mg /g b.s., expresso como pelargonidina 3-glicosídeo (PINTO, 2008).

Quanto às antocianinas monoméricas totais quantificadas por Copetti (2010) observou-se que, de forma geral, não obtiveram uma variação expressiva quanto aos meses de colheita. A cultivar Albion apresentou a maior média, 2,8 mg cianidina 3-glicosídeo g b.s., valor este aproximado ao encontrado neste.

Segundo Erkan et al. (2008) foram verificadas diferenças significativas no teor de antocianinas totais em frutos de morangueiro, tratados com radiação ultravioleta. Em estudo com maçãs, foi observado que a influência da radiação solar e da temperatura aumentou a síntese de antocianinas na casca; analisando diferentes cultivares de macieiras, os resultados mais expressivos foram observados em plantas submetidas a maiores radiações e temperaturas próximas a 17 °C, segundo estudo de Ubi et al. (2006).

Figura 14. Concentração de antocianinas monoméricas de extrato metanólico de diferentes cv. de morango. Cv. Oso Grande (MO), Camarosa (MC), Camino Real (MCR) e Toionoca (MT). Resultados expressos como média $\pm$ DP. 1 e 2 referem-se ao primeiro e segundo tempo de amostragem, respectivamente, coletas no ano de 2014. Letras diferentes representam diferença estatística entre as amostras (ANOVA e Teste de Tukey como *post-hoc* $p < 0,05$).

Dentre todos os frutos avaliados, a amora-preta em A1 apresentou a maior concentração de antocianinas monoméricas ($45,33 \pm 0,39$ mg /g b.s), sendo muito superior aos valores encontrados por Hassimotto et al. (2008) entre 11,6 a 19,4 mg cianidina 3-glucosídeo/g b.s.

Por outro lado, a concentração de antocianinas para framboesa vermelha, nos dois tempos de amostragem foi de $2,87 \pm 0,06$ e $2,48 \pm 0,04$ mg/g b.s, em A1 e A2, respectivamente.

O teor de antocianinas monoméricas encontrado por Ferreira et al (2010), foi de $1,04 \pm 1,8$ mg/100 g, o qual encontra-se dentro da ampla faixa de 0,67 a 2,48 mg cianidina 3-glucosídeo/100 g b.u, reportada para diversas espécies e cultivares de amoras (WANG; LIN, 2000; SELLAPPAN et al., 2002; BENVENUTI et al., 2004; FAN-CHIANG; WROLSTAD, 2005; HAGER et al., 2008; WANG et al., 2008). No entanto, valores encontrados neste trabalho em A1, foi observado bem acima do relatado acima.

A variação nos teores de antocianinas descrita para a amora-preta pode-se a possíveis efeitos das condições climáticas da região cultivada, estágio de maturação, espécie e cultivar (FERREIRA, 2010).

A principal antocianina encontrada no morango é a pelargonidina 3- O glucosídeo, com cianidina 3- O glucosídeo e pelargonidina 3- O rutinosídeo presentes em quantidades menores (CORDENUNSI et al., 2005, GIL; HOLCROFT; KADER, 1997). Para a amora-preta e framboesa vermelha a antocianina majoritária é a cianidina 3- O glucosídeo (FERREIRA et al., 2010). Estas antocianinas, juntamente com outros compostos fenólicos no extrato podem contribuir para as diferentes atividades biológicas observadas para estes frutos.

Figura 15. Concentração de antocianinas monoméricas de extrato metanólico de amora e framboesa. Resultados expressos como média $\pm$ DP. 1 e 2 referem-se ao primeiro e segundo tempo de amostragem, respectivamente, coletas no ano de 2014. Letras diferentes representam diferença estatística entre as amostras (ANOVA e Teste de Tukey como *post-hoc* $p < 0,05$).

5.4. CONTEÚDO DE ÁCIDO ELÁGICO TOTAL

Ácido elágico é um polifenol sintetizado por múltiplas espécies de plantas, e pode ser encontrado em nossa dieta principalmente em frutas vermelhas. Este pode ocorrer na forma chamada de: livre, glicosilada, ou ligada como os elagitaninos, que são esterificados com glicose (TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000; PINTO, 2008).

Os elagitaninos (ETs) são compostos fenólicos solúveis em água e de alto peso molecular. São ésteres do ácido hexa hidroxidifênico e um poliol, geralmente glicose, e o ácido quínico ou gálico, que por hidrólise ácida libera o AE, princípio de sua quantificação. Os ETs demonstraram atividades antioxidantes e possíveis efeitos antimutagênico e anticarcinogênico (WILLINER; PIROVANI; GUEMES, 2003).

A concentração de AE total encontrada para as cv. de morangos (Figura 16) variou de $1,09 \pm 0,01$ mg/g a $3,07 \pm 0,17$ mg/g, sendo a cv. Camorosa no segundo

tempo de amostragem (A2) com o maior valor dentre as outras ($3,07 \pm 0,17$ mg/g). Valores esses 10 vezes inferior ao encontrado por Rocha (2010), sendo $16,39 \pm 1,46$ mg/kg de morango b.u.

Hernanz et al (2007) avaliou a concentração de compostos fenólicos de diferentes variedades de morangos (Aromas, Camarosa, Diamante, Medina, e Ventana) cultivados em dois diferentes sistemas de cultivo (com e sem solução nutritiva); as médias foram comparadas em função da variedade e do sistema de cultivo. Vários compostos foram quantificados em CLAE incluindo ácido elágico e houve variação na concentração de $0,080 \pm 2,63$ a $0,043 \pm 2,89$ mg/g b.u.

Figura 16. Conteúdo de ácido elágico total de diferentes cultivares de morango. Cv. Oso Grande (MO), Camarosa (MC), Camino Real (MCR) e Toionoca (MT). Resultados expressos como média $\pm$ DP. 1 e 2 referem-se ao primeiro e segundo tempo de amostragem, respectivamente, coletas no ano de 2014. Letras diferentes representam diferença estatística entre as amostras (ANOVA e Teste de Tukey como *post-hoc* $p < 0,05$).

Em relação às outras frutas vermelhas, amora e framboesa (Figura 17) e seus respectivos tempos (A1 e A2), foi observada uma variação de $0,24 \pm 0,01$ mg/g b.s. no primeiro tempo de amostragem A1 e $4,39 \pm 0,25$ mg/g b.s. para o A2 no fruto de

amora-preta. Já para framboesa vermelha foi encontrado valores de $2,96 \pm 0,06$ mg/g b.s. e $4,18 \pm 0,84$ mg/g b.s. para A1 e A2 respectivamente.

Segundo Pires (2016) foi observado o valor de $5,96 \pm 0,22$ mg/100 g b.s. desta maneira, o valor encontrado no segundo tempo de amostragem neste trabalho torna-se superior ao relatado no nosso trabalho. No entanto a amostra amora-preta em A1, foi a que apresentou valor bem abaixo das outras *berries* deste.

A quantidade de ácido elágico relatado por Bobinaite et al (2012) o qual avaliou algumas cultivares de framboesa, apresentaram uma variação de $2,0 \pm 0,10$ mg/100 g b.u. a $5,5 \pm 0,09$ mg/100 g b.u. Valores próximos foram encontrados em outro trabalho por Bobinaite et al (2013) sendo de $2,92 \pm 0,14$ mg/100 g b.u. e $3,41 \pm 0,19$ mg/100 g b.u. para as cultivares Glen Moy e Beglianka, respectivamente.

Figura 17. Conteúdo de ácido elágico total de frutas vermelhas. Amora-preta (Amora) e Framboesa vermelha (Framb). Resultados expressos como média $\pm$ DP. 1 e 2 referem-se ao primeiro e segundo tempo de amostragem, respectivamente, coletas no ano de 2014. Letras diferentes representam diferença estatística entre as amostras (ANOVA e Teste de Tukey como *post-hoc* $p < 0,05$).

5.5. QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES

5.5.1. Identificação e quantificação de flavonoides no morango

O perfil de flavonoides das quatro cultivares de morango está apresentado nas Figuras 18 e 19, e as identificações na Tabela 2.

Os principais flavonoides identificados nas diferentes cultivares de morango, por CLAE-DAD e LC-qTOF-MS/MS (Tabela 2), foram as antocianinas pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (a m/z 433) e cianidina-3-*O*-glicosídeo (a m/z 449), além do flavonol quercetina-3-*O*-glucosídeo (a m/z 463). Além dos flavonoides, também foi identificado o ácido elágico livre (a m/z 301).

Segundo Aaby, Skrede e Wrolstad (2005) a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo é descrita como a antocianina majoritária no morango. Os valores encontrados variaram de 64,3% para o cultivar Polka e 75% para o cultivar Blink.

O mesmo foi observado por Kelebek e Selli (2011), em que a pelargonidina 3-glucosídico foi a antocianina predominante e representava a maior proporção do conteúdo total de antocianinas. A quantidade de pelargonidina 3- *O* glucosídeo variou de 4,29 a 36,58 mg/100g de base úmida em cultivares de morangueiro, Seyhun e Camarosa, respectivamente.

Os flavonoides presentes nos extratos foram quantificados a partir de padrões e os seus teores foram calculados em mg de equivalentes ao composto identificado/100 g de b.s., e expressos na Tabela 3.

Desta maneira observou-se que 87,2% do total de flavonoides encontrado nas cultivares de morango, estão as antocianinas, o que corrobora com resultados já vistos. Entretanto, a concentração de ácido elágico foi de 7,2% e do flavonol quercetina apresentou 5,6%.

Dentre valores encontrados nas cv de morango, em relação ao pico predominante, pelargonidina 3- *O* glucosídeo, do total de antocianinas encontradas nas mesmas; sendo 204,97 mg/100g b.s para a cv. MO1 e 146,18 mg/100g b.s para a cv. MC2.

O segundo composto majoritário foi a cianidina-3 glicosídeo, do total de antocianinas presentes nas cv de morangos; em relação a esse composto identificado e quantificado, 42,44 mg/100g b.s foi encontrado na amostra MC1 e 40,37 na cv. MO1, estes foram os que apresentaram maiores valores para tal composto.

Tabela 2. Espectro de massas, obtido por LC-ESI-MS/MS, de compostos fenólicos identificados em diferentes cultivares de morango.

Composto identificado	TR (min)	Pico	[M+] (m/z)	MS/MS (m/z)
Modo positivo				
Cianidina-3- <i>O</i> glucosídeo*	10.9	1	449	287
Pelargonidina-3- <i>O</i> glucosídeo*	12.6	2	433	271
Pelargonidina-hexosídeo	13.3	3	433	271
Pelargonidina-dissacharide	14.2	4	607	397-271
Pelargonidina-3- <i>O</i> rutinosídeo	13.2	5	579	271
Pelargonidina-3- <i>O</i> malonilglucosídeo	14.7	6	519	257
Composto identificado	TR (min)	Pico	[M -H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)
Modo negativo				
Ácido Elágico*	20.6	7	301	175
Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo*	21.3	8	463	301

*identidade confirmada com padrão comercial. TR, tempo de retenção. Picos numerados de acordo com as Figuras 18 e 19.

Pelargonidina-3- O rutinosídeo e Pg 3- O malonilglucosídeo, só foi encontrado na amostra MT1 com 7,36 mg/100g b.s e 1,90 mg/100g b.s respectivamente.

Figura 18. Cromatograma obtido por CLAE-DAD. Picos são numerados de acordo com as Figura A;a (cv. Toionoca), Figura B;b (cv. Camarosa). Letras maiúscula $\lambda = 525$ nm e minúscula $\lambda = 270$ nm.

Figura 19. Cromatograma obtido por CLAE-DAD. Picos são numerados de acordo com as Figura D;d (cv. Camino Real), Figura F;f (cv. Oso Grande). Letras maiúscula $\lambda = 525$ nm e minúscula $\lambda = 270$ nm.

Tabela 3. Concentração de flavonoides em cultivares de morango

	Amostragem 1				Amostragem 2		
	MT	MC	MCR	MO	MC	MCR	MO
Cianidina-3- <i>O</i> -glucosídeo	13,51	42,44	12,55	40,37	7,60	11,59	6,72
Pelargonidina- 3- <i>O</i> -glucosídeo	51,99	19,17	23,25	204,97	146,18	83,58	74,45
Pelargonidina-hexosídeo	ND	33,58	ND	ND	15,82	13,09	ND
Pelargonidina-dissacarídeo	ND	ND	7,97	ND	ND	6,06	ND
Pelargonidina-3- <i>O</i> rutinosídeo	7,36	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pelargonidina- 3-malonilglucosídeo	1,90	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido Elágico	3,96	17,77	6,82	11,28	11,47	8,86	8,32
Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	44,78	ND	7,77	ND	ND	ND	ND

Valores expressos em mg/100 g b.s. ND- Não Detectado.

5.5.2. Identificação e quantificação de flavonoides presentes na amora-preta e framboesa vermelha

O perfil de flavonoides de amora-preta e framboesa vermelha está apresentado na Figura 20, e as identificações na Tabela 4.

As principais antocianidinas identificadas na amora-preta e framboesa foram a cianidina e pelargonidina, com íon molecular a m/z 287, e m/z 271, respectivamente.

As cianidinas identificadas incluíram cianidina-3-*O*-glucosídeo (pico 1) e cianidina-3-*O*-rutinosídeo (pico 5) apresentando íon molecular a m/z 449 e m/z 579, respectivamente; a pelargonidina identificada foi a pelargonidina-3-*O*-glucosídeo (pico 3) apresentando íon molecular a m/z 433.

Foi possível confirmar-se a presença dos flavonóis kaempferol-3-*O*-glucosídeo e quercetina-3-*O*-glucosídeo (picos 6 e 7 respectivamente), apresentando íon molecular a m/z 447 e a m/z 463, respectivamente; foi detectado traços de ácido elágico (Tabela 3).

Os flavonoides foram quantificados a partir de padrões e os seus teores foram calculados em mg de equivalentes ao composto identificado/100 g de b.s., e expressos na Tabela 5.

As antocianinas descritas nos frutos de *Rubus idaeus* L. e *Rubus fruticosus* L. incluem a cianidina-3-soforosídeo, a cianidina-3-glucosídeo, a cianidina-3-glucosil-rutinósido e a cianidina-3-rutinosídeo (MAZUR et al, 2014; BRADISH et al, 2011; CHEN et al, 2014).

Observou-se que 93% do total de flavonoides encontrado em amora-preta e framboesa vermelha, estão as antocianinas, condizente com resultados já vistos. A concentração do flavonol quercetina 3- *O* glucosídeo e kaempferol 3- *O* glucosídeo foi de 6,97%.

Dentre os valores encontrados nas cv de morango, em relação ao pico predominante, cianidina-3 glicosídeo, do total de antocianinas encontradas nas mesmas; sendo 17,45 mg/100g b.s para a cv. AMO em A1 e 15,41 mg/100g b.s no A2.

O segundo composto majoritário foi a pelargonidina-3 *O* glucosídeo, do total de antocianinas presentes nas cv de morangos; em relação a esse composto identificado e quantificado, 5,65 mg/100g b.s foi encontrado na amostra AMO em A1 e 7,48 na cv. AMO em A2, estes foram os que apresentaram maiores valores para tal composto.

Cianidina-3-rutinosídeo, foi encontrada nas amostras FRAM em A1 e A2 com 2,11 mg/100g b.s e 2,70 mg/100g b.s respectivamente.

Tabela 4. Espectro de massas, obtido por LC-ESI-MS/MS, de compostos fenólicos identificados em amora-preta e framboesa.

Composto identificado	TR (min)	Pico	[M+] (m/z)	MS/MS (m/z)
Modo positivo				
Cianidina 3- O glucosídeo*	10.0	1	449	287
Cianidina hexosídeo	11.0	2	449	287
Pelargonidina 3- O glucosídeo*	12.0	3	433	271
Derivado de Cianidina 3- O glucosídeo	14.0	4	535	287
Cianidina 3-rutinosídeo*	14.5	5	579	289
Composto identificado	TR (min)	Pico	[M -H]⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)
Modo negativo				
Kaempferol 3-O glicosídeo*	11.6	6	447	285
Quercetina 3-O glucosídeo*	13.2	7	463	301
Ácido Elágico*	20.6	8	301	175

*identidade confirmada com padrão comercial. TR, tempo de retenção. Picos numerados de acordo com a Figura 20.

Figura 20. Cromatograma obtido por CLAE-DAD. Picos são numerados de acordo com as Figura A;a (Amora-preta), Figura D;d (Framboesa). Letras maiúscula $\lambda = 525$ nm e minúscula $\lambda = 270$ nm.

Tabela 5. Concentração de flavonoides em cultivares de amora-preta e framboesa vermelha.

	Amostragem 1		Amostragem 2	
	AMO ^a	FRAM ^b	AMO ^a	FRAM ^b
Cianidina 3- O glucosídeo	17,45	6,58	15,41	7,43
Cianidina hexosídeo	7,75	ND	6,18	ND
Pelargonidina 3- O glucosídeo	5,65	3,76	7,48	2,98
Derivado de Cianidina	ND	ND	2,44	ND
Cianidina 3- O rutinosídeo	ND	2,11	ND	2,70
Kaempferol 3-O glucosídeo	2,44	ND	ND	1,49
Quercetina 3-O glucosídeo	2,66	ND	ND	ND
Ácido Elágico	Tr	Tr	Tr	Tr

Concentração expressa como mg/100 g b.s. ND- Não Detectado. Tr- Traços. AMO^a - Amora-preta. FRAM^b -Framboesa vermelha.

5.6. INIBIÇÃO DA ALFA-GLICOSIDASE

A avaliação da atividade inibitória baseia-se na ação da α -glicosidase sobre um substrato sintético, *p*-nitrofenil- α -D-glicosídeo, que ao ser hidrolisado libera o cromóforo *p*-nitrofenol (GONÇALVES, 2008). As concentrações de inibição da α -glicosidase estão expressas na Tabela 6.

Tabela 6 Atividade inibitória da α -glicosidase, de extratos metanólicos e em extratos SPE de frutas obtidas em dois períodos de amostragem no ano de 2014.

Frutas	IC ₅₀ -A1*	IC ₅₀ - A2**	IC ₅₀ -A1* enriquecido	IC ₅₀ - A2** enriquecido
<i>Morango Toianoca (MT)</i>	1,21±0,01	-	0.088±0,02	-
<i>Morango Camarosa (MC)</i>	1,77±0,03	1,59±0,01	0.093±0,02	0.092±0,01
<i>Morango Oso Grande (MO)</i>	2,65±0,03	1,55±0,04	0.065±0,01	0.068±0,02
<i>Morango Camino Real (MCR)</i>	0,50±0,06	0,46±0,02	0.057±0,02	0.080±0,02
<i>Amora</i>	0.82±0,02	0.57±0,02	0.0023±0,01	0.0021±0,01
<i>Framboesa</i>	0.47±0,01	0.57±0,01	0.004±0,01	0.004±0,01

*1- Primeira amostragem; **2- Segunda amostragem. Valores expressos como mg de fenólicos totais.

Para as cv. de morangos, o valor de IC₅₀ variou entre 0,46 ± 0,02 mg FT a 2,65 ± 0,03 mg FT. A cv. Camino Real foi a que apresentou menor valor de IC₅₀ (0,46 mg FT) nos dois períodos de amostragem, seguida da cv. Toianoca (1,21 mg FT). Apesar da cv. Camino Real não ter apresentado maior valor de antocianina monomérica, a mesma dentre as cultivares foi a que mais apresentou capacidade de inibição; deste modo levantando a hipótese de que essa inibição possa ter sido também corroborada por outros compostos.

Para os demais frutos vermelhos avaliados, a framboesa vermelha (IC₅₀ de 0,47 mg FT, A1) e a amora preta nos dois tempos A1 e A2 (0,82 a 0,57 mg FT, respectivamente). Assim sendo, acompanhando os valores encontrados para concentração de antocianinas monoméricas, em relação as amostras framboesa vermelha e amora preta; confirmando hipóteses defendidas por autores, em que frutas vermelhas corroboram na inibição da enzima α -glicosidase (BOATH et al., 2012).

Em relação aos extratos enriquecidos em polifenóis, o valor de IC_{50} variou entre 0,057 mg FT a 0,093 mg FT. Sendo a cv Camino Real (MCR) que apresentou o melhor potencial inibitório sobre a enzima α -glicosidase no primeiro tempo de amostragem (A1); no segundo tempo de amostragem (A2) entre as cv. foi a Oso Grande (MO) com o valor de 0,068 mg FT.

Foi observado para os demais frutos avaliados: framboesa vermelha e amora-preta, nos dois tempos A1 e A2, 0,0023 mg FT e 0,0021 mg FT para amora, e 0,004 mg FT para a amostra framboesa vermelha nos dois tempos. Portanto, baseado nos resultados obtidos, os frutos avaliados neste, apresentaram a concentração necessária para inibir 50% da enzima α -glicosidase, o que sugere que a ingestão desses frutos possam ter efeitos benéficos referentes ao controle da glicemia.

Estudo realizado por Pradeep e Sreerama (2015), avaliou o impacto do processamento térmico em grãos de milheto (*Poaceae*) sobre a ação antienzimática de seus constituintes fenólicos (ácido vanílico, ferúlico e caempferol). Constatando que todos os extratos se mostraram potencialmente capazes de inibir a enzima alfa-glicosidase ($IC_{50} = 19,21 \mu\text{g/ mL}$) do que a alfa-amilase ($IC_{50} = 32,59 \mu\text{g/ mL}$).

No presente trabalho, os constituintes fenólicos dos extratos obtidos das frutas vermelhas desempenham papel-chave na inibição da enzima alfa-glicosidase e, portanto, proporcionam efeito benéfico por favorecer a homeostase glicêmica; estabelecendo uma aproximação com os resultados observados por Pradeep e Sreerama (2015), descritos acima.

A acarbose foi utilizada como o inibidor da atividade de alfa-glicosidase, utilizado como controle positivo no ensaio de inibição da enzima. Uma curva dose-resposta foi construída com as concentrações de acarbose entre 20 e 100 $\mu\text{g/mL}$, a qual apresentou IC_{50} de 97 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 20).

Figura 21. Curva de calibração da inibição da alfa-glicosidase pela acarbose.

5.7. CAPTAÇÃO DE GLICOSE

Fragmentos de tecido obtidos conforme seção 4.2.11 foram incubados em 1 mL meio de Krebs, com 0,1 µCi de U-(C14) glicose, 5,5 mM glicose e adicionados aos extratos como já descrito nos itens 4.2.11 e 4.2.12.

Dentre as amostras avaliadas, a que apresentou maior potencial de captação de glicose foi o extrato de Amora-preta A1 na condição estimulada, ou seja, com adição de insulina mais o tratamento com o extrato (Figura 22). No entanto, todas as amostras apresentaram resultado positivo sobre a captação de glicose superior a basal.

Sendo assim, foi observado dentro da mesma condição basal para todas as amostras, que amora-preta A1, amora-preta A2 e framboesa vermelha A1 são diferentes do controle ($p < 0,05$). Desta maneira, na condição basal as amostras que se diferiram das demais, apresentaram maior captação de glicose do que o controle, mas elas não diferem das outras amostras.

Quando analisadas as amostras que foram tratadas com extratos e estimulada com insulina, somente a amora-preta A1 apresentou maior captação de glicose nessa condição ($p < 0,05$). Ainda foi observado que somente os tratamentos com extratos de

morango, cv. Camino Real A1 e Oso grande A1 (MCR e MO) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as duas condições, estimulada e o basal.

Portanto, foi possível compreender que ao utilizar a insulina para estimular a captação de glicose juntamente com o tratamento (extrato), esses estimularam o aumento da captação de glicose somente com as amostras MCR1 e MO1.

Dentre as cv. de morango os resultados encontrados variaram de 74,12 μM a 54,36 μM glicose/g tecido, sendo MCR1 a amostra que apresentou maior potencial de glicose, porém no segundo tempo de amostragem (A2) não permaneceu o mesmo valor, sendo de 61 μM glicose/g tecido (Figura 22).

A cv. que também apresentou alto potencial de captação de glicose foi a morango Oso Grande 1 (MO1), com 65,65 μM glicose/g tecido, porém o mesmo não foi observado no segundo tempo de amostragem, com 54,36 μM glicose/g tecido (Figura 22).

Como já se sabe, a estimulação do transporte de glicose pela insulina nos adipócitos e nas células musculares envolve uma complexa via de sinalização (IR/IRS/PI3K/Akt), é primordial para estimulação da captação de glicose e síntese de glicogênio, iniciada pela autofosforilação do IR e terminando na translocação de um pool de GLUT4 a partir de estoques intracelulares para a membrana plasmática (SALTIEL; KAHN, 2001; WATSON; PESSIN, 2001).

Alzaid et al. (2013), em estudo *in vitro* com enterócitos humanos, observaram que os polifenóis de frutas vermelhas, principalmente antocianinas presentes no alimento, modularam a glicemia pós prandial por meio da diminuição da expressão de mRNA do transportador de glicose GLUT2. Conclui-se que as antocianinas podem estar associadas a uma menor resistência insulínica periférica e redução dos níveis de inflamação.

Resultados obtidos por Huang et al. (2010), mostraram que o ácido pachímico (encontrado em *Poria cocos*) apresentou atividade estimulante mais significativa na captação de glicose em células adipócitos 3T3-L1. O efeito do ácido pachímico sobre o perfil de expressão de transportadores de glicose em adipócitos 3T3-L1 diferenciados também foi analisado e observou-se que o ácido pachímico induziu um

aumento na expressão de GLUT4, mas não de GLUT1, nos níveis de mRNA e de proteína (PI3K/Akt/AMPK).

Em uma tentativa de investigar a ação do ácido palmitoleico sobre a captação de glicose em células adipócitos 3T3-L1 (*in vitro*) e camundongos (*in vivo*), por Bolsoni-Lopes et al. (2014), realizaram um estudo que se mostrou positivo para captação. Além disso, dados indicaram que o ácido palmitoleico é um importante modulador positivo da captação de glicose e do conteúdo de proteína e mRNA do GLUT4, favorecendo a utilização de glicose celular em direção às vias de produção de energia, tais efeitos que parecem estar associados, pelo menos em parte, à ativação de AMPK (BOLSONI-LOPES et al. 2014).

Observou-se que os tratamentos (extratos) foram capazes de aumentar a captação de glicose. Contudo outros estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais as amostras analisadas, ativam a via de sinalização (IR/IRS/PI3K/Akt/AMPK) desencadeando a homeostase da glicose.

Figura 22. Captação de glicose em tecido explante tratada com extrato fenólico de amora-preta, framboesa vermelha e cv. de morangos (MT, MC, MCR e MO). Resultados expressos como $\mu\text{M glicose/g tecido}$ (média $\pm$ SE). 1 e 2 referem-se ao primeiro e segundo tempo de amostragem, respectivamente, coletas no ano de 2014. Os resultados são médias $\pm$ SE (n=8). Letras diferentes representam diferença estatística entre as amostras (ANOVA e Teste *test-t* como *post-hoc* $p < 0,05$). ANOVA representado por letra maiúscula indica diferenças significativas para todas as frutas e controle (basal ou estimulada) e *test-t* representado pela letra minúscula indica diferenças significativas entre basal e estimulado da mesma amostra.

5.8. ENSAIO DE LIPÓLISE

Todos os extratos mostraram redução da lipólise na condição basal (ausência de isoproterenol), quando comparada com a condição basal do controle (não tratado). Na condição estimulada observou-se, um aumento da lipólise em todas as amostras, mesmo em concentrações de glicerol menores do que foi observado no controle estimulado.

Isso pode ser decorrente de que o tratamento estimulado não induziu significativamente a lipólise quando foi tratado com a amostra amora-preta A1, no entanto com relação as outras frutas, em condição estimulada, apresentou um aumento da lipólise: esse aumento então, conseguiu se equiparar com a lipólise da amora-preta A1 em condição basal que não foi diferente da condição estimulada.

Desta maneira foi possível observar que dentre os extratos avaliados a que apresentou maior potencial de ativação de lipólise foi a cv. de morango Camino Real A2 e A1 (MCR) com 6,41 mg glicerol/ tecido e 5,52 mg glicerol/ tecido, respectivamente (Figura 23).

Os valores encontrados para este ensaio variaram entre 6,41 a 3,84 mg glicerol/ tecido, sendo o menor valor para a cv. de morango MT1 (Figura 23).

Assim como foi observado na captação de glicose, o mesmo foi encontrado na estimulação de lipólise para a amostra amora-preta A1 o qual apresentou 6,43 mg glicerol/ tecido; no segundo tempo de amostragem foi de 5,74 mg glicerol/ tecido. A framboesa vermelha A1 apresentou maior estimulação de lipólise de amostragem com valor de 6,01 mg glicerol/ tecido.

Em estudo realizado por Bolsoni-Lopes et al. (2013), foi possível evidenciar que o ácido palmitoleico esteve associado com um aumento significativo na lipólise de adipócitos, tanto em condições basais quanto estimuladas em células diferenciadas de adipócitos 3T3-L1 ou de camundongos C57BL/6.

Além disso, células 3T3-L1 diferenciadas, na presença de tratamentos diferenciados contendo 20 e 10 mg / mL b.s de extrato de *cranberry* elevou a liberação de glicerol para 42,7 e 24,9 nmol / mL, respectivamente, em comparação com os adipócitos de controle, em que a liberação de glicerol foi de 12,52 nmol / mL (KOWALSKA et al., 2014). No presente trabalho foi possível concluir que o extrato de *cranberry* pode agir diretamente sobre os adipócitos para inibir a lipogênese e estimular a lipólise.

Lee et al. (2009) observaram que o tratamento com diferentes concentrações (0, 1 ou 10 μM) de chá verde, sendo o composto majoritário encontrado (-) epigallocatequina-3-galato (EGCG), foi capaz de diminuir o conteúdo de lípidos intercelulares nos adipócitos 3T3-L1 e aumentou a quantidade de glicerol liberada no meio, indicando a ativação da lipólise.

Diante dos resultados encontrados, entende-se que a hidrólise dos triglicerídeos armazenados na célula de gordura é um fenômeno complexo envolvendo lipases, transportadores de membrana plasmática, proteínas de ligação a ácidos graxos e proteínas associadas à partículas lipídicas (LANGIN, 2006). São necessários mais estudos para elucidar a via detalhada e os mecanismos moleculares subjacentes para o efeito das cv. de morangos, amora-preta e framboesa vermelha do trabalho na lipólise.

Figura 23 Liberação de glicerol em condições basal e estimulada por isoproterenol em tecido explante em amora-preta, framboesa e cv. de morangos (MT, MC, MCR e MO). Resultados expressos como mg glicerol/ tecido (média $\pm$ SE). 1 e 2 referem-se ao primeiro e segundo tempo de amostragem, respectivamente, coletas no ano de 2014. Os resultados são médias $\pm$ SE (n=8). Letras diferentes representam diferença estatística entre as amostras (ANOVA e Teste *test-t* como *post-hoc* $p < 0,05$). ANOVA representado pela letra maiúscula indica diferenças significativas para todas as frutas e controle (basal ou estimulada) e *test-t* representado pela letra minúscula indica diferenças significativas entre basal e estimulado da mesma amostra.

5.9. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DAS AMOSTRAS E ENSAIOS

Para melhor entender as mudanças relacionadas à captação de glicose, lipólise e composição dos flavonoides, a PCA foi realizada, utilizando-se todos os resultados acima apresentados para todas as amostras testadas (11 amostras x 22 variáveis). Estes resultados podem ser encontrados na Figura 24.

Os componentes principais com todos os resultados (PC 1 e 2) juntos explicaram 50,8% da variância total entre as amostras e separaram as amostras testadas (Figura 24).

Flavonoides identificados, por CLAE-DAD, como quercetina-3-*O*-glucosídeo, pelargonidina-3-*O*-glucosídeo, cianidina-3-*O*-glucosídeo, pelargonidina-3-*O*-glucosídeo isômero, pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo, ácido elágico, ensaio enzimático (inibição α -glicosidase), metanólico e purificado, ensaio de lipólise, ácido elágico total (ET), contribuíram para a separação entre as cultivares de morango das demais amostras. Enquanto que cianidina-3-*O*-rutinosídeo, cianidina-3-*O*-glicosídeo, kaempferol-3-*O*-glicosídeo, ensaio de captação de glicose, ORAC, DPPH, antocianinas monoméricas (AM), fenólicos totais (FT), foram compostos principais que contribuíram para a separação de amora 1, amora 2, framboesa 1 e framboesa 2.

A separação dos componentes sofreu influência dos compostos identificados pelo CLAE-DAD, sendo as antocianinas responsáveis por tal efeito, e puderam assim, influenciar positivamente com potencial inibitório sobre a enzima alfa-glicosidase.

Sancho e Pastore (2011), descreveram a eficácia das antocianinas como antienzimáticos, exercendo efeitos múltiplos e simultâneos sobre as enzimas-chave envolvidas no gerenciamento na homeostase glicêmica. Os dados publicados sugerem também, que as antocianinas são capazes de diminuir a glicemia melhorando a resistência à insulina, protegendo as células β , aumentando a secreção de insulina e clivagem da sacarose.

Tomando por base a PC 1, foi possível distinguir as cv. de morango da amora-preta e framboesa. Da mesma forma, a amostra A1 (Amora 1) foi separada das demais por um efeito de colheita, onde valores como ORAC, AM, DPPH, FT se mostraram com alta capacidade de correlação e também está relacionado com sua separação das demais amostras.

Melo et al. (2006) relatam que a eficiência da ação antioxidante dos componentes bioativos dos vegetais depende de sua estrutura química e da concentração deste fitoquímico no alimento. Porém sabe-se que esta concentração depende diretamente de fatores genéticos, condições ambientais, grau de maturação e variedade da planta.

Figura 24 Análise de componentes principais (PCA) para os dados referentes a amora-preta, framboesa e cv. de morangos (MT, MC, MCR e MO). PCA foi realizada com flavonoides identificados, por CLAE-DAD, ensaio enzimático (inibição α -glicosidase), metanólico e purificado, ensaio de lipólise, ácido elágico total (ET), ensaio de captação de glicose, ORAC, DPPH, antocianinas monomérica (AM), fenólicos totais (FT) e ensaio de lipólise. As setas vermelhas indicam os ‘loadings plots’, mostrando a contribuição dos compostos para cada componente principal (PC 1 ou PC 2).

6. CONCLUSÃO

Resultados preliminares sinalizaram que as frutas vermelhas são boas fontes de compostos bioativos, com potencial efeito inibitório sobre a enzima α -glicosidase, portanto, com promissores efeitos benéficos sobre a saúde humana.

Nos extratos avaliados, a cv. de morango, Camino Real, apresentou alta atividade de inibição sobre alfa-glicosidase. Para os demais frutos vermelhos avaliados, a framboesa vermelha foi a que apresentou maior atividade inibitória sobre essa enzima.

Sabe-se que os polifenóis atuam diretamente com os transportadores de glicose, assim, os extratos analisados no presente trabalho, em especial antocianinas identificadas, pelargonidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo, podem ter sido capazes de ratificar resultados já descritos.

Verificou-se que os extratos tem a capacidade de inibir a lipólise, em condição basal e estimulada. Quando avaliada a captação de glicose observou-se que os extratos tem capacidade de aumentar este efeito.

Assim, com os resultados obtidos para captação de glicose e lipólise em tecido adiposo explantes pode-se concluir que os extratos possuem características anabólicas; pois privilegiam o armazenamento de energia impedindo a lipólise e aumentando a captação de glicose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABY, K.; SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E. Phenolic Composition and Antioxidant Activities in Flesh and Achenes of Strawberries (*Fragaria ananassa*) **J. Agric. Food Chem.** 2005, 53, 4032-4040.
- ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. Flavonoids, chemistry, biochemistry and applications. New York: **CRC Press**; 2006. 1197 p.
- ANDREADI, C. K.; HOWELLS, L. M.; ATHERFOLD, P. A.; MANSON, M. M. Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor-kappaB, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemeoxygenase-1 by dietary polyphenols. **Mol. Pharmacol.** 69:1033–1040; 2006.
- ALZAID, F.; CHEUNG, H.; PREEDY, V.R.; SHARP, P.A. Regulation of glucose transporter expression in human intestinal caco-2 cells following exposure to an anthocyanin-rich berry extract. **Plos One**, v.8, n.11, p.1-6, 2013
- BABU, P.V; LIU, D.; GILBERT, E. R. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. **J Nutr Biochem.** 2013, 24(11):1777-89.
- BENVENUTI, S.; PELLATI, F.; MELEGARI, M.; BERTELLI, D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.69, n.3, p.164-169, 2004.
- BERGAMIM, S. C. **Avaliação da atividade antioxidante e da resposta glicêmica e insulínica do suco de laranja fresco em comparação ao suco de laranja pasteurizado no soro sanguíneo de indivíduos saudáveis.** Araraquara – SP/ 2012. 45p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas– Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho.
- BOATH, A. S.; STEWART, D.; MCDUGALL, G. J.; Berry components inhibit α -glucosidase in vitro: Synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry. **Food Chemistry** 135, 2012 929–936.
- BOBINAITE, R.; BOBINAS, C.; VIŠKELIS, P.; VENSKUTONIS, R. P. Total Phenolics, Anthocyanins, Ellagitannins Content and Radical Scavenging Activity of Raspberries During Ripening. **Rural Development** 2013.
- BOBINAITE, R.; VIŠKELIS, P.; VENSKUTONIS, P. R. Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. **Food Chemistry** 132, 2012 1495–1501.
- BOLSONI-LOPES, A.; FESTUCCIA, W. T.; CHIMIN, P.; FARIAS, T. S. M.; TORRES-LEAL, F. L.; CRUZ, M. M.; ANDRADE, P. B.; HIRABARA, S. M.; LIMA, F. B.; ALONSO-VALE, M. I. C. Palmitoleic acid (n-7) increases white

adipocytes GLUT4 content and glucose uptake in association with AMPK activation. **Lipids in Health and Disease** 2014, 13:199.

BOLSONI-LOPES, A.; FESTUCCIA, W. T.; FARIAS, T. S. M.; CHIMIN, P.; TORRES-LEAL, F. L.; DEROGIS, P.B.M.; ANDRADE, P. B.; MIYAMOTO, S.; LIMA, F. B.; CURTI, R.; ALONSO-VALE, M. I. C. Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocyte lipolysis and lipase content in a PPAR α -dependent manner. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2013.

BONDIA-PONS, I.; AURA, A.; VUORELA, S.; KOLEHMAINEN, M.; MYKKANEN, H.; POUTANEN, K. Rye phenolics in nutrition and health. **J. Cereal Sci.** 2009, 49, 323–336.

BORDIGNON- JÚNIOR, C. L. **Análise Química de Cultivares de Morango em Diferentes Sistemas de Cultivo e Épocas de Colheita**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF. Passo Fundo, fevereiro de 2008.

BORGES, K. C.; **Estudo das características físico-químicas e funcionalidade de bagaços de frutas tropicais desidratados em leite de jorro**. Natal- RN, 2011. 100p. Dissertação de Mestrado. Centro de Tecnologia Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

BRADISH, C. M.; PERKINS-VEAZIE, P.; FERNANDEZ, G. E.; XIE, G.; JIA, W. Comparison of Flavonoid Composition of Red Raspberries (*Rubus idaeus* L.) Grown in the Southern United States. **J Agric Food Chem.** 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Menos de 20% dos brasileiros consomem frutas e hortaliças e praticam exercícios. 2010. Disponível em <<http://www.portal.saude.gov.br>>. Acesso em 01 de março de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. 2011. Disponível em <<http://www.portal.saude.gov.br>>. Acesso em 01 de março de 2015.

CAO, H.; HININGER-FAVIER, I.; KELLY, M. A.; BENARABA, R.; DAWSON, H. D.; COVES, S.; ROUSSEL, A. M.; ANDERSON, R. A. Green tea polyphenol extract regulates the expression of genes involved in glucose uptake and insulin signaling in rats fed a high fructose diet. **J. Agric. Food Chem.**, 2007, 55, 6372–6378.

CAPOCASA, F.; SCALZO, J.; MEZZETTI, B.; MAURIZIO BATTINO, M. Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: The role of genotype. **Food Chemistry**, v. 111, p. 872–878, 2008.

CHAVES, V. E.; FRASSON, D.; MARTINS-SANTOS, M. E. S.; BOSCHINI, R. P.; GARÓFALO, M. R. A.; FESTUCCIA, W. T. L.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. Glyceroneogenesis Is Reduced and Glucose Uptake Is Increased in Adipose

Tissue from Cafeteria Diet–Fed Rats Independently of Tissue Sympathetic Innervation. **The Journal of Nutrition Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient-Nutrient Interactions**. 2006.

CHEN, L.; XIN, X.; YUAN, Q.; SU, D.; LIU, W. Phytochemical properties and antioxidant capacities of various colored berries. **J Sci Food Agric**. 2014;94(2):180-188.

COPETTI, C. **Atividade antioxidante *in vitro* e compostos fenólicos em morangos (*fragaria x ananassa* duch): influência da cultivar, sistema de cultivo e período de colheita**. Florianópolis, 2010. 85p Dissertação de Mestrado- Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias-Universidade Federal de Santa Catarina.

CORDENUNSI, B.R.; GENOVESE, M.I.; NASCIMENTO, J.R.O.; HASSIMOTTO, N. M. A.; SANTOS, R. J.; LAJOLO, F. M. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. **Food Chemistry** v. 91, 2005, p 113–121.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. **Blackwell Publishing**, 2006.

CROZIER, A.; JAGANATHB, I. B.; CLIFFORDC, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **This journal is The Royal Society of Chemistry** 2009, Nat. Prod. Rep., 26, 1001–1043.

DANTA, C. C.; PIPLANI, P. The discovery and development of new potential antioxidant agents for the treatment of neurodegenerative diseases. **Expert. Opin. Drug Discov**. 2014, 9(10):1205–22.

DE SALES, P. M.; SOUZA, P. M.; SIMEONI, L. A.; MAGALHÃES, P. O.; SILVEIRA, D. α -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source. **J Pharm Pharmaceut Sci**. 15(1) 141 - 183, 2012.

DE SOUZA, A. E.; GONÇALVES, S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 58, n. 8, 2010.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciência Farmacêuticas Básica Aplicada**. v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet**. 2005 Apr 16-22;365(9468):1415-28.

ERKAN, M.; WANG, S.Y.; WANG, C.Y. Effect of UV treatment on antioxidante capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 2008.

FAN-CHIANG, H.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanin pigment composition of blackberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v.70, n.3, p.198-202, 2005.

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

FERNANDES, S. R. S. **O efeito da ingestão de um café com e sem canela na glicemia pós prandial em adultos saudáveis**. Instituto superior de ciências da saúde em Moniz. Mestrado em nutrição clínica. setembro de 2013.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; VILLAÑO, D.; GARCIA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 113-118, 2004.

FERREIRA, D. S.; ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A.Z. Compostos Bioativos Presentes em Amora-Preta (*Rubus* spp.). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 3, p. 664-674, Setembro 2010.

FUJISAWA, T; IKEGAMI, H.; INOUE, K.; KAWABATA, Y.; OGIHARA. Effect of two - glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 54, p. 3887- 390, 2005.

GESCHER, A.; PASTORINO, U.; PLUMMER, S. M.; MANSON, M. M. Suppression of tumour development by substances derived from the diet — Mechanisms and clinical implications. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 1998, 45, 1–12.

GHOSH, D.; KONISHI, T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. **Asia Pac J Clin Nutr**. 2007;16(2):200-8.

GIL, M.I.; HOLCROFT, D.M.; KADER, A.A. Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 45, p. 1662-1667, 1997.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. São Paulo, 2008. 88p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

GONÇALVES, R.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V. Inhibition of α -amylase activity by condensed tannins. **Food Chem**. 2011, 125, 665– 672.

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

- HAGER, T.; HOWARD, L.R.; PRIOR, R.L. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.56, n.3, p.689-695, 2008.
- HANHINEVA, K.; TORRONEN, R.; BONDIA-PONS, I.; PEKKINEN, J.; KOLEHMAINEN, M.; MYKKANEN, H.; POUTANEN, K. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **Int J Mol Sci.** **2010**;11:1365–402.
- HANSON, R. W.; RESHEF, L. Glyceroneogenesis revisited. **Biochemistry**, v.85, p.1199-1205, 2003.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Oxford, v. 52, p. 481- 504, 2000.
- HASSIMOTTO N.M.A.; PINTO, M.S.; LAJOLO, F.M. Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 56, p. 11727-11733, 2008.
- HERNANZ, D.; RECAMALES, A. F.; MELEÁNDEZ-MARTIÁNEZ, A. J.; GONZAÁ LEZ-MIRET, M. L.; HEREDIA, F. J. Assessment of the Differences in the Phenolic Composition of Five Strawberry Cultivars (*Fragaria ´ ananassa* Duch.) Grown in Two Different Soilless Systems. **J. Agric. Food Chem.** 2007, 55, 1846-1852.
- HUANG, YU-CHUAN.; CHANG, WEN-LIANG.; HUANG, SU-FEN.; LIN, CHENG-YU.; LIN, HANG-CHING.; CHANG, TSU-CHUNG. Pachymic acid stimulates glucose uptake through enhanced GLUT4 expression and translocation. **European Journal of Pharmacology** 648, 2010. 39–49.
- JAKOBS, S.; FRIDRICH, D.; HOFEM, S.; PAHLKE, G.; EISENBRAND, G. Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. **Mol. Nutr. Food Res.** 50:52–57; 2006.
- KANG, S.I.; SHIN, H.S.; KIM, H.M.; HONG, Y.S.; YOON, S.A.; KANG, S.W.; KIM, J.H.; KIM, M.H.; KO, H.C.; KIM, S.J. Immature Citrus sunki Peel Extract Exhibits Antiobesity Effects by β -Oxidation and Lipolysis in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 2, p. 223-230, 2012.
- KELEBEK, H.; SELLI, S. Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry Fruits by Rp-Hplc-Dad and Investigation of Their Antioxidant Capacity. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 34, n. 20, p. 2495-2504, 2011.
- KIM, G.S.; PARK, H.J.; WOO, J.H.; KIM, M.K.; KOH, P.O.; MIN, W.; KO, Y.G.; KIM, C.H.; WON, C.K.; CHO, J.H. Citrus aurantium flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, issue 31, p.1-10, 2012.

- KOWALSKA, K.; OLEJNIK, A.; RYCHLIK, J.; GRAJEK, W. Cranberries (*Oxycoccus quadripetalus*) inhibit adipogenesis and lipogenesis in 3T3-L1 cells. **Food Chemistry** 148, 2014.
- KUMARAPPAN, C.T.; THILAGAM, E.; MANDAL, S. C. Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*. Saudi **Journal of Biological Sciences**.19, 349-355, 2012.
- KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.
- LAI, C. S.; HO, M.H.; TSAI, M.L.; LI, S.; BADMAEV, V.; HO, C.T.; PAN, M.H. Suppression of Adipogenesis and Obesity in High-Fat Induced Mouse Model by HydroxylatedPolymethoxyflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.10320-10328, 2013.
- LANGIN, D. Controlo f fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. **C R Biol**. 2006; 329:598-607.
- LEE, J. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruits, beverages, natural colorants and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.88, nº 5, p. 1269-1278.
- LEE, MAK-SOON.; KIM, CHONG-TAI.; KIM, IN-HWAN.; KIM, Y. Inhibitory Effects of Green Tea Catechin on the Lipid Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes. **Phytother. Res.** 23, 1088–1091, 2009.
- LU, MING-FENG.; XIAO, ZHENG-TAO.; ZHANG, HONG-YU. Where do health benefits of flavonoids come from. Insights from flavonoid targets and their evolutionary history. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 434 2013, 701–704.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, 25(4): 659-664, out.-dez. 2005.
- MARLES, R.; FARNSWORTH, N. Plants as sources of antidiabetic agents. In: WAGNER, H.; FARNSWORTH, N. R. **Economic and Medicinal Plant Research**. vol. 6, p.149-187, 1994.
- MARRAZZO, G. BARBAGALLO, I.; GALVANO, F.; MALAGUARNERA, M.; GAZZOLO, D.; FRIGIOLA, A.; D’ORAZIO, N.; LI VOLTI, G. Role of dietary and endogenous antioxidants in diabetes. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 2014, 54(12):1599–616.

- MAZUR S, NES A, WOLD A, REMBERG S, AABY K. Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. **Food Chem.** 2014;160:233-240.
- MAZZA, G.J. Anthocyanins and heart health. **Ann Ist Super Sanita**, v43, n.4, 369-74 2007.
- MCDUGALL, G. J.; KULKARNI, N. N.; STEWART, D. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. **Food Chem.** 2009, 115, 193–199.
- MCDUGALL, G. J.; KULKARNI, N. N.; STEWART, D. Current developments on the inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **BioFactors**, 2008, 33, 1–8.
- MCDUGALL, G. J.; SHPIRO, F.; DOBSON, P.; SMITH, P.; BLAKE, A.; STEWART, D. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit Amylase and R-glucosidase. **J. Agric. Food Chem.** 2005, 53, 2760–2766.
- MCDUGALL, G. J.; STEWART, D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **Biofactors**. vol. 23 (4), p. 189-195, 2005.
- MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; MACIEL, M. I. S. Polyphenol, ascorbic acid and total carotenoid contents in common fruits and vegetables. **Braz J Food Technol**, 2006, 9:89-94.
- MELO, E. B.; GOMES, A. S.; CARVALHO, I. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**. 2006; 62:10277–302.
- MEYERS, K. J.; WATKINS, C. B.; PRITTS, M. P.; LIU, R. H. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6887-6892, 2003.
- MONTAGUT, G.; ONNOCKX, S.; VAQUE, M.; BLADE, C.; BLAY, M.; FERNANDEZ-LARREA, J.; PUJADAS, G.; SALVADO, M. J; AROLA, L.; PIRSON, I.; ARDEVOL, A.; PINENT, M. Oligomers of grape-seed procyanidin extract activate the insulin receptor and key targets of the insulin signalling pathway differently from insulin. **J Nutr Biochem** 2009.
- MORENO, F. N.; BRITO, M. N. Regulação Hormonal da Gliceroneogênese. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 161-173, jan./abr. 2012 - ISSN 1983-1870.
- MOURA, L. P. **Papel do exercício físico na regulação da proteína rock em camundongos obesos: efeitos sobre a sinalização da insulina e homeostase da glicose.** Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências. Campus de Rio Claro. Tese de Doutorado. Rio Claro. Estado de São Paulo - Brasil .Abril/2015.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Noncommunicable Diseases Country Profiles**. 2011. Disponível em <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em 01 de março de 2015.

OTA, M.; OKAMOTO, T.; HOSHINO, W.; WAKABAYASHI. Action of α -D-glucosidase from *Aspergillus niger* towards dextrin and starch. **Carbohydrate Polymers**. 2009;78:28791.

PANCHAL, R. G.; REID, S. P.; TRAN, J. P.; BERGERON, A. A.; WELLS, J. Identification of an antioxidant smallmolecule with broad-spectrum antiviral activity. **Antivir. Res.** 2012, 93(1):23–29.

PARHIZ H, ROOHBAKHSH A, SOLTANI F, REZAEI R, IRANSHAHI M.. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. **Phytother. Res.** 2015, 29(3):323–31.

PINENT, M.; BLAY, M.; BLADE, M. C; SALVADO, M. J.; AROLA, L.; ARDEVOL, A. Grape seed derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin sensitive cell lines. **Endocrinology** 2004, 145, 4985–4990.

PINTO, M. S. **Compostos bioativos de cultivares brasileiras de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.): caracterização e estudo da biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico**. São Paulo, 2008. 138p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

PINTO, M. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Chemistry**, v. 107 (4), p. 1629-1635, 2008.

PIRES, V. C. **Efeitos do consumo materno e/ou paterno de extrato de amora preta (*Rubus spp.*) na suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária quimicamente induzida**. São Paulo, 2016. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

PRADEEP, P.M.; SREERAMA, Y.N. Impact of processing on the phenolic profiles of small millets: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia. **Food Chemistry**, v. 169, p. 455–463, 2015.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 4, 755-760, 2006.

ROBERFROID, M. B. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition** 87, S139–S143. 2002.

ROCHA, T. O. **Compostos Bioativos e Qualidade Microbiológica de Morangos “Oso Grande” Produzidos em Sistemas de Cultivo Orgânico e Convencional.** Dissertação como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Nutrição Humana da Universidade de Brasília. 2010.

RODRIGUES, R.; POZZOBON, A.; HOERLLE, J.; REMPEL, C.; PÉRICO, E. Avaliação do perfil glicêmico de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com e sem administração de infusão de folhas de Averrhoa carambola. **Scientia Medica** (Porto Alegre) 2010; volume 20, número 2, p. 161-165.

ROLEIRA, F. M. F.; TAVARES-DA-SILVA, E. J.; VARELA, C. L.; COSTA, S. C.; SILVA, T. 2015. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. **Food Chem.** 183:235–58.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; SILVA, A. S.; DE SOUZA, C. T.; GUADAGNINI, D.; CARVALHO, B. M.; CARICILLI, A. M.; KATASHIMA, C. K.; CARVALHO-FILHO, M. A.; HIRABARA, S.; CURI, R.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. A.; CARVALHEIRA, J. B. C. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice. **Diabetes** 2013, 62:466–470.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. DIETARY FLAVONOIDS: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. **Annual Review Nutrition.** v. 22:p. 19–34, 2002.

RUFINO, M. S. M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais.** Mossoró-RN, 2008. 236p Dissertação de Doutorado-Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.

SANCHO, R. A.; PASTORE, G. M. Review: Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. **Food Research international**, 2011.

SATUÉ-GRACIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, n.9, 3362-3367, 1997.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 2005;45(4):287-306.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n.8, p. 2432-2438, 2002.

SILVA, H. R. F. **Influência da temperatura e da incidência do sol sobre a atividade de algumas enzimas durante a estocagem refrigerada do mamão.** Campos dos goytacazes – RJ, 2003. Dissertação de Doutorado - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento**, 5^a ed. Editora da UFSC: Santa Catarina, 2004.

SKROVANKOVA, S.; SUMCZYNSKI, D.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; SOCHOR, J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. **J. Mol. Sci.** 2015, 16(10), 24673-24706.

SUNKIREDDY, P.; JHA, S. N.; KANWAR, JR.; YADAV, S. C. Natural antioxidant biomolecules promises future nanomedicine based therapy for cataract. **Colloids Surf. B** 2013, 112:554–62.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Food and Agriculture**, London, v. 10, n.1, p. 63-68, Jan.1959.

TAO Z, SHI A, ZHAO J: Epidemiological Perspectives of Diabetes. **Cell Biochem Biophys** 2015.

TINKEL, J.; HASSANAIN, H.; KHOURI, S. J. Cardiovascular antioxidant therapy: a review of supplements, pharmacotherapies, and mechanisms. **Cardiol. Rev.** 2012, 20(2):77–83.

TOELLER, M. α -Glucosidase inhibitors in diabetes: efficacy in NIDDM subjects. **Eur. J. Clin. Invest.** 24(Suppl. 3): 31-35. 1994.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; CLIFFORD, M.N. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives nature, occurrence and dietary burden. **J. Sc. Food Agric.**, Bognor Regis , v. 80, p. 1024-1032, 2000.

TORRONEN, R.; SARKKINEN, E.; TAPOLA, N.; HAUTANIEMI, E.; KILPI, K.; NISKANEN, L. Berries modify the postprandial plasma glucose response to sucrose in healthy subjects. **Br. J. Nutr.** 2009.

TSUDA, T. Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. **Mol. Nutr. Food Res.** 2012, 56, 159–170.

UBI, B.E.; HONDA, C.; BESSHO, H.; KONDO, S.; WADA, M.; KOBAYASHI, S.; MORIGUCHI, T. Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: Effect of UV-B and temperature. **Plant Science**, v. 170, p. 571 - 578, 2006.

- VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology** 94 (2002) 137–155.
- VIRGILI, F.; MARINO, M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. **Free Radical Biology & Medicine** 45, 2008, 1205–1216.
- VUONG, T.; MARTINEAU, L. C.; RAMASSAMY, C.; MATAR, C.; HADDAD, P. S. Fermented Canadian lowbush blueberry juice stimulates glucose uptake and AMP activated protein kinase in insulin sensitive cultured muscle cells and adipocytes. **Can. J. Physiol. Pharmacol** 2007, 85, 956–965.
- VYSAKH, A.; RATHEESH, M.; RAJMOHANAN, T. P.; PRAMOD, C.; PREMLAL, S. Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. **Int. Immunopharmacol.** 2014, 20(1):124–30.
- WANG, S.Y.; BOWMAN, L.; DING, M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. **Food Chemistry**, Oxford, v.107, n.3, p.1261-1269, 2008.
- WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, n.2, p.140-146, 2000.
- WANG, Y.; MA, L.; LI, Z.; DU, Z.; LIU, Z.; QIN, J.; WANG, X.; HUANG, Z.; GU, L.; CHEN, A.S.C. Synergetic inhibition of metal ions and genistein on α -glucosidase. **FEBS Letters**, v. 576, p. 46-50, 2004.
- WARDLOW, G.; SMITH, A. E.; LINDEMAN, A. Contemporary Nutrition: a Functional Approach. EUA: **Mc Graw Hill**, 2012.
- WATSON, R. T.; PESSIN, J. E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 56, p. 175-193, 2001.
- WHITSON, J.; MCDOUGALL, G. J.; ROSS, H. A.; LUND, V. A.; HAMILTON, C. A.; DOMINICZAK, A. F.; STEWART, D. Bioactive berry components: Potential modulators of health benefits. **Funct. Plant Sci. Biotechnol.** 2010, 4, 34–39.
- WIDSTEN, P.; CRUZ, C. D.; FLETCHER, G. C.; PAJAKMA-MCGHIE, T. K. Tannins and extracts of fruit byproducts: antibacterial activity against foodborne bacteria and antioxidant capacity. **J. Agric. Food Chem.** 2014, 62(46):11146– 56.
- WILLIAMS, C. L. **Br. Med. J.**, 1995, 1453–1455.

WILLINER, M. R.; PIROVANI M. E.; GUEMES, D. R. Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. **J Sci Food Agric** 0022–5142, 2003.

World Health Organization. WHO Global action plan for the prevention and control of noncommunicable disease 2013-2020 [Internet]. **Geneva: World Health Organization**; 2013 [cited 2014 Feb 20]. Available.

YAN, X. T, LEE, S. H.; LI, W.; SUN, Y. N.; YANG, S. Y. Evaluation of the antioxidant and anti-osteoporosis activities of chemical constituents of the fruits of *Prunus mume*. **Food Chem.** 2014, 156:408–15.

ZADERNOWSKI, R.; CZAPLICKI, S.; NACZK, M. Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). **Food Chemistry** 112 (2009) 685–689.

ZANATTA, L; ROSSO, A; FOLADOR, P; FIGUEIREDO, MS; PIZZOLATTI, MG; LEITE, LD; SILVA, FR. Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle. **J. Nat. Prod** 2008, 71, 532–535.

ZUANAZZI, J. A.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, et al. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 2010.

8. ANEXOS

Anexo I – Curva de calibração da inibição da alfa-glicosidase dos frutos em extrato metanólico

Anexo II – Curva de calibração da inibição da alfa-glicosidase dos frutos em extrato enriquecido

Anexo III – Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Anexo IV – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Caracterização do envolvimento do sensor de nutrientes mTOR no desenvolvimento de doenças metabólicas crônicas associadas a obesidade*", registrado sob o protocolo nº **115/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **24/09/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) William Tadeu Lara Festuccia**

- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*

- Membros da Equipe: *Thiago Belchior (Pós-doutorando), Fernanda Janku Cabral (Pós-doutorando), Alex Shimura Yamashita (Pós-doutorando), Juliana Magdalon (Pós-graduando), Maynara Lucca Andrade (Pós-graduando), Rafael Junges Moreira (Pós-graduando), Tiago Eugênio de Oliveira da Silva (Pós-graduando), Érique de Castro (Pós-graduando), Milene Ortiz Silva (Pós-graduando), Thayna dos Santos Vieira (Treinamento técnico), Carlos Mario Donado Pestana (Pós-doutorando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Involvement of the nutrient sensor mTOR in the development of obesity associated chronic metabolic diseases*", protocol nº **115/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **9/24/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) William Tadeu Lara Festuccia**

- Team members: *Thiago Belchior (Postdoctoral Researcher), Fernanda Janku Cabral (Postdoctoral Researcher), Alex Shimura Yamashita (Postdoctoral Researcher), Juliana Magdalon (Graduate Student), Maynara Lucca Andrade (Graduate Student), Rafael Junges Moreira (Graduate Student), Tiago Eugênio de Oliveira da Silva (Graduate Student), Érique de Castro (Graduate Student), Milene Ortiz Silva (Graduate Student), Thayna dos Santos Vieira (Technical Trainee), Carlos Mario Donado Pestana (Postdoctoral Researcher).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/ Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	C57BL/6J	Macho/Male	8 semanas/weeks	230
	Tsc1 floxed adiponectina Cre +/-	Macho/Male	8 semanas/weeks	140
	Raptor floxed adiponectina Cre +/-	Macho/Male	8 semanas/weeks	80
	Pten floxed albumina Cre +/-	Macho/Male	8 semanas/weeks	80
	PTEN/Rictor duplo floxed albumina Cre +/- e PTEN/Raptor duplo floxed albumina Cre +/-	Macho/Male	8 semanas/weeks	90
	UCP1 KO - B6.129-UCP1 TM1KZ/J	Macho/Male	8 semanas/weeks	160
	Rictor floxed adiponectina Cre +/-	Macho/Male	8 semanas/weeks	40
	PPARGalpha floxed adiponectina Cre +/-	Macho/Male	8 semanas/weeks	85

Anexo V – Ficha do aluno

22/01/2017

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 8862768/1 - Ana Maria Duarte de Souza

Email: anamarladuarte23@gmail.com (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)
Data de Nascimento: 29/12/1988
Cédula de Identidade: RG - 5248234 - PA
Local de Nascimento: Estado do Pará
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Nutricionista - Universidade da Amazônia - Pará - Brasil - 2012

Curso: Mestrado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Bromatologia
Data de Matrícula: 07/02/2014
Início da Contagem de Prazo: 07/02/2014
Data Limite para o Depósito: 03/02/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Franco Maria Lajolo - 07/02/2014 até o presente. Email: fmlajolo@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 07/02/2014
Trancamento(s): 180 dias
Período de 02/06/2016 até 30/08/2016
Período de 04/03/2016 até 01/06/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/04/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 07/02/2014
Trancado em 04/03/2016
Trancado em 02/06/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Trancado em 02/06/2016

Impresso em: 22/01/2017 22:07:52

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo

22/01/2017

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 8862768/1 - Ana Maria Duarte de Souza

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBA5899-2/3	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5813-4/1	Aplicações de Cromatografia e Espectrometria de Massas em Análises Toxicológicas	11/03/2014	14/04/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5712-6/1	Fisiologia da Nutrição I	19/05/2014	29/06/2014	90	6	90	B	N	Concluída
ICB5735-1/1	Regulação Central do Balanço Energético e da Homeostase Glicêmica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	29/07/2014	30/09/2014	45	3	100	B	N	Concluída
FBA5728-3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5900-2/2	Biomodelos Experimentais Aplicados na Avaliação de Alimentos	28/04/2015	18/05/2015	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Trancado em 02/06/2016

Impresso em: 22/01/2017 22:07:52

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 8862768/1 - Ana Maria Duarte de Souza

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
33546	Franco Maria Lajolo	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Trancado em 02/06/2016

Impresso em: 22/01/2017 22:07:52

2/3

Anexo VI- Currículo Lattes

22/1/2017

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Ana Marla Duarte de Souza)

English

Dados gerais Formação Atuação Projetos Produções Educação e Popularização de C & T Eventos +

Ana Marla Duarte de Souza

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0201329181516344>

Última atualização do currículo em 25/10/2016

Mestranda em Ciência dos Alimentos (área de concentração: bromatologia) pela Universidade de São Paulo. Especialista em Gastronomia Funcional pela Faculdade Método de São Paulo. Tem experiência em monitoria e prática laboratorial nas áreas de bromatologia e microbiologia dos alimentos. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Ana Marla Duarte de Souza

Nome em citações bibliográficas

SOUZA, A. M. D.

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Avenida Professor Lineu Prestes
Butantã
05508000 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 1130913647
Fax: (11) 30913647

Formação acadêmica/titulação

2014

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4459269D6>

1/7

Mestrado em andamento em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Mix de frutas com potencial ação no controle de Diabetes mellitus-2, Orientador: Franco Maria Lajolo.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2012 - 2014

Especialização em Gastronomia Funcional.

Faculdade Método de São Paulo, FAMESP, Brasil.

Título: PAPEL DA GASTRONOMIA FUNCIONAL NA MELHORA DOS EFEITOS DELETÉRIOS SECUNDÁRIOS AOS TRATAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS.

Orientador: Suzana Cristina de Toledo Camacho Lima.

2008 - 2012

Graduação em Nutrição.

Universidade da Amazônia, UNAMA, Brasil.

Título: Manual de Suplementação Proteica para Atletas e Desportistas.

Orientador: Joseana Moreira Assis Ribeiro Pinheiro.

Formação Complementar

2016 - 2016

Solicitação e Interpretação de Exames Laboratoriais Aplicados à Nutrição. (Carga horária: 8h).

Academia Paraense de Biomedicina, APBM, Brasil.

2012 - 2012

Curso de Nutrição em Estética. (Carga horária: 3h).

8º Fórum Nacional de Nutrição, NÚCLEO, Brasil.

2012 - 2012

Curso de Nutrição Esportiva. (Carga horária: 3h).

8º Fórum Nacional de Nutrição, NÚCLEO, Brasil.

2012 - 2012

Curso de Food Service. (Carga horária: 3h).

8º Fórum Nacional de Nutrição, NÚCLEO, Brasil.

2010 - 2010

Culinária para uma vida mais saudável. (Carga horária: 8h).

Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - São Paulo, SBPC, Brasil.

2009 - 2009

Cozinha Brasil. (Carga horária: 10h).

SERVIÇO SOCIAL DA INDÚSTRIA, SESI, Brasil.

2009 - 2009

GASTRONOMIA FUNCIONAL. (Carga horária: 40h).
ROBERTO MARCÍLIO - NUTRIÇÃO FUNCIONAL, ROBERTO MARCÍLIO, Brasil.

2009 - 2009

Qualidade do Pescado e seus Produtos Derivados. (Carga horária: 8h).
Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - São Paulo, SBPC, Brasil.

2008 - 2008

MB o Curso de Primeiros Socorros. (Carga horária: 30h).
Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial, SENAC, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional**2014 - Atual**

Vínculo: , Enquadramento Funcional:

Universidade da Amazônia, UNAMA, Brasil.

Vínculo institucional**2011 - 2012**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 20

Outras informações

Bolsista do Programa de Iniciação Científica, para desenvolver o Projeto "Avaliação do perfil nutricional dos portadores de doença de chagas atendidos na Fundação Hospital de Clínicas Gaspar Viana"

Vínculo institucional**2010 - 2010**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 20

Outras informações

Monitoria na disciplina de Bromatologia, do curso de Nutrição
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4459269D6>

Projetos de pesquisa

2014 - Atual

Compostos bioativos com potencial ação no controle da homeostase glicêmica.

Descrição: Identificar compostos bioativos com potencial ação no controle da homeostase glicêmica..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Ana Maria Duarte de Souza - Coordenador / Franco Maria Lajolo - Integrante / Neuza Mariko Aymoto Hassimotto - Integrante.

Áreas de atuação

1.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição.

2.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Microbiologia.

3.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Bromatologia.

Idiomas

Inglês

Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Espanhol

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1.

★ FRANCA, T. S. ; **SOUZA, A. M. D.** ; PELAIS, A. C. A. . AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA CARNE BOVINA MOÍDA COMERCIALIZADA EM AÇOUGUES NO BAIRRO DA MARAMBAIA NO MUNICÍPIO DE BELÉM-PA. In: 62 Reunião Anual da SBPC, 2010, Natal-RN. Anais/Resumos da 62ª Reunião Anual da SBPC, 2010.

2.

★ **SOUZA, A. M. D.**; FRANCA, T. S. ; PELAIS, A. C. A. . PERFIL MICROBIOLÓGICO DE LANCHES CONSUMIDOS POR ESTUDANTES NOS ARREDORES DE UMA UNIVERSIDADE PRIVADA. In: 62 Reunião Anual da SBPC, 2010, Natal-RN. Anais/Resumos da 62ª Reunião Anual da SBPC, 2010.

Apresentações de Trabalho

1.

SOUZA, A. M. D.; BARBOSA, D.R.S ; FALCAO, L. F. . A Dislipidemia Associada aos Portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUIBB) - Estudo de Caso.. 2012. (Apresentação de Trabalho/Outra).

2.

BARBOSA, D.R.S ; FRANCA, T. S. ; PELAIS, A. C. A. ; **SOUZA, A. M. D.** . Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APCC) na Elaboração de Salada de Batatas em uma Cozinha Institucional.. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).

3.

SOUZA, A. M. D.. Bacillus Cereus e suas Toxinas nos Alimentos: uma revisão. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Produção técnica

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1.

FALCAO, L. F. ; **SOUZA, A. M. D.** ; BARBOSA, D.R.S ; FRANCA, T. S. . Dicas de Nutrição (Nutri dicas). 2012.

Demais tipos de produção técnica

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

8º Fórum Nacional de Nutrição 2012. 2012. (Outra).

2.

I Jornada de Nutrição FSCMP. 2011. (Outra).

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4459269D6>

3.

62ª Reunião Anual da SBPC. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA CARNE BOVINA MOÍDA COMERCIALIZADA EM AÇOUGUES NO BAIRRO DA MARAMBAIA NO MUNICÍPIO DE BELÉM-PA. 2010. (Outra).

4.

Casos Clínicos estudados na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. 2010. (Outra).

5.

COMEMORAÇÃO AO DIA DO NUTRICIONISTA. DIA DO NUTRICIONISTA. 2010. (Encontro).

6.

Competências do Nutricionista Esportivo. 2010. (Outra).

7.

DIETOTERAPIA E ERROS INATOS DO METABOLISMO. 2010. (Outra).

8.

O Café é um Alimento Funcional?. 2010. (Outra).

9.

SEMANA MUNDIAL DE AMAMENTAÇÃO (SMAM-2010). 2010. (Seminário).

10.

Sessão Acadêmica do Curso de Nutrição. Alimentos Funcionais: Dieta alimentar para manter a saúde e evitar doenças.. 2010. (Outra).

11.

VIII Jornada Paraense de Nutrição Clínica e Nutrição Parenteral e Enteral. 2010. (Outra).

12.

I Jornada de Nutrição: A importância da nutrição na prevenção de doenças e promoção da saúde. 2009. (Outra).

13.

Mulher cidadã: Participação política e garantia de direitos. 2009. (Seminário).

14.

SBPC. 2009. (Outra).

15.

Seminário de Segurança Alimentar "Alimentação: direito de todos". 2009. (Seminário).

Educação e Popularização de C & T

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1.

FALCAO, L. F. ; **SOUZA, A. M. D.** ; BARBOSA, D.R.S ; FRANCA, T. S. . Dicas de Nutrição (Nutri dicas). 2012.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 22/01/2017 às 19:50:24

[Baixar Currículo](#)[Imprimir Currículo](#)