UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos

Área de Bromatologia

Efeito dos compostos fenólicos de *Eugenia dysenterica* DC sobre a glicemia pós-prandial de indivíduos com síndrome metabólica e disglícemia

Renata Luise de Araujo

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos

Área de Bromatologia

**Efeito dos compostos fenólicos de *Eugenia dysenterica* DC sobre a glicemia pós-prandial
de indivíduos com síndrome metabólica e disglycemia**

Renata Luise de Araujo

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

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

Araujo, Renata Luise de
A663e Efeito dos compostos fenólicos de *Eugenia dysenterica* DC
sobre a glicemia pós-prandial de indivíduos com síndrome metabólica
e disglícemia / Renata Luise de Araujo. -- São Paulo, 2015.
93p.

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

Orientador: Genovese, Maria Inês

1. Bromatologia I. T. II. Genovese, Maria Inês, orientador.

641 CDD

RENATA LUISE DE ARAUJO

**Efeito dos compostos fenólicos de *Eugenia dysenterica* DC sobre a glicemia pós-prandial
de indivíduos com síndrome metabólica e disglycemia**

Comissão julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^o. Dr. Maria Inés Genovese
Orientador

Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Renato e Ana Luise,
ao meu amado marido Henrique
e ao meu querido irmão Luis Felipe.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos anos de trabalho que resultaram nesta dissertação, pessoas e instituições me apoiaram. Agora que alcanço meus objetivos, não poderia jamais deixar de reconhecê-las. Início esta sincera lista de agradecimentos pelas pessoas mais inspiradoras que até hoje já conheci, meus pais Ana Luise e Renato. Agradeço pelo incentivo à minha formação pessoal e profissional. Obrigada também por apenas serem quem são, o que já é motivo de orgulho.

Ao meu irmão Luis Felipe, agradeço por ter sido um professor de quase todas as disciplinas acadêmicas. Eterna admiração.

Obrigada ao meu querido marido Henrique pelo apoio incondicional ao longo deste trabalho.

A conclusão deste mestrado não teria sido possível sem os conselhos, paciência, dedicação, profundo conhecimento e oportunidades oferecidas pela minha mentora, Profa. Dra. Maria Inés Genovese que sempre orientou-me nas inúmeras vezes que precisei.

Gostaria, ainda, de homenagear meus queridos colegas de laboratório tanto da geração antiga como da atual Alice, Beatriz, Carlos, Daniel, Diully, Flávia, Gabi Cunha, Gabi Pedrosa, Guto, Helena, Kelly, Profa. Lígia, Luana, Luciene, Márcio, Maria Cecília, Marcela, Rosa Maria, Simone e Tatyane. Um agradecimento especial à Helô que na reta final do mestrado ajudou-me nos experimentos.

Ao Dr. Luciano Giacaglia, Dra. Rosa Ferreira dos Santos e Dra. Silvia Cozzolino por participarem da minha banca de qualificação. Obrigada pela colaboração.

Entre as instituições com as quais me relacionei e muito aprendi, dirijo meus agradecimentos à Faculdade de Medicina da USP, pois me permitiu conhecer profissionais que admiro como Dra. Elizabeth, Dr. Jorge, Dr. Luciano e Dra. Rosa.

Agradeço também as enfermeiras e auxiliares que assistiram aos pacientes durante as coletas de sangue.

Jamais esqueceria os funcionários e alunos do laboratório de investigação médica - LIM-18 que me acolheram desde o primeiro dia de trabalho, em especial a Maria do Carmo

que ajudou-me na elaboração da logística do estudo com os pacientes quando o nosso projeto ainda estava somente no papel.

Agradeço a todos os colegas da Liga Acadêmica de Síndrome Metabólica enquanto nutricionista voluntária junto com a Anna Luize, Jéssica Castro, Patrícia Rios, Raquel Bellani, Raquel Pissigueli e Thayrine Moraes.

Finalmente, agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro ao laboratório, bem como a FAPESP.

Meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das principais classes de flavonoides (Adaptado de CROZIER et al., 2009).....	17
Figura 2. Representação da absorção de glicose intestinal. Setas escuras representam enzima ou transportador alvo dos polifenóis. (A) Lúmen intestinal de um indivíduo saudável; (B) Lúmen intestinal de um indivíduo diabético tipo 2 (Adaptado de WILLIAMSON, 2013).....	28
Figure 1. Dose-response of phenolic compounds obtained by SPE using polyamide (A) and C18 (B) cartridges from cagaita fruit juice and acarbose (C), on α -glucosidase activity. Dose-response of phenolic compounds obtained by SPE using C18 (D) cartridge from cagaita fruit juice and acarbose (E), on α -amylase activity. Dose-response of phenolic compounds obtained by SPE using polyamide (F) and C18 (G) cartridges from cagaita fruit juice and orlistat (H), on pancreatic lipase activity.	72
Figure 2. Postprandial blood glucose (A) and insulin (B) at 0, 30, 60, 90 and 120 minutes after test meals: bread + water (300 mL) as control; bread + clarified cagaita juice (300 mL); bread + non-clarified cagaita juice (300 mL). Mean $\pm$ standard deviation (n=14).	73

LISTA DE TABELAS

Table1. Chemical characterization of clarified and non-clarified cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i> DC) juices prepared from commercial frozen pulp, ready to consumption, administered to volunteers.	66
Tabela 2. Inhibition of α -glucosidase, α -amylase and pancreatic lipase activities, <i>in vitro</i> , of phenolic compounds from cagaita fruit juice.	67
Tabela 3. Baseline characteristics of the study volunteers.	68
Tabela 4. Effect of cagaita fruit juices on postprandial plasma glucose and insulin of prediabetic subjects (n=14), compared to water as control.	69
Tabela 5. Effect of cagaita juices on postprandial antioxidant capacity of plasma of volunteers.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem	Dg: incremento absoluto de glicose
μ: micro	PIg: incremento percentual de glicose
μg: micrograma	VIg: velocidade de incremento de glicose
g: grama	ATG: área abaixo da curva de glicose
g: gravitacional	ATI: área abaixo da curva de insulina
nm: nanômetro	TPG: tempo de pico de glicose
mg: miligramas	CBF: compostos bioativos fenólicos
μL: microlitro	EROS: espécies reativas de oxigênio
mL: mililitros	DNA: ácido desoxirribonucleico
L: litro	LPH: lactase floridzina hidrolase
°C: graus Celsius	SULT: sulfotransferase
nM: nanomolar	UGT: uridina-50-difosfato
μM: micromolar	glicuronosiltransferase
mM: milimolar	COMT: catecol- <i>O</i> -metiltransferase
M: molar	SM: síndrome metabólica
μmol: micromol	OMS: organização mundial da saúde
mmol: milimol	NCEP-ATPIII: <i>National Cholesterol</i>
pH: potencial hidrogeniônico	<i>Education Program - Adult Treatment Panel</i>
n°: número	<i>III</i>
dL: decilitro	IDF: federação internacional de diabetes
eq. : equivalente	DM2: diabetes mellitus tipo 2
>: maior que	TNF-α: fator de necrose tumoral –α
<: menor que	et al.: e colaboradores
≥: maior ou igual	ANOVA: análise de variância
≤: menor ou igual	PTFE: politetrafluoretileno
EAG: equivalentes de ácido gálico	DAD: detector de arranjo de diodo
ETQ: equivalentes de tanino quebracho	HPLC: <i>High performance liquid</i>
GB: glicose basal	<i>chromatography</i>
IB: insulina basal	HCl: ácido clorídrico
VPg: valor de pico de glicose	NaCl: cloreto de sódio
VPi: valor de pico de insulina	TTOG: teste de tolerância oral à glicose
	NOS: óxido nítrico sintetase

LDL: lipoproteína de baixa densidade
GLUT: transportador de glicose
HIV: vírus da imunodeficiência humana
ATP: trifosfato de adenosina
RNAm: ácido ribonucleico mensageiro
DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
FRAP: poder redutor do ferro
TPTZ: 2,4,6-tripiridil-s-triazine
TROLOX: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico
ORAC: Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
AAPH: 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
USP: Universidade de São Paulo
Abs: Absorbância
min: minuto
SGLT: transportador ativo de glicose dependente de sódio
®: marca registrada
pH: potencial hidrogeniônico
AA: ácido ascórbico
U: unidade
DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. Compostos bioativos fenólicos em alimentos	16
1.2. Síndrome metabólica: obesidade, hiperglicemia e complicações cardiovasculares	19
1.3. Polifenóis na digestão e absorção dos carboidratos: estado de hiperglicemia	23
1.4. Cagaita	28
2. Objetivos	31
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. Materiais e métodos	32
3.1. Materiais	32
3.2. Métodos	33
3.2.1. Determinação de açúcares totais	33
3.2.2. Determinação do potencial hidrogeniônico	33
3.2.3. Determinação de fibras totais	33
3.2.4. Quantificação de proantocianidinas – Método do butanol acidificado	33
3.2.5. Determinação da capacidade redutora do Folin-Ciocalteu e teor de fenólicos totais	34
3.2.6. Determinação da capacidade antioxidante	34
3.2.6.1. Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	34
3.2.6.2. Determinação do poder redutor do ferro - Método FRAP	35
3.2.6.3. Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)	35
3.2.7. Identificação e caracterização dos compostos fenólicos da cagaita	36
3.2.7.1. Obtenção dos extratos para determinação de flavonoides e ácido elágico livre	36
3.2.7.2. Cromatografia líquida de alta eficiência	36
3.2.7.3. Determinação do teor de ácido ascórbico	37

3.2.8. Determinação da atividade inibitória da α -amilase, α -glicosidase e lipase pancreática <i>in vitro</i>	37
3.2.8.1. Obtenção dos extratos fenólicos do suco	38
3.2.8.2. Determinação da atividade inibitória da α -amilase <i>in vitro</i>	38
3.2.8.3. Determinação da atividade inibitória da α -glicosidase <i>in vitro</i>	39
3.2.8.4. Determinação da capacidade inibitória da lipase pancreática <i>in vitro</i>	39
3.3. Determinação do efeito dos compostos fenólicos sobre a glicemia pós-prandial – Protocolo de estudo	40
3.3.1. Indivíduos e modelo experimental	40
3.3.2. Refeições teste	41
3.3.3. Análise de glicemia	42
3.3.4. Análises do plasma	42
3.3.5. Análise dos resultados	43
4. Resultados - Effect of <i>Eugenia dysenterica</i> DC fruit juice on postprandial glycemia in subjects with metabolic syndrome: role of phenolic compounds	44
1. Introduction	48
2. Research design and methods	49
2.1. Subjects	49
2.2. Test meals	50
2.3. Glucose and insulin analysis	50
2.4. Plasma antioxidant capacity	51
2.5. Characterization of cagaita fruit juice	51
2.5.1. Total sugar	52
2.5.2. Titratable acidity	52
2.5.3. Total fiber	52
2.5.4. Total phenolics content	52
2.5.5. Proanthocyanidin content	52
2.5.6. Flavonoids composition	52
2.6. Antioxidant capacity	52

2.6.1. DPPH radical-scavenging ability	53
2.6.2. FRAP ferric reducing power	53
2.6.3. ORAC oxygen radical absorbance activity	53
2.7. Preparation of polyphenol-rich extracts from cagaita fruit juice	53
2.7.1. α -Glucosidase inhibition assay	53
2.7.2. α -Amylase inhibition assay	53
2.7.3. Pancreatic lipase inhibition assay	54
2.8. Statistical analysis	54
3. Results and Discussion	55
3.1. Effect of cagaita fruit juices on postprandial glycemia and insulinemia	58
5. Conclusions	62
6. References	63
5. Conclusões	74
6. Referências	75
7. Anexos	85

RESUMO

ARAUJO, R.L. **Efeito dos compostos fenólicos de *Eugenia dysenterica* DC sobre a glicemia pós-prandial de indivíduos com síndrome metabólica e disglícemia.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O Brasil possui diversas frutas nativas, algumas consideradas potentes fontes de compostos bioativos fenólicos (CBF) como, por exemplo, a cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) que é um fruto nativo do bioma cerrado pertencente à família das Mirtáceas. Alguns CBF presentes nos frutos desta família são capazes de inibir as enzimas envolvidas na digestão dos carboidratos α -amilase e α -glicosidase *in vitro*. A inibição destas enzimas retarda a absorção de glicose sanguínea reduzindo, assim, a glicemia e insulinemia pós-prandial. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de sucos de cagaita, clarificado e não clarificado, ricos em elagitaninos e proantocianidinas, sobre a glicemia e insulinemia pós-prandial de indivíduos pré-diabéticos sem uso de fármacos capazes de influenciar o metabolismo de glicose e insulina, após o consumo de 50 g de pão francês. Três diferentes refeições foram consumidas pelos voluntários (n=14). A primeira foi composta por pão branco (50 g) mais água (300 mL) como controle; a segunda, pão branco (50 g) mais suco cagaita clarificado (300 mL), e a última refeição consistia em pão branco (50 g) mais suco de fruta cagaita não clarificado (300 mL). Os resultados mostraram que ambos os sucos reduziram quantidade total de glicose absorvida (AUC) em 56% (suco clarificado) e 71% (não clarificado) e insulina liberada em 59% (suco clarificado) e 69% (não clarificado), após a ingestão do pão branco. Embora a velocidade de incremento da glicose (VIG) não tenha apresentado diferenças significativas, o incremento absoluto de glucose (IAG), incremento percentual de glicose (IPG) e valores de pico de glicose (VPG) e insulina (VPI) foram significativamente menores do que os de controle ($p < 0,05$). Além disso, após a ingestão de sucos cagaita observou-se um aumento da capacidade antioxidante do plasma em indivíduos que consumiram as refeições ($p < 0,05$).

Palavras-chave: glicemia pós-prandial; cagaita; polifenóis

ABSTRACT

ARAÚJO, R.L. **Effect of phenolic compounds from *Eugenia dysenterica* DC on postprandial glycemia in subjects with metabolic syndrome and dysglycemia.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Brazil has several native fruits, some of them are considered potential sources of phenolic compounds. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) is a native fruit from Cerrado region belonging to the *Myrtaceae* family. Some polyphenols presents in fruits of this family may be able to act on inhibition of enzymes related to carbohydrates such as α -amylase and α -glucosidase *in vitro*. The inhibition of those enzymes activities delays blood glucose absorption, thereby reducing postprandial glycemia and insulinemia. This study aimed to assess the effect of cagaita fruit juices, clarified and non-clarified, rich in phenolic compounds including ellagitannins and proanthocyanidins, on the postprandial blood glucose and insulin responses from a bread meal (50 g), in prediabetic humans who were not taking medications known to influence glucose or insulin metabolism. Three different meals were consumed by volunteers (n=14). The first one consisted of white bread (50 g) plus water (300 mL) as a control; the second one, white bread (50 g) plus clarified cagaita fruit juice (300 mL), and the last one white bread (50 g) plus non-clarified cagaita fruit juice (300 mL). The results showed that both cagaita fruit juices reduced the total amount of glucose absorbed (AUC) by 56% (clarified juice) and 71% (non-clarified) and insulin released by 59% (clarified juice) and 69% (non-clarified), after the ingestion of white bread. Although glucose incremental velocity (GIV) did not show significant differences, absolute increase of glucose (AIG), glucose incremental percentage (GIP) and peak values of glucose (GPV) and insulin (IPV) were significantly lower than those of control ($p < 0.05$). Also, after ingestion of cagaita juices it was observed an increased antioxidant capacity of plasma in subjects that consumed the meals ($p < 0.05$).

Keywords: postprandial glycemia; cagaita; polyphenols

1. Introdução

1.1. Compostos bioativos fenólicos em alimentos

O progresso da ciência dos alimentos propiciou, na atualidade, um aumento do conhecimento a respeito da ação de diversos nutrientes no organismo e, com isso, outros componentes, também presentes nos alimentos, ganharam importância devido aos indícios de que seu consumo estaria relacionado a efeitos benéficos ao organismo. Os compostos bioativos, que podem ou não ser considerados nutrientes, estão largamente distribuídos nos alimentos de origem vegetal e demonstram importante associação com a manutenção da saúde. São alguns exemplos: fitoesteróis, proteínas da soja, fibras da dieta e probióticos (ALVES et al., 2008; CHAMPGNE & FUSTIER, 2007; CHOI et al., 2008; CRUZ & CASAL, 2012; MONTELLA et al., 2013; ROCHFORD & PANOZZO, 2007).

Dentre as distintas classes de compostos bioativos destacam-se os compostos fenólicos (CBF), também conhecidos como polifenóis, que compõem a maior categoria dentre os agentes fitoquímicos. Os CBF são estruturas químicas sintetizadas a partir do metabolismo secundário de plantas e exercem função de fotoproteção, defesa contra microrganismos e insetos e pigmentação (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Os polifenóis apresentam, obrigatoriamente, o esqueleto fenólico em sua composição. No entanto, esses compostos variam extensamente em sua estrutura química sendo divididos em três diferentes classes: flavonoides, ácidos fenólicos e taninos. Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos de plantas e são divididos em seis subclasses, dependendo do estado de oxidação do anel central (**Figura 1**). São estas: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, isoflavonas e antocianidinas. Os ácidos fenólicos abrangem os ácidos benzoicos e derivados (hidroxibenzoico, vanílico, gálico, etc.) e os ácidos cinâmicos e derivados (cumárico, caféico, ferúlico, clorogênico, etc.). Os taninos são polímeros de alto peso molecular e são divididos em três classes: taninos hidrolisáveis (galotaninos e

elagitaninos), taninos condensados (também conhecidos como proantocianidinas) e taninos complexos, de distribuição mais restrita na natureza (D'ARCHIVIO et al., 2007; COS et al., 2003).

Figura 1. Estrutura química das principais classes de flavonoides (Adaptado de CROZIER et al., 2009).

Os polifenóis têm sido associados a múltiplos efeitos biológicos, incluindo atividade antioxidante. Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio (EROs) são gerados a partir do metabolismo das células aeróbicas quando o oxigênio é utilizado para converter nutrientes, adquiridos pela dieta, em energia. A produção desordenada desses subprodutos do oxigênio pode incitar a oxidação de lipídeos de membrana, proteínas, enzimas, carboidratos e DNA, prejudicando o equilíbrio, gerando estresse oxidativo ou, ainda, danos oxidativos. Os compostos fenólicos possuem a capacidade de reagir com os radicais livres e EROs formando radicais estáveis, prevenindo o estresse oxidativo. Portanto, a importância de constituintes antioxidantes tem sido demonstrada devido à capacidade de proteger as células de danos causados por EROs, atuando na diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas

não transmissíveis (CARRIE-THOMPSON et al., 2009; DEJONG & LANARI, 2009; PÄLLIN et al., 2008; VALKON, et al., 2007).

Não apenas por suas atribuições antioxidantes, estudos tem associado polifenóis com atividades antiinflamatória, quimiopreventiva e neuroprotetora, que podem contribuir com a promoção da saúde. Tais compostos podem, ainda, influenciar no metabolismo da glicose e dos lipídeos, sendo assim, importantes na diminuição de risco para desenvolver diabetes tipo 2, obesidade e síndrome metabólica. Os principais mecanismos de ação baseiam-se na inibição da digestão e absorção de carboidratos e lipídeos no intestino, estimulação da secreção da insulina pelas células pancreáticas, modulação da produção hepática de glicose, ativação dos receptores de insulina, aumento da absorção de glicose em tecidos periféricos sensíveis à insulina, inibição da diferenciação e proliferação dos adipócitos e redução da inflamação crônica (HANHIEVA et al., 2010; LIU et al., 2008; MEYDANI & HASAN, 2010).

Embora apresentem baixa biodisponibilidade, após a ingestão, alguns compostos fenólicos são absorvidos pelo estômago e intestino delgado (MANACH et al., 2005). Na porção intestinal, os flavonoides sofrem hidrólise por uma β -glicosidase, presente nas microvilosidades dos enterócitos, denominada lactase floridzina hidrolase (LPH), que é capaz de desconjugar os açúcares liberando as agliconas, que possuem característica lipofílica, sendo assim, passíveis de absorção pelo intestino. Após a absorção, a aglicona sofre metabolização no fígado formando metabólitos sulfatados, glicuronilados e/ou metilados através da ação respectiva das enzimas de fase II sulfotransferase (SULT), uridina-50-difosfato glicuronosiltransferase (UGT) e catecol-*O*-metiltransferase (COMT) (CROZIER et al., 2010; DONAVAN et al., 2006).

Alguns compostos fenólicos que não são absorvidos podem chegar até o intestino grosso e entrar em contato com a microbiota intestinal gerando diversos produtos, como ácidos

fenólicos que podem ser absorvidos ou agir como prébióticos estimulando o crescimento e atividade das células intestinais, selecionando bactérias probióticas ou inibindo a proliferação de células cancerígenas (DEL RIO et al., 2010).

Recentes estudos epidemiológicos indicam que o consumo frequente de frutas está associado à redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, principalmente obesidade e diabetes (DEVALAJARA et al., 2011; YAHIA, 2010). Por isso, estes alimentos vêm sendo alvo de diversos estudos, que destacam suas características nutricionais, compostos bioativos e especialmente sua capacidade antioxidante (CONTRERAS-CALDERÓN et al., 2011; CROZIER et al., 2010).

Com base em evidências recentes, sabe-se que a capacidade antioxidante dos alimentos não apresenta relevância para efeitos no organismo, uma vez que as vias metabólicas associadas aos CBF ainda não estão completamente elucidadas. Assim, dados de capacidade antioxidante *in vitro*, não podem ser extrapolados para efeitos *in vivo* (USDA, 2010). No entanto, estudos indicam ação benéfica dos CBF em diversas patologias através de múltiplos mecanismos de ação (PATELA et al., 2011; PRANDOTA, 2011; TÖRRÖNEN et al., 2010).

Neste trabalho, o possível efeito dos CBF na síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2 e obesidade será discutido.

1.2. Síndrome metabólica: obesidade, hiperglicemia e complicações cardiovasculares

A síndrome metabólica (SM) é um transtorno complexo multifatorial caracterizado como um estado de inflamação crônica e estresse oxidativo comumente associado a distúrbios que tem como causa obesidade, hiperglicemia, hipertensão, dislipidemia, diminuição da tolerância à glicose e mais comumente resistência à insulina (ECKEL et al., 2005; MARTÍNEZ, 2006; NELIGAN, 2010).

Até o momento, observam-se dificuldades na adoção de critérios diagnósticos uniformes

para definição da SM. De fato, três entidades: Organização Mundial da Saúde (OMS), *National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATPIII) e *International Diabetes Federation* (IDF) buscaram desenvolver critérios diagnósticos para SM, sendo estes preconizados para utilização em adultos que apresentem ao menos três fatores de risco para doença cardiovascular que, em geral, são: obesidade, dislipidemia, hipertensão e disglucemia (MOHAMED, 2014; SANTOS et al., 2009).

A não uniformidade para o critério de diagnóstico da SM gera estimativas variadas em sua prevalência. No entanto, é possível observar uma perspectiva ascendente na população, acima de 40 anos, de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Estima-se a prevalência de SM entre 21% e 27% em adultos norte-americanos, 20% e 24% em europeus e 18% e 30% em brasileiros (CAVAGIONI et al., 2008; FORD et al., 2004; HU et al., 2004; LEITÃO & MARTINS et al., 2012; MOEBUS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; SANTOS et al., 2004; SOUZA et al., 2003; TULL et al., 2005).

É de extrema relevância salientar que a síndrome metabólica não deve ser observada em seus fatores de risco específicos. Este transtorno complexo deve ser avaliado de maneira global, uma vez que os eventos bioquímicos ocorrem de forma integrada. Assim, esta desordem multifatorial conta com o aumento de ácidos graxos livres circulantes, angiotensinogênio e citocinas pró-inflamatórias liberados pelo tecido adiposo e elevação da secreção de insulina que, associados, determinam uma correlação entre obesidade visceral, resistência à insulina e disfunção cardiovascular presentes na SM (FERNANDEZ-REAL & RICART, 2003; KERSHAW & FLIER, 2004; MAGGE et al., 2012).

A obesidade, caracterizada pelo aumento do tecido adiposo, é considerada um fator de risco significativo para determinadas patologias. No entanto, é o tecido adiposo visceral que apresenta maior associação com o surgimento de complicações metabólicas como resistência à insulina, diabetes tipo 2, aterosclerose, dislipidemias, doenças cardiovasculares e síndrome

metabólica (DESPRES & LEMIUX, 2006; GALIC et al., 2010).

O tecido adiposo visceral, em excesso, libera quantidades também excessivas de ácidos graxos livres na circulação portal e sistêmica que induzem a redução da sensibilidade à insulina no músculo esquelético, redução da captação hepática de glicose e da sensibilidade à insulina, aumento da gliconeogênese e supressão da secreção pancreática de insulina gerando um cenário propício à disglícemia (KERSHAW & FLIER, 2004; WEISS et al., 2007).

Na obesidade visceral, a expansão do tecido adiposo leva um a aumento da produção de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-6 e TNF- α , que por sua vez, induzem a infiltração de macrófagos para o interior do mesmo tecido causando inflamação que, associada a ácidos graxos circulantes e secreção desregulada de leptina, adiponectina e resistina, acentuam ainda mais a inflamação local, diminuem a sensibilidade da insulina no fígado e estimulam maior deposição de gordura hepática, agravando o risco cardiovascular. Ainda, as células do tecido adiposo estão relacionadas com a secreção de angiotensinogênio, que induz a diferenciação celular de pré-adipócito em adipócito e estimula o aumento da hipertensão arterial sistêmica, complicação observada com frequência em indivíduos obesos (GALIC et al., 2010; KERSHAW & FLIER, 2004; MIRBAGHERI et al., 2007).

A hipertensão arterial sistêmica está associada à hiperinsulinemia em indivíduos diabéticos obesos e também em sujeitos não diabéticos obesos. Embora ainda não totalmente esclarecidas, algumas hipóteses são sugeridas para esta associação. A principal teoria seria que a leptina, hormônio produzido pelo tecido adiposo, os ácidos graxos livres circulantes e a insulina, cujas concentrações estão aumentadas na obesidade, atuariam de maneira sinérgica estimulando a vasoconstrição (STAS & EL-ATAT, 2004).

O endotélio, revestimento dos vasos sanguíneos, realiza funções anticoagulantes e antiinflamatórias que são essenciais para manter a homeostasia. Este revestimento conta com funções protetivas relacionadas com a inibição da adesão de moléculas inflamatórias e células

de defesa, proliferação de células musculares lisas e ação vasodilatadora. Um dos principais responsáveis por essas funções de proteção é o óxido nítrico, produzido pelo próprio tecido endotelial através da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (DIAS et al., 2011).

Quando o equilíbrio entre fatores de agressão e proteção ao endotélio é rompido, como por exemplo, na hipertensão arterial sistêmica, há aumento na liberação de citocinas que induzem o recrutamento e adesão de moléculas relacionadas à agregação plaquetária sob a superfície do endotélio e aumento da síntese de EROs, caracterizando a disfunção endotelial. Nesta situação, o indivíduo encontra-se em risco cardiovascular (VACHHARAJANI & GRANGER, 2009).

O processo aterogênico tem como primeiro passo a adesão de linfócitos T, macrófagos e monócitos ao endotélio, a qual é desencadeada pela quimiotaxia a partir das citocinas pró-inflamórias, níveis elevados de LDL-colesterol oxidado, angiotensina ou estresse oxidativo (VACHHARAJANI & GRANGER, 2009). O processo inflamatório e as espécies reativas de oxigênio presentes no endotélio da lesão aterosclerótica diminuem a produção de óxido nítrico que pode intensificar a agregação plaquetária e a vasoconstrição (GALIC et al., 2010; SILHA et al., 2005). Em estudo realizado com seres humanos portadores de doença arterial coronariana, polifenóis derivados do cacau administrados por um mês foram capazes de aumentar a vasodilatação arterial e a quantidade de células progenitoras endoteliais e, ainda, reduzir a pressão arterial sistólica (HEISS et al., 2010).

Neste contexto, os taninos hidrolisáveis (elagitaninos e galotaninos) têm demonstrado potencial benéfico à saúde cardiovascular (MAR LARROSA et al., 2010). Anderson et al. (2001) e Zhao et al. (2008) demonstraram que elagitaninos podem inibir a oxidação do colesterol LDL e também reduzir a ação inflamatória proveniente de TNF- α . O ácido gálico, advindo da hidrólise de galotaninos, parece exercer funções antitrombóticas por inibir a agregação plaquetária e reduzir a ação de moléculas relacionadas à adesão endotelial (DE

LANGE et al., 2007).

1.3. Polifenóis na digestão e absorção dos carboidratos: estado de hiperglicemia

O amido é o principal carboidrato presente no reino vegetal, sendo considerado a mais importante fonte de energia para o ser humano, representando 45 a 70% da dieta cotidiana (ENGLYST & ENGLYST, 2005; FAO, 2003).

Após a ingestão alimentar composta por carboidratos, os níveis de glicose no sangue elevam-se e picos de liberação de insulina são estimulados para tentar equilibrar a glicemia sanguínea. Logo após este processo, inicia-se uma liberação mais lenta deste hormônio. Os níveis de glicemia começam a aumentar a partir de dez minutos após a refeição, atingem seu pico máximo em 60 minutos e, normalmente, alcançam seus níveis basais em aproximadamente 2 a 3 horas (BRAND-MILLER et al., 2009).

Durante o processo de digestão, ainda na boca, o amido sofre hidrólise pela ação da enzima α -amilase (α -1,4-D-glicano-4- glicano hidrolase, EC 3.2.1.1), presente na saliva e no suco pancreático, liberando polissacarídeos menores como amilose e amilopectina. (MURRAY et al., 2008).

No estômago, o bolo alimentar mistura-se com o ácido do estômago e com as enzimas específicas para digestão de proteínas. Apesar de o baixo pH inibir a ação das amilases, a digestão dos carboidratos é retomada adiante no trato gastrointestinal (MURRAY et al., 2008).

Quando o conteúdo ácido do estômago atinge o duodeno, no intestino delgado, é neutralizado pelas secreções de alto pH do pâncreas, criando um meio adequado para a ação das enzimas envolvidas na digestão dos glicídios. Neste cenário as amilases retomam a digestão transformando polissacarídeos em dissacarídeos (MURRAY et al., 2008).

A digestão final dos carboidratos, no epitélio mucoso do jejuno superior, se dá pela

presença das dissacaridases, secretadas na membrana ciliada do intestino delgado. As α -glicosidases (α -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.20), grupo específico de dissacaridases, são basicamente representadas pela maltase e sacarase. A primeira é capaz de hidrolisar a maltose em 2 moléculas de glicose e a segunda hidrolisa a sacarose produzindo 1 molécula de frutose e outra de glicose. A lactase hidrolisa a lactose gerando galactose e glicose (MURRAY et al., 2008).

Após completa digestão, a glicose é o principal produto da quebra do amido e dos demais dissacarídeos presentes na dieta. Por terem característica hidrofílica, os monossacarídeos não dispõem da capacidade de atravessar a membrana celular tornando necessária a presença de transportadores específicos como os das famílias GLUT e SGLT (SCHEEPERS et al., 2004).

Os principais transportadores de glicose no intestino são SGLT1 e GLUT2. O SGLT1 é um transportador ativo de glicose, que requer consumo de ATP, dependente de Na^+ , situado permanentemente na membrana apical da borda em escova do enterócito, que capta este monossacarídeo do lúmen intestinal. O GLUT2 é um transportador responsável pela absorção de glicose por difusão facilitada. Está presente no enterócito, fígado, rins e células pancreáticas. Esta proteína transportadora tem o poder de translocação dentro da célula, então, após uma refeição composta por carboidratos, o GLUT2 desloca-se para a membrana apical onde a concentração de glicose estará elevada e desempenha seu papel de transportar este açúcar para dentro da célula (KELLETT et al., 2008).

Uma vez que a glicose é absorvida pelo intestino, entra na corrente sanguínea, é absorvida pelas células β pancreáticas, via GLUT2, e em seguida é fosforilada estimulando a secreção de insulina. Este hormônio, por sua vez, liga-se ao seu receptor de membrana ativando a cascata molecular para sinalização da abertura de GLUT4, transportador também chamado de insulino-sensível, transportando a glicose para o interior das células do músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, locais onde o GLUT4 está presente (BRYANT et al.,

2002; HUANG & CZECH, 2007).

A manutenção da homeostase da glicose está sob controle hormonal, cujo equilíbrio é de extrema importância para a fisiologia humana. O Diabetes Mellitus é uma desordem metabólica multifatorial caracterizada por repetidos momentos de hiperglicemia e desequilíbrio no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos, resultando em uma deficiência na secreção de insulina, ou ainda, diminuição da ação deste hormônio nos tecidos periféricos (WHO, 2011). O diabetes mellitus tipo 1, também conhecido como insulino-dependente, caracteriza-se pela produção insuficiente de insulina pois as células β pancreáticas sofrem destruição auto-imune. Já o diabetes mellitus tipo 2, (DM2) além de possuir aspecto genético, está frequentemente associado ao estilo de vida, como hábitos alimentares e sedentarismo. O indivíduo é capaz de produzir insulina, entretanto, não raramente, sua ação é restrita devido à obesidade, neste caso, fenômeno conhecido como resistência à insulina. Estima-se que 60 a 90% dos portadores de DM2 sejam obesos e a incidência é maior após 40 anos de idade (ADA, 2012).

Indivíduos com síndrome metabólica apresentam maior probabilidade de tornarem-se diabéticos. O pré-diabetes é uma situação que antecede o DM2 e serve de alerta para a progressão da doença, onde os níveis de glicose de jejum e/ou pós-prandial sanguíneos são mais elevados em relação aos mesmos parâmetros de um indivíduo normal, embora não aumentados suficientemente para ser diagnosticado como DM2 (STERN et al., 2004).

Em indivíduos pré-diabéticos, a resposta glicêmica pós-prandial é alterada devido a desequilíbrios na secreção de insulina, utilização periférica de glicose reduzida e pela exacerbada produção de glicose hepática. Assim, o pré-diabetes na síndrome metabólica é um estado de resistência à insulina que confere riscos ao DM2 (ORIENT et al., 2008; STERN et al., 2004).

Recorrentes episódios de disglucemia pós-prandial estão associados efeitos deletérios à

saúde cardiovascular que incluem estresse oxidativo, capaz de induzir à disfunção endotelial (CAVALOT et al., 2006; CERRIELO et al., 2004; HASEGAWA et al., 2005). Além disso, elevados teores de glicose sanguínea após refeições podem causar danos às células β pancreáticas (glicotoxicidade), que são as responsáveis pela produção e liberação da insulina. No entanto, ratos diabéticos suplementados com isoflavonas de soja mantiveram estável a produção de insulina e apresentaram melhor sensibilidade dos tecidos periféricos a este hormônio (CHOI et al., 2008; YANG & SANTAMARI, 2006). Compostos fenólicos como resveratrol, quercetina, galato de epigallocatequina e curcumina podem ser capazes de contribuir para a amenização de pressão arterial sistêmica, glicose sanguínea, perfil lipídico e resistência à insulina (CHERNIACK, 2011).

Uma das abordagens terapêuticas para a atenuação ou tratamento do diabetes é reduzir a hiperglicemia pós-prandial, retardando a absorção de glicose através da inibição da hidrólise de carboidratos (BHANDARI et al., 2008; KRENTZ & BAILEY, 2005). No Brasil, o medicamento comumente utilizado como inibidor de α -glicosidase é a acarbose, cujo mecanismo de ação é retardar a hidrólise dos carboidratos e consequentemente a absorção intestinal de glicose, atenuando a glicemia pós-prandial. Por isto, este medicamento tem sido apontado com eficácia para terapia da síndrome metabólica, DM2 e obesidade, pois controla a elevação dos níveis de glicose no plasma (PISTROSH et al., 2009; TORMO et al., 2006). No entanto, fitoquímicos, tais como os compostos fenólicos, vêm sendo relatados como bons inibidores de α -amilase e α -glicosidase (BOATH et al., 2012; GRUSSU et al., 2011). Em estudo de Yilmazer-Musa et al. (2012) foram testados extrato de semente de uva, extrato de chá verde, extrato de chá branco e teavigo® para aferir uma possível inibição da α -glicosidase *in vitro*. Todos os extratos inibiram a enzima de forma mais eficiente em relação à acarbose. Os flavonoides presentes em algumas frutas nativas brasileiras podem atuar inibindo diretamente as enzimas envolvidas na digestão dos carboidratos. Rutina, quercetina, ácido

clorogênico, catequina e ácido rosmarínico tiveram seu potencial inibitório das enzimas envolvidas na digestão dos carboidratos, *in vitro*, avaliado. O potencial de inibição da α -amilase foi maior para quercetina> rutina> ácido rosmarínico> ácido elágico> catequina> ácido clorogênico. Em relação à α -glicosidase, a inibição mais eficaz correspondeu à quercetina> rutina> catequina> ácido elágico> acarbose> ácido clorogênico, e o ácido rosmarínico não mostrou atividade sobre esta enzima (GONÇALVES et al., 2010).

Em estudo prévio, em seres humanos, realizado pelo nosso grupo, foi demonstrado que compostos fenólicos presentes no suco clarificado do fruto araçá, consumido concomitantemente com 1 pão francês, foram capazes de reduzir a área sob a curva de glicose, de indivíduos saudáveis, em aproximadamente 43% em relação ao controle água (BALISTEIRO et al., 2013).

Alguns estudos apontam uma associação entre transportadores de glicose e compostos fenólicos. Embora ocorra por mecanismos ainda não tão claros, a principal hipótese é que os polifenóis podem inibir essas proteínas responsáveis por carrear a glicose para o interior da célula, promovendo amenização da disglucemia pós-prandial (HE et al., 2009; TAHRANI et al., 2013; WILLIANSO, 2013).

Extratos de maçã e morango contendo flavonoides, incluindo quercetina e floridizina, ácidos fenólicos e taninos inibiram, *in vitro*, o transporte da glicose via SGLT1 e GLUT2, em estudo utilizando vesículas da membrana da borda em escova do intestino (MANZANO & WILLIANSO, 2010). Outros trabalhos sugerem que derivados de quercetina, principal flavonoide consumido pela população, podem modular a absorção de glicose através da inibição do SGLT1 e da translocação do GLUT2 pelo enterócito, *in vitro* (ARABBI et al., 2004; CERMAK et al., 2004; KNOW et al., 2007, HARNLY et al., 2006).

Dyer et al. (2002) avaliaram a expressão de transportadores de monossacarídeos intestinais em indivíduos diabéticos tipo 2 e foi possível inferir que a ação do SGLT1 pode

estar aumentada em até quatro vezes no duodeno, ao passo que a expressão do RNAm das dissacaridases secretadas na borda em escova do intestino delgado, como a sacarase e lactase, pode estar elevada de duas a três vezes. Dessa forma, nestes indivíduos, a glicose pode ser absorvida aproximadamente três vezes mais rapidamente. Além disso, em estudo que avaliou humanos portadores de DM2 e obesidade, foi mostrado que há maior concentração da enzima α -amilase na saliva desta população (**Figura 2**) (AYDIN, 2007).

Figura 2. Representação da absorção de glicose intestinal. Setas escuras representam enzima ou transportador alvo dos polifenóis. (A) Lúmen intestinal de um indivíduo saudável; (B) Lúmen intestinal de um indivíduo diabético tipo 2 (Adaptado de WILLIAMSON, 2013).

1.4. Cagaita

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do mundo (LETERME et al., 2006). O Cerrado é um bioma brasileiro que contém grande número de espécies de frutos de grande

interesse potencial para a agroindústria, porém, ainda pouco explorados (ALMEIDA et al., 2011).

A cagaita, *Eugenia dysenterica* DC, é uma fruta pertencente à família *Myrtaceae* e nativa do Cerrado Brasileiro. A distribuição deste fruto se dá principalmente nos seguintes estados: Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo e Tocantins. Sua árvore, conhecida como cagaiteira, pode atingir até 10 metros de altura, tem galhos retorcidos, casca grossa e seu período de frutificação ocorre entre outubro e dezembro (ANDRADE et al., 2003). O fruto da cagaiteira é uma baga globosa-achatada, amarelo-pálida, de 2 a 3 cm de diâmetro, contendo de 1 a 3 sementes brancas, envoltas em uma polpa levemente ácida. Apresenta um cálice seco aderido ao fruto, casca brilhante membranácea, mesocarpo e endocarpo suculentos (DONADIO et al., 2002).

Mesmo sendo uma espécie pouco estudada e explorada, é considerada um fruto de interesse econômico principalmente devido ao uso na culinária (CARDOSO et al., 2011), pois é utilizado por populações locais para fazer sorvetes, doces, geleias e sucos, além de possuir uma expressiva quantidade de fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro* (GENOVESE et al., 2008). Os principais flavonoides presentes no fruto são pertencentes ao grupo dos flavonóis, como os derivados de quercetina e caempferol (GONÇALVES et al., 2010).

O uso de espécies de *Eugenia* para o tratamento de doenças infecciosas é bem conhecido na medicina popular (HUSSEIN et al., 2003). *Eugenia dysenterica* DC, por exemplo, é utilizada pela medicina alternativa na América Latina. O seu chá, derivado de suas folhas, é utilizado para infecções renais e da bexiga e para tratar diabetes, icterícia, e diarreia, muito embora o fruto tenha propriedades laxativas (PALHARES, 2003). Segundo Lima et al. (2010), o efeito laxativo advindo do fruto é causado por um peptídeo específico presente na cagaita, capaz de aumentar a motilidade intestinal.

Algumas plantas têm mostrado capacidade hipoglicemiante. Barbosa-Filho et al. (2005)

fizeram um apanhado de 224 plantas e as dez famílias que apresentaram maior atividade hipoglicemiante foram: *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Myrtaceae*, *Labiatae*, *cucurbitaceae*, *Solanaceae*, *Anacardiaceae*, *Euphorbiaceae*, *Rubiaceae* e *Liliaceae*. Gonçalves et al. (2010) analisaram sete polpas de frutos distintos: panã, umbu, cagaita, coquinho azedo, aracá e cambuci. Dentre estas, a cagaita foi a polpa com maior atividade inibitória, *in vitro*, tanto para enzima α -amilase quanto para α -glicosidase.

As folhas da cagaiteria apresentam um perfil de metabólitos secundários representado, principalmente, por taninos e flavonoides. Quercetina, miricetina, caempferol, quercitrina e galangina são os principais compostos fenólicos encontrados em suas folhas (COUTO et al., 2009) que, assim como o fruto, apresentam capacidade inibitória de enzimas envolvidas na digestão dos carboidratos. De Souza et al. (2012) avaliaram a capacidade das folhas de inibir α -amilase e α -glicosidase e foi demonstrada eficácia na inibição com IC₅₀ 14,9 μ g/mL e 0,46 μ g/mL, respectivamente.

Considerando-se o potencial hipoglicemiante do fruto cagaita demonstrado *in vitro*, e da importância da dieta como adjuvante no tratamento da SM e DM2, objetivou-se o estudo do efeito do consumo do suco deste fruto sobre a glicemia pós-prandial após o consumo de um pão francês. Para determinar a contribuição da fração fibra sobre os efeitos observados, avaliou-se o efeito da clarificação prévia do suco sobre a resposta glicêmica.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o efeito do consumo de sucos de polpa de cagaita, clarificado e não clarificado, sobre a glicemia pós-prandial em seres humanos portadores de síndrome metabólica e disglícemia.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do consumo de sucos de polpa de cagaita, clarificado e não clarificado, sobre a glicemia pós-prandial em humanos pré-diabéticos após consumo de 50 g de pão francês;
- Estudar o efeito dos compostos fenólicos purificados a partir dos sucos de cagaita sobre as enzimas α -amilase, α -glicosidase e lipase pancreática em relação a seus controles positivos acarbose e orlistate, *in vitro*;
- Caracterizar os sucos de polpa de cagaita em relação ao teor de fenólicos totais, proantocianidinas, elagitaninos, flavonoides e capacidade antioxidante *in vitro*.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

As polpas de cagaita congeladas (data de fabricação: 26/out/2013 – L1-004) do mesmo lote, prontas para consumo, foram adquiridas diretamente do fornecedor, um estabelecimento comercial, denominado Sítio do Bello, Paraibuna, SP.

O suco clarificado foi preparado de acordo com o protocolo sugerido por Balisteiro et al. (2013) utilizando centrifugação a 22.770 *g* por 40 minutos. O suco não clarificado foi preparado a partir do descongelamento da polpa integral de cagaita sem adição de água ou qualquer edulcorante.

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação de açúcares totais. Os açúcares totais foram determinados de acordo com Dubois et al. (1956) utilizando espectrofotômetro (HITACHI mod. U-1100). Para obtenção da curva padrão foi utilizada solução de glicose 1% em água destilada. As leituras das amostras foram realizadas em comprimento de onda de 490 nm e os resultados expressos em g/300 mL de suco.

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

3.2.3. Determinação de fibras totais. As fibras totais foram determinadas de acordo com o método descrito pela AOAC (2005). Em um recipiente foram misturados 5 mL de suco e 20 mL de água. O recipiente foi posteriormente envolvido com papel alumínio e incubado a 37 °C por 90 minutos. Após a incubação, 100 mL de etanol absoluto foram adicionados e a suspensão permaneceu em repouso por 60 minutos a 25 °C. A suspensão foi filtrada a vácuo (filter aid - CELITE) e o sedimento recolhido em cadinho previamente pesado. O sedimento foi lavado 2 vezes com 20 mL de etanol aquoso (78%), 2 vezes com 10 mL de etanol absoluto e 1 vez com 10 mL de acetona absoluta. Após a lavagem, o cadinho contendo sedimento foi colocado em estufa a 105 °C por 120 minutos. Os resultados foram expressos em g de fibras/300 mL suco.

3.2.4. Quantificação de proantocianidinas – Método do butanol acidificado. A determinação de proantocianidinas foi baseada no método cromogênico descrito por Porter et al. (1986). Primeiramente, 77 mg de sulfato de ferro hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 500 mL de uma solução de n-butanol e ácido clorídrico (3:2). Em seguida, 2,5 mL desta solução foram adicionados a 250 µL de suco devidamente diluído, em tubos de ensaio. Os mesmos tubos, tampados, foram a banho por 15 minutos a 95 °C. Após o

resfriamento, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (HITACHI mod. U-1100) a 540 nm. A curva padrão foi preparada com tanino quebracho (QT, Unitan, Buenos Aires, Argentina) utilizando-se concentrações entre 0 e 2,4 mg/mL e os teores de proantocianidinas foram expressos em g de equivalente de tanino quebracho (ETQ)/300 mL suco.

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

Foi analisada de acordo com Singleton et al. (1999) com modificações (GENOVESE et al., 2003), utilizando-se 0,25 mL dos sucos em suas devidas diluições, 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu, em tubo de ensaio. Após 3 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio e os tubos permaneceram por 30 minutos em banho de 37 °C para formação de cor. A curva padrão foi preparada com ácido gálico (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) utilizando-se concentrações entre 0 e 0,04 mg/mL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (HITACHI mod. U-1100) a 750 nm e a capacidade redutora do Folin-Ciocalteu foi expressa em g equivalentes de ácido gálico (EAG)/300 mL de suco.

3.2.6. Determinação da capacidade antioxidante

3.2.6.1. Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil – Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) do meio de reação pelos antioxidantes presentes na amostra (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Uma solução metanólica de DPPH (0,05 mM) foi preparada para apresentar aproximadamente 0,4 de absorbância em 517 nm de comprimento de onda. As determinações foram realizadas em espectrofotômetro Synergy™ H1 (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA) utilizando microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade foram adicionados 40 µL de água para o controle, o mesmo volume para solução padrão de Trolox e para as amostras de suco devidamente diluídas. As leituras de

absorbância foram efetuadas a 517 nm no tempo zero e 20 minutos. Os cálculos foram realizados de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ descoloramento do DPPH} = [(A_{517(c)} - A_{517(A)} / A_{517(c)}) \times 100$$

onde, $A_{517(c)}$ refere-se à absorbância do controle a 517 nm e $A_{517(A)}$ refere-se à absorbância da amostra a 517 nm.

A curva padrão foi preparada com uma solução de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (Trolox – Flucka Chemicals Suisse) em água, em diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em mmol equivalentes de Trolox/300 mL suco.

3.2.6.2. Determinação do poder redutor do ferro – Método FRAP. A capacidade de redução do ferro foi determinada de acordo com Benzie e Strain. (1996), com modificações. O reagente FRAP foi preparado na proporção de 10:1:1 com as seguintes soluções: (a) tampão acetato de sódio (Dinâmica) 300 mM pH 3,6; (b) solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazine (TPTZ – Flucka Chemicals Suisse) 10 mM em ácido clorídrico (Synth) 40 mM e (c) solução de cloreto férrico (Synth) 20 mM. O reagente foi preparado no momento da análise. Para a curva padrão foi utilizado o reagente ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (Trolox – Flucka Chemicals Suisse) em concentração de 50 a 400 μ M. A leitura da absorbância foi realizada em 593 nm em microplaca de 96 cavidades utilizando-se espectrofotômetro Synergy™ H1 (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA). Os resultados foram expressos em μ mol equivalentes de Trolox/300 mL suco.

3.2.6.3. Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC). A capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio foi determinada de acordo com Dávalos et al. (2004) com modificações. As amostras adequadamente diluídas (25 μ L) em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4, controle e curva padrão de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (Trolox – Flucka Chemicals Suisse) 0,002 M foram misturados com 150 μ L de uma solução de fluoresceína 40 nM e incubados a 37 °C por 15 minutos antes da adição de 25 μ L da

solução do radical peroxila 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH 153 mM) que dá início a reação. A intensidade da fluorescência (485 nm-excitação/520 nm emissão) foi verificada a cada 1 minuto até o tempo final de 80 minutos em espectrofotômetro de fluorescência, em microplaca com 96 cavidades, SynergyTM H1 (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA). A capacidade antioxidante foi determinada pela curva resultante da perda de fluorescência da fluoresceína versus a concentração de equivalentes de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (Trolox – Flucka Chemicals Suisse) (6,25 µM a 100 µM). Os resultados foram expressos em mmol equivalentes de Trolox/300 mL suco.

3.2.7. Identificação e caracterização dos compostos fenólicos da cagaita

3.2.7.1. Obtenção dos extratos para determinação de flavonoides e ácido elágico livre. A identificação e quantificação de flavonoides e ácido elágico livre foi feita de acordo com Arabbi et al. (2004). Alíquotas de 5 mL de suco foram passadas em 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel GmbH & Co., Alemanha), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água. Após a passagem das amostras de suco, as colunas foram lavadas com 60 mL de água e a eluição dos flavonoides foi realizada com 50 mL de metanol seguido de 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5), ocorrendo a eluição do ácido elágico nesta última. Foi utilizado *Manifold* Visiprep 24 DL (Suppelco®, Bellefonte, USA). Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol grau CLAE e filtradas em filtros de polietileno com membrana de politetrafluoretileno (PTFE) (Millipore Ltd., Bedford, MA) de 0,22 µm. As extrações foram realizadas em triplicata e a quantificação dos flavonoides e do ácido elágico livre foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.7.2. Cromatografia líquida de alta eficiência. A identificação e quantificação de flavonoides e ácido elágico foram realizadas utilizando coluna Prodigy 5µ ODS(3) 250 x 4,6

mm (Phenomenex Ltd, Reino Unido) de acordo com Arabbi et al. (2004). O gradiente de solvente utilizado foi constituído por: (a) Água:Tetrahidrofurano:Ácido trifluoroacético (98:2:0,1) (b) Acetonitrila nas seguintes condições de eluição: 2 min-17% (b); 7 min-25% (b); 15 min-35% e 20 min-50% (b). Para limpeza da coluna foi aumentado (b) para 100% e em seguida, para o reequilíbrio da mesma as condições iniciais foram retomadas por 10 min. O cromatógrafo utilizado foi o do sistema Hewlett-Packard 1100, constituído por injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector de arranjo de diodo (DAD), controlados pelo software ChemStation. As amostras foram injetadas em duplicata e os polifenóis foram identificados através da comparação de tempo de retenção e espectro com os padrões. A quantificação foi baseada em calibração externa, e os padrões foram obtidos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA). Os resultados foram expressos em mg/300 mL suco.

3.2.7.3. Determinação do teor de ácido ascórbico. As análises de ácido ascórbico (AA) foram realizadas segundo Rizzolo et al. (1984), com modificações. As amostras foram homogeneizadas com solução de ácido acético a 0,1% em proporção 1:10. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana MILLIPORE de 0,45 µm, e diluído 1 vez com ácido acético para análise do AA e com ditiotreitól (DTT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) 0,5 M para análise do ácido ascórbico total (AT). As amostras foram analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna C18 (µBondapak, 300 mm de comprimento e 10 µm de porosidade). A fase móvel foi composta por A: acetonitrila com ácido acético (0,1%) e B: ácido acético 0,1% em água, e o fluxo adotado foi 1,5 mL/min. A curva padrão foi obtida com padrão de AA (10 – 100 µg/mL). A detecção foi realizada com detector de ultravioleta a 254 nm.

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

3.2.8.1. Obtenção dos extratos fenólicos do suco. A purificação dos compostos fenólicos do suco foi realizada através de extração em fase sólida usando colunas de 1 g de Poliamida e 1 g de C18, preparadas em seringas próprias de 6 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água. A eluição dos flavonoides foi realizada com 50 mL de metanol seguido de 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5), esta última apenas para extração em poliamida. Foi utilizado *Manifold Visiprep 24 DL* (Supelco®). Em seguida, foi realizada a secagem completa através da rotaevaporação e os extratos foram ressuspensos em água destilada.

3.2.8.2. Determinação da atividade inibitória da α -amilase *in vitro*. Este ensaio foi realizado de acordo com *Whorthington Enzyme Manual* (WHORTHINGTON BIOCHEMICAL CORP., 1993), com algumas modificações, que avalia a capacidade de uma amostra em inibir a produção de maltose pela ação da enzima α -amilase sobre o amido. Para tanto, uma solução 1 U/mL da enzima α -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI-A, Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) dissolvida em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,9) contendo 0,006 M de cloreto de sódio foi preparada. O substrato utilizado foi o amido de batata (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) 1% (m/v) dissolvido no mesmo tampão após breve aquecimento. Para o ensaio, 250 μ L de extrato e 250 μ L da solução de enzima foram incubados a 25 °C por 10 minutos. Para iniciar a reação 250 μ L de solução de amido foram adicionados nos tubos de ensaio e incubados novamente a 25 °C por 10 minutos. Após este período, 250 μ L de DNS (96 mM - ácido 3,5-dinitrosalicílico) foram adicionados e os tubos de ensaio foram levados diretamente para o banho a 100 °C por 10 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente foram adicionados 2 mL de água destilada, e posteriormente as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (HITACHI mod. U-1100) a 540 nm. Para o branco da amostra a solução enzimática foi substituída por tampão. Os

resultados foram expressos como valores de IC50 considerando a quantidade de amostra e o volume de reação (μg equivalentes de ácido gálico/mL de reação).

3.2.8.3. Determinação da atividade inibitória da α -glicosidase *in vitro*. Este ensaio foi baseado no método descrito por McCue et al. (2005) que avalia a capacidade de uma amostra de inibir a produção de glicose, liberada na quebra do substrato, pela enzima. O substrato utilizado foi *p*-nitrofenil- α -glicosídeo 5 mM dissolvido em tampão fosfato (pH 6,9). Para o ensaio, 50 μL de extrato, 50 μL de tampão e 100 μL de solução de enzima α -glicosidase (G5003, *Saccharomyces cerevisiae* – Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foram incubados a 25 °C por 10 minutos, efetuando-se a leitura n°1. Após, 50 μL de substrato foram adicionados e incubados a 25 °C por 5 minutos para posterior leitura n°2. As leituras foram realizadas em microplaca com 96 cavidades, utilizando-se espectrofotômetro Synergy™ H1 (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA) a 405 nm. Os cálculos foram efetuados a partir da fórmula:

$$\% \text{inibição} = \frac{(\text{Abs}^{\text{controle}}_{5 \text{ min}} - \text{Abs}^{\text{controle}}_{0 \text{ min}}) - (\text{Abs}^{\text{extrato}}_{5 \text{ min}} - \text{Abs}^{\text{extrato}}_{0 \text{ min}})}{(\text{Abs}^{\text{controle}}_{5 \text{ min}} - \text{Abs}^{\text{controle}}_{0 \text{ min}})} \times 100$$

Os resultados foram expressos como valores de IC50 considerando a quantidade de amostra e o volume de reação (μg equivalentes de ácido gálico/mL de reação).

3.2.8.4. Determinação da atividade inibitória da lipase pancreática *in vitro*. A atividade da enzima lipase pancreática foi avaliada de acordo Nakai et al. (2005), utilizando 4-metilumbeliferil oleato 0,1 mM (75164 – Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) como substrato. Em microplaca de poliestireno com 96 cavidades foram adicionados 25 μL de amostra devidamente diluída em água, 50 μL de substrato dissolvido em tampão Tris-HCl (13 mM) contendo NaCl (150 mM) e CaCl_2 (1,3 mM) e 25 μL de solução de lipase pancreática 50

U/mL (P1625 – Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA SIGMA) que foram incubados a 25 °C por 30 minutos. Após a incubação, 100 µL de citrato de sódio 0,1 M (pH 4,2) foram adicionados à mistura para cessar a reação. A quantidade de 4-metilumbeliferona liberada foi quantificada por um leitor de fluorescência (355 nm excitação/460 nm emissão). Os resultados foram expressos como valores de IC₅₀ considerando a quantidade de amostra e o volume de reação (µg equivalentes de ácido gálico/mL de reação).

3.3. Determinação do efeito dos compostos fenólicos sobre a glicemia pós-prandial – Protocolo de estudo

O estudo foi realizado no ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas na Faculdade de Medicina/USP, mais precisamente na liga acadêmica de síndrome metabólica, com a ajuda da equipe técnica do HCFMUSP para a realização das coletas de sangue, utilizando-se material descartável e devidamente esterilizado. O projeto e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram aprovados pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, número do parecer: 373.615, CAEE: 16311113.0.0000.0067 e pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP número do parecer: 502.938, CAEE: 16311113.0.0000.0067 (**Anexo**). Todos os pacientes envolvidos no estudo receberam as devidas explicações acerca do projeto e concordaram em assinar o TCLE.

3.3.1. Indivíduos e modelo experimental

A amostra do estudo foi composta por n=14 indivíduos voluntários, pacientes da Liga de síndrome metabólica do Hospital das Clínicas/USP. O estudo sobre o efeito dos sucos de polpa de cagaita sobre a glicemia pós-prandial foi realizado na sala de testes da endocrinologia do Hospital das Clínicas/USP no período da manhã, com horário de início marcado para as 07h00min. Para seleção dos indivíduos foram adotados os critérios de

diagnóstico para pré-diabetes sendo: teste de tolerância oral à carga de 75 g de glicose (TTOG), realizado após jejum noturno de 12 horas, com resposta aos 120 minutos ≥ 140 mg/dL ≤ 199 mg/dL; glicemia de jejum ≥ 100 mg/dL ≤ 125 mg/dL, ou ainda, hemoglobina glicada $\geq 5,7\% \leq 6,4\%$ (ADA, 2014). Os critérios de exclusão foram portadores de nefropatia grave, hepatopatia grave, cardiopatia grave, neoplasias, diabetes tipo 1, hipotireoidismo não tratado, pós operatório de cirurgia bariátrica, HIV, tuberculose, pacientes em tratamento de reposição hormonal para menopausa, gestantes, portadores de desordens do trato gastrointestinal, de distúrbios de sangramento ou de hemofilia e tratamentos com fármacos como: metformina, glicocorticoides, sulfonilureias, glinidas, incretinas, insulinas e hormônio de crescimento.

O protocolo de estudo foi baseado em Josse et al. (2007), que estudaram o efeito de diferentes porções de amêndoas (30, 60, 90 g) na glicemia pós-prandial causada pelo consumo de pão branco. Os indivíduos foram submetidos a jejum de 10-12 horas (na noite anterior ao experimento) para a realização das curvas de glicose e insulina, através de punção venosa do antebraço para coleta de sangue nos tempos 0, 30, 60, 90, e 120 minutos e determinação da capacidade antioxidante do plasma nos tempos 0 e 120 minutos (FRAP e ORAC).

No dia anterior ao experimento, preferiu-se que o voluntário mantivesse sua rotina na atividade física e alimentação. No entanto foi solicitada a não ingestão de alimentos ricos em polifenóis como frutas vermelhas, café, chocolate e chás. Ao chegarem ao local os participantes foram pesados e questionados sobre o que consumiram no dia que antecedeu o teste.

3.3.2. Refeições teste

Cada refeição foi constituída por 50 g de pão branco (sempre pesados momentos antes do teste) e 300 mL de água ou suco. Três refeições distintas compostas por pão branco + água, sendo esta utilizada como controle; pão branco + suco clarificado de cagaita e pão

branco + suco não clarificado de cagaita foram administradas aos voluntários. O intervalo entre um teste e outro foi de, no mínimo, sete dias. As refeições deveriam ser consumidas em um intervalo de tempo máximo de 10 minutos. Durante todo o período da coleta das amostras sanguíneas, os indivíduos estudados foram orientados a permanecer em repouso na posição de decúbito dorsal.

3.3.3. Análises de glicemia

A área abaixo da curva de glicose foi calculada usando a regra trapezoidal para determinar a redução da resposta glicêmica. O índice glicêmico da refeição foi calculado para o incremento de glicose no tempo de 2 horas. Foram analisadas as seguintes variáveis nas curvas de glicose: *glicose basal* (GB), obtida no tempo zero; *valor de pico da glicose* (VPg), definido como sendo o maior valor acima do basal observado após ingestão da refeição e expresso em mg/dL; *incremento absoluto da glicose* (Dg), definido como a diferença absoluta entre o valor máximo da glicose obtido após estímulo (VPg) e o valor basal (GB), expresso em mg/dL ($Dg = VPg - GB$); *incremento percentual da glicose* (PIg), sendo a relação entre o incremento absoluto da glicose (Dg) e o valor basal (GB), e expresso em termos percentuais ($PIg = (Dg/GB) \times 100$). *Área total abaixo da curva da glicose* (ATG), determinada como a área abaixo da curva da glicose, até o eixo das abscissas. Foi obtida através do cálculo numérico da integral da curva e expressa em mg/dL.min; *velocidade de incremento da glicose* (VIG), definida como sendo a relação entre o incremento absoluto da glicose (Dg) e o tempo, em minutos, onde foi registrado o valor de pico (TPG), e expressa em mg/mL.min⁻¹ ($VIG = Dg / \text{tempo de pico}$) (CORRÊA et al., 2007).

3.3.4. Análises do plasma

Para análise de capacidade antioxidante do plasma, o sangue dos voluntários foi coletado em tubos heparinizados. Imediatamente após a coleta, nos tempos 0 e 120 minutos,

as amostras foram centrifugadas a 1500 *g* por 20 minutos (4° C) e o plasma armazenado a -70 °C até o momento das análises.

3.3.5. Análise dos resultados

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ DP. Para a análise dos dados foi utilizado o programa Graphpad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA). Inicialmente foram realizados testes para checar a normalidade dos dados (Shapiro-Wilk). A comparação das médias foi realizada pelos testes ANOVA ($p < 0,05$) e Friedman.

4. Resultados

Os resultados foram apresentados na forma de artigo científico, conforme a seguir:

- Effect of juice of *Eugenia dysenterica* DC fruit on postprandial glycemia in subjects with metabolic syndrome and dysglycemia: role of phenolic compounds.

Effect of juice of *Eugenia dysenterica* DC fruit on postprandial glycemia in subjects with metabolic syndrome and dysglycemia: role of phenolic compounds

Abbreviation list

AUCg area under the curve of glucose

AUCi area under the curve of insulin

GIP glucose incremental percentage

AIg absolute increase of glucose

GIV glucose incremental velocity

GPV glucose peak value

IPV insulin peak value

Abstract

Brazil has a natural resource of fruits. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) is a native fruit from Cerrado region with phytochemicals, such as polyphenols, that may be able to act on body metabolism, particularly on the carbohydrate digestion and absorption. This study aimed to assess the effect of cagaita fruit juices, rich in phenolic compounds including ellagitannins and proanthocyanidins, on the postprandial blood glucose and insulin responses from a bread meal (50 g), in prediabetic humans who were not taking medications known to influence glucose or insulin metabolism. Three different meals were consumed by volunteers. The first one consisted of white bread (50 g) plus water (300 mL) as a control; the second one, white bread (50 g) plus clarified cagaita fruit juice (300 mL), and the last one white bread (50 g) plus non-clarified cagaita fruit juice (300 mL). The results showed that both cagaita fruit juices reduced the total amount of glucose absorbed (AUC) by 56% (clarified juice) and 71% (non-clarified) and insulin released by 59% (clarified juice) and 69% (non-clarified), after the ingestion of white bread. Although glucose incremental velocity (GIV) did not show significant differences, absolute increase of glucose (AIg), glucose incremental percentage (GIP) and peak values of glucose (GPV) and insulin (IPV) were significantly lower than those of control ($p < 0.05$). Also, after ingestion of cagaita juices it was observed an increased antioxidant capacity of plasma in subjects that consumed the meals ($p < 0.05$).

Keywords: postprandial glycemia; cagaita; polyphenols

1. Introduction

Metabolic syndrome is a state of chronic inflammation and oxidative stress usually associated with cardiovascular risk factors such as obesity, hyperglycemia, impaired glucose tolerance, dyslipidaemia, hypertension and most commonly insulin resistance (Eckel et al., 2005; Martínez, 2006; Neligan, 2010).

Prediabetic subjects usually present insulin resistance, which leads to a decompensated postprandial glucose response that is a strong risk factor to develop macrovascular complications such as hypertension and coronary heart disease. β -cells are very sensitive to variation of glucose levels and may suffer damage with recurrent episodes of postprandial hyperglycemia. In addition, high levels of glucose in plasma induce oxidative stress and lipid peroxidation (Cavalot et al., 2006; Cerriello et al., 2004; Hasegawa et al., 2005).

Based on the current acquaintance of pathophysiology of metabolic syndrome, pharmacological and non-pharmacological interventions have been developed aiming the attenuation of postprandial hyperglycemia. A therapeutic approach to attenuate or treat type 2 diabetes (T2D) is to delay glucose absorption in the gut, during the digestion process, inhibiting α -amylase and α -glucosidase activity. Acarbose, a fermentation product of *Actinoplanes* species, is a pharmaceutical drug that is able to modulate these enzymes related to glucose metabolism (Chiasson et al., 2002; Pitrosh et al., 2009).

Although there are large efficient pharmacotherapies to control prediabetes and T2D, such as oral hypoglycemic drugs, many patients are poor compliers with the treatment. Thus, dietary adjuvants can be a good strategy to manage postprandial hyperglycemia (Cramer, 2004; Mohamed et al., 2014).

Recent epidemiological and clinical studies have indicated that consumption of fruits is associated with multiple health benefits including reduced risk of cardiovascular disease and T2D, and these effects seem to be related to the presence of bioactive compounds, mainly

polyphenols. Phenolic compounds are known for their multiple biological effects, such as antioxidant, anti-inflammatory, chemopreventive and neuronal protector. Additionally, these phytochemicals may act on glucose and lipid metabolism, thus contributing to decreased risk to develop T2D, obesity and metabolic syndrome. The main mechanisms of action are based on inhibition of carbohydrates and lipids digestion and absorption on the gut, stimulation of insulin secretion from pancreatic cells, increase of glucose uptake by skeletal muscle and reduction of chronic inflammation (Contreras-Calderón et al., 2010; Crozier et al., 2010; Devalajara et al., 2011; Hanhieva et al., 2010; Liu et al., 2008; Meydani & Hasan, 2010; Yahia et al., 2010).

Several studies have reported that phenolic compounds such as quercetin are stronger inhibitors of α -glucosidase and can be five times more potent than acarbose (Li et al., 2009). Furthermore, this flavonoid may act on glucose transporters in the gut such as sodium-glucose transport proteins-1 (SGLT1) and glucose transporter-2 (GLUT2), also present in hepatocytes and pancreatic β -cells (Gonçalves et al., 2010; Manzano & Williamson, 2010; Williamson, 2013).

Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) is a native fruit from Brazilian Cerrado region, belonging to the *Myrtaceae* family, rich in polyphenols. The main flavonoids present in this fruit are quercetin and kaempferol derivatives (Andrade et al., 2003; Gonçalves et al., 2010). In fact, polyphenol-rich extract of cagaita was shown to present a strong inhibitory activity against α -glucosidase (Gonçalves et al., 2010). Considering this hypoglycemic potential *in vitro*, in this work we aimed to assess the effect of cagaita fruit juices on the postprandial blood glucose response from a bread meal (50 g), in prediabetic humans.

2. Research design and methods

2.1. Subjects

A total of fourteen prediabetic subjects, classified according to the ADA criteria (ADA, 2014), were recruited from Hospital of Clinics of the School of Medicine of the University of São Paulo (São Paulo, Brazil). The cohort included twelve women and two men, with a mean age ($\pm$ SD) 46 ± 8 years.

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee in Research of the College of Pharmaceutical Sciences and the Ethics Committee for Review of Research Projects of the Hospital of Clinics of the School of Medicine, both in the University of São Paulo (protocol CAAE: 16311113.0.0000.0067). Informed consent was obtained from each research participant. Exclusion criteria were: diabetes, medication for the treatment of T2D, antibiotics, hormone replacement therapy, smoking, pregnancy and patients with gastrointestinal disorders.

2.2. Test meals

The frozen pulp of cagaita fruit was obtained from Cooperativa dos Agricultores Familiares Agroextrativistas Grande Sertão (Montes Claros, MG, Brazil), ready for human consumption. The clarified juice was prepared using centrifugation at 22.770 g for 40 min and non-clarified juice was composed of whole pulp defrosted.

The meals consisted of approximately 30 g of available carbohydrate from 50 g of white bread (USP, 1998) plus 300 mL of water as control, clarified cagaita juice or non-clarified cagaita juice. These meals were administered after 10-12 hours overnight fasting. All participants were also informed to prevent some kind of food and beverage rich in polyphenols on the previous day, such as chocolate, wine, red fruits, tea and coffee. The subjects were advised to consume the meals within 10 min maximum and each volunteer was submitted to test meals with an interval of 7 days among them.

2.3. Glucose and insulin analysis

This study was carried out at Hospital of Clinics of the School of Medicine of the University of São Paulo (São Paulo, Brazil). Time 0 was set immediately before the first bite and the following blood samples were taken after 30, 60, 90 and 120 min after test meal intake. Blood glucose and insulin concentrations were determined using hexokinase (Labtest®) and chemiluminescence (Roche®) kits, respectively.

The *area under the curve* (AUC) for glucose and insulin were calculated by trapezoidal rule to determinate the reduction of glycemic response. Others parameters concerning glucose were evaluated such as *glucose baseline* (GB) obtained by time zero; glucose peak value (GPV) considered the highest value above the baseline after meal consumption and expressed in mg/mL; *absolute increase of glucose* (AIg) characterized by difference between GPV and GB ($\text{AIg} = \text{GPV} - \text{GB}$) and expressed in mg/dL; *glucose incremental percentage* (GIP) defined as the ratio between the AIg and GB ($\text{GIP} = (\text{AIg}/\text{GB}) \times 100$) and expressed in percentage; *glucose incremental velocity* (GIV) as the ratio between AIg and the time of highest blood glucose concentration ($\text{GIV} = \text{AIg}/\text{peak time}$) (Balisteiro et al., 2013).

2.4. Plasma antioxidant capacity

The blood collected was immediately centrifuged for 20 minutes at 1500 g (4°C) and the plasma was stored at -80°C until the analyzed. Antioxidant capacity of plasma was determined by ferric reducing ability of plasma (FRAP) according to Benzie & Strain (1996) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) according to Dávalos et al (2004). Both methods were performed on a Synergy H1 Hybrid Multi-Mode microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT) and the results were expressed as nmol Trolox equivalents (TE)/mL plasma and mmol Trolox equivalents (TE)/mL plasma, respectively.

2.5. Characterization of cagaita fruit juice

2.5.1. *Total sugar.* Total sugars were determined according to Dubois et al. (1956). Results were expressed as g of glucose equivalents/300 mL of juice.

2.5.2. *Titrateable acidity.* Titrateable acidity was determined according to Association of Official Agricultural Chemists (1997).

2.5.3. *Total fiber.* The determination of total fiber was performed according to the AOAC (AOAC, 1997).

2.5.4. *Total phenolics content.* The determination of total phenolics content was performed according to Singleton, Orthofer, and Lamuela-Raventos (1999), with some modifications. Gallic acid was used as the reference standard and the results were expressed as g of gallic acid equivalents (GAE)/300 mL of juice.

2.5.5. *Proanthocyanidin content.* Total proanthocyanidins were determined according to Porter et al (1986). Results were expressed as g of quebracho tannin equivalents (TQE)/300 mL of juice.

2.5.6. *Flavonoids composition.* Identification and quantification of flavonoids, phenolic acids, free and total ellagic acid in cagaita fruit juice were carried out using analytical reversed-phase HPLC in a Hewlett-Packard 1100 system with autosampler and quaternary pump coupled to a diode array detector (DAD), according to Arabbi et al (2004). The column used was 250 x 4.6 mm, 5 μ m, Prodigy ODS3 reversed-phase C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Samples were injected in duplicate. Results were expressed per 300 mL of juice.

2.5.7. *Total ellagic acid content.* Total ellagic acid was determined according to Pinto et al (2008). After extraction and acid hydrolysis, an aliquot of 2 mL of extract was dried under nitrogen, 2 N trifluoroacetic acid were added, and the hydrolysis was performed at 120°C for 90 min. The hydrolyzed samples were evaporated under nitrogen, redissolved in methanol and filtered for HPLC/DAD analysis.

2.6. *Antioxidant capacity*

2.6.1. DPPH radical-scavenging ability. The antioxidant capacity was evaluated according to Brand-Williams et al (1995) with some modifications. The results were expressed as mmol Trolox equivalentes (TE)/300 mL of juice.

2.6.2. FRAP ferric reducing power. The antioxidant capacity was assessed according to Benzie & Strain (1996) by ferric reducing ability of plasma (FRAP). Results were expressed as $\mu\text{mol TE}/300\text{ mL}$ of juice.

2.6.3. ORAC oxygen radical absorbance capacity. The antioxidant capacity was determined according by Dávalos et al (2004). Results were expressed as mmol TE/ 300 mL.

2.7. Preparation of polyphenol-rich extracts from cagaita fruit juice

Polyphenols rich-extracts were obtained after solid phase extraction (SPE) of juices in polyamide (Mackerey-Nagel GmbH and Co., Duren, Germany) or C18 (SupelcleanTM LC-18, Supelco) cartridges, according to Gonçalves et al (2010).

2.7.1. α -Glucosidase inhibition assay. Inhibition of α -glucosidase activity was performed as described previously by McCue et al (2005). An aliquot of 50 μL of the sample, 50 μL of 0.1 M buffer potassium phosphate (pH 6.9) and 100 μL of α -glucosidase (EC 3.2.1.20) from *Saccharomyces cerevisiae* solution (1 U/mL) purchased from Sigma Co (St. Louis, MO, USA) were incubated in 96-well plates at 25°C for 10 min. After pre incubation, 50 μL of 5 mM p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (Sigma Co, St. Louis, MO, USA) in the same buffer was added to reaction mixture that were incubated at 25°C for 5 min. The absorbance was measured before and after the incubation at 405 nm using a Synergy H1 Hybrid Multi-Mode microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT). The α -glucosidase inhibitory activity (IC₅₀) was expressed as μg of gallic acid equivalents (GAE)/mL reaction.

2.7.2. α -Amylase inhibition assay. A slight modification of the assay described by Worthington Enzyme Manual was performed (Worthington Biochemical Corp., 1993). A volume of 250 μL of extract and 250 μL of 0.1 M sodium phosphate with 0.006 M NaCl (pH

6.9) containing α -amylase (EC 3.2.1.1) from porcine pancreas (type VI-B) solution (1 U/mL) purchased from Sigma Co (St. Louis, MO, USA) were incubated at 25°C for 10 min. After pre incubation, 250 μ L of 1% starch solution in the same buffer was added to reaction mixture and incubated at 25°C for 10 min. The reaction was stopped with 500 μ L of 96 mM 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) color reagent (Sigma Co, St. Louis, MO, USA). The tubes were incubated at 100°C for 10 min and cooled to room temperature, 2 mL of distilled water were added and the absorbance was measured at 540 nm. The α -amylase inhibitory activity (IC₅₀) was expressed as μ g of gallic acid equivalents (GAE)/mL reaction.

2.7.3. Pancreatic lipase inhibition assay. The pancreatic lipase activity was measured using 4-methylumbelliferyl oleate (4-MU oleate) (Sigma Co, St. Louis, MO, USA) as a substrate according to Nakai et al (2005). A volume of 25 μ L of the extract, described before (2.7) at different concentrations, and 50 μ L of 0.1 mM 4-MU oleate solution dissolved in a buffer consisting of 13 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 1.3 mM CaCl₂ (pH 8.0) were mixed in 96-well plates at 25°C, and 25 μ L of pancreatic lipase (EC 3.1.1.3) from porcine pancreas (type II) solution (1 mg/mL) purchased from Sigma Co (St. Louis, MO, USA) in the same buffer to start the reaction. After incubation at 25°C for 30 min, 100 μ L of sodium citrate (pH 4.2) was added to stop the reaction. The amount of 4-methylumbelliferone released by lipase was measured with a fluorometrical Synergy H1 Hybrid Multi-Mode microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT) at an excitation wavelength of 355 nm and an emission wavelength of 460 nm. The pancreatic lipase inhibitory activity (IC₅₀) was expressed as μ g of gallic acid equivalents (GAE)/mL reaction.

2.8. Statistical analysis

The results are presented as mean $\pm$ SD. Data were analyzed using Graphpad Prism version 5.0 (San Diego, CA, EUA). The results were checked for normality by using the

Shapiro-Wilk test, and one-way ANOVA and Friedman tests were used to compare the means. *P*-values below 0.05 were regarded as significant.

3. Results and Discussion

The chemical characterization of cagaita fruit juices administered to volunteers, clarified and non-clarified, is presented in Table 1. Clarification of juices was performed in order to differentiate possible effects associated to fiber from those associated to water soluble phenolic compounds. Cagaita juices were shown to be highly acidic and not very sweet, and non-clarified juice presented a higher amount of total fiber, when compared to ordinary juices such as orange (*Citrus sinensis*) and apple (*Malus domestica*), that are the most popular and probably are the most consumed fruit juices in the world. Orange juice present approximately 2.8 g citric acid equivalents/300 mL juice and pH 3.8 whereas apple juice present 2.5 g malic acid equivalents/300 mL juice and pH 3.7 (Eisele & Drake, 2005; Pollack et al., 2003; USDA, 1956). The presence of organic acids contributes to the flavor and palatability of fruits or their juices (Vandercook, 1977). The amount of sugar of cagaita juices was more than three times lower than those of orange and apple juice (28.1 g/300 mL juice and 28.9 g/300 mL, respectively). The clarification process used here (centrifugation) was effective for fiber separation. The amount of fiber of the non-clarified cagaita juice was the double of the values orange and apple juices (0.6 g/300 mL of juice) (USDA, 2005). It is known that soluble fibers represented by pectin, β -glucan, and fructans, act mainly in the glucose and fat absorption, as long as administered in sufficient dose (Oh et al., 2014). Thus, to evaluate the possible effect of phenolic compounds on postprandial glycemia in humans, the clarification process was performed to reduce efficiently the fiber fraction in juice (Abdullah et al., 2007; Pinelo et al., 2010).

Non-clarified cagaita fruit juice presented higher phenolic content (41%), and the amount of proanthocyanidins was almost 2 times higher than of clarified cagaita juice. Also, the non-clarified beverage presented an increased ferric reducing antioxidant power (FRAP) and DPPH radical-scavenging ability (DPPH). Ellagic acid and quercetin derivatives were the most widespread flavonoids identified by HPLC/DAD analysis of cagaita fruit juice, whereas tannins (ellagitannins and proanthocyanidins) were the main polyphenols in juice.

In this study, we assessed the effect of cagaita fruit juices, clarified and non-clarified, on postprandial glycemia and insulinemia in prediabetic subjects together with 50 g of white bread. The central idea is based on the hypothesis that an approach to decrease complications related to prediabetes and T2D is to attenuate postprandial glucose response. Thus, glucose homeostasis in postprandial state is a strategy to improve sensitivity to insulin (Scheen et al., 2003). Several pharmacological agents are used to treat T2D. The oral antidiabetic drugs generally have four mechanisms of action: stimulate insulin secretion, improve insulin resistance, inhibit the DPP-4 and slow down the digestion of carbohydrates (Krentz & Bailey, 2005). A strategy to ameliorate postprandial hyperglycemia is to delay the digestion and absorption of carbohydrates. α -Amylase and α -glucosidase are essential in the cleavage of carbohydrates, turning them into smaller molecules capable of absorption through small gut by glucose specific transporters. The inhibition of these enzymes and/or these transporters limits the available glucose to be absorbed by the enterocytes and, thereby, reduce postprandial glycemia (Bhandari et al., 2008; Huang & Czech, 2007).

Acarbose, which is the best studied and the most widely used drug to slow down carbohydrate absorption, acts inhibiting α -glucosidase enzymes present in brush border of the small intestine which turns disaccharides and oligosaccharides into their monosaccharides (Balfour & McTavish, 1993; Lebovitz et al., 1998; Scheen et al., 2003). However, side effects

such as flatulence and diarrhea are pronounced, suggesting that new alternatives to reduce postprandial glycemia have to be adopted, thereby minimizing adverse effects.

The phenolic compounds present in cagaita fruit juice were much more efficient than acarbose (IC₅₀ 410 µg/mL reaction) in inhibiting α -glucosidase. In contrast, no, or very low, α -amylase inhibitory activity was detected (IC₅₀ 1.67 µg/mL reaction) (Table 2 and Figure 1). Our findings *in vitro*, concerning α -glucosidase assay agree with other studies indicating that flavonoids, mainly quercetin derivatives, are stronger inhibitors of α -glucosidase than acarbose (Jo et al., 2010; Li et al., 2009). Also, we found that tannins are weak inhibitors of α -amylase, whereas flavonoids did not present any inhibitory activity. In accordance with our results, a previous study reported that tannins are weak inhibitor of α -amylase activity, although their inhibitory effectiveness may be modulated by other phenolic compounds due to the synergism between polyphenols present in the fruits (Boath et al., 2012; McDougall et al., 2005). In addition, the poor breakdown of the dietary starch due to the excessive inhibition of α -amylase can imply in decompensated fermentation by gut microbiota resulting in severe abdominal distension (Putzai et al., 1995).

Ninety per cent of patients with T2D are overweight or obese. Generally, when these patients lose 5-10% of their initial body weight there is an improvement on insulin resistance and cardiovascular risk factors, therefore weight-reducing drugs are widely used (Lloret-Linares et al., 2008). Orlistat is an inhibitor of pancreatic lipase, which is the key enzyme for dietary fat digestion and its inhibition may be a strategy to decrease fat absorption (Jandacek & Woods, 2004).

To further study the potential effect of polyphenols from cagaita juice on metabolic syndrome, pancreatic lipase inhibitory activity was also measured. As can be seen, both polyphenol-rich extracts were able to inhibit pancreatic lipase, but that rich in tannins (C18) was less effective than positive control orlistat (IC₅₀ 69.3 µg/mL reaction), while the

polyamide-extract was more effective indicating that flavonoids or phenolic acids are potent inhibitors of pancreatic lipase activity (Table 2 and Figure 1).

The XENDOS study aimed to evaluate the effect of orlistat with lifestyle modifications or placebo with lifestyle modifications on reducing progression of T2D in obese subjects. The obese prediabetic individuals who took the drug reduced the incidence of T2D in 45%, indicating that orlistat reduces progression to T2D in prediabetic subjects (Togerson et al., 2004). However, in a similar way to acarbose, the patients taking orlistat as a therapeutic to lose weight present gastrointestinal side effects suggesting that new alternatives to reduce fat digestion and absorption are required (Miles et al., 2002). Our results *in vitro* showed that flavonoids are stronger inhibitors of pancreatic lipase than orlistat, whereas tannins had a relatively weak effect compared to orlistat. In a previous study reported by our group, tannins were not the best inhibitors of pancreatic lipase whereas quercetin derivatives had a good dose-dependent inhibitory ability (Donado-Pestana et al., 2015; Li et al., 2011).

3.1. Effect of cagaita fruit juices on postprandial glycemia and insulinemia.

Previous human studies using polyphenol-rich foods aimed to ameliorate important hallmarks of T2D, such as glycated hemoglobin, fasting and postprandial glycemia and insulinemia. In a study carried out in healthy volunteers it was evaluated the effect of almonds consumption (30, 60 and 90 g) together with 50 g of available carbohydrate, in postprandial glycemia. The results showed that polyphenols from almonds may be determinant to reduce postprandial glycemia indicating a dose-response effect (Josse et al., 2007).

Aiming to evaluate the possible effect of cagaita fruit juices on postprandial glycemia, of prediabetic subjects, a total of 21 participants were assessed for eligibility. Of these, six did not comply with the requirements in the inclusion criteria and one was excluded due to gastrointestinal side effects. Hence, fourteen volunteers participated of this study. The baseline characteristics of the study volunteers are shown in Table 3.

As expected, the concomitant consumption of cagaita fruit juices with 50 g of white bread demonstrated a significant effect on postprandial glycemic and insulineric curves that can be seen in Figure 2. At 60 and 90 min, clarified juice reduced plasma blood glucose ($p < 0.05$) when compared to control, whereas at 30, 60, 90 and 120 min, plasma glucose was reduced ($p < 0.05$) after consumption of non-clarified cagaita juice.

Similarly, at 60 min, serum insulin concentrations were attenuated with both beverages consumption ($p < 0.05$). Clarified cagaita juice reduced plasma insulin at 60 and 90 min, whereas non-clarified resulted in lower insulin at 30, 60 and 120 min ($p < 0.05$).

In agreement with previous studies, important properties were observed in this study. The values of AUCg, AUCi, AIg (absolute increase of glucose), GIV (glucose incremental velocity), GIP (glucose incremental percentage), GPV (glucose peak value) and IPV (insulin peak value) are presented in Table 4. Both cagaita fruit juices were able to reduce the AUCg. AUCi, AIg and GIP. Our results showed that the consumption of cagaita fruit juices was able to reduce the amount of glucose absorbed in 2 hours (AUCg), clarified juice reducing 56% and non-clarified juice 71%, whereas their glucose peak concentration (GPV) were decreased by clarified juice by 19% and non-clarified juice by 24%. These results may be attributed to polyphenols, supporting the hypothesis that phenolic compounds from cagaita fruit juices play an important role in inhibiting α -glucosidase.

Our previous study has shown that the administration of clarified araçá (*Psidium guineenses* Sw.) fruit juice, a Brazilian native fruit also belonging to *Myrtaceae* family, reduced by 43% the amount of glucose absorbed by healthy subjects. The authors suggested that the reduction of postprandial glycemia could be attributed to polyphenols, such as proanthocyanidins and ellagitannins, present in araçá juice (Balisteiro et al., 2013).

Interestingly, in addition to exert hypoglycemic properties in acute interventions, polyphenols seem to have this benefit when administered in long term too. Sattanathan et al

(2011) evaluated the supplementation of rutin, a glycoside of quercetin, in humans with T2D for 120 days. After this period, a significant reduction of fasting glucose levels and glycated hemoglobin was observed. Quercetin and kaempferol derivatives were administered in capsules containing 200 mg of the powdered plant material (leaves) from *Eugenia punicifolia* DC, a Brazilian native fruitful specie. Fifteen patients with T2D took the capsules three times a day for 3 months, in addition to their current treatment. After intervention, there was significant reduction of glycated hemoglobin and insulin baseline (Sales et al., 2014).

In an acute study that investigated insulin metabolism for 2 h, 150 g of berries rich in ellagitannins, ellagic acid and proanthocyanidins, were administered together with 50 g available starch from rye bread to healthy female volunteers and the results showed that postprandial insulin response was reduced by 40% at 30 min (Törrönen et al., 2013). Similarly, non-clarified cagaita juice containing high concentrations of proanthocyanidins and ellagic acid reduced by 34% at 30 min the serum insulin concentrations.

The consumption of both cagaita fruit juices was very effective to reduce postprandial insulin response, once that clarified juice reduced by 59% the AUC_i and 46% the IPV whereas non-clarified reduced by 69% the AUC and 45% the IPV. The lower postprandial insulin response after consumption of cagaita fruit juices made less insulin to be required and secreted for maintenance of postprandial glucose metabolism. A compensated insulin response generally avoids lipolysis in the adipose tissue and stimulates storage glucose in the liver and glucose uptake by muscle (Galic et al., 2010).

Although the mechanism of action is unclear, phenolic compounds can act on activation of insulin signaling by different pathways. An *in vitro* study demonstrated that quercetin and kaempferol derivatives, the flavonoids found in cagaita fruit juice, were more efficient to improve glucose uptake in adipocytes, stimulated by insulin, than rosiglitazone, an oral antidiabetic drug which works as insulin sensitizer (Fang et al., 2008).

The postprandial event is naturally a moment of active metabolism and formation of reactive oxygen species (ROS), implying in pro-oxidant state. A relatively weak balance between oxidant generation and antioxidant defence and postprandial hyperglycemia stimulated by meals with high glycemic index induce oxidative stress generation (Burton-Freeman, 2010; Halliwell, 2012). Thus, the increase of antioxidant capacity of plasma may attenuate the imbalance of ROS production. Table 7 shows that polyphenols present in both beverages from cagaita frozen pulp increased ferric reducing antioxidant power (FRAP) of plasma from 0.11 nM eq. TE/mL to 0.15 nM eq. TE/mL plasma ($p < 0.05$) after clarified juice intake and 0.07 nM eq. TE/mL plasma to 0.16 nM eq. TE/mL plasma after non-clarified juice consumption. However, only non-clarified cagaita juice enhanced oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of plasma of volunteers from 8.39 mM eq. TE/mL plasma to 10.7 mM eq. TE/mL plasma ($p < 0.05$), probably related to the high phenolics content.

In a previous study, patients with T2D received one capsule of pomegranate and green tea extract per day containing ellagitannins and catechin derivatives, for 3 months. After this period, it was observed an increase plasma antioxidant capacity, almost four times higher than that control group that received placebo, indicating that polyphenols may normalize and/or enhance antioxidant defence (Fenercioglu et al., 2010).

Other mechanism explaining lower hyperglycemia may be the inhibition of the glucose transporters. The absorption of glucose in the small gut is mediated by SGLT1 and GLUT2 which are responsible to carry glucose into the enterocytes. Some studies *in vitro* have shown that quercetin derivatives may inhibit them, reducing postprandial glycemia and insulinemia. Furthermore, tannins, that are a major component of polyphenols in cagaita fruit juices, stimulate glucose transporter 4 (GLUT4) expressions due to activation of an insulin-mediated signaling pathway in adipocytes (Liu et al., 2005; He et al., 2009; Tahrani et al., 2013).

5. Conclusions

This study demonstrated that cagaita fruit juices attenuate postprandial glycemia and insulinemia responses in prediabetic subjects, an effect probably associated to the presence of water-soluble polyphenols but also fiber associated polyphenols or still, to the fiber itself. In this way, cagaita fruit can be used as a complementary strategy for the management of hyperglycemia linked to obesity.

Acknowledgement

The authors thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP 2012/23891-5; 2013/19797-6) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 470338/2013-0).

6. References

- Abdullah, A.G.I., Sulaiman, N.M., Aroua, M.K., Megat Mohd Noor, M.J. (2007). Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering*, 81, 65-71.
- Andrade, A.C.S., Cunha, R., Souza, A.F., Reis, R.B., Almeida, K.J. (2003). Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC, *Seed Science & Technology*, 31, 125–137.
- Arabbi, P.R., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. (2004). Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1124-1131.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC (1997). *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists*. Arlington: AOAC.
- Balfour, J.A., Mctavish, D. (1993). Acarbose: An update of its pharmacology and therapeutic use in diabetes mellitus, *Drugs*, 46(6), 1025-1054, 1993.
- Balisteiro, D.M., Alezandro, M.R., Genovese, M.I. (2013). Caracterization of clarified araçá (*psidium guineenses* Sw.) juice on postprandial glycemia in healthy subjects. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 33(1), 66-74.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bhandari, M.R., Nilubon, J.A., Gao, H., Kawabata, J. (2008). α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata* Haw.). *Food Chemistry*, 106, 247–252.
- Boath, A.S., Grussu, D., Stewart, D., McDougall, G.J. (2012). Berry polyphenols inhibit digestive enzymes: a source of potential health benefits? *Food Digestion*, 3, 1 -7.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Burtin-Freeman, B. (2010). Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: a review of the science, *British Journal of Nutrition*, 101, S1-S14.
- Cavalot, F., Benseñor, I.M., Halpern, A., Pierin, A.M.G. (2008). Síndrome metabólica em motoristas profissionais de transporte de cargas da rodovia BR-116 no trecho Paulista-Régis Bittencourt. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica*, 52(6), 1015-1023.
- Cerriello, A., Quagliaro, L., Piconi, L., Assaloni, R., Da Ros, R., Maier, A., Esposito, K., Giuliano, D. (2004). Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. *Diabetes*, 53(3), 701-710.
- Chiasson, J.L., Josse E.G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., STOP-NIDDM Trial Research Group. (2002). Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*, 359, 2072-2077.
- Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia, *Food Research International*, 44, 2047–2053.
- Cramer, J.A. (2004). A systematic review of adherence with medications for diabetes. *Diabetes Care*, 27, 1218-1224.
- Crozier, A., Del-Rio, D., Clifford, M.N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 446-467.
- Dávalos, A., Gomez-Cordoves. C., Bartolome, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48-54.

- Devalajara, S., Jain, S., Yadav, H. (2011). Exotic fruits as therapeutic complements for diabetes, obesity and metabolic syndrome. *Food Research International*, 44, 1856-1865.
- Donado-Pestana, C.M., Belchior, T., Festuccia, W.T., Genovese, M.I. (2015). Phenolic compounds from cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg) fruit attenuate glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by a high-fat, high-sucrose diet. *Food research international*, 69, 170-178.
- Dubois, M., Gille, K.A., Hamilton, J.K., Rebersa, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P. (2005). The metabolic syndrome, *Lancet*, 365, 1415-1428.
- Eisele, T.A.; Drake, S.R. (2005). The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties, *Journal of food composition and analysis*, 18, 213-221.
- Fang, X.K., Gao, J., Zhu, D.N. (2008). Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity, *Life Sciences*, 82, 615-622.
- Fenercioglu, A.K., Saler, T., Genc, E., Sabuncu, H., Altuntas, Y. (2010). The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus without complications. *Journal of endocrinology investigation*, 33, 118-124.
- Galic, S.; Oakhill, J.S.; Steinberg, G.R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 316(2), p.129-139.
- Gonçalves, A.E.S.S., Lajolo, F.M., Genovese, M.I. (2010). Chemical composition and Antioxidant/Antidiabet potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4666-4674.
- Halliwel, B. (2012). The antioxidants paradox: less paradoxical now? *British Journal of Clinical Nutrition*, 75(3), 637-644.
- Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, K. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 1365-1402.
- Hasegawa G., Yamamoto, Y., Zhi, J.G., Tanino, Y., Yanasaki, M., Yano, M., Nakajima, T., Fukui, M., Yoshikawa, T., Nakamura, N. (2005). Daily profile of plasma %CoQ10 level, a biomarker of oxidative stress, in patients with diabetes manifesting postprandial hyperglycaemia, *Acta Diabetologica*, 42(4), 179-181.
- He, Y.X., Liu, X.D., Wang, X.T., Wang, G.J., Xie, L. (2009). Sodium-dependent Glucose Transporter Was Involved in Salidroside Absorption in Intestine of Rats. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 7(6), 444-448.
- Huang, S., Czech, M.P. (2007). The GLUT 4 glucose transporter. *Cell Metabolism*, 5(4), 237-252.
- Jandacek, R.J., Woods, S.C. (2004). Pharmaceutical approaches to the treatment of obesity. *Drug Discovery Today*, 15, 874-880.
- Jo, S.H.; Ka, E.H.; Lee, H.S.; Apostolidis, E., Jang, H.D., Known, Y.I. (2010). Comparison of antioxidant potential and rat intestinal α -glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin and isoquercetin. *International Journal of Applied Research in Natural Products* 2(4), 52-60.
- Josse, A.R., Kendall, C.W.C, Augustin, L.S.A., Ellis, P.R., Jenkins, D.J.A. (2007). Almonds and postprandial glycemia - a dose-response study. *Metabolism Clinical and Experimental*, 56, 400-404.
- Krentz, A.J., Bailey, C.J. (2005). Oral antidiabetic agents current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 65, 385-411.
- Lebovitz, H.E. (1998). α -glucosidase inhibitors as agents in the treatment of diabetes. *Diabetes Reviews*, 6, 132-145.
- Li, Y.Q., Yang, P., Gao, F. (2011). Probing the interaction between 3 flavonoids and pancreatic lipase by methods of fluorescence spectroscopy and enzymatic kinetics. *European food Research and Technology*, 233, 63-69.

- Li, Y.Q., Zhou, F.C., Gao, F., Bian, J.S., Shan, F. (2009). Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of α -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(24), 11463-11469.
- Liu, H., Qiu, N., Ding, H., Yao, R. (2008). Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Research International*, 41, 363–370.
- Liu, X., Kim, J.K., Li, Y., Li, J., Liu, F., & Chen, X. (2005). Tannic acid stimulates glucose transport and inhibits adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *The Journal of Nutrition*, 135, 165–171.
- Lloret-Linares, C., Greenfield, J.R., Czernichow, S. (2008). Effect of weight-reducing agents on glycemic parameters and progression to type 2 diabetes: a review. *Diabetic medicine*, 25, 1142-1150.
- Manzano, S., Williamson, G. (2010). Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 1773–1780.
- Martínez, J.A. (2006). Mitochondrial oxidative stress and inflammation: A slalom to obesity and insulin resistance. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 62, 303–306.
- McCue, P., Kwon, Y., Shetty, K. (2005). Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods. *Journal of Food Biochemistry*, 29(3), 278-294.
- McDougall, G.J., Stewart, D. (2005). The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*, 23(4), 184-195.
- Meydani, M., Hasan, S.T. (2010). Dietary Polyphenols and Obesity (review). *Nutrients*, 2, 737-751.
- Miles, J.M., Leiter, L., Hollander, P., Wadden, T., Anderson, J.W., Doyle, M., Foreyt, J., Arrone, L., Klein, S. (2002). Effect of orlistat in overweight and obese patients with type 2 diabetes treated with metformin. *Diabetes care*, 25(7), 1123-1128.
- Mohamed, S. (2014). Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease. *Food Science and Technology*, 35, 114-128.
- Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F., Kiso, Y. (2005). Inhibitory Effects of Oolong Tea Polyphenols on Pancreatic Lipase in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4593-4598.
- Neligan, P.J. (2010). Metabolic syndrome: Anesthesia for morbid obesity. *Current Opinions in Anaesthesiology*, 23, 375–383.
- Oh, I.K., Bae, I.Y., Lee H.G. (2014). In vitro starch digestion and cake quality: Impact of the ratio of soluble and insoluble dietary fiber. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 98-103.
- Pinello, M., Zeuner, B., Meyer, A.S. (2010). Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing*, 88, 259–265.
- Pinto, M. S., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2008). Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 107, 1629-1635.
- Pitrosh, F., Sharper, F., Passauer, J., Koehler, C., Bornsterin, S.R., Hanefeld, M. (2009). Effects of alpha glucosidase inhibitor acarbose on endothelial function after mixed meal in newly diagnosed type 2 diabetes. *Hormone and metabolic research*, 41, 104-108.
- Pollack, S.L., Lin, B.H., ALLSHOUSE, J. (2003). Characteristics of U.S orange consumption. *United States Department of Agriculture, n.FTS305-01*, Washington, DC.
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25, 223-230.

- Putzai, A., Duguid, G.G.T., Brown, D.S., Peumans, W.J., Van Damme, E., Bardocz, S. (1995). Inhibition of Starch Digestion by α -Amylase Inhibitor Reduces the Efficiency of utilization of Dietary Proteins and Lipids and Retards the Growth of Rats. *Nutrient metabolism*, 125, 1554-1562.
- Sales, D.S., Carmona, F., Azevedo, B.C., Taleb-Contini, S.H.; Bartolomeu, A.C.D., Honorato, F.B., Martinez, E.Z., Pereira, M.S. (2014) *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. As an adjuvant treatment for type 2 diabetes mellitus: A non-controlled, pilot study. *Phytotherapy research*, 28, 1816-1821.
- Sattanathan, K., Dhanapal, C.K., Manavalan, R. (2011). Antihyperglycemic effect of rutin supplementation on Diabetic Mellitus patients. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2(4), 2229-3701.
- Scheen, J.A. (2003). Is there a role for alpha-glucosidase inhibitors in the prevention of type 2 diabetes mellitus? *Drugs*, 63(10), 933-951.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Tahrani, A.A., Barnett, A.H., Bailey, C.J., (2013). SGLT inhibitors in a management of diabetes. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 1(2), 140-151.
- Torgerson, J.S., Hauptman, J., Boldrin, M.N., Sjöström, L. (2004). Xenical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care*, 27:155–61. Erratum in: *Diabetes Care*, 2004 27:856.
- Törrönen, R., Kolehmainen, M., Sarkkinen, E., Poutanen, K., Mykkänen, H., Niskanen, L. (2013). Berries reduce postprandial insulin responses to wheat and rye breads in healthy woman. *British Journal of Nutrition*, 143(4), 430-436.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA (1956). Agriculture research service, Agriculture Handbook, *Chemistry and technology of citrus, citrus products, and byproducts*, 98, Washington, D.C.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA (2005). Agriculture research service, National *nutrient database for standard reference*, Washington, D.C.
- University of Sao Paulo, Faculty of pharmaceutical sciences, department of food and experimental nutrition/BrazilFoods (1998). *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos*, - USP, Version 5.0. <http://www.fcf.usp.br/tabela>.
- Vandercook, C.E. (1977). Organic acids. In: Nagy S, Shaw P E, Veldhuis M K, eds, *Citrus Science and Technology*. Avi Publishing Co. Westport, Conn, 209-22.
- Williamson, G. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(1), 48-57.
- Worthington, V. (1993). Alpha amylase. In: *Worthington Enzyme Manual*. Worthington Biochemical Corp. Freehold, NJ, 36-41.
- Yahia, E.M., Larosa, L., Parrilla, E.A., González-Aguiar, G.A. (2010). The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. *Phytochemicals: Chemistry, nutritional and stability*, Oxford: Wiley-Blackwell, 3-51.

Table 1. Chemical characterization of clarified and non-clarified cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) juices prepared from commercial frozen pulp, ready to consumption, administered to volunteers.

	Clarified	Non-clarified
Total sugar (g/300 mL juice)	6.44 ± 0.08 ^a	7.8 ± 0.56 ^b
Titrateable acidity (g/300 mL juice)	19.36 ± 0.2 ^a	19.92 ± 0.2 ^b
Total fiber (g/300 mL juice)	n.d.	1.29 ± 0.04
pH	3.3 ± 0 ^a	3.0 ± 0 ^b
Phenolics content (g GAE/300 mL juice)	0.51 ± 0.04 ^a	0.87 ± 0.04 ^b
Proanthocyanidins (g QTE/300 mL juice)	0.59 ± 0.02 ^a	1.14 ± 0.04 ^b
DPPH (mmol TE/300 mL juice)	2.12 ± 0.07 ^a	2.87 ± 0.2 ^b
FRAP (μmol TE/300 mL juice)	0.84 ± 0.08 ^a	1.06 ± 0.09 ^b
ORAC (mmol TE/300 mL juice)	3.8 ± 0.2 ^a	4.1 ± 0.1 ^a
Quercetin derivates (mg/300 mL juice)	8.88 ± 0.5	n.e.
Free ellagic acid (mg/300 mL juice)	0.42 ± 0.07	n.e.
Total ellagic acid (mg/300 mL juice)	69.97 ± 0.29 ^a	265.3 ± 24.1 ^b
Syringic acid (mg/300 mL juice)	2.39 ± 0.09	n.e.
Kaempferol derivates (mg/300 mL juice)	0.57 ± 0.1	n.e.

Results are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Means in the same row with different letters are significantly different ($p < 0.05$). GAE= gallic acid equivalents; QTE= quebracho tannin equivalents; TE= trolox equivalents; n.d.= not detected; n.e.= not evaluated.

Table 2. Inhibition of α -glucosidase, α -amylase and pancreatic lipase activities, *in vitro*, of phenolic compounds from cagaita fruit juice.

				α -glucosidase	α -amylase	Pancreatic lipase
Polyamide*	(μ g	eq.	GAE/mL	34.2 ± 1.4^a	n.d.	26.2 ± 0.8^a
reaction)						
C18*	(μ g	eq.	GAE/mL	80.5 ± 5.2^b	219.1 ± 5.5	90.7 ± 5.9^b
reaction)						
Positive control						
Acarbose	(μ g/mL	reaction)		410	1.67	-
Orlistat	(μ g/mL	reaction)		-	-	69.3

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=3). Means in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$). *Phenolic compounds obtained by solid phase extraction (SPE) using polyamide or C18 cartridges, n.d.= not detected.

Table 3. Baseline characteristics of the study volunteers.

Variable	Mean $\pm$ SD
Subjects, <i>n</i>	14
Age (years)	46 $\pm$ 8
Weight (kg)	100 $\pm$ 25
BMI (kg/m ²)	36 $\pm$ 4
Waist circumference (cm)	109 $\pm$ 17
Diastolic blood pressure (mmHg)	95 $\pm$ 26
Systolic blood pressure (mmHg)	144 $\pm$ 19
HbA _{1c} (%)	5.7 $\pm$ 0.5
HDL-cholesterol (mg/dL)	47 $\pm$ 13
LDL-cholesterol (mg/dL)	119 $\pm$ 39
Total cholesterol (mg/dL)	194 $\pm$ 42
Triglycerides (mg/dL)	144 $\pm$ 79
Fasting plasma glucose (mg/dL)	101 $\pm$ 8
Fasting plasma insulin (μ U/mL)	19 $\pm$ 11

Data are given as mean $\pm$ SD. BMI= body mass index; HbA_{1c}= glycated hemoglobin; HDL= high density lipoprotein; LDL= low density lipoprotein.

Table 4. Effect of cagaita fruit juices on postprandial plasma glucose and insulin of prediabetic subjects (n=14), compared to water as control.

Parameters	Control	Clarified juice	Non-clarified juice
AUC (mg glucose/dL)	3392 ± 1571 ^a	1502 ± 1110 ^b	986 ± 696 ^b
AUC (μU insulin/mL)	3720 ± 3353 ^a	1506 ± 1412 ^b	1151 ± 978 ^b
AIg (mg glucose/dL)	39.7 ± 15.3 ^a	13.5 ± 7.4 ^b	10.4 ± 4 ^b
GIP (%)	39.1 ± 14.4 ^a	13.3 ± 6.9 ^b	10.9 ± 4.4 ^b
GIV (mg glucose/mL minute)	0.67 ± 0.3 ^a	0.35 ± 0.3 ^a	0.22 ± 0.17 ^a
GPV (mg glucose/mL)	141.9 ± 19.2 ^a	114.1 ± 11.8 ^b	106.9 ± 8.4 ^b
IPV (μU insulin/mL)	70.5 ± 38.3 ^a	38 ± 17 ^b	38.4 ± 14.4 ^b

The results were expressed as mean ± standard deviation (n=14). Means in the same row with different letters are significantly different ($p < 0.05$). AUC: area under the curve; AIg: absolute increase of glucose; GIP: glucose incremental percentage; GIV: glucose incremental velocity; GPV glucose peak value; IPV: insulin peak value.

Table 5. Effect of cagaita juices on postprandial antioxidant capacity of plasma of volunteers.

	ORAC		FRAP	
	mM eq. TE/mL plasma		nM eq. TE/mL plasma	
	T = 0'	T = 120'	T = 0'	T = 120'
Control	8.72 ± 3.34^a	8.8 ± 3.1^a	0.08 ± 0.05^a	0.08 ± 0.06^a
Clarified	8.7 ± 1.3^a	9.49 ± 3.47^a	0.11 ± 0.07^a	0.15 ± 0.08^b
Non-clarified	8.39 ± 3.71^a	10.7 ± 5.1^b	0.07 ± 0.05^a	0.16 ± 0.09^b

The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=14). Means in the same row with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Figure 1. Dose-response of phenolic compounds obtained by SPE using polyamide (A) and C18 (B) cartridges from cagaita fruit juice and acarbose (C), on α -glucosidase activity. Dose-response of phenolic compounds obtained by SPE using C18 (D) cartridge from cagaita fruit juice and acarbose (E), on α -amylase activity. Dose-response of phenolic compounds obtained by SPE using polyamide (F) and C18 (G) cartridges from cagaita fruit juice and orlistat (H), on pancreatic lipase activity.

Figure 2. Postprandial blood glucose (A) and insulin (B) at 0, 30, 60, 90 and 120 minutes after test meals: bread + water (300 mL) as control; bread + clarified cagaita juice (300 mL); bread + non-clarified cagaita juice (300 mL). Mean $\pm$ standard deviation (n=14).

5. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os sucos de cagaita podem reduzir as respostas glicêmicas e insulinêmicas pós-prandiais em indivíduos pré-diabéticos portadores de síndrome metabólica. Assim, como não foi detectada a presença de fibras no suco clarificado, sustenta-se a hipótese que a redução da quantidade de glicose absorvida, em duas horas, seja devida à atuação inibitória dos compostos fenólicos solúveis em água, presente nas bebidas, sobre a ação da enzima α -glicosidase. A redução da glicemia pós-prandial causada pelo consumo do suco não clarificado pode ser atribuída ao efeito dos polifenóis solúveis, dos polifenóis associados à fração fibra do suco, ou ainda, a ação da própria fibra. Além disso, o consumo dos sucos de cagaita foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante do plasma dos voluntários que ingeriram as refeições propostas pelo estudo, o que sugere que os polifenóis podem atuar no estresse oxidativo, que está associado à hiperglicemia.

Tendo em vista que a população estudada é pré-diabética, a hiperglicemia pós-prandial é uma situação recorrente nestes indivíduos, portanto, alternativas que possam contribuir com a redução das altas concentrações de glicose sanguínea após as refeições merecem ser estudadas a fim de reduzir complicações associadas a esta desordem. Desta forma, os sucos de cagaita podem ser utilizados como adjuvantes da dieta, como uma estratégia complementar ao tratamento da hiperglicemia pós-prandial.

6. Referências

- ADA - AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, Standards of medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v.37. Suppl 1, p. S14-S80, 2014.
- ADA - AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.35, p.S64-S71, 2012.
- ALMEIDA, M.M.B.; SOUZA, P.H.M.; ARRIAGA, A.M.C.; PRADO, G.M.P.; MAGALHÃES, C.E.C.; MAIS, G.A.M.; et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v.44, p.2155–2159, 2011.
- ALVES, R.E.; BRITO, E.A.; RUFINO, M.S.M.; SAMPAIO, C.G. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: A case study with acerola. **Acta Horticulturae**, v.773, p.299-305, 2008.
- ANDERSON, K.J.; TEUBER, S.S.; GOBEILLE, A.; CREMIN, P.; WATERHOUSE, A.L.; STEINBERG, F.M. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. **Journal of Nutrition**, v.31, p.2837–2842, 2001.
- ANDRADE, A.C.S.; CUNHA, R.; SOUZA, A.F.; REIS, R.B.; ALMEIDA, K.J. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. **Seed Science & Technology**, v.31, p.125–137, 2003.
- AOAC - **Official Methods of Analysis**, Association of Official Analytical Chemists. 18ed., Gaithersburg, MD, 2005.
- ARABBI, PR; GENOVESE, MI; LAJOLO, FM. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1124-1131, 2004.
- AYDIN, S.A. A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. **Journal of Biochemistry Molecular Biology**, v.40, p.29-35, 2007.
- BALISTEIRO, D.M., ALEZANDRO, M.R., GENOVESE, M.I. Characterization of clarified araçá (*psidium guineenses* Sw.) juice on postprandial glycemia in healthy subjects. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.33, Slup.1, p.66-74, 2013.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; GUDDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M, D.; DINIZ, M. F. F. M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central and North América with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.392-413, 2005.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v.239, n.1, p.70-76, 1996.

- BHANDARI, M.R.; NILUBON, J.A.; GAO, H.; KAWABATA, J. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata* Haw.). **Food Chemistry**, v.106, p.247–252, 2008.
- BOATH, A.S.; GRUSSU, D.; STEWART, D.; MCDUGALL, G.J. Berry polyphenols inhibit digestive enzymes: a source of potential health benefits? **Food Digestion**, v.3, p.1-7, 2012.
- BRAND-MILLER, J.C.; STOCKMANN, K.; ATKINSIN, F.; PETOCZ, F.; DENYER, G. Glycemic index, postprandial glycemia, and shape of the curve in healthy subjects: analysis of database of more than 1000 foods. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.89, p.97-105, 2009.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, London, v.28, p.25-30, 1995.
- BRYANT, N.J.; GOVERS, R.; JAMES, D.E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v.3, p.267–277, 2002.
- CARDOSO, L.M.; MARTINO, H.S.D.; MOREITA, A.V.B.; RIBEIRO, S.M.R.; SANT'ANA, H.M.P. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Research International**, v.44, p.2151–2154, 2011.
- CARRIE-THOMPSON, A.; HABERMAN, M.T.; WANG, H.A.; VIERKANT, R.A.; FOLSOM, A.R.; ROSS, J.A.; CERHAN, J.R. Antioxidant intake from fruits, vegetables and other sources and risk of non-Hodgkin's lymphoma: the Iowa Women's Health Study. **International Journal of Cancer**, v.126, p.992–1003, 2009.
- CAVAGIONI, L.C.; BENSEÑOR, I.M.; HALPERN, A.; PIERIN, A.M.G. Síndrome metabólica em motoristas profissionais de transporte de cargas da rodovia BR-116 no trecho Paulista-Régis Bittencourt. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, São Paulo, v.52, n.6, p.1015-1023, maio, 2008.
- CAVALOT, F.; PETRELLI, A.; TRAVERSA, M.; BONOMO, K.; FIORA, E.; CONTI, M.; ANFOSSI, G.; COSTA, G.; TROVATI, M. Postprandial blood glucose is a stronger predictor of cardiovascular events than fasting blood glucose in type 2 diabetes mellitus, particularly in women: lessons from the San Luigi Gonzaga Diabetes Study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, n.3, p.813-819, 2006.
- CERMAK, R.; LANDGRAF, S.; WOLFFRAM, S. Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejum, **British Journal of Nutrition**, v.91, p.849-855, 2004.
- CERRIELO, A.; QUAGLIARO, L.; PICONI, L.; ASSALONI, R.; DA ROS, R.; MAIER, A.; ESPOSITO, K.; GIULIANO, D. Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. **Diabetes**, v.53, n.3, p.701-710, 2004.
- CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive

- compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, n.2, p.184-190, 2007.
- CHERNIACK, E.P. Polyphenols: Planting the seeds of treatment for metabolic syndrome. **Nutrition**, v.27, n.6, p.617-623, 2011.
- CHOI, SIU-WAY; BENZIE I.F.F.; MA, SHUK-WOON; STRAIN, J.J.; HANNIGAN B.M. Acute hyperglycemia and oxidative stress: Direct cause and effect? **Free Radical Biology & Medicine**, v.44, p.1217–1231, 2008.
- CONTREAS-CALDERÓN, J.; CALDERÓN-JAIMES, L.; GUERRA-HERNANDÉZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v.44, p.2047–2053, 2011.
- CORRÊA, F.; NOGUEIRA, V.G.; BEVILÁQUIA, M.F.; GOMES, M.B. Avaliação da secreção e resistência insulínica em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose - do metabolismo normal ao diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia Metabologia**, v.51, n.9, 2007.
- COS, P.; DE BRUYNE, N.; HERMANS, N.; APERS, S.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A.J. Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. **Current medicinal chemistry**, v.10, p.1345-1359, 2003.
- COUTO, R.O.; VALGAS, A.B.; BARA, M.T.; PAULA, J.R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC (MYRTACEAE). **Revista eletrônica de farmácia**, v.4, n.3, p.59-69, 2009.
- CROZIER, A.; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. **Molecular Aspects of Medicine**, v.31, p.446-467, 2010.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I.B; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v.26, p.1001-1043, 2009.
- CRUZ, R.; CASAL, S. Validation of a fast and accurate chromatographic method for detailed quantification of vitamin E in green leafy vegetables. **Food Chemistry**, v.141, p.1175-1180, 2012.
- D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Istituto Superior di Sanità**, v.43, n.4, p.348-361, 2007.
- DÁVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVES, C.; BARTOLOME, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.48-54, 2004.
- DE LANGE, D.W.; VERHEOF, S.; GORTER, G.; KRAAIJENHAGEN, R.J.; VAN DE WIEL, A.; AKKERMAN, J.W.N. Polyphenolic grape extract inhibits platelet activation through PECAM-1: an explanation for the French paradox. **Alcohol Clinical Experimental Research**, v.31, p.1308–1314, 2007.

- DE SOUZA, P.M.; SALES, P.M.; SIMEONI, L.A.; SILVA, E.C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P.O. Inhibitory activity of α -amilase and α -glicosidase by plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Medica**, v.78, p.393–399, 2012.
- DEJONG, S.; LANARI, M.C. Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork: Contribution of individual phenolics to the antioxidant activity of the extract. **Food Chemistry**, v.116, n.4, p.892-897, 2009.
- DEL RIO, D.; COSTA, L. G.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Polyphenols and health: What compounds are involved? **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.20, p.1-6, 2010.
- DESPRES, J.P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v.444, n.7121, p.881-887, 2006.
- DEVALAJARA, S.; JAIN, S.; YADAV, H. Exotic fruits as therapeutic complements for diabetes, obesity and metabolic syndrome. **Food Research International**, v.44, p.1856-1865, 2011.
- DIAS, R.G.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, M.H. Nitric Oxide and the Cardiovascular System, Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**, v.96, n.1, p.68-75, 2011.
- DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas brasileiras**. Jaboticabal: Novos Talentos, 2002.
- DONOVAN, J.L.; MANACH, C.; FAULKS, R.M.; KROON, P.A., Absorption and metabolism of dietary secondary metabolites. In: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.), **Plant Secondary Metabolites**. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Blackwell Publishing, Oxford, New York, p. 303–351, 2006.
- DUBOIS, M.; GILLE, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.
- DYER, J.; WOOD, I.S.; PALEJWALA, A.; ELLIS, A.; SHIRAZI-BEECHEY, S.P. Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. *Am. J. Physiol.* **Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 282, p.241–248, 2002.
- ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; ZIMMET, P.Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, v.365, p.1415–1428. 2005.
- ENGLYST, K.N.; ENGLYST, H.N. Carbohydrate bioavailability. **British Journal of Nutrition**, v.94, p.1-11, 2005.
- FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Food energy – **Methods of Analysis and Conversion Factors**, Roma, 2003.
- FERNANDEZ-REAL, J.M.; RICART, W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. **Endocrine Reviews**, v.24, p. 278–301, 2003.

- FORD, E.S. Prevalence of the metabolic syndrome in US populations, **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v. 33, n.2, p.333-350, 2004.
- GALIC, S.; OAKHILL, J.S.; STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.316, n.2, p.129-139, 2010.
- GENOVESE, M. I.; SANTOS, R. J.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n.3, p. 67-69, 2003.
- GENOVESE, M.I.; DA SILVA PINTO, M.; GONÇALVES, A.E.S.S.; LAJOLO, F.M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v.14, p.207–214, 2008.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, p.374-381, 2007.
- GONÇALVES, A.E.S.S.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Chemical composition and Antioxidant/Antidiabet potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.8, 2010.
- GRUSSU, D.; STEWART, D.; MCDUGALL, G.J. Berry polyphenols inhibit (+or-) amylase in vitro: identifying active components in rowanberry and raspberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.6, p.2324-2331, 2011.
- HANHINEVA, K.; TÖRRÖNEN, R.; BONDIA-PONS, I.; PEKKINEN, J.; KOLEHMAINEN, M.; MYKKÄNEN, H.; POUTANEN, K. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, p.1365-1402, 2010.
- HARNLY, J.M.; DOHERTY, R.F.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; BHAGNAT, S.; GEBHARDT, S. Flavonoid content of US fruits, vegetables, and nuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.9966–9977, 2007.
- HASEGAWA, G.; YAMAMOTO, Y.; ZHI, J.G.; TANINO, Y.; YANASAKI, M.; YANO, M.; NAKAJIMA, T.; FUKUI, M.; YOSHIKAWA, T.; NAKAMURA, N. Daily profile of plasma %CoQ10 level, a biomarker of oxidative stress, in patients with diabetes manifesting postprandial hyperglycaemia, **Acta Diabetologica**, v.42, n.4, p.179-181, 2005.
- HE, Y.X.; LIU, X.D.; WANG, X.T.; WANG, G.J.; XIE, L. Sodium-dependent Glucose Transporter Was Involved in Salidroside Absorption in Intestine of Rats. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.7, n.6, p.444-448, 2009.
- HEISS, C.; JAHN, S.; TAYOR, M.; REAL, W.M.; ANGELI, F.S.; WRONG, M.L.; AMABILE, N.; PRASAD, M.; RADDAD, T.; OTTAVIANI, J.I.; MIHARDJA, S.; KEEN, C.L.; SPRINGER, M.L.; BOYLE, A.; GROSSMAN, W.; GLANTZ, S.A.; SCHROETER, H.; YEGHIZARIANS, Y. Improvement of endothelial function with dietary flavanols in associated with mobilization of circulating angiogenic cells in patients with coronary artery disease. **The Journal of American College of Cardiology**, v.56, p.218–224, 2010.
- HU, G.; QIAO, Q.; TIOMILEHTO, J.; BALKAU, B.; BORCH-JOHNSEN, K.; PYORALA, K.

- Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. **Archives of Internal Medicine**, v.164, n.10, p.1066–1076, 2004.
- HUANG, S, CZECH, M.P. The GLUT 4 glucose transporter. **Cell Metabolism**, v.5, n.4, p.237-252, 2007.
- HUSSEIN, S.A.M.; HASHEM, A.N.M.; SELIEM, M.A.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M.A.M. Polyoxigenated flavonoids from *Eugenia edulis*. **Phytochemistry**, v.64, p.883-889, 2003.
- JOSSE, A.R.; KENDALL, C.W.C.; AUGUSTIN, L.S.A.; ELLIS, P.R.; JENKINS, D.J.A. Almonds and posprandial glycemia - a dose-response study. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.56, p.400-404, 2007.
- KELLET, G.L.; BROT-LAROCHE, E.; MACE, O.J.; LETURQUE, A. Sugar absorption in the intestine: The role of GLUT2. **Annual Review of Nutrition**, v.28, p.35-54, 2008.
- KERSHAW, E.E.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.89, p.2548-2556, 2004.
- KNOWN, O.; ECK, P.; CHEN, S.; CHRISTOPHER, P.C.; LEE, J.; KRUHLAK, M.; LEVINE, M. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. **The FASEB Journal**, v.21, p.366-377, 2007.
- KRENTZ, A.J.; BAILEY, C.J. Oral antidiabetic agents current role in type 2 diabetes mellitus. **Drugs**, v.65, p.385–411, 2005.
- LEITÃO, M.P.C.; MARTINS, I.S. Prevalência e fatores associados à síndrome metabólica em usuários de Unidades Básicas de Saúde em São Paulo – SP. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.58, n.1, p.60-69, 2012.
- LETERME, P.; BULDGEN, A.; ESTRADA, F.; LONDOÑO, A.M. Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. **Food Chemistry**, v.95, p.644–652, 2006.
- LIMA, T.B.; SILVA, O.N.; OLIVEIRA, J.T.; VASCONCELOS, I.M.; ROCHA, T.L.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; SILVA, L.P.; GUADAGNIN, R.V.; QUIRINO, B.F.; CASTRO, C.F.; LENARDECZ, E.; FRANCO, O.L. Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: a novel strategy in the treatment chronic constipation and irritable bowel syndrome. **Peptides**, v.31, n.8, p.1426–1433, 2010.
- LIU, H.; QIU, N.; DING, H.; YAO, R. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. **Food Research International**, v.41, p.363–370, 2008.
- MAGGE, S.N.; PRASAD, D.; KOREN, D.; GALLAGHER, P.R.; MOHLER, E.R.; STETTLER, N.; LAVITT KATZ, L.E.; RADER, D.J. Prediabetic Obese Adolescents have a More Atherogenic Lipoprotein Profile Compared with Normoglycemic Obese Peers. **The Journal of Pediatrics**, v.161, n.5, 2012.

- MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans, Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, p.2300-242, 2005.
- MANZANO, S.; WILLIAMSON, G. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 1773–1780, 2010.
- MAR LARROSA, M.T.G.C.; ESPÍN, J.C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. **Molecular Aspects of Medicine**, v.31, n.6, p.513-519, 2010.
- MARTÍNEZ, J. A. Mitochondrial oxidative stress and inflammation: A slalom to obesity and insulin resistance. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v.62, p.303–306, 2006.
- MCCUE, P.; KWON, Y.; SHETTY, K. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods. **Journal of Food Biochemistry**, v.29, n.3, p.278-294, 2005.
- MEYDANI, M.; HASAN, S. T. Dietary Polyphenols and Obesity (review). **Nutrients**, v.2, p. 737-751, 2010.
- MIRBAGHERI, S.A.; RASHIDI, A.; ADBI, S.; SAEDI, D.; ABOUZARI, M. Liver: an alarm for the heart? **Liver International**, v.27, n.7, p.881-894, 2007.
- MOEBUS, S.; HANISH, J.U.; NEUHÄUSER, M.; AIDELSBUEGER, P.; WASEM, J.; JÖCKEL, K. Assessing the prevalence of the metabolic syndrome according to NCEP ATP III in Germany: feasibility and quality aspects of a two step approach in 1550 randomly selected primary health care practices. **GMS German Medical Science**, v.4, ISSN 1612-3174 , 2006.
- MOHAMED, S. Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease. **Food Science and Technology**, v.35, p.114-128, 2014.
- MONTELLA, R.; COISÖN, J.D.; TRAVAGLIA, F.; LOCATELLI, M.; MALFA, P.; MARTELLI, A.; ARLORIO, M. Bioactive compounds from hazelnut skin (*Corylus avellana* L.). Effects on *Lactobacillus plantarum* P17630 and *Lactobacillus crispatus* P17631. **Journal of functional foods**, v.5. p.306-315, 2013.
- MURRAY, D. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica ilustrada**, 27 edição, Mc Graw-Hill: São Paulo, 2008.
- NAKAI, M., FUKUI, Y., ASAMI, S., TOYODA-ONO, Y., IWASHITA, T., SHIBATA, H., MITSUNAGA, T.; HASHIMOTO, F., KISO, Y. Inhibitory Effects of Oolong Tea Polyphenols on Pancreatic Lipase in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.53, n.11, p.4593-4598, 2005.
- NELIGAN, P. J. Metabolic syndrome: Anesthesia for morbid obesity. **Current Opinions in Anaesthesiology**, v.23, p.375–383, 2010.
- OLIVEIRA, E.P.; SOUZA, M.L.A.; LIMA, M.D.A. Prevalência de síndrome metabólica em uma área rural do semi-árido baiano. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**,

- v.50, n.3, p.456-465, 2006.
- ORIoT, P.; FEYS, J.L.; MERTENS DE WILMARNs, S.; MISSON, A.; AYACHE, L.; FAGNART, O.; GRUSSON, D.; LUTS, A.; JAMART, J.; HERMANS, M.P.; UYSSCHAERT, M. Insulin sensitivity, adjusted β -cell function and adiponectinaemia among lean drug-naïve schizophrenic patients treated with atypical antipsychotic drugs: A nine-month prospective study. **Diabetes & Metabolism**, v.34, n.5, p.490-496, 2008.
- PALAHRES, D. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae Jussieu). **Revista Lecta**, v.21, p.29–36, 2003.
- PÄLLIN, T.P.R.; RAUDSEPP, P.; SOIDLA, R.; REI, M. Inhibition of lipid oxidation and dynamics of polyphenol content in mechanically deboned meat supplemented with sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berry residues. **Food Chemistry**, v.107, n.2, p.714–721, 2008.
- PATELA, J.R.; TRIPATHIB, P.; SHARMAA, V.; CHAUHANA, N.S.; DIXITA, V.K. *Phyllanthus amarus*: Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.138, p.286–313, 2011.
- 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, p.1629-1635, 2008.
- PISTROSH, F.; SHARPER, F.; PASSAUER, J.; KOEHLER, C.; BORNSTERIN, S.R.; HANEFELD, M. Effects is alpha glucosidase inhibitor acarbose on endothelial function after mixed meal in newly diagnosed type 2 diabetes. **Hormone and metabolic research**, v.41, p.104-108, 2009.
- PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v.25, p.223-230, 1986.
- PRANDOTA, J. Metabolic, immune, epigenetic, endocrine and phenotypic abnormalities found in individuals with autism spectrum disorders, Down syndrome and Alzheimer disease may be caused by congenital and/or acquired chronic cerebral toxoplasmosis. **Research in Autism Spectrum Disorders**, v.5, p.14-59, 2011.
- RIZZOLO, A.; FORNI, E.; POLESELO, A. HPLC assay of ascorbic acid in fresh and vegetables. **Food Chemistry**, v.14, p.189-199, 1984.
- ROCHFORT, S.; PANOZZO, J. Phytochemicals for health, the role of pulses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.7981–7994, 2007.
- SANTOS, A.C.; LOPES, C.; Barros, H.; Prevalência de síndrome metabólica na cidade do Porto. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v.23, n. 1, p.45-52, 2004.
- SANTOS, C.E.; SCHRANK, Y.; KUPFER, R. R. Análise crítica dos critérios da OMS, IDF e NCEP para síndrome metabólica em pacientes portadores de diabetes melito tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.59, n.9, p.1096-1102, 2009.

- SCHEEPERS, A.; JOOST, H.G.; SCHÜRMANN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.28, n.5, p.364–371, 2004.
- SILHA, J.V.; KRSEK, M.; SUCHARDA, P.; MURPHY, L.J. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. **International Journal of Obesity**, v.29, p.1308–1314, 2005.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.
- SOUZA, L.J.; GICOVATE NETO, C.; CHALITA, F.E.B.; REIS, A.F.F.; BASTOS, D.A.; SOUTO FILHO, J.T.D.; SOUZA, T.F.; CÔRTEZ, V.A. Prevalência de obesidade e fatores de risco cardiovascular em Campos, Rio de Janeiro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.47, n.6, p.669-676, 2003.
- STAS, S.N.; EL-ATAT, F.A. SOWERS, R. Pathogenesis of hypertension in diabetes. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v.5, p.221-225, 2004.
- STERN, M.P.; WILLIAMNS, K.; GONZALEZ-VILLALPANDO, C.; HUNT, K.J.; HAFFNER, S.M.; Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? **Diabetes Care**, v.27, p.2676–2681, 2004.
- TAHRANI, A.A.; BARNETT, A.H.; BAILEY, C.J. SGLT inhibitors in a management of diabetes. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v.1, n.2, p.140-151, 2013.
- TORMO, M.A.; GIL-EXOJO, I.; TEJADA, A.R.; CAMPILLO, J.E. White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycemia in type 2 diabetic rats. **British Journal of Nutrition**, v.96, p.539–544, 2006.
- TÖRRÖNEN, R.; SARKKINEN, E.; TAPOLA, N.; HAUTANIEMI, E.; KILPI, K.; NISKANEN, L. Berries modify the postprandial plasma glucose response to sucrose in healthy subjects. **British Journal of Nutrition**, v.103, n.8, p.1094-1097, 2010.
- TULL, E.S.; THURLAND, A.; LAPORTE, R.E. Metabolic syndrome among Caribbean-born persons living in the U.S. Virgin Islands. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v.18, n.6, p. 418-426, 2005.
- USDA-UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, agricultural Research Service, Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, 2010. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/services/docs.htm?docid=15866>> Acesso em 10/04/2014.
- VACHAHARAJANI, V.; GRANGER, D.N. Adipose tissue: a motor for the inflammation associated with obesity. **Life**, v.61, p. 424–430, 2009.
- VALKON, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D. MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.
- WEISS, E.P.; BRAUNDAUER, J.; KULAPUTANA, O.; GHIU, I.; WOHN, C.R.; PHARES, D.A.; SHULDINERM A.R.; HAGBERG, J.M. FABP2 Ala54Thr genotype is associated with

glucoregulatory function and lipid oxidation after a high-fat meal in sedentary nondiabetic men and woman. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.85, n.1, p.102-108, 2007.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011. **Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I: Diagnosis and classification of diabetes mellitus**. Disponível em: < <http://www.who.int/diabetes/publications/en/>>, acesso em: 08/02/2014.

WILLIAMSON, G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.57, n.1, p.48-57, 2013.

WORTHINGTON V; Alpha amylase. In: **Worthington Enzyme Manual**. Worthington Biochemical Corp. Freehold, NJ, p. 36-41, 1993.

YAHIA, E.M.; LAROSA, L.; PARRILLA, E.A.; GONZÁLEZ-AGUIAR, G.A. **The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. Phytochemicals: Chemistry, nutritional and stability**, Oxford: Wiley-Blackwell, p.3-51, 2010.

YANG, Y., SANTAMARI, P. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. **Clinical Science**, v.110, p.627-639, 2006.

YILMAZER-MUSA, M.; GRIFFITH, A.M.; MICHELS, A.J., SCHNEIDER, E.; FREI, B. Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α -amylase and α -glucosidase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.8924-8929, 2012.

ZHAO, L.; ZHANG, S.L.; TAO, J.Y.; PANG, R.; JIN, F.; GUO, Y.J.; DONG, J.H.; YE, P.; ZHAO, H.Y.; ZHENG, G.H. Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of corilagin (b-1-O-galloyl-3, 6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose) in vitro. **International Immunopharmacology**, v.8, p.1059–1064, 2008.

7. Anexos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :SEXO- M ☐ F DATA NASC.
/...../.....
 ENDEREÇO Nº.....APT.....
 BAIRRO:..... CIDADE.....CEP:.....
 TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

.....
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:

 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD

DADOS SOBRE A PESQUISA - TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA -“ Efeito dos sucos de frutas da família Myrtaceae sobre a glicemia pós prandial em pre-diabéticos “

PESQUISADORES : Profa. Dra Maria Ines Genovese : Profa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em colaboração com Dra.Rosa Ferreira dos Santos. : Médica, Inscrição no Conselho Regional de Medicina nº 15871 Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio, LIM-18 Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do HCFMUSP

AValiação DO RISCO DA PESQUISA : RISCO MÍNIMO() RISCO MÉDIO() RISCO BAIXO(X) RISCO MAIOR()

DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

1 – **Desenho do estudo e objetivo(s)** . O diabetes tipo 2 (DM2) é uma das doenças mais prevalentes nos dias de hoje em todo o mundo e, caracteriza-se pela presença de níveis altos de açúcar no sangue, que levam às complicações do diabetes como: Hipertensão arterial, Infarto do miocárdio, Acidente vascular cerebral, Insuficiência dos rins, Cegueira, etc. Quanto melhor controlado estiver o açúcar no sangue, menores serão as chances do paciente ter essas complicações. Várias pesquisas na Europa e Ásia principalmente, tem mostrado que algumas frutas pertencentes ao grupo das **Myrtaceae**, como a **jabuticaba, cambuci e araçá** , tem o efeito de abaixar o açúcar no sangue, e essas frutas já são muito conhecidas para os brasileiros, por serem comuns principalmente na Amazônia. O objetivo desta pesquisa é avaliar o efeito do suco dessas frutas sobre as taxas de açúcar no sangue após as refeições, em indivíduos pré-diabéticos O estudo consta do seguinte : O paciente comparece às 7 hs da manhã, em jejum de 8 horas, à sala de testes do ambulatório de Endocrinologia e Metabologia do HCFMUSP. Será acomodado,

por uma enfermeira, em cadeira reclinável, confortável, onde permanecerá durante a realização do teste. Cada paciente se submeterá ao teste de tolerância à glicose duas vezes, com intervalo de uma semana entre um e outro. **TESTE** : consta do seguinte: A veia do antebraço é puncionada e, mantida com cateter apropriado para retirada de 4 ml de sangue nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 minutos, mais 10 ml nos tempos 0 e 180 min. Após colher sangue no tempo 0 (primeira coleta), o paciente receberá um pãozinho francês de 50 gr para comer em no máximo 10 min. No primeiro teste o paciente receberá apenas o pãozinho e no segundo teste, além do pãozinho, receberá um copo, 300 ml, de suco de uma fruta da família Myrtaceae, conhecida como cagaita. Anexo a este TCLE, o Sr(a) vai receber uma matéria sobre essas fruta, que é rica em compostos fenólicos e, que reduz as taxas de açúcar no sangue após as refeições.

Convidamos o Sr (a) a VOLUNTARIAMENTE a realizar o teste de refeição com um pãozinho francês para participar desse estudo

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados- O Sr (a) passará por uma consulta médica com hora marcada, na Liga de Síndrome metabólica , após a qual serão agendados dois dias para a realização dos testes.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados –Exame físico, medidas de : pressão arterial, cintura, quadril, peso e altura, coleta de sangue para dosagens laboratoriais.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3 - O desconforto do Teste da refeição é ter a veia do antebraço puncionada e, permanecer em cadeira estofada, reclinável, com um cateter na veia do antebraço, durante 3 horas.

5 – Benefícios para o participante – Prevenção do diabetes e suas conseqüências.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar; Não há

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, o Sr(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a médica Dra **Rosa Ferreira dos Santos em colaboração com a Profa Maria Ines Genovese e a nutricionista Renata Luise Araujo. A Dra Rosa pode ser encontrada no endereço Avenida Dr. Arnaldo, 455 3º andar sala 3324** Telefone(s) (11) 3061-7258 e celular 983131727; a **farmacêutica Dra Maria Ines Genovese, e a nutricionista Renata Luise de Araujo**, nos telefones 3091/4238 e 1525, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Av Prof Lineu Prestes, 580 Bloco 14 . Se o Sr(a) tiverem alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade – Os resultados das coletas de sangue são confidenciais. Não será divulgada a identificação de nenhum paciente.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação, exceto para traslado de casa para instituição e vice e versa. Ao final da pesquisa o voluntário receberá uma quantia em dinheiro equivalente ao valor gasto com transporte público, pela verba financeira da pesquisa. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.“Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo” Eu discuti com a Dra. Rosa Ferreira dos Santos e com a nutricionista Renata Luise Araujo, sobre a minha decisão em participar

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de sucos de frutas da família Myrtaceae sobre a glicemia pós-prandial em pré-diabéticos

Pesquisador: MARIA INES GENOVESE RODRIGUEZ

Área Temática: Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

Versão: 3

CAAE: 16311113.0.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 502.938

Data da Relatoria: 22/01/2014

Apresentação do Projeto:

Efeito de sucos de frutas da família Myrtaceae sobre a glicemia pós-prandial em pré-diabéticos

Objetivo da Pesquisa:

Estudar o efeito dos sucos de frutas da família Myrtaceae sobre a hiperglicemia pós-prandial e capacidade antioxidante do plasma em seres humanos pré-diabéticos após o consumo de uma unidade de pão francês

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

nenhum

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

nenhum

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

nenhum

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sugerimos aprovação do estudo por não apresentar pendências éticas

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 502.938

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 20 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de sucos de frutas da família Myrtaceae sobre a glicemia pós-prandial em pré-diabéticos

Pesquisador: MARIA INES GENOVESE RODRIGUEZ

Área Temática: Área 4. Equipamentos, insumos e dispositivos para saúde novos, ou não registrados no país.

Versão: 2

CAAE: 16311113.0.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 373.615

Data da Relatoria: 29/07/2013

Apresentação do Projeto:

A incidência do diabetes do tipo 2 tomou proporções epidêmicas nos últimos anos, atingindo bilhões de indivíduos em todo o mundo, e encontra-se em contínuo crescimento. Nesse sentido, inovações na área científica, capazes de prevenir e/ou tratar essa patologia, tornam-se relevantes para amenizar seus impactos na saúde pública. Como indivíduos pré-diabéticos apresentam resposta glicêmica alterada quando comparados aos saudáveis, a confirmação dos efeitos dos sucos de Mirtáceas em hiperglicêmicos apresenta enorme potencial, como adjunto à dieta, em contribuir com a redução dos picos de glicemia dos mesmos. Estudos vêm mostrando que compostos bioativos fenólicos podem ser capazes de influenciar o metabolismo de carboidratos, sendo assim uma alternativa para a população portadora dessa doença. Algumas frutas nativas brasileiras podem ser consideradas excelentes fontes de compostos bioativos de natureza fenólica, como, por exemplo, as frutas da família Myrtaceae, como cambuci, jabuticaba, camu-camu e cagaita, cujos compostos fenólicos são capazes de inibir as enzimas do metabolismo de carboidratos alfa-amilase e alfa-glicosidase in vitro e cujos sucos clarificados são capazes de diminuir a glicemia pós-prandial, em cerca de 20 a 60%, em indivíduos saudáveis. Ao longo da introdução, vários estudos foram citados mostrando que as frutas que serão empregadas são fontes de compostos bioativos fenólicos.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfcb@usp.br

Continuação do Parecer: 373.615

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do estudo proposto é avaliar o efeito de sucos de frutas nativas brasileiras, da família das Mirtáceas, sobre a glicemia pós-prandial e a capacidade antioxidante em seres humanos pré-diabéticos, após consumo de 25 g de carboidratos disponíveis provenientes de pão branco (aproximadamente 1 pão francês de 50 g), utilizando somente frutas de plantações comerciais e com comprovação da segurança de uso por histórico de consumo pela população.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco do estudo foi considerado baixo pelos pesquisadores e está relacionado ao procedimento de coleta de sangue. Os participantes serão assistidos durante todo o procedimento, por equipe especializada do ambulatório de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os benefícios foram adequadamente descritos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante, está justificado, fará uso de instrumentos de observação reconhecidos pela comunidade científica, sendo que as exigências contidas na Resolução 466/12, visando a proteção dos participantes, foram abordadas e consideradas de modo adequado pelos pesquisadores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está formulado em linguagem clara e acessível, na forma de convite, e atende as exigências previstas na Resolução 466/12.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As sugestões anteriores foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Em face ao exposto, este CEP recomenda a aprovação do presente protocolo de pesquisa.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfcb@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 373.615

SAO PAULO, 27 de Agosto de 2013

Assinador por:
Cristina Helena dos Reis Serra
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcb@usp.br