UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos

Área de Bromatologia

Biodisponibilidade dos compostos fenólicos de *Eugenia dysenterica* DC e efeito sobre as respostas glicêmica, insulinêmica e incretínica de indivíduos portadores de síndrome metabólica e disglicemia

Renata Luise de Araujo

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos

Área de Bromatologia

Biodisponibilidade dos compostos fenólicos de *Eugenia dysenterica* DC e efeito sobre as respostas glicêmica, insulinêmica e incretínica de indivíduos portadores de síndrome metabólica e disglicemia

Renata Luise de Araujo

Versão Corrigida

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

AA663b

Araujo, Renata Luise de
Biodisponibilidade dos compostos fenólicos de Eugenia dysenterica DC e efeito sobre as respostas glicêmica, insulinêmica e incretínica de indivíduos portadores de síndrome metabólica e disglicemia / Renata Luise de Araujo. - São Paulo, 2019.
94 p.

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

1. elagitaninos. 2. hiperglicemia pós-prandial. 3. cagaita. 4. biodisponibilidade. 5. compostos fenólicos. I. T. II. Genovese, Maria Inés, orientador.

RENATA LUISE DE ARAUJO

Biodisponibilidade dos compostos fenólicos de *Eugenia dysenterica* DC e efeito sobre as respostas glicêmica, insulinêmica e incretínica de indivíduos portadores de síndrome metabólica e disglicemia

Comissão julgadora da

Tese para obtenção do grau de Doutor

_____

Prof. Dr. Maria Inés Genovese

Orientador

_____

1º examinador

_____

2º examinador

_____

3º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2019.

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 últimos anos de trabalho, que resultaram em uma dissertação de mestrado e esta tese de doutorado, pessoas e instituições me apoiaram. Agora que alcanço meus objetivos, não poderia jamais deixar de reconhecê-las. Inicio esta sincera lista de agradecimentos pelas pessoas mais inspiradoras já conheci, meus pais Ana Luise e Renato. Agradeço pelo incentivo à minha formação pessoal e profissional.

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 doutorado 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 Carlos, Elias, Érika, Gabi Lima, Larissa, Márcio, Rafa e Rosa.

Ao Dr. Luciano Giacaglia, Dra. Eliana Bristiche e Dr. Fernando Moreno 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.

Agradeço a todos os colegas da Liga Acadêmica de Síndrome Metabólica: Fernanda Ferreira, Patrícia Rios, Raquel Pissigueli e Thayrine Moraes.

Outro agradecimento especial ao Prof. Dr. Tomás Barberán, e sua equipe, que me recepcionaram em seu laboratório na Espanha.

Finalmente, agradeço ao CNPq (142032/2015-8) pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro ao laboratório, bem como a FAPESP.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), processo: 8881.187903/2018-01.

Meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das principais classes de flavonoides Fonte: Adaptado de Del Rio *et al*., 2013 14

Figura 2. Estrutura básica dos elagitaninos: (A) ácido hexahidroxidifênico (HHDP); (B) unidade de galoil e (C) ácido elágico. Fonte: Adaptado de VILLALBA *et al*., 2019 15

Figura 3. Estruturas químicas dos principais elagitaninos e suas fontes na dieta 16

Figura 4. Bioconversão de elagitaninos a urolitinas. Fonte: Adaptado de NUÑEZ-SÁNCHEZ *et al*., 2014 26

Figura 5. Perfil cromatográfico a 280 nm dos sucos não clarificado (A) e clarificado (B) de cagaita 46

Figura 6. Perfil cromatográfico da cagaita após hidrólise ácida a 280 nm (A) e 360 nm (B) 53

Figura 7. Perfil cromatográfico da cagaita após catálise ácida na presença de floroglucinol 280 nm 55

Figura 8. Resposta glicêmica pós-prandial (A) e dos hormônios glicorreguladores insulina (B), peptídeo C (C) e GIP (D) nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos após do consumo das refeições testes: pão + 300 mL de água (controle); e pão + 300 mL de suco clarificado de cagaita. Média ± desvio padrão (n=12) 59

Figura 9. Resposta dos hormônios glicorreguladores GLP-1 (E) e GIP (D) nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos após do consumo das refeições testes: pão + 300 mL de água (controle); e pão + 300 mL de suco clarificado de cagaita. Média ± desvio padrão (n=12) 53

Figura 10. Resposta do hormônio grelina (G) nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos após do consumo das refeições testes: pão + 300 mL de água (controle); e pão + 300 mL de suco clarificado de cagaita. Média ± desvio padrão (n=12) 64

Figura 11. Pressões arteriais sistólica (A) e diastólica (B) após do consumo das refeições testes: pão + 300 mL de água (controle); e pão + 300 mL de suco clarificado de cagaita, Média ± desvio padrão (n=12) 66

Figura 12. Perfil cromatográfico a 305 nm e espectro ultravioleta-visível de IsoUro-A glicuronídeo presente na urina de 24 h de um voluntário, após o consumo do suco não clarificado de cagaita 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização química dos sucos de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC), clarificado e não clarificado, preparados a partir de polpas comerciais prontas para consumo, administrados aos voluntários 44

Tabela 2. Identificação dos fitoquímicos presentes na cagaita por CLAE-DAD-IT MS/MS 48

Tabela 3. Identificação dos fitoquímicos presentes na cagaita por CLUE-ESI-QTOF 50

Tabela 4. Quantificação de elagitaninos e galotaninos presentes nos sucos de cagaita, administrados aos voluntários 53

Tabela 5. Características clínicas e bioquímicas dos voluntários disglicêmicos e portadores de síndrome metabólica do estudo 57

Tabela 6. Características clínicas dos voluntários saudáveis que participaram do ensaio de biodisponibilidade 68

Tabela 7. Identificação de metabólitos presentes na urina de 24 h de indivíduos saudáveis que consumiram o suco não clarificado de cagaita 70

Tabela 8. Identificação de metabólitos presentes na urina de 24 h de indivíduos disglicêmicos portadores de síndrome metabólica 73

SUMÁRIO

1. Introdução 12

1.1. Compostos bioativos fenólicos em alimentos 12

1.2. Aspectos gerais da síndrome metabólica 19

1.3. Disglicemia na síndrome metabólica 20

1.4. Biodisponibilidade de compostos fenólicos 22

1.5. Cagaita 27

2. Objetivos 30

2.1. Objetivo geral 30

2.2. Objetivos específicos 31

3. Material e métodos 31

3.1. Material 31

3.2. Métodos 31

3.2.1. Determinação de açúcares totais. 31

3.2.2. Acidez total titulável 31

3.2.3. Determinação do potencial hidrogeniônico. 31

3.2.4. Determinação de fibras totais 31

3.2.5. Determinação dos fenólicos totais 32

3.2.6.1. Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) 32

3.2.6.2. Determinação do poder redutor do ferro – Método FRAP 33

3.2.6.3. Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) 34

3.2.7. Identificação e caracterização dos compostos fenólicos da cagaita 34

3.2.7.1. Identificação e caracterização dos compostos fenólicos da cagaita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de massas com analisador *íon trap* (CLAE-DAD-IT MS/MS) 35

3.2.7.2. Identificação e caracterização dos compostos fenólicos da cagaita por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com ionização por eletrospray acoplada a detector de massas de alta resolução quadrupolo-tempo de vôo (CLUE-ESI-QTOF) 35

3.2.7.3. Análise e quantificação de elagitaninos por hidrólise ácida 36

3.2.7.4. Análise de proantocianidinas por floroglucinólise 37

3.3. Determinação do efeito dos compostos fenólicos sobre a resposta de hormônios glicorreguladores no período pós-prandial – Protocolo de estudo 37

3.3.1. Indivíduos e modelo experimental 38

3.3.2. Refeições teste 39

3.3.3. Análises de glicemia 39

3.3.4. Análise de hormônios glicorreguladores e pressão arterial sistêmica 40

3.4. Avaliação da biodisponibilidade de compostos fenólicos de *Eugenia dysenterica* DC – Protocolo de estudo

3.4.1. Indivíduos e modelo experimental 41

3.4.2. Identificação de metabólitos de elagitaninos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um espectrômetro de massas com analisador quadrupolo simples CLAE-DAD-ESI-Q (MS) e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com ionização por eletrospray acoplada a detector de massas de alta resolução quadrupolo-tempo de vôo (CLUE-ESI-QTOF) 42

3.5. Análise dos resultados 43

4. Resultados e discussão 44

4.1. Caracterização química dos sucos de cagaita 44

4.2. Determinação do efeito dos compostos fenólicos sobre a resposta de hormônios glicorreguladores no período pós-prandial 56

4.2.1. Efeito dos compostos fenólicos sobre as respostas glicêmica e insulinêmica no período pós-prandial 58

4.2.2. Efeito dos compostos fenólicos sobre a resposta incretínica no período pós-prandial 62

4.2.3. Efeito dos compostos fenólicos sobre a resposta de grelina no período pós-prandial 64

4.2.4. Efeito dos compostos fenólicos sobre a pressão arterial sistêmica 65

4.3. Avaliação da biodisponibilidade de compostos fenólicos de *Eugenia dysenterica* DC 66

5. Conclusões 76

6. Referências 77

Anexo A 86

Anexo B 90

Anexo C 94

RESUMO

ARAUJO, R.L. **Biodisponibilidade dos compostos fenólicos de *Eugenia dysenterica* DC e efeito sobre as respostas glicêmica, insulinêmica e incretínica de indivíduos portadores de síndrome metabólica e disglicemia.** Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A cagaita (*Eugenia dysenterica* DC), pertencente à família das mirtáceas, é um fruto nativo do bioma Cerrado, rico em compostos bioativos fenólicos (CBF) que estão associados a diversos efeitos biológicos benéficos à saúde humana, tais como redução da resistência à insulina e inflamação sistêmica. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar quimicamente os compostos fenólicos presentes na cagaita, em especial os elagitaninos (ET), avaliar a biodisponibilidade dos ET presentes no suco de cagaita em seres humanos saudáveis e o seu efeito sobre as respostas glicêmica, insulinêmica e incretínica em indivíduos disglicêmicos, portadores de síndrome metabólica. A caracterização química dos CBF da cagaita foi realizada através de cromatografia líquida de ultra eficiência com ionização por eletrospray acoplada a detector de massas de alta resolução quadrupolo-tempo de vôo (CLUE-ESI-QTOF) e mostrou, de maneira inédita, a presença de elagitaninos como telimagrandina I e pedunculagina, além de derivados de ácido elágico, derivados de quercetina e derivados de miricetina. A biodisponibilidade dos ET da cagaita foi avaliada, após a administração do fruto na forma de suco a indivíduos saudáveis (n=16), por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas com analisador quadrupolo simples (CLAE-DAD-ESI-Q(MS)) e CLUE-ESI-QTOF. Foi possível observar pela primeira vez a metabolização destes compostos (ET) do fruto com a identificação dos metabotipos A (37%), metabotipos B (44%) e metabotipos 0 (19%). Quanto às respostas endócrinas, em voluntários disglicêmicos portadores de síndrome metabólica (n=12) observou-se a área abaixo da curva (AUC) de glicose reduzida em 53%, insulina 38%, GIP (polipeptídeo insulinotrópico dependente de glicose) 78% e peptídeo-C 58% ($p<0,05$), em relação ao controle. No entanto, os hormônios GLP-1 (peptídeo-1 semelhante ao glucagon), glucagon e grelina não apresentaram diferença significativa em relação à AUC ($p<0,05$), em comparação ao controle. Também não foi observada diminuição significativa nas pressões sistólica e diastólica dos indivíduos estudados, comparando-se ao controle. Conclui-se, portanto, que o perfil de CBF da cagaita se destaca pela presença de ET, tais como telimagrandina I, pedunculagina e galoil-HHDP-hexose, que são passíveis de metabolização, e o consumo do suco deste fruto é capaz de reduzir a glicemia pós-prandial em indivíduos disglicêmicos e portadores de síndrome metabólica.

PALAVRAS-CHAVES: elagitaninos, hiperglicemia pós-prandial, cagaita, biodisponibilidade

ABSTRACT

ARAUJO, R.L. **Bioavailability of phenolic compounds of *Eugenia dysenterica* DC and their effect on glycemic, insulinemic and incretinic responses in subject with metabolic syndrome and dysglycemia**. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) is a native fruit from Cerrado biome and belongs to Myrtaceae family. This fruit is rich in phenolic compounds, which are associated to human health benefits such as reduction of insulin resistance and systemic inflammation. The aim of this study was to characterize the phenolic composition of cagaita, specially in relation to ellagitannins (ET), to evaluate the bioavailability of ET present in cagaita juice in healthy subjects, and to evaluate the effect of cagaita juice on glycemic, insulinemic and incretinic responses in subjects with metabolic syndrome and dysglycemia. The chemical characterization of phenolic compounds was performed by ultra-performance liquid chromatography coupled to an accurate-mass quadrupole time-of-flight, with an electrospray ionization (ESI) system (UPLC-ESI-QTOF-MS/MS). The results showed, for the first time, the presence of ET such as tellimagrandin I, pedunculagin and galloyl-HHDP-hexoside, plus ellagic acid, quercetin and myricetin derivatives in cagaita fruit. The bioavailability of cagaita ET, after cagaita juice consumption by healthy subjects (n=16), was evaluated by high-performance liquid chromatography equipped with a photodiode-array detector and a single quadrupole (single Q) mass spectrometer (HPLC-DAD-ESI-Q (MS)) and UPLC-ESI-QTOF-MS/MS. It was observed, for the first time, the metabolization of cagaita ET to urolithin and volunteers were classified as metabotype A (37%), urolithin metabotype B (44%) e urolithin metabotype 0 (19%). In relation to the endocrine responses, subjects with metabolic syndrome and dysglycemia (n=12) showed reduction of area under the curve (AUC) of glucose in 53%, insulin in 38%, GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide) in 78% and C-peptide in 58% ($p<0.05$) after the consumption of cagaita juice along with bread. However, GLP-1 (glucagon-like peptide-1), glucagon and ghrelin were not affected by cagaita juice ingestion. There was no significant decrease in systolic and diastolic blood pressure, after cagaita juice consumption ($p<0.05$). In conclusion, the phenolic profile of cagaita stands out by the presence of ET, such as tellimagrandin I and pedunculagin and galloyl-HHDP-hexoside. These compounds can be metabolized into urolithins and the consumption of cagaita juice is able to reduce postprandial glycemia in dysglycemic subjects.

KEYWORDS: ellagitannins, postprandial hyperglycemia, cagaita, bioavailability

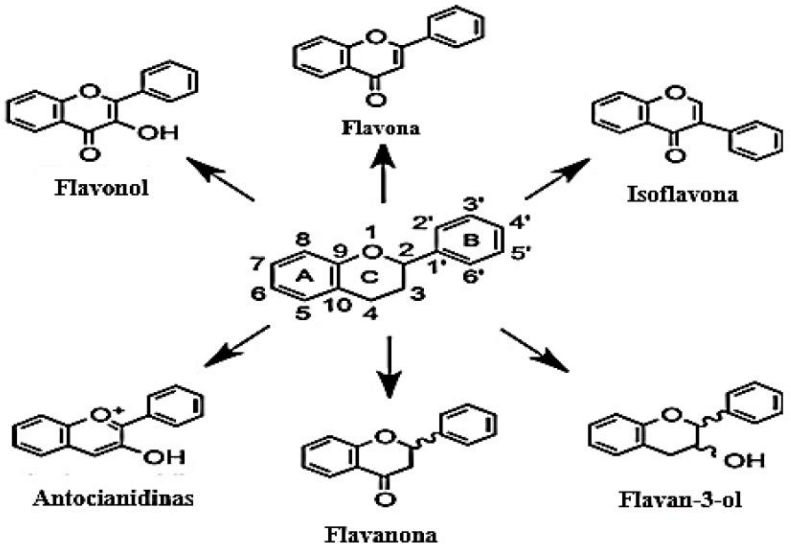
1. Introdução

1.1. Compostos bioativos fenólicos em alimentos

O consumo adequado de frutas e hortaliças é associado à promoção da saúde humana, devido ao seu papel na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis (YAHIA, 2010). Os guias de políticas públicas internacionais preconizam a ingestão de pelo menos 5 porções ou 400 g destes alimentos por dia (WHO, 2008). A relevância nutricional de frutas e hortaliças é atribuída ao conteúdo de fibras, carotenoides, vitamina C e minerais. Além destes macro e micronutrientes, os alimentos de origem vegetal são reconhecidos como fontes de compostos bioativos, também chamados de fitoquímicos. Dentre as distintas classes de compostos bioativos, destacam-se os polifenóis devido à expressiva quantidade de estudos que os relacionam com a saúde (BRESCIANI *et al*., 2017).

Os polifenóis apresentam, obrigatoriamente, o esqueleto fenólico em sua composição. No entanto, estes compostos variam extensamente em sua estrutura química, sendo divididos em duas diferentes classes: flavonoides e não flavonoides. 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 não flavonoides tais como os ácidos fenólicos abrangem os ácidos benzoicos e derivados (hidroxibenzoico, vanílico, gálico, por exemplo) e os ácidos cinâmicos e derivados (cumárico, cafeico, ferúlico, clorogênico, por exemplo)

Figura 1. Estrutura química dos flavonoides.



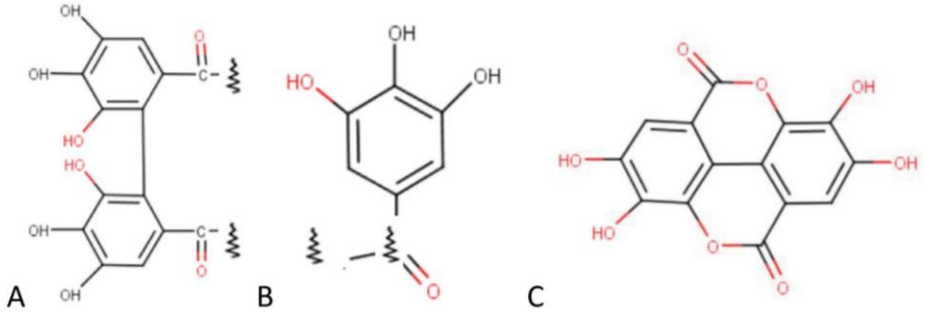
Fonte: Adaptado de DEL RIO *et al*., 2013.

Os taninos são polímeros de alto peso molecular, derivados dos flavan-3-ols, considerados não flavonoides. Tradicionalmente, podem ser divididos em três principais grupos, de acordo com suas características estruturais. São eles: proantocianidinas ou taninos condensados, galotaninos e elagitaninos, ambos conhecidos como taninos hidrolisáveis, e com menor distribuição na natureza os taninos complexos (DEL RIO *et al*., 2013; LANDETE, 2011). Os taninos hidrolisáveis, e principalmente os condensados, apresentam um importante papel no mecanismo de defesa no reino vegetal, uma vez que inibem o desenvolvimento de patógenos, promovem proteção contra radiação ultravioleta e estresse oxidativo da planta. A distribuição dos taninos hidrolisáveis é inferior em relação às proantocianidinas no reino vegetal. Os elagitaninos, no entanto, são encontrados em diversas plantas e frutos, ao passo que os galotaninos possuem distribuição mais limitada no reino vegetal (DEL RIO *et al*., 2013; LANDETE, 2011).

Os elagitaninos são formados por uma ou mais unidades do ácido hexahidroxidifênico (HHDP) esterificados a um açúcar, geralmente glicose, ou unidades de galoil, que ao passar pelo processo de hidrólise sofrem um rearranjo espontâneo, formando ácido elágico (**Figura 2**). Diversas estruturas podem ser formadas a partir do

HHDP, como dímeros, trímeros e polímeros. Os principais ET identificados em alimentos são punicalagina, sanguiina H-6, lambertianina C, pedunculagina e casuarictina (**Figura 3**) (VILLALBA *et al*., 2019).

Figura 2. Estrutura básica dos elagitaninos: (A) ácido hexahidroxidifênico (HHDP); (B) unidade de galoil e (C) ácido elágico.



Fonte: Adaptado de VILLALBA *et al*., 2019.

As fontes clássicas de elagitaninos na dieta, avaliadas por diversos estudos, são romã (*Punica granatum*), nozes (*Juglans regia*), morango (*Fragaria ananassa*) e frutas vermelhas como framboesa (*Rubus idaeus*) (LORENZO *et al*., 2018). No entanto, começou-se a observar que os elagitaninos não estariam restritos a estes alimentos. Frutas nativas brasileiras da família das mirtáceas, tais como camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC), araçá (*Psidium guineensis* Sw) e jaboticaba *(Myrciaria jaboticaba*) demonstraram ser excelentes fontes de elagitaninos (ABE *et al*., 2012; GONÇALVES *et al*., 2010).

Figura 3. Estruturas químicas dos principais elagitaninos e suas fontes na dieta.

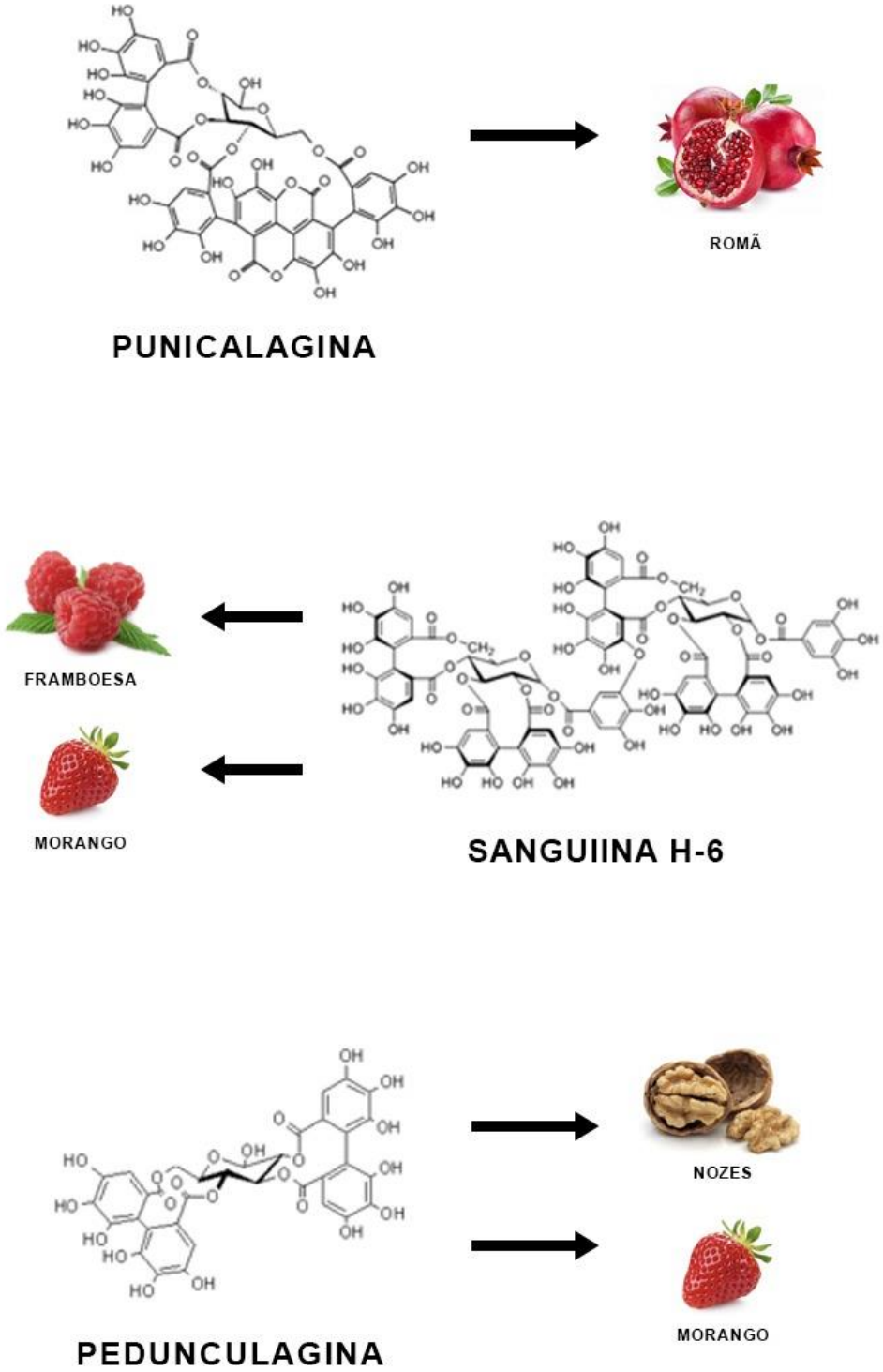
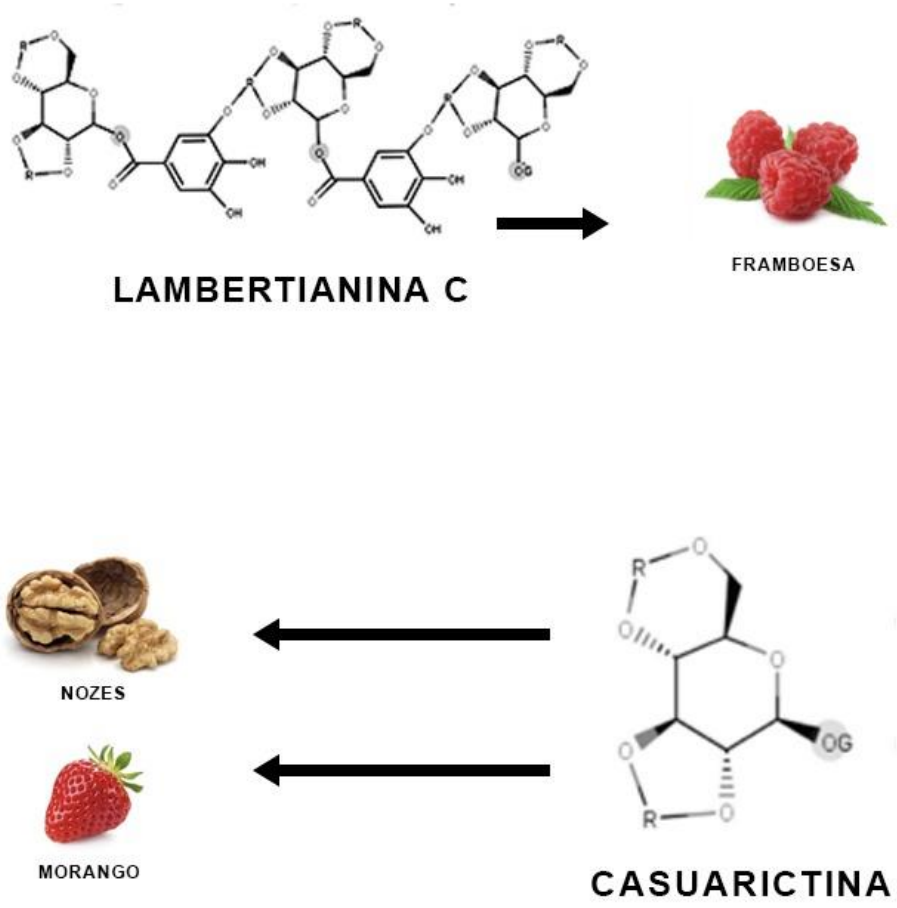


Figura 3. Estruturas químicas dos principais elagitaninos e suas fontes na dieta. Fonte:



Adaptado de LORENZO *et al*., 2018.

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 (ESTÉVEZ; XIONG, 2019).

Além de suas atribuições antioxidantes, estudos têm demonstrado que os polifenóis podem desempenhar um papel importante na redução do risco de doenças crônicas relacionadas a processos inflamatórios como diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares (YAHFOUFI *et al*., 2018).

1.2. Aspectos gerais da síndrome metabólica

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 a resistência à insulina e o excesso de adiposidade visceral, que conferem o aumento do risco para diabetes tipo II e doença cardiovascular aterosclerótica (GRANDL: WOLFRUM, 2017; McCRAKEN *et al*., 2018).

É de extrema relevância salientar que a SM 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. Suas características clínicas são baseadas na presença da resistência à insulina juntamente à adiposidade visceral, dislipidemia aterogênica (altos níveis de triacilgliceróis e LDL-colesterol, e redução do HDL-colesterol), disfunção endotelial, elevada pressão arterial sistêmica e um estado de hipercoagulação (GRANDL; WOLFRUM, 2017).

O aumento da quantidade de ácidos graxos livres circulantes (AGL), angiotensinogênio e citocinas pró-inflamatórias liberados pelo tecido adiposo, juntamente com a elevação da secreção de insulina, determinam uma correlação entre obesidade visceral, resistência à insulina e disfunção cardiovascular presentes na SM (McCRAKEN *et al*., 2018).

O tecido adiposo visceral, em excesso, resulta em um elevado *turnover* de (AGL) que alcançam a circulação portal e sistêmica. Estes AGL reduzem a sensibilidade à insulina no músculo esquelético, a captação hepática de glicose e a secreção pancreática de insulina e, paralelamente, aumentam a gliconeogênese, gerando um cenário propício à disglicemia (ROCHLANI *et al*., 2017).

Na obesidade visceral, a hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos (hipóxia) levam a um 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 adiposo causando inflamação que, associada ao elevado turnover de AGL 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, os adipócitos estão relacionados 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 (ROCHLANI *et al*., 2017).

O desenvolvimento da hipertensão arterial é provavelmente multifatorial, sendo parcialmente mediado por disfunção endotelial causada pela geração de EROs, ativação do sistema nervoso simpático induzido por hiperinsulinemia, inibição da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) e efeitos das citocinas inflamatórias derivadas do tecido adiposo visceral. Há também hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A hipertensão é um fator de risco altamente prevalente e significativo para o desenvolvimento de todas as manifestações das doenças cardiovasculares, incluindo doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, doença arterial aórtica e periférica e doença valvular cardíaca (LANDSBERG *et al*., 2013).

1.3. Disglicemia na síndrome metabólica

A manutenção da homeostase glicêmica está sob controle hormonal, cujo equilíbrio é de extrema importância para a fisiologia humana. O Diabetes Mellitus é uma desordem metabólica multifatorial caracterizada pela 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 (NAM

HAN *et al*., 2017). O diabetes mellitus tipo 1, também conhecido como insulino-dependente, caracteriza-se pela produção insuficiente de insulina. Já o diabetes mellitus tipo 2, (DM2) está associado à resistência à insulina (ADA, 2014).

Em condições fisiológicas, no estado pós-prandial, a concentração de glicose sérica aumenta assim como a secreção de insulina e, consequentemente, há a captação de glicose pelo fígado, músculos, rins e tecidos periféricos. As excursões de glicose são, portanto, mantidas dentro de uma faixa estreita, como resultado do efeito da insulina em seus órgãos-alvo. A resposta fisiológica da célula beta a um aumento na concentração de glicose no plasma é bifásica, com uma liberação de insulina de primeira fase (0 a 10 minutos) seguida de uma segunda fase estável e duradoura (ROCHLANI *et al*., 2017).

Indivíduos disglicêmicos manifestam anormalidades na ação e/ou secreção da insulina. Níveis elevados de glicose sérica no período pós-prandial geram um estado de hiperinsulinemia compensatória, sendo responsável pelo declínio progressivo da função das células β (glicotoxicidade) (SONG *et al*., 2015).

Diversas terapias farmacológicas são utilizadas para o tratamento da disglicemia. Os antidiabéticos orais, em geral, possuem quatro mecanismos de ação: incrementam a secreção pancreática de insulina (sulfonilureias e glinidas); reduzem a velocidade de absorção de carboidratos (acarbose); diminuem a produção hepática de glicose (biguadinas) e aumentam a utilização periférica de glicose (glitazonas) (CHAUDHURY *et al*., 2017). A estes antiabéticos orais foram adicionadas outras duas classes de fármacos. A primeira possui mecanismo de ação baseada nos efeitos incretínicos que são mediados pelos hormônios GLP-1 *(glucagon-like peptide-1*) e GIP *(glucose-dependent insulinotropic polypeptide),* considerados peptídeos insulinotrópicos dependente de glicose. Por esta razão são capazes de elevar a secreção de insulina somente quando há um aumento da glicemia. Pertencem a esta família medicamentos com ação similar ao do

GLP-1 (miméticos e análogos) e os inibidores da enzima dipeptidilpeptidase 4 (DPP-4). A inibição da enzima DPP-4 reduz a degradação do GLP-1, o que permite aumentar a secreção de insulina, reduzir a velocidade do esvaziamento gástrico e inibir a secreção de glucagon (FONSECA, 2014).

A segunda classe de fármacos compreende os inibidores do cotransportador sódio-glicose SGLT2, que inibem a recaptação de glicose pelo túbulo renal. Apresentam-se como uma forma de regular a glicemia de forma independente da secreção/ação da insulina (JUNG; JANG; PARK, 2014).

No entanto, devido aos efeitos colaterais, alto custo e redução da resposta após o uso em longo prazo da terapêutica farmacológica, utilizada para tratar a disglicemia associada à SM, novas alternativas para reduzir a glicemia têm sido amplamente estudadas. Neste contexto, alguns possíveis mecanismos de ação dos polifenóis são discutidos: inibição da atividade das enzimas relacionadas à digestão dos carboidratos e à gliconeogênese e inibição dos transportadores de glicose no intestino. Ainda, o aumento da expressão do GLUT4, do receptor de insulina e da secreção deste hormônio são observados entre os efeitos dos compostos fenólicos (HANHINEVA *et al*., 2010; SOLAYMAN *et al*., 2016).

1.4. Biodisponibilidade de compostos fenólicos

A biodisponibilidade é um conceito proveniente da farmacologia, definida como a quantidade administrada de uma droga, contida em uma fórmula farmacêutica, que alcança a circulação sistêmica e a velocidade necessária para este processo ocorrer (ANVISA, 2017). Esta definição conta com cinco processos integrados, tais como a liberação do composto pela matriz, absorção pelo organismo, distribuição, metabolização e excreção (ALMINGER *et al*., 2014). A associação do conceito de biodisponibilidade a

alimentos, ricos em compostos bioativos, é relativamente nova, e sustentou-se a partir das evidências de que o consumo destes alimentos seria benéfico à saúde humana (CROZIER *et al*., 2010). No entanto, a complexidade da matriz alimentar, a estrutura química do composto, e a ingestão associada a outros alimentos, interfere, facilitando ou dificultando, a sua absorção. Isto sugere que o consumo diário, e em altas quantidades de um polifenol, por exemplo, não garante que este composto irá exercer propriedades biológicas no tecido alvo (VELDERRAIN-RODRÍGUES *et al*., 2014).

Um dos principais objetivos da avaliação da biodisponibilidade de polifenóis é a identificação de biomarcadores, pois através destes alvos moleculares, as atividades biológicas e seus respectivos mecanismos de ação podem ser elucidados, ou ainda, a ingestão de alimentos fonte destes compostos por populações, bem como as associações entre dieta e saúde podem ser avaliadas. No entanto, para estabelecer um biomarcador a partir de um polifenol específico, a exploração de seus parâmetros farmacocinéticos é essencial (ZAMORA-ROS *et al*., 2012).

A biodisponibilidade dos taninos varia de acordo com o seu peso molecular, ou seja, moléculas menores tendem a ser mais solúveis em comparação com aquelas de maior peso molecular, que são mais insolúveis e em geral, apresentam-se associadas à proteínas, ou à parede celular (PALAFOX-CARLOS *et al*., 2011).

As proantocianidinas apresentam alto peso molecular, e por este motivo sua biodisponibilidade é limitada. Parece muito improvável que estes compostos sejam absorvidos de forma intacta e alcancem os tecidos alvos. O caminho proposto para estes compostos no organismo inicia-se com sua interação com as proteínas presentes na saliva, causando adstringência. Em seguida, atravessam o estômago e parecem resistir às condições ácidas. Entretanto, ao chegarem ao intestino delgado, as proantocianidinas complexam-se com proteínas e enzimas digestivas diminuindo sua absorção, nesta porção

intestinal. No cólon, as proantocianidinas, ainda intactas ou parcialmente hidrolisadas, são submetidas à biotransformação pela microbiota residente formando ácidos fenólicos e hipúrico e valerolactonas, que são passíves de absorção, metabolização colônica ou ainda, excreção (MENA *et al*., 2014). Os compostos que são absorvidos sofrem metabolização no fígado formando metabólitos sulfatados, glicuronidados e/ou metilados, através da ação das enzimas de fase II sulfotransferase (SULT), uridina 5'-difosfo glicuronosiltransferase (UGT) e catecol-*O*-metiltransferase (COMT). Estas biotransformações representam um processo metabólico de detoxificação, que facilita a eliminação biliar e urinária devido ao aumento da solubilidade destes compostos (CROZIER *et al*., 2010).

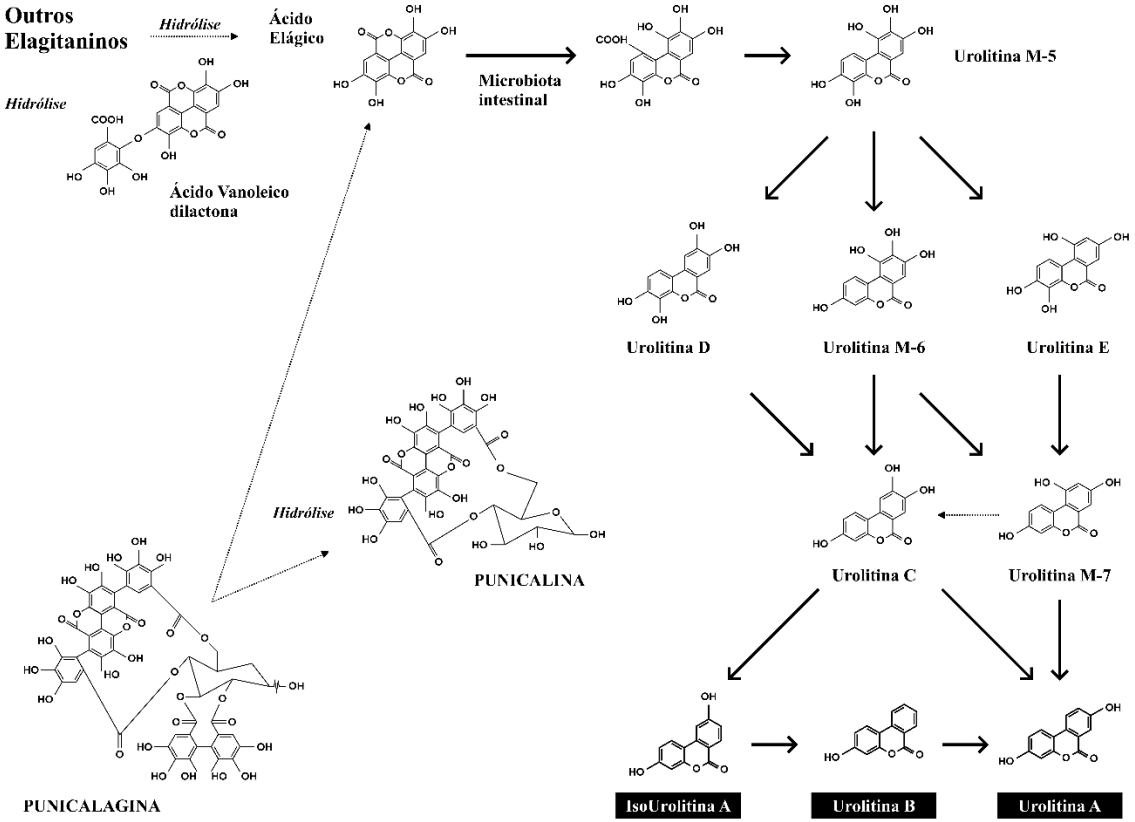
De forma similar às proantocianidinas, os elagitaninos não são metabolizados na cavidade oral, embora interajam com as proteínas salivares, causando sensação de adstringência. O ácido elágico livre, que pode estar presente em pequenas quantidades em alguns alimentos, é possivelmente absorvido pelo estômago, ao passo que os elagitaninos resistem ao meio ácido, e são conduzidos às porções posteriores do trato gastrointestinal. No intestino delgado, estes compostos sofrem hidrólise, pela ação de enzimas microbianas, gerando ácido elágico. Uma pequena parte deste ácido fenólico é transportada pela membrana apical do enterócito, e sofre intensa metabolização de fase II no fígado (metilação, glicuronidação, sulfatação ou um combinado entre estas reações). A porção restante do ácido elágico que não foi absorvida pelo enterócito, e que é a maior parte, sofre bioconversão pela ação da microbiota intestinal a urolitinas (Uro), que são os principais biomarcadores do consumo de elagitaninos, e apresentam biodisponibilidade superior à dos seus compostos precursores (MENA *et al*., 2014; TOMÁS-BARBERÁN *et al*., 2016a).

A microbiota intestinal é um sistema complexo, que desempenha um papel essencial na metabolização dos elagitaninos. Embora os mecanismos ainda não estejam esclarecidos, sabe-se que gêneros bacterianos distintos regulam este processo de bioconversão (TOMÁS-BARBERÁN *et al*., 2016a).

Ainda no jejuno, o primeiro metabólito denominado urolitina M-5 (penta-hidroxi urolitina) é formado a partir do ácido elágico (**Figura 4**). É considerado um intermediário determinante, pois a partir dele outros derivados são produzidos. A metabolização das Uro continua ao longo do trato gastrointestinal, com sucessivas reações de descarboxilação. A partir de Uro-M5 dois isômeros são formados: Uro-D e Uro-M6 (tetrahidroxi-urolitinas), que são convertidos a Uro-C e Uro-M7 (trihidroxi-urolitinas), e finalmente, são formados os principais metabólitos detectados no plasma e na urina em seres humanos, Uro-A e IsoUro-A (dihidroxi-urolitinas), ou ainda, Uro-B e IsoUro-B e monohidróxi-urolitinas (ESPÍN *et al*., 2017; TOMÁS-BARBERÁN *et al*., 2016b).

Uma vez absorvidas, as Uro agliconas são submetidas a biotransformações através das reações de fase II, seguidas de intensa circulação entero-hepática. Posteriormente, estes metabólitos agora mais biodisponíveis alcançam a circulação sistêmica, podendo atingir seus respectivos tecidos alvos, e exercer ações biológicas associadas à saúde humana. Por fim, as urolitinas conjugadas são excretadas na urina (MENA *et al*., 2014; CROZIER *et al*., 2010).

Figura 4. Bioconversão de elagitaninos a urolitinas.



Fonte: Adaptado de NUÑEZ-SÁNCHEZ *et al*., 2014. Setas mais grossas representam as reações catalisadas pela microbiota intestinal.

1.5. 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*, nativa do Cerrado Brasileiro. 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).

A cagaiteira é considerada uma espécie de interesse econômico, principalmente devido ao consumo de seus frutos *in natura* e ao seu aproveitamento na culinária em receitas de doces e bebidas, bastante difundido entre os habitantes do Cerrado (SIQUEIRA *et al*., 1997). Em relação ao seu histórico de consumo, em levantamento das espécies nativas dos Cerrados utilizadas na culinária regional, realizado no período de 1981 a 1985, a cagaita foi identificada entre as vinte espécies mais utilizadas, seja através do consumo dos frutos ao natural ou sob a forma de alimentos derivados (ALMEIDA *et al*., 1987). A comercialização da cagaita ocorre quase que exclusivamente em mercados regionais, com produção extrativista, oriunda de áreas de Cerrado nativo, sendo mais comum nos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia (MARTINOTTO *et al*., 2008). Pequenas indústrias alimentícias utilizam o fruto como matéria-prima na fabricação de geleias, refrescos e sorvetes. O mercado consumidor dos produtos processados a partir da

polpa de cagaita está hoje restrito à região central do Brasil (MARTINOTTO *et al*., 2008; SILVA, *et al*., 2001). No Sudeste, a forma mais comum de se encontrar a fruta é a de polpa congelada.

O uso de espécies de *Eugenia* para o tratamento de doenças infecciosas é bem difundido 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.

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.

O fruto é rico em elagitaninos (DONADO-PESTANA *et al*., 2015a) e flavonoides tais como os derivados de quercetina e caempferol (GONÇALVES *et al*., 2010).

Polifenóis de outro fruto pertencente à família das Mirtáceas têm mostrado efeitos benéficos no metabolismo da glicose. Donado-Pestana *et al*. (2015b) demonstraram que extratos de cambuci, também ricos em elagitaninos, administrados a camundongos reduziram a glicemia de jejum e a intolerância à glicose induzida por dieta rica em sacarose e gordura saturada, em camundongos C57BL/6J. Em um outro estudo com desenho experimental similar, extratos de cagaita, ricos em elagitaninos, atenuaram o

ganho de peso e acúmulo de gordura em camundongos alimentados com o mesmo perfil de dieta, que está associada à disglicemia (Donado-Pestana *et al*., 2015a).

Efeitos benéficos à saúde humana também têm sido demonstrados a partir do consumo de cagaita. Indivíduos saudáveis consumiram aproximadamente 30 g de carboidratos disponíveis, juntamente com 300 mL de suco clarificado de cagaita, e foi observada a redução de 64% da quantidade de glicose absorvida, no período de duas horas, em comparação com o controle água (BALISTEIRO *et al*., 2017).

Embora a cagaita seja um fruto fonte de elagitaninos, não se sabe quais são os tipos de ET presentes e nem se são passíveis de metabolização/absorção após o consumo pela dieta humana. Tendo isto em vista, o presente trabalho objetivou caracterizar quimicamente os compostos fenólicos presentes na cagaita, em especial os elagitaninos, e avaliar sua biodisponibilidade a partir do consumo da polpa congelada comercial do fruto. Além disto, estudou-se o efeito sobre as respostas glicêmica, insulinêmica e incretínica em seres humanos portadores de síndrome metabólica e disglicemia.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a biodisponibilidade dos compostos fenólicos de suco de cagaita e avaliar o seu efeito sobre as respostas glicêmica, insulinêmica e incretínica em seres humanos portadores de síndrome metabólica e disglicemia.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar o suco de cagaita em relação aos teores de fenólicos totais, proantocianidinas, elagitaninos, flavonoides e capacidade antioxidante *in vitro*;
- Estudar a biodisponibilidade dos polifenóis de suco de cagaita, em seres humanos saudáveis e pré-diabéticos;
- Avaliar o efeito do consumo de suco de cagaita sobre as respostas de glicose, insulina, GLP-1, GIP, peptídeo C, glucagon e grelina pós-prandiais em seres humanos pré-diabéticos, após a ingestão de 50 g de pão francês.

3. Material e métodos

3.1. Material

As polpas de cagaita congeladas do mesmo lote (L1723), prontas para consumo, foram adquiridas diretamente do fornecedor Sítio do Bello (Paraibuna, SP).

O suco clarificado foi preparado de acordo com o protocolo sugerido por Balisteiro *et al*. (2017) 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. As leituras das amostras foram realizadas em comprimento de onda de 490 nm e os resultados expressos em g de equivalentes de glicose/300 mL de suco.

3.2.2. Acidez total titulável. A acidez total titulável foi determinada por titulometria de acordo com a AOAC (1995). A titulação foi feita com uma solução de NaOH 0,5 M e fenolftaleína (1%) como indicador. Os resultados foram expressos em g de equivalentes de ácido cítrico/300 mL suco.

3.2.3. Determinação do potencial hidrogeniônico. O pH dos sucos foi determinado utilizando-se um potenciômetro digital (modelo pH20-ph21, Hanna Instruments, Woonsocket, EUA) calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 (Synth, Diadema, SP, BR).

3.2.4. Determinação de fibras totais. As fibras totais foram determinadas de acordo com o método descrito pela AOAC (2005), aplicável para alimentos com teores de amido

inferior a 2% (base seca). Em um recipiente foram pipetados, em quadruplicata, 5 mL de suco e 20 mL de água, coberto com papel alumínio e incubado em banho a 37 °C por 90 minutos, em repouso. Após este período foram adicionados 100 mL de etanol absoluto e a suspensão mantida em repouso por 60 minutos em banho a 25 °C. Em seguida, a suspensão foi filtrada a vácuo em cadinho filtrante nº2 (*coarse* ASTM 40-60 mm) contendo lã de vidro e previamente tarado. Os resíduos foram lavados sequencialmente com etanol aquoso 78% (2x), etanol 95% (2x) e acetona (1x), e colocados em estufa a 105 °C por 120 minutos, resfriados em dessecador e pesados. Posteriormente, foram analisados nestes resíduos os teores de proteínas (AOAC, 1995) e cinzas (BRASIL, 2005), os quais foram descontados para o cálculo das fibras totais, juntamente com o branco da análise. Os resultados foram expressos em g de fibras/300 mL suco.

3.2.5. Determinação dos fenólicos totais. O conteúdo de fenólicos totais foi determinado 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) e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (mod. U-1100, Hitachi, Tóquio, Japão) a 750 nm. 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:

% 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 porporção 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 µM. 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 µmol 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 µL) 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 µL de uma solução de fluoresceína 40 nM e incubados a 37 °C por 15 minutos antes da adição de 25 µL da solução do radical peroxila 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto (AAPH 153 mM) que dá início à 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, Synergy ™ 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

A identificação e caracterização dos compostos fenólicos da cagaita foram realizadas junto ao *Centro de Edafologia y Biología Aplicada del Segura - Consejo Superior de Investigaciones* (CEBAS-CSIC), no grupo de *Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales* do *Departamento de Alimentos Ciencias y*

Tecnología da Universidad de Murcia, Murcia, Espanha, utilizando as metodologias descritas a seguir:

3.2.7.1. Identificação e caracterização dos compostos fenólicos da cagaita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de massas com analisador *íon trap* (CLAE-DAD-IT MS/MS)

O polpa liofilizada de cagaita (500 mg) foi ressuspensa em 10 mL de metanol:água (70:30 v/v), homogeneizada em vórtex e sonicador, para porteriormente ser analisada em um sistema cromatográfico Agilent 1200 *series* (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado com detector de arranjo de diôdos e acoplado ao espectrômetro de massas com analisador do tipo *íon trap*, com sistema de ionização em eletrospray (Bruker, Daltonics, Bremen, Germany). A separação dos compostos fenólicos foi realizada em coluna de fase reversa C18 Pursuit XRs, com 250 x 4 mm; 5 µm (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). A fase móvel foi composta por água:fórmico (99:1 v/v) como fase A e acetonitrila como fase B e fluxo 0,8 mL/min. O gradiente de eluição foi o seguinte: 0 min-3% (b); 5 min-9% (b); 15 min-16% (b); 45 min- 50% (b); 47 min-90% (b); 52 min-3% (b); 57 min-3% (b). Dados relativos à espectrometria de massas foram obtidos na polaridade negativa. Os compostos fenólicos foram identificados através da comparação do padrão de fragmentação, característico de cada composto, a partir dos seus respectivos íons moleculares. O volume de injeção foi de 8 µL (García-Villalba et al., 2016).

3.2.7.2. Identificação e caracterização dos compostos fenólicos da cagaita por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com ionização por eletrospray acoplada a detector de massas de alta resolução quadrupolo-tempo de vôo (CLUE-ESI-QTOF)

Com o intuito de confirmar as identificações dos compostos fenólicos por CLAE-DAD-IT MS/MS, o extrato de cagaita foi analisado por CLUE-ESI-QTOF. Para isto, foi utilizado um sistema cromatográfico Agilent 1290 acoplado ao espectrômetro de massas quadrupolo (6550 Accurate Agilent Technologies, Walbronn, Germany), utilizando uma interface de eletrospray com tecnologia de jato de fluxo. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna de fase reversa Poroshell 120 CE-C18 com 3 X 100 mm; 2,7 µm (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). A fase móvel foi composta por água:fórmico (99:1 v/v) como fase A e acetonitrila como fase B e fluxo 0,4 mL/min. O gradiente de eluição foi o seguinte: 0-4 min, 5-18% (b); 4-15 min,18-30% (b); 15-20 min, 30-90% (b); 1 min a 90% e, em seguida para as condições iniciais em 1 min.% (b). Dados relativos à espectrometria de massas foram obtidos na polaridade negativa. As condições de eletropulverização foram: temperatura do gás de 280 °C, gás de secagem 9 L/min, nebulizador 45 psi, temperatura do gás 400 °C, fluxo de gás 12 L/min. O volume de injeção foi de 8 µL.

3.2.7.3. Análise e quantificação de elagitaninos por hidrólise ácida

A quantificação dos elagitaninos foi determinada de acordo com a metodologia proposta por García-Villalba *et al*. (2015). Inicialmente, 50 mg de polpa liofilizada de cagaita foram dissolvidas em 5 mL de uma solução de HCl 4 N. Esta mistura foi homogeneizada em vórtex e colocada em estufa a 90 °C por 4 h. Após o resfriamento em temperatura ambiente, o pH foi ajustado para 2,5 com uma solução de NaOH 5N e, as amostras foram centrifugadas 3000 *g* por 10 min a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante teve seu volume ajustado a 10 mL com água ultra pura e foi filtrado com um filtro de 0,45 µm. O corpo de fundo foi reextraído com 10 mL de metanol:dimetilsulfóxido (50:50, v/v), seguido de homogeneização em vórtex e centrifugação 3000 *g* por 10 min a 4 °C. O

sobrenadante da reextração do corpo de fundo foi filtrado com um filtro de 0,45 µm. As amostras foram injetadas em sistema cromatográfico Agilent 1200 *series* (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado com detector de diodos e acoplado ao espectrômetro de massas com analisador do tipo *íon trap* com sistema de ionização em eletrospray (Bruker, Daltonics, Bremen, Germany). A separação dos compostos fenólicos foi realizada em coluna C18 Pursuit XRs, com 250 x 4 mm; 5 µm (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). As condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas no item **3.2.7.1**. O volume de injeção foi de 8 µL. Os elagitaninos foram quantificados a 280 nm com uma curva de calibração de ácido elágico (1-2000 mg/L) adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.2.7.4. Análise de proantocianidinas por floroglucinólise

A análise de proantocianidinas foi realizada de acordo com Karonen *et al*. (2007). Inicialmente, 50 mg de polpa liofilizada de cagaita foram dissolvidas em 0,8 mL de uma solução de floroglucinol em metanol acidificado com HCl 0,1 M contendo 50 mg/mL de floroglucinol e 10 mg/mL de ácido ascórbico. Esta mistura foi homogeneizada em vórtex e colocada em banho a 50 °C por 20 min. Em seguida, a amostra foi resfriada em banho de gelo e, 1 mL de acetato sódico 40 mM foi adicionado com o intuito de parar a reação. Após esta etapa, a amostra foi centrifugada 3000 *g* por 10 min a 4 °C, filtrada em filtro 0,45 µm e analisada por CLAE-DAD-IT MS/MS). As condições cromatográficas foram as mesmas descritas no item **3.2.7.l**. O volume de injeção foi de 8 µL.

3.3. Determinação do efeito dos compostos fenólicos sobre a resposta de hormônios glicorreguladores no período pós-prandial – Protocolo de estudo

O estudo foi realizado na Liga Acadêmica de Síndrome Metabólica (LSM) do ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas na Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP), com a ajuda da equipe de enfermagem 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 USP e pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, número do parecer: 1.637.867, CAEE: 53727916.0.0000.0067 **(Anexo A)**. Todos os pacientes envolvidos no estudo receberam as devidas explicações acerca do projeto e concordaram em assinar o TCLE (**Anexo A**).

3.3.1. Indivíduos e modelo experimental

A amostra do estudo foi composta por n=12 indivíduos voluntários, pacientes da LSM/USP. O estudo sobre o efeito do suco de cagaita clarificado sobre a resposta de hormônios glicorreguladores no período pós-prandial foi realizado na sala de testes da endocrinologia do HCFMUSP, 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 ≥ 5,7% ≤ 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 Balisteiro *et al*. (2013), que estudaram o efeito dos polifenóis presentes no fruto araçá (*Psidium guineenses* Sw.) na glicemia pós-prandial após o consumo de pão branco. Os indivíduos foram submetidos a jejum de 10-12 horas (na noite anterior ao experimento) para a realização das curvas glicêmicas e de hormônios nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 min.

No dia anterior ao experimento, permitiu-se que os voluntários mantivessem a rotina de atividade física e alimentação. No entanto, foi solicitada a não ingestão de alimentos ricos em polifenóis, tais como frutas vermelhas, café, chocolate e chás. Ao chegarem ao local de coleta, os indivíduos 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 clarificado. Duas refeições distintas compostas por pão branco + água, sendo esta utilizada como controle, e pão branco + suco clarificado de cagaita, foram administradas aos voluntários. O intervalo entre um teste e outro foi de, no mínimo, sete dias. As refeições foram consumidas em um intervalo de tempo máximo de 10 minutos.

3.3.3. Análises de glicemia

A glicose plasmática foi mensurada no laboratório central do HCFMUSP pelo método enzimático-colorimétrico (Burtis; Ashwood, 1994) nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 min. 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 3 horas. Foram analisadas as seguintes variáveis nas curvas de glicose: *glicose basal* (GB), concentração de glicose obtida no tempo zero; *valor de pico da glicose* (VPg), definido como sendo a maior

concentração de glicose acima da basal observada 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) x 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} (VIP = Dg/tempo de pico) (CORRÊA *et al*., 2007).

3.3.4. Análise de hormônios glicorreguladores e pressão arterial sistêmica

Insulina, glucagon, GIP, GLP-1, peptídeo-C e grelina plasmáticos foram determinados pelo kit comercial HMHEMAG-34K (Millipore, Billeria, MA, EUA), lote: 2792342 na FCF/USP. Para a análise destes hormônios, primeiramente, o sangue dos voluntários foi coletado em tubos heparinizados, e imediatamente após a coleta foi adicionada uma solução aquosa contendo inibidor de DPP-IV (Millipore Corp., St. Charles, MO, EUA) para preservar a forma ativa do GLP-1, serina protease e aprotinina (Millipore Corp., Billerica, MA, EUA) para manter a estabilidade da grelina e glucagon, respectivamente, em cada tubo coletado (0, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 min). As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 1500 *g* por 10 minutos (4° C) (modelo RC 3C PLUS, Sorvall, Waltham, MA, EUA) e o plasma armazenado a -70° C até o momento das análises. Todas as amostras foram analisadas em duplicata pelo equipamento Luminex Magpix System (Luminex, Corp., Austin, TX, EUA).

As pressões sistólicas e diastólicas foram aferidas nos tempos 0, 60, 120 e 180 min, após o consumo das refeições, pela equipe de enfermagem presente durante todos os ensaios na sala de testes.

3.4. Avaliação da biodisponibilidade de compostos fenólicos de *Eugenia dysenterica* DC – Protocolo de estudo

3.4.1. Indivíduos e modelo experimental

Para avaliar a biodisponibilidade dos compostos fenólicos, foram selecionados n=16 indivíduos saudáveis, alunos de pós-graduação da FCF/USP. Após o jejum da noite anterior de 10-12 h, a primeira urina do dia foi descartada, e logo depois, os voluntários ainda em jejum, ingeriram 300 mL de suco de cagaita não clarificado. Toda a urina produzida ao longo das 24 h após o consumo do suco foi coletada em frasco apropriado. Os critérios de seleção para inclusão dos indivíduos no estudo foram ausência de DM1, DM2 ou pré-diabetes, obesidade, dislipidemia, hipotireoidismo não tratado, HIV, cardiopatia, tuberculose, tratamento de reposição hormonal para menopausa, portadores de desordens do trato gastrointestinal, de distúrbios de sangramento ou de hemofilia e gestação. No dia anterior e no dia do consumo do suco de cagaita, preferiu-se que o voluntário mantivesse sua rotina de atividade física e alimentação, embora tenha sido solicitada a não ingestão de alimentos ricos em polifenóis como frutas vermelhas, café, chocolate e chás. Com o intuito de avaliar a metabolização dos elagitaninos em indivíduos pré-diabéticos, a urina de 24 h, após o consumo do suco clarificado também foi coletada de 7 participantes envolvidos no ensaio clínico descrito no item **3.3.1**. O projeto e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram aprovados pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, número do parecer: 1.637.867, CAEE:

53727916.0.0000.0067. Todos os voluntários envolvidos no estudo receberam as devidas explicações acerca do projeto e concordaram em assinar o TCLE (**Anexo B**).

3.4.2. Identificação de metabólitos de elagitaninos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um espectrômetro de massas com analisador quadrupolo simples CLAE-DAD-ESI-Q (MS) e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com ionização por eletrospray acoplada a detector de massas de alta resolução quadrupolo-tempo de vôo (CLUE-ESI-QTOF)

A identificação dos metabólitos de elagitaninos presentes na cagaitra foram realizadas junto ao *Centro de Edafologia y Biología Aplicada del Segura - Consejo Superior de Investigaciones* (CEBAS-CSIC), no grupo de *Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales* do *Departamento de Alimentos Ciencias y Tecnololgía da Universidad de Murcia*, Murcia, Espanha.

As amostras liofilizadas de urina foram reconstituídas, homogeneizadas em vórtex, centrifugadas 3000 *g* por 10 min e filtradas em um filtro de 0.22 µm. Após estas etapas, as amostras foram injetadas em sistema Agilent 1200 *series* (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado com detector de diodos e um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo simples (single Q) (6120 Quadrupole, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A separação dos compostos fenólicos foi realizada em coluna de fase reversa Poroshell 120 CE-C18 com 3 X 100 mm; 2.7 µm (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). A fase móvel foi composta por água:fórmico (99:1 v/v) como fase A e acetonitrila como fase B e fluxo 0,8 mL/min. O gradiente de eluição foi o seguinte: 0 min-3% (b); 5 min-9% (b); 15 min-16% (b); 45 min- 50% (b); 47 min-90% (b); 52 min-3% (b); 57 min-3% (b). Dados relativos à

espectrometria de massas foram obtidos na polaridade negativa (García-Villalba et al., 2016).

As urolitinas que não foram identificadas por CLAE-DAD-ESI-Q(MS) foram identificadas por CLUE-ESI-QTOF. As condições cromatográficas e de eletropulverização foram as mesmas descritas no item **3.2.7.2.** O volume de injeção foi de 8 µL.

A identificação das urolitinas por CLAE-DAD-ESI-Q(MS) foi realizada com a comparação do tempo de retenção e espectro ultra-violeta dos padrões de Uro-A glur, IsoUro-A glur, Uro-B glur, Uro-M6, Uro-M7, IsoUro-A, Uro-A e Uro-B adquiridas da *Villafarma* (*Parque Tecnológico de Fuente Alamo*, Murcia, Spain).

A identificação das urolitinas por CLUE-ESI-QTOF foi realizada através da comparação do padrão de fragmentação, característico de cada composto, a partir dos seus respectivos íons moleculares.

3.5. Análise dos resultados

Os resultados foram apresentados como média ± DP. Para a análise dos dados foi utilizado o programa Graphpad Prism 8.0 (San Diego, CA, EUA). Primeiramente, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk e, em seguida a comparação entre as médias foi determinada pelos testes Wilcoxon ou Teste T de *Student* com nível de significância $p < 0,05$.

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização química dos sucos de cagaita

A caracterização química dos sucos de cagaita ofertados aos voluntários é apresentada na **Tabela 1**. É possível observar que o processo de clarificação mostrou-se efetivo na separação da fração fibra, pois não foi detectada sua presença no suco clarificado, indicando que os eventuais efeitos sobre as respostas pós-prandiais deste estudo são provenientes da ação dos polifenóis presentes no suco.

Tabela 1. Caracterização química dos sucos de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC), clarificado e não clarificado, preparados a partir de polpas comerciais prontas para consumo, administrados aos voluntários.

	Clarificado	Não-clarificado
Açúcares totais (g/300 mL suco)	8,29 ± 0,44[a]	13,1 ± 1,4[b]
Acidez total titulável (g EAC/300 mL suco)	1,85 ± 0,04[a]	1,99 ± 0,02[b]
Fibras totais (g/300 mL suco)	n.d.	1,29 ±0,04
pH	3,2 ± 0,0[a]	3,0 ± 0,0[b]
Fenólicos totais (g EAG/300 mL juice)	0,545 ± 0,005[a]	0,87 ± 0,04[b]
DPPH (mmol ET/300 mL suco)	1,94 ± 0,09[a]	2,98 ± 0,12[b]
FRAP (µmol ET/300 mL suco)	1,702 ± 0,004[a]	2,117 ± 0,007[b]
ORAC (mmol ET/300 mL suco)	5,83 ± 0,29[a]	5,79 ± 0,43[a]

Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão. Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). EAC= equivalentes de ácido cítrico; EAG= equivalentes de ácido gálico; ET= equivalentes de trolox.

A média brasileira de ingestão de polifenóis é de 460 mg/dia, sendo 49% atribuídos a bebidas como café, suco de laranja e chá mate, seguidos de leguminosas (19,5%), e cereais e frutas (16,6%) (CORREA *et al*., 2015). Este valor pode ser considerado baixo, em comparação com a média de ingestão de países que compõem o Mediterrâneo, tais como Grécia, Espanha e Itália, com 1011 mg/dia, assim como outros países europeus não

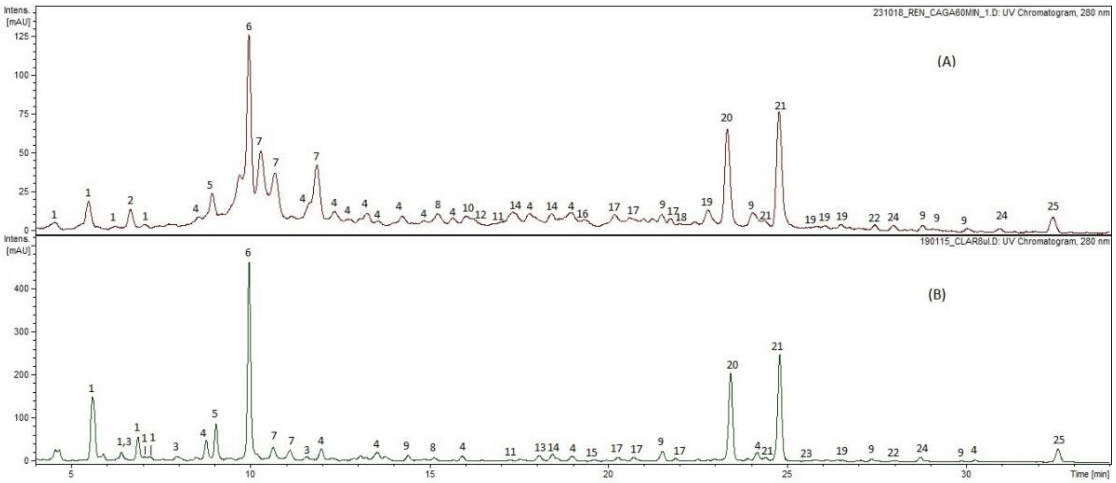
mediterrâneos como Alemanha, Suíça, Suécia, Noruega e Reino Unido, que consomem em média 1284 mg/dia (ZAMORA-ROS *et al*., 2016). Embora o suco não clarificado de cagaita tenha apresentado maiores teores de polifenóis (37%) e expressiva capacidade antioxidante, ambos os sucos podem ser considerados boas fontes destes compostos, pois um copo da bebida fornece uma quantidade superior à média de ingestão diária brasileira (~545-870 mg de fenólicos totais em um copo).

O gênero *Eugenia* possui mais de 400 espécies, sendo muitas delas exploradas comercialmente, por exemplo, *Eugenia uniflora L* (pitanga), *Eugenia stipitata* Mac Vaugh (araçá-boi), *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixama) e *Eugenia pyriformis* Cambess (uvaia). Os principais compostos bioativos deste gênero são flavonoides, tais como derivados de quercetina, catequina, caempferol e miricetina, elagitaninos como pedunculagina, carotenoides e vitaminas (De Araújo *et al*., 2019).

A CLAE associada à espectrometria de massa é uma técnica analítica amplamente utilizada para identificar um composto fenólico específico, através da detecção seletiva do seu peso molecular e das características do perfil de fragmentação do íon molecular (TOMÁS-BARBERÁN *et al*., 2016a). Em função da ausência de padrões de calibração, a identificação dos polifenóis presentes na cagaita foi realizada a partir da comparação dos fragmentos dos íons moleculares, gerados pela espectrometria de massas, nas bases de dados MassBank®, Metlin® and ReSpect®. Outros compostos foram identificados pela comparação dos seus tempos de retenção e espectros ultra-violeta com o composto padrão.

A **Figura 5** apresenta o perfil cromatográfico dos sucos não clarificado (A) e clarificado (B) de cagaita. Ao todo, foram tentativamente identificados por CLAE-DAD-IT MS/MS 24 compostos.

Figura 5. Perfil cromatográfico a 280 nm dos sucos não clarificado (A) e clarificado (B) de cagaita.



A lista detalhada dos compostos presentes na cagaita é apresentada na **Tabela 2**. Foram identificados tentativamente 17 compostos fenólicos, sendo 4 elagitaninos (identificados pelos números 3, 7, 10 e 16), 4 ácidos hidroxibenzoicos (identificados pelos números 1, 2, 5 e 8), 3 ácidos hidroxicinâmicos (identificados pelos números 11, 12 e 22), 6 flavonois (identificados pelos números 15, 17, 18, 19, 23 e 24).

De maneira geral, a clarificação não alterou de forma expressiva o perfil fenólico presente na cagaita. É possível observar que alguns compostos foram encontrados exclusivamente no suco não clarificado: telimagrandina I (10), pedunculagina (16), ácido ferúlico-pentose-hexose (12) e miricetina-hexose (18), ao passo que os compostos galoil-HHDP-hexose (3), vomifoliol-hexose (13), quercetina galoil-hexoside (15) e quercetina-hexose (23) foram identificados somente na bebida clarificada.

Um estudo caracterizou diversas espécies de frutas nativas brasileiras de acordo com seu perfil fenólico. Alguns frutos da família das mirtáceas foram avaliados por espectrômetro de massas com analisador do tipo *íon trap*, com sistema de ionização em eletrospray. Diversos compostos foram identificados na cagaita, sendo alguns em comum com o presente estudo, tais como: telimagrandina I (m/z 785), quercetina 3-(2"-galoil-

alfa-L-arabinopiranosídeo) (m/z 585), quercetina-hexose (m/z 463) e miricetina hexose (m/z 449) (BIAZOTTO *et al*., 2019). Em relação aos compostos diferentes, é importante destacar que este estudo não utilizou nenhum método de separação cromatográfica, o que seguramente garante uma identificação mais precisa.

Tabela 2. Identificação dos fitoquímicos presentes na cagaita por CLAE-DAD-IT MS/MS.

Identificação do pico	Composto	[M-H]−	Principais íons de fragmentação
1	Ácido gálico-hexose	331	169, 271, 211, 125
2	Ácido gálico	169	125, 151
3	Galoil-HHDP-hexose	633	301, 275
4	n.i.		
5	Galato de metila-hexose	345	183, 225, 285
6	n.i.		
7	Elagitanino	783	768, 935, 601
8	Derivado de ácido gálico	417	401, 269
9	N.I-hexose		
10	Telimagrandina I	785	301, 483, 248, 169
11	Ácido ferúlico-hexose	355	193, 216
12	Ácido ferúlico-pentose-hexose	517	385, 205, 223
13	Vomifoliol-hexose	431	385, 223
14	Vomifoliol-pentose-hexose	517	385, 205, 293
15	Quercetina galoil-hexoside	615	468, 301
16	Pedunculagina	785	765, 301, 483
17	Miricetina-pentose	449	317, 271
18	Miricetina-hexose	479	317, 411, 279
19	Quercetina-pentose	433	301, 300
20	n.i.		
21	Ácido abscísico-hexose	425	263, 425
22	Ácido elágico-deoxihexose	447	315, 285, 300
23	Quercetina-hexose	463	301
24	Quercetina 3-(2"-galoil-alfa-L-arabinopiranosídeo)	585	301
25	Ácido abscísico	263	153, 219

n.i.: não identificado

Os dados apresentados na **Tabela 3** mostram os compostos fenólicos presentes na cagaita identificados por CLUE-ESI-QTOF. A CLUE acoplada a analisadores de massas de alta resolução como o quadrupolo tempo de vôo é uma técnica comumente usada com o intuito de identificar compostos químicos. A CLUE-ESI-QTOF combina a eficiência da separação cromatográfica e a informação das estruturas dos compostos pela espectrometria de massas (peso molecular e padrão de fragmentação). As colunas de separação cromatográficas possuem partículas menores a fim de melhorar a resolução e

reprodutibilidade, aumentar a sensibilidade e reduzir o tempo de análise. Estes fatores permitem que esta técnica confirme os dados adquiridos pela CLAE-DAD-IT MS/MS (ASZYK; KOT-WASIK, 2016).

..

Tabela 3. Identificação dos fitoquímicos presentes na cagaita por CLUE-ESI-QTOF.

Identificação do pico	Compostos	[M-H]−	Principais íons de fragmentação [M-H]−	Fórmula molecular	*Score*	Erro (ppm)
1	Ácido gálico-hexose	331,0694	169,0143; 211,0259; 125,0245	$C_{13}H_{16}O_{10}$	90,55	-3,57
2	Ácido gálico	169,0145	301,0004; 169,0139	$C_7H_6O_5$	98,4	-1,86
3	Galoil-HHDP-hexose	633,0782	301,0005; 169,0143; 481,0660	$C_{27}H_{22}O_{18}$	72,27	-7,81
4	n.i.					
5	Galato de metila-hexose	345,0848	183,0301; 59,0130; 225,0411	$C_{14}H_{18}O10$	88,04	-6
6	N.i	368,0988	206,0827; 119,0498; 207,0856	$C_{11}H_{13}NO_3$	96,84	-3,69
7	Elagitanino	-				
8	Derivado de ácido gálico	417,1354	417,1351; 169,0131; 151,0027	C_7H_5O5		
9	n.i-hexose					
10	Telimagrandina I	785,0844	300,9988	$C_{34}H_{26}O_{22}$	93,08	0,26
11	Ácido ferúlico-hexose	355,1051	193,0508	$C_{16}H_{20}NO_9$	92,61	-4,53
12	Ácido ferúlico-pentose-hexose	487,1456	175,0398; 193,0508	$C_{21}H_{28}O_{13}$	99,79	0,2
13	Vomifoliol-hexose	385,1881	153,0919; 385,1877	$C_{20}H_{32}O_{10}$	87,19	-4,88
14	Vomifoliol-pentose-hexose	517,2329	89,0245;153,0923	$C_{24}H_{38}O_{12}$	77,86	-7,45
15	Quercetina galoil-hexoside	615,1024	169,0144; 301,0370; 463,0904	$C_{28}H_{24}O_{16}$	80,99	-6,07
16	Pedunculagina	-				
17	Miricetina-pentose	449,0757	316,0244; 271,0258; 317,0289	$C_{20}H_{18}O_{12}$	81,81	-6,85
18	Miricetina-hexose	479,0820	317,0301	$C_{21}H_{20}O_{13}$	97,34	2,29
19	Quercetina-pentose	433,0799	300,0292; 301,0347; 178,9996	$C_{20}H_{18}O_{11}$	88,06	-5
20	n.i.	359,1365	153,0923; 197,0823	$C_{16}H_{24}O_9$	90,84	-4,97
21	Ácido abscísico-hexose	425,1834	153,0922; 219,1396;263,1297	$C_{21}H_{30}O_9$	92,45	-4,23
22	Ácido elágico-deoxihexose	447,0598	315,0165; 299,9927; 300,9953	$C_{20}H_{16}O_{12}$	83,49	-6,31
23	Quercetina-hexose	463,0909	301,0356	$C_{21}H_{20}O_{12}$	84,65	-6,02

Continua

Tabela 3. Identificação dos fitoquímicos presentes na cagaita por CLUE-ESI-QTOF.

Continuação

Identificação do pico	Compostos	[M-H]−	Principais íons de fragmentação [M-H]−	Fórmula molecular	*Score*	Erro (ppm)
23	Quercetina-hexose	463,0909	301,0356	$C_{21}H_{20}O_{12}$	84,65	-6,02
24	Quercetina 3-(2"-galoil-alfa-L-arabinopiranosídeo)	585,0924	301,0369	$C_{27}H_{22}O_{15}$	80,8	-6,39
25	Ácido abscísico	263,1303	153,0922; 204,1165	$C_{15}H_{20}O_4$	92,15	-5,56

n.i.: Não identificado

Os taninos hidrolisáveis são poliésteres de glicose e ácidos fenólicos. São divididos em 2 subclasses de acordo com suas características estruturais: galotaninos e elagitaninos. Após a hidrólise, os galotaninos liberam o ácido gálico (ácido 3,4,5 tri-hidróxi benzoico). Por outro lado, os elagitaninos são caracterizados pela liberação de um ou mais grupos do ácido hexahidroxidifênico (HHDP), que se rearranja espontaneamente em ácido elágico após a hidrólise ácida (MENA *et al*., 2014).

A **Figura 6** apresenta o perfil cromatográfico da cagaita após hidrólise ácida a 280 nm (A) e 360 nm (B). Os principais produtos da reação foram identificados como ácido gálico (m/z 169), ácido elágico (m/z 301), ácido valoneico dilactona (m/z 469) e ácido sanguisórbico dilactona (m/z 469). Todos estes compostos foram encontrados após a hidrólise ácida da romã, utilizando-se o mesmo método analítico do presente estudo. A presença dos dois isômeros, ácido valoneico dilactona e ácido sanguisórbico dilactona, indica a presença de elagitaninos complexos com ligações estruturais que envolvem grupos galoil ligados a estéres de HHDP (GARCÍA-VILLALABA *et al*., 2015).

O presente estudo reporta pela primeira vez a presença destes dois isômeros na cagaita. A concentração de elagitaninos presentes no suco não clarificado (51,89 ± 11,6 mg/300 mL) foi aproximadamente 5 vezes maior em comparação ao clarificado (9,83 ± 0,47 mg/300mL), ao passo que o conteúdo de galotaninos apresentou-se mais de 200 vezes maior na bebida não clarificada, indicando que estes compostos estão majoritariamente associados à fração fibra (**Tabela 4**).

Figura 6. Perfil cromatográfico da cagaita após hidrólise ácida a 280 nm (A) e 360 nm (B).

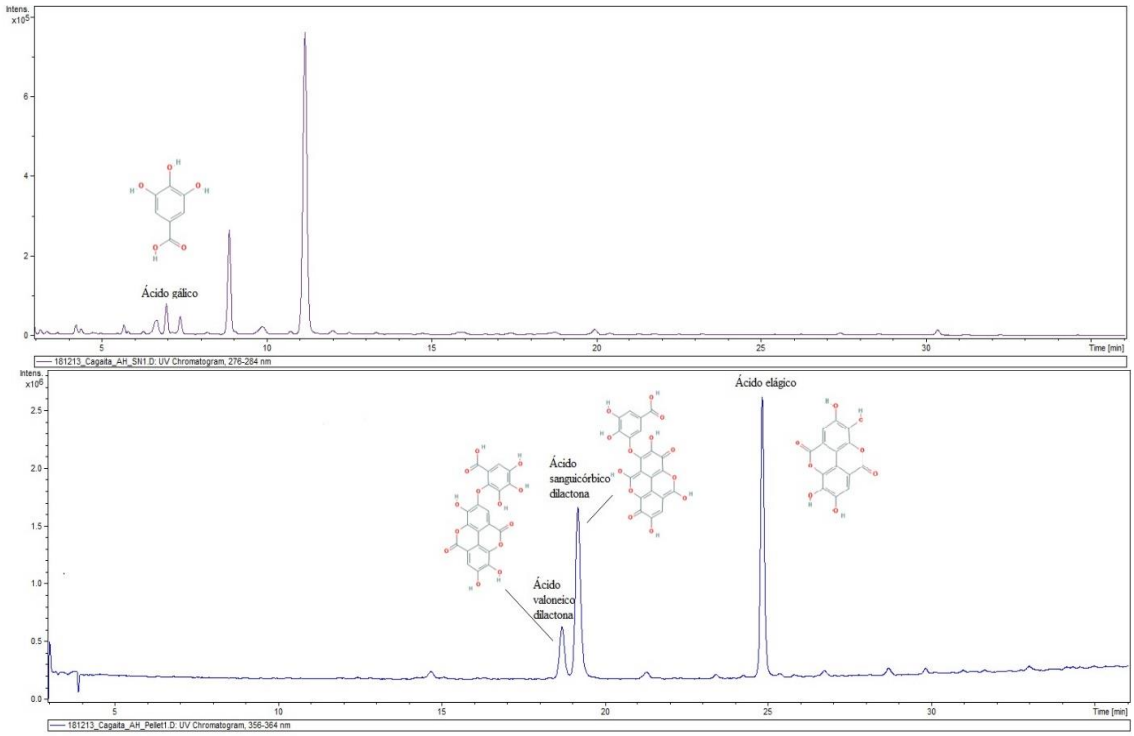


Tabela 4. Quantificação de elagitaninos e galotaninos presentes nos sucos de cagaita, administrados aos voluntários.

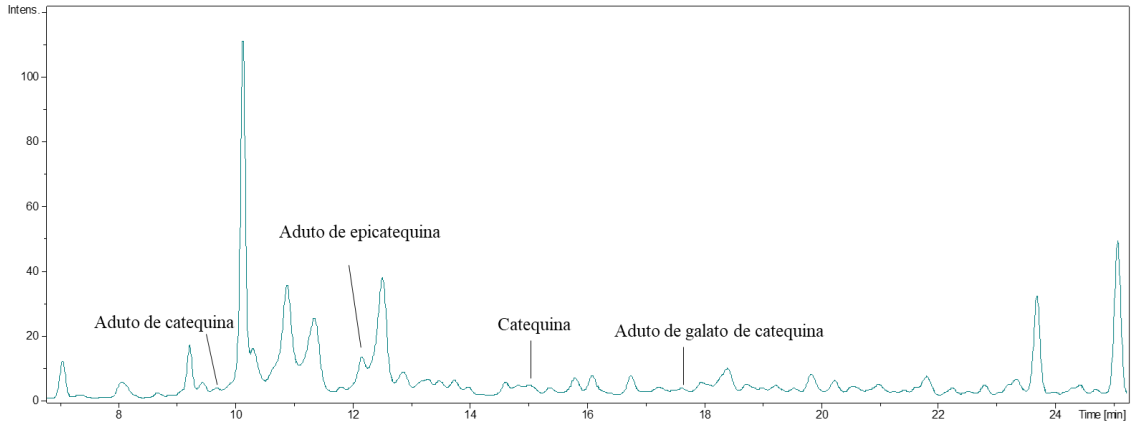
	Suco clarificado mg/300 mL	Suco não clarificado mg/300 mL	mg/g polpa (b.s.)
Ácido gálico	0,11 ± 0,07	23,73 ± 4,37	0,64 ± 0,12
Ácido elágico	7,25 ± 0,30	31,96 ± 1,90	0,86 ± 0,05
Ácido valoneico dilactona	0,39 ± 0,06	3,56 ± 3,02	0,096 ± 0,081
Ácido sanguisórbico dilactona	2,19 ± 0,11	16,37 ± 6,7	0,44 ± 0,18

Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). b.s: base seca.

As proantocianidinas (PAs), também conhecidas como taninos condensados, são um grupo representado por unidades oligoméricas ou poliméricas de flavan-3-óis. As PAs que contêm unidades de catequina ou epicatequina são chamadas de procianidinas, aquelas que contêm galato de catequina ou galato de epigalocatequina são chamadas de prodelfinidinas e, as properlagonidinas são compostas por afzalequina ou epiafzalequina (RAUF *et al*., 2019).

A análise por floroglucinólise é baseada na despolimerização das PAs, em meio ácido, na presença de floroglucinol. Do ponto de vista qualitativo, o perfil de PAs da cagaita é representado por uma única unidade monomérica de flavan-3-ol, catequina (m/z 289), um aduto de catequina (m/z 413), um aduto de epicatequina (m/z 413) e um aduto de galato de catequina (m/z 429) (**Figura 7**). Não foram identificados dímeros, trímeros ou polímeros de flavan-3-óis. Isto pode ser devido à ausência destes compostos na cagaita, ou concentrações abaixo do limite de detecção da técnica analítica empregada. Um estudo realizado com romã demonstrou que este fruto, também submetido à catálise ácida com floroglucinol, apresenta catequina, epicatequina, catequina galato e galato de epigalocatequina, além da presença de dímeros de flavan-3-óis (DÍAZ-MULA *et al*., 2019).

Figura 7. Perfil cromatográfico da cagaita após catálise ácida na presença de floroglucinol 280 nm.



4.2. Determinação do efeito dos compostos fenólicos sobre a resposta de hormônios glicorreguladores no período pós-prandial

O presente estudo avaliou o efeito do consumo do suco clarificado de cagaita concomitantemente a uma refeição rica em amido sobre a resposta pós-prandial de hormônios glicorreguladores, de indivíduos disglicêmicos e portadores de síndrome metabólica.

As fibras solúveis representadas por pectinas, β-glicano, frutanos e gomas atuam, principalmente, na absorção de glicose e gorduras (OH *et al*., 2014). Por este motivo, optou-se pelo processo de clarificação do suco para eliminação da fração fibra, possibilitando a avaliação do efeito dos CBF do suco exclusivamente.

A carga de carboidratos disponíveis, oferecida aos voluntários, foi constituída de aproximadamente 30 g a partir de uma unidade de pão francês de 50 g, segundo a Tabela Brasileira de composição de alimentos – FCF/USP (USP, 1998). Foram avaliadas n=12 mulheres (**Tabela 5**). Os valores de glicemia de jejum, circunferência da cintura, hemoglobina glicosilada, colesterol-HDL, triacilgliceróis e pressões arteriais sistólica e diastólica demonstram que os indivíduos que participaram do estudo são disglicêmicos (ADA, 2014) e portadores de síndrome metabólica (IDF, 2006).

Tabela 5. Características clínicas e bioquímicas dos voluntários disglicêmicos e portadores de síndrome metabólica do estudo.

Variáveis	Média ± DP
Indivíduos, *n*	12
Idade (anos)	45 ± 11
Peso (kg)	94 ± 18
IMC (kg/m^2)	37 ± 8
Circunferência da cintura (cm)	104 ± 8
Pressão sistólica (mmHg)	122 ± 18
Pressão diastólica (mmHg)	85 ± 12
HbA_{1c} (%)	5,9 ± 0,2
HDL-colesterol (mg/dL)	47 ± 8
LDL-colesterol (mg/dL)	130 ± 28
Total colesterol (mg/dL)	195 ± 35
Triacilgliceróis (mg/dL)	145 ± 36
Glicose de jejum (mg/dL)	105 ± 13
Insulina de jejum (pg/mL)	729 ± 423

Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão, IMC= Índice de massa corporal; HbA1c= hemoglobina glicada; HDL= *high density lipoprotein*; LDL= *low density lipoprotein*.

O *Diabetes Epidemiology Collaborative Analysis of Diagnostic Criteria in Europe* (DECODE) (DECODE, 2001) e o *Diabetes Epidemiology Collaborative Analysis of Diagnostic Criteria in Asia* (DECODA) (NAKAGAMI *et al*., 2006) avaliaram estudos prospectivos de coorte, com um número representativo de homens e mulheres da Europa e Ásia, e concluíram que a hiperglicemia no período pós-prandial é um fator preditivo para doenças cardiovasculares mais eficiente do que a glicose de jejum elevada. Flutuações intensas de glicose no período pós-alimentar são associadas principalmente

com inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial, que convergem em risco cardiovascular (IDF, 2014).

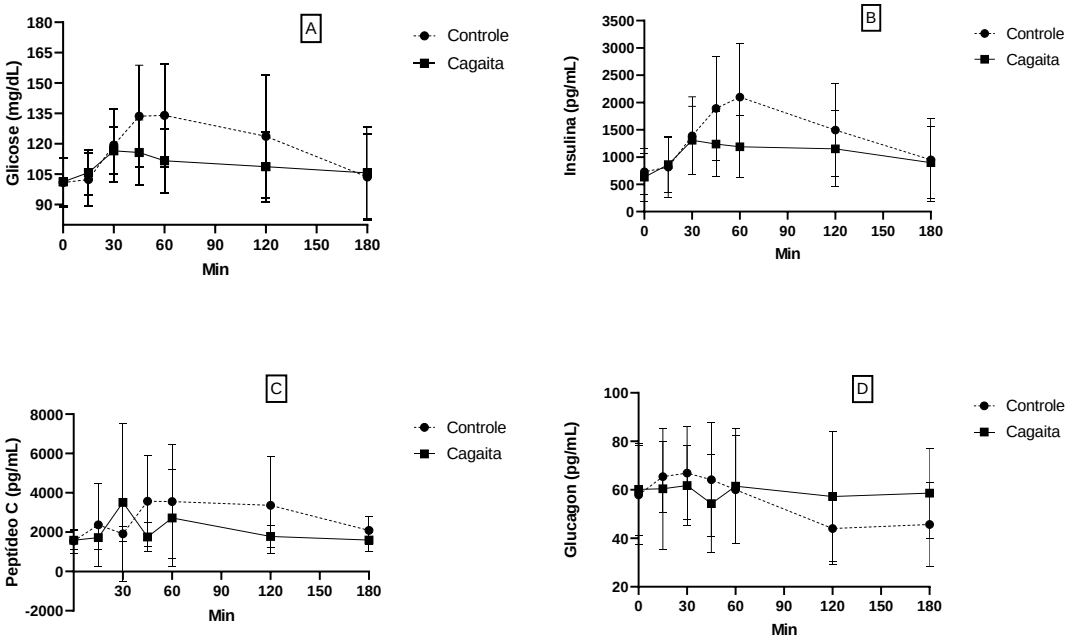
Nesta conjuntura, novas abordagens que reduzam a glicemia pós-prandial podem contribuir como estratégias terapêuticas.

4.2.1. Efeito dos compostos fenólicos sobre as respostas glicêmica e insulinêmica no período pós-prandial

O suco clarificado de cagaita ofertado aos voluntários afetou a resposta glicêmica pós-prandial, em comparação ao controle água, conforme mostram a **Figura 8 e Anexo C**. A área abaixo da curva de glicose e insulina foi reduzida em 53% e 38%, respectivamente ($p < 0,05$), assim como o VPi (35%), Dg (45%), PIg (44%) e VPg (12%) ($p < 0,05$), pelo consumo do suco, em comparação com o controle água.

No presente estudo, a secreção de peptídeo C foi reduzida de forma significativa ($p < 0,05$) em 58%, após consumo do suco de cagaita, em relação ao controle. É interessante destacar que aos 45 min, há redução significativa deste hormônio, o que coincide com o primeiro ponto de linearidade da curva de insulina (45 min), após o consumo da refeição composta pelo suco de cagaita (**Figura 8**).

Figura 8. Resposta glicêmica pós-prandial (**A**) e dos hormônios glicorreguladores insulina (**B**), peptídeo C (**C**) e GIP (**D**) nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos após do consumo das refeições testes: pão + 300 mL de água (controle); e pão + 300 mL de suco clarificado de cagaita. Média ± desvio padrão (n=12).



Tendo em vista que o peptídeo C é um indicador de secreção de insulina utilizado para estimar a função da célula β (WILCOX, 2005), este resultado sugere que houve uma redução da insulina compensatória. Em um estudo recente, bebidas à base de "cranberry" e morango, contendo 333 mg de polifenóis, dentre eles elagitaninos e ácidos fenólicos, foram administradas por 6 semanas a indivíduos obesos e com resistência à insulina. Após o período de intervenção foi observada a redução do peptídeo C e, por consequência, atenuação da resistência à insulina (PAQUETTE *et al*., 2017).

Este importante efeito hipoglicemiante, observado no presente estudo, pode ser atribuído à efetividade dos polifenóis presentes no suco de cagaita em inibir a α-amilase salivar e pancreática, sobretudo a α-glicosidase presente na borda em escova do intestino delgado (KIM *et al*., 2016). Em pacientes pré-diabéticos ou DM2, a inibição da α-glicosidase é realizada pela acarbose, uma ferramenta terapêutica que pode reduzir de

forma significativa a absorção de glicose no período pós-prandial (STEIN *et al*., 2017). No entanto, efeitos adversos, tais como flatulência e diarreia, comprometem a aderência dos pacientes ao tratamento. Neste sentido, o uso de inibidores naturais destas enzimas relacionadas à digestão dos carboidratos, com reduzidos efeitos adversos, seria uma alternativa relevante.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que polifenóis como elagitaninos e antocianinas presentes em frutas vermelhas (MCDOUGALL; STEWART, 2005) e catequinas do chá verde (KOH *et al*., 2010) são capazes de inibir a atividade de α-amilase e α-glicosidase, Entretanto, os compostos fenólicos provenientes de frutas nativas brasileiras, principalmente da família das Mirtáceas, como cagaita, cambuci e camu-camu, dentre eles derivados de quercetina e elagitaninos, também causam efetiva inibição da atividade da α-glicosidase (GONÇALVES *et al*., 2010). Fujita *et al*. (2015) mostraram que extratos secos de camu-camu, obtidos através de diferentes métodos de secagem, foram mais eficientes em inibir a α-glicosidase do que a acarbose. Esta inibição também parece ocorrer *in vivo*, pois o suco de cagaita clarificado, reduziu a absorção de glicose em indivíduos saudáveis, de forma significativa ($p < 0,05$) em 64%, após o consumo de 50 g de pão branco, em comparação ao controle água (BALISTEIRO *et al*., 2017). Ainda, outros estudos agudos e cruzados, conduzidos em seres humanos saudáveis, avaliaram o efeito dos polifenóis na glicemia pós-prandial, Em geral, o desenho experimental é caracterizado pelo consumo de uma fonte de carboidratos, principalmente glicose ou amido, e a intervenção é realizada com bebidas, cápsulas, extratos ou chás, ricos em polifenóis (COE; RYAN, 2016).

Outro possível mecanismo que associa os polifenóis à redução da glicemia pós-prandial seria a inibição dos principais transportadores de glicose, presentes no intestino delgado, tais como SGLT1 presente na membrana apical e GLUT2 na membrana

basolateral de células intestinais (FARRELL *et al*., 2013). Em condições fisiológicas, a sinalização deste processo de transporte inicia-se com a absorção de glicose pelo SGLT1 no período pós-prandial, e com a sua saturação, vesículas intracelulares translocam o GLUT2 para a membrana apical, para a captação de glicose. No entanto, pacientes resistentes à insulina ou DM2 parecem ter maior expressão destes transportadores, contribuindo assim para maior captação de glicose (WILLIAMSON, 2013). Tendo em vista que estes transportadores desempenham um papel primordial na regulação absortiva da glicose, a supressão de SGLT1 e GLUT2 são alvos terapêuticos para atenuar a glicemia pós-prandial (SOLAYMAN *et al*., 2016).

Estudos *in vitro* têm mostrado a efetividade dos polifenóis em inibir estes transportadores. Extratos de maçã e morango contendo flavonoides, ácidos fenólicos e taninos são capazes de inibir o transporte da glicose via SGLT1 e GLUT2, em vesículas da membrana da borda em escova do intestino (MANZANO; WILLIANSON, 2010). Naringenina e ácido clorogênico podem atuar na inibição dos dois transportadores (THOMAS; PFEIFFER, 2012), ao passo que catequina e quercetina são capazes de provocar efeitos antidiabéticos através da inibição de GLUT2 (SOLAYMAN *et al*., 2016).

Em condições homeostáticas, a glicogenólise e a gliconeogênese estão sob o controle do glucagon produzido nas células α-pancreáticas. Durante o período de jejum, este hormônio contribui para a produção de glicose disponível a partir do glicogênio, e em jejum prolongado, o glucagon regula a produção e liberação de glicose a partir de compostos não glicados. No entanto, em indivíduos pré-diabéticos, devido à resistência à insulina, não há supressão adequada de glucagon, o que leva ao desequilíbrio da liberação de glicose hepática (ARONOFF *et al*., 2004). O consumo do suco de cagaita não causou diferença significativa nas concentrações plasmáticas de glucagon, em comparação ao

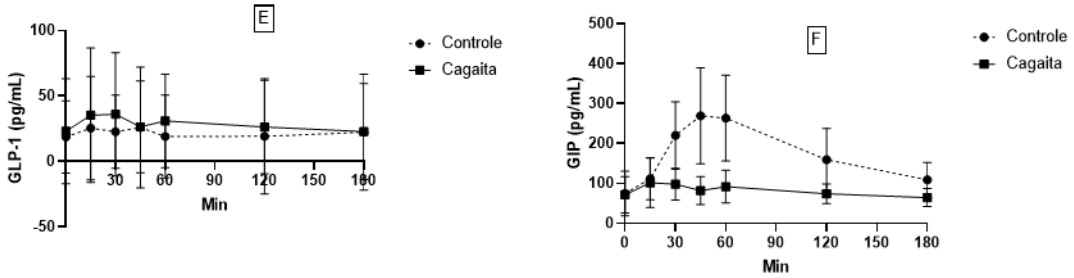
controle (**Figura 8**) ($p < 0,05$), demonstrando que o seu efeito hipoglicemiante não seja por esta via.

4.2.2. Efeito dos compostos fenólicos sobre a resposta incretínica no período pós-prandial

Em condições fisiológicas, a glicose plasmática é controlada por processos regulatórios hormonais, pela capacidade absortiva do intestino no período pós-alimentar, e por mecanismos hepáticos. O período pós-prandial é regulado por um sistema complexo que coordena a homeostase glicêmica não apenas pela secreção e ação de insulina e glucagon, mas também de outros hormônios que têm sua secreção comprometida em portadores de DM2. O efeito incretínico é caracterizado por sinalizações entre o intestino e o pâncreas endócrino, que ocorrem através de peptídeos (GIP e GLP-1), os quais geram efeito insulinotrópico em resposta à ingestão oral de carboidratos, mas não após a administração intravenosa de glicose (NAUCK; MEIER, 2016).

O SGLT1 é coexpresso com GIP e GLP-1 em células enteroendócrinas, e por isto observa-se menor secreção destes hormônios incretínicos, principalmente de GIP, quando o SGLT-1 é suprimido, em células intestinais de ratos, por floridzina, um flavonol presente em maçãs (GORBOULEV *et al*., 2012; MACE *et al*., 2012). A **Figura 9** mostra que os níveis de GIP foram reduzidos em 78% ($p < 0,05$), após o consumo do suco clarificado de cagaita, o que poderia ser explicado pela inibição parcial da atividade deste transportador de glicose. Castro-Acosta *et al*. (2017) administraram a indivíduos saudáveis bebida à base de cassis, rica em antocianinas, junto com 100 g de pão branco. Os resultados mostraram que houve diminuição dos níveis de glicose e insulina, em comparação ao controle água, e uma acentuada redução de GIP, conforme observado no presente estudo.

Figura 9. Resposta dos hormônios glicorreguladores GLP-1 (**E**) e GIP (**F**) nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos após do consumo das refeições testes: pão + 300 mL de água (controle); e pão + 300 mL de suco clarificado de cagaita. Média ± desvio padrão (n=12).



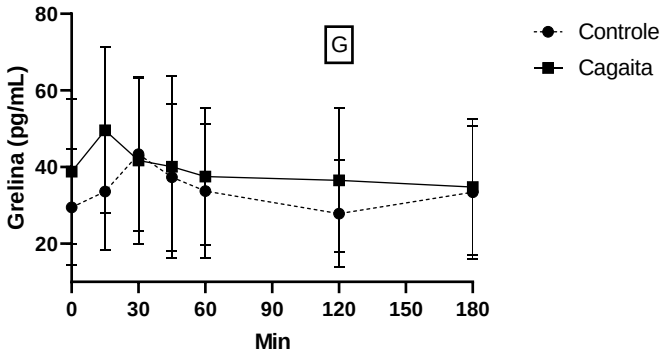
O GLP-1 é o principal responsável pelo efeito incretina por atuar na secreção de insulina dependente de glicose, redução do esvaziamento gástrico e supressão de glucagon pelas células α do pâncreas (NAUCK; MEIER, 2016). Por esta razão, agonistas do receptor de GLP-1 e inibidores de DPP-IV são estratégias terapêuticas bastante usuais na prática clínica para o controle da glicemia em pacientes DM2 (FRANDRIKS, 2016). O consumo de cagaita aumentou de forma não significativa em 22% a secreção de GLP-1. Contudo, um aspecto importante a ser considerado quando se avalia a secreção deste peptídeo é a grande diferença interindividual. Em um estudo que administrou 150 g de frutas vermelhas, ricas em elagitaninos e antocianinas, a seres humanos saudáveis mostrou que a glicose e a insulina séricas foram reduzidas em determinados tempos até 120 min, após o consumo da refeição de frutas, em comparação ao controle. A refeição composta pelas frutas vermelhas acarretou em um modesto aumento da secreção de GLP-1, embora este resultado não tenha sido significativo, provavelmente em função da grande diferença secretória deste hormônio entre os indivíduos, conforme citam os autores (TORRÖNEN *et al*., 2013). Em outro estudo com modelo experimental similar, homens portadores de DM2, recém-diagnosticados, sem medicação, foram submetidos a dois testes de tolerância oral à glicose (75 g de glicose), sendo o primeiro como controle, e o segundo associado a cápsulas contendo o perfil e a quantidade de polifenóis equivalentes a 50 g de mirtilo. A ingestão dos polifenóis junto com a carga de glicose resultou na

redução da AUC de glicose e insulina. No entanto, nenhuma alteração foi observada na secreção de GLP-1, GIP e glucagon, e a diferença interindividual em relação ao GLP-1 também é citada pelos autores (HOGGARD *et al*., 2013).

4.2.3. Efeito dos compostos fenólicos sobre a resposta de grelina no período pós-prandial

Outro hormônio com importante papel na homeostase glicêmica é a grelina, produzida principalmente na mucosa do fundo gástrico, também associada ao balanço energético. Seus níveis circulantes no plasma são influenciados pelo estado prandial, com concentração aumentada antes da refeição e suprimida após a ingestão alimentar devido à secreção da insulina (DE; SINGH, 2016). O presente estudo mostrou que não houve diferença significativa na secreção deste hormônio orexígeno após o consumo do suco de cagaita (**Figura 10**) ($p < 0,05$).

Figura 10. Resposta do hormônio grelina (**G**) nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos após do consumo das refeições testes: pão + 300 mL de água (controle); e pão + 300 mL de suco clarificado de cagaita. Média ± desvio padrão (n=12).



A grelina pós-prandial é proporcionalmente suprimida em relação ao conteúdo calórico ingerido, em pessoas magras. Contudo, este efeito não é observado em obesos,

uma vez que não há adequada supressão da grelina ao longo do período pós-alimentar, devido à resistência à insulina (ENGLISH *et al*., 2002).

Os resultados aqui obtidos indicam que os CBF presentes no suco de cagaita seriam os principais responsáveis pela redução da glicemia pós-prandial. Entretanto, este efeito não parece ser consequência do estímulo da via incretínica, ou ainda, da supressão de glucagon. Ao que parece, a atenuação da resposta glicêmica pode estar relacionada com a inibição da α-glicosidase, e/ou de transportadores de glicose.

4.2.4.Efeito dos compostos fenólicos sobre a pressão arterial sistêmica

Os polifenóis parecem contribuir com a saúde cardiovascular através da regularização da pressão arterial sistêmica (MEDINA-REMÓN *et al*., 2017), cujo mecanismo de ação é semelhante ao dos agentes inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) (MARUNAKA *et al*., 2017), como captopril e enalapril, amplamente utilizados na prática clínica (ISRAILI *et al*., 1992). Esta classe de anti-hipertensivos impede a conversão de angiotensina I a angiotensina II que é um eficiente vasoconstritor, atenuando, assim, seus efeitos (SPARKS *et al*., 2014).

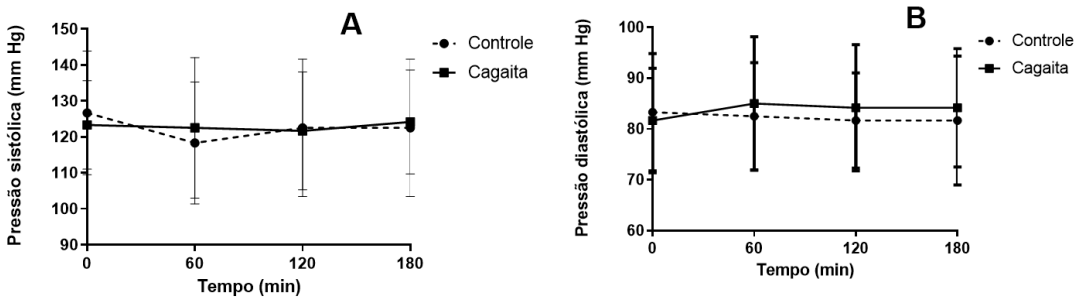
Não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) nas pressões sistólica e diastólica dos indivíduos, após o consumo do suco de cagaita (**Figura 11**), em contraste com que Mubarak *et al*. (2012) observaram ao administrarem 400 mg de ácido clorogênico a indivíduos saudáveis. Os autores constataram que as pressões sistólica e diastólica foram reduzidas significativamente em até 150 min, após o consumo deste composto fenólico.

Um ponto a ser considerado acerca destas diferenças de resultados é a alta variabilidade interindividual no perfil farmacocinético dos polifenóis. Indivíduos saudáveis que consumiram extrato de romã, contendo aproximadamente 500 mg de ácido

elágico, apresentaram variações na Cmax (nM) no plasma entre 3 h e 24 h (GONZÁLEZ-SARRÍAS *et al*., 2015).

Estudos com intervenção em longo prazo também apresentam resultados contraditórios na efetividade de alimentos ricos em polifenóis tais como cacau (TAUBERT *et al*., 2007; RIED *et al*., 2010), azeite de oliva (MARTÍN-PELÁEZ *et al*., 2017; DE BOCK *et al*., 2013), uvas tintas e vinho tinto (RANGEL-HUERTA *et al*., 2016) em reduzir a pressão arterial sistêmica através do eixo renina-angiotensina.

Figura 11. Pressões arteriais sistólica (**A**) e diastólica (**B**) após do consumo das refeições testes: pão + 300 mL de água (controle); e pão + 300 mL de suco clarificado de cagaita, Média ± desvio padrão (n=12).



No entanto, os resultados obtidos no presente estudo não excluem a possibilidade dos polifenóis atuarem na saúde vascular. Estas inconsistências nos resultados podem ser atribuídas às diferentes condições de cada estudo, tais como o perfil dos participantes, forma de administração e dose destes compostos, mas principalmente à biodisponibilidade para desempenharem suas ações relacionadas à saúde.

4.3. Avaliação da biodisponibilidade de compostos fenólicos de *Eugenia dysenterica* DC

Conforme apresentado anteriormente no item **4.1**, o suco de cagaita demonstrou ser uma boa fonte de elagitaninos. Sabe-se que os taninos não são passíveis de absorção devido ao seu elevado peso molecular. Os elagitaninos, em particular, sofrem hidrólise em sua estrutura polimérica originando ácido elágico, no intestino delgado, e posteriormente são metabolizados pela microbiota intestinal a outros compostos (MENA *et al*., 2014). Após o consumo de extrato de romã, rico em elagitaninos, foram identificados ácido elágico e Uro-B no plasma, enquanto metabólitos conjugados pelas reações de fase II, tais como Uro-A glicuronídeo, Uro-A sulfato, IsoUro-A glicuronídeo, dentre outros, foram detectados na urina de indivíduos saudáveis (GONZALES-SARRÍAS *et al*., 2015). De forma similar, Uro-A, Uro-B e suas formas conjugadas com ácido glicurônico foram identificadas na urina de indivíduos saudáveis, após o consumo de morangos frescos, também ricos em elagitaninos (TRUCHADO *et al*., 2012). No entanto, nada se sabia acerca da absorção/metabolização dos elagitaninos da cagaita. No presente estudo foi demonstrado que o suco não clarificado de cagaita apresentou aproximadamente 5 vezes mais elagitaninos em comparação ao clarificado (**Tabela 4**), indicando que grande proporção dos elagitaninos presente no fruto estão associados à fração fibra. Os polifenóis associados à fibras precisam ser hidrolisados por enzimas digestivas ou microbianas do trato gastrointestinal, caso contrário não se tornam biodisponíveis à absorção ou metabolização colônica (PALAFOX-CARLOS *et al*., 2011). Por isto, o intuito do presente estudo foi administrar aos voluntários a versão do suco mais similar ao fruto, e posteriormente avaliar a presença de metabólitos de elagitaninos nas amostras de urina 24 h de indivíduos saudáveis que consumiram 1 copo de suco não clarificado de cagaita (300 mL). A **Tabela 6** apresenta as características clínicas dos 16 indivíduos saudáveis que participaram deste ensaio.

Tabela 6. Características clínicas dos voluntários saudáveis que participaram do ensaio de biodisponibilidade.

Variáveis	Média ± DP
Indivíduos, *n*	16
Sexo (F/M)	12/4
Idade (anos)	33 ± 7
Peso (kg)	64 ± 10
IMC (kg/m^2)	23 ± 3
Circunferência da cintura (cm)	72 ± 9

Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão, IMC= Índice de massa corporal.

Considerando-se a baixa biodisponibilidade dos polifenóis, alguns trabalhos sugerem que estes não seriam os reais compostos que desempenhariam os efeitos benéficos à saúde (PUUPPONEN-PIMIA *et al*., 2013; TOMÁS-BARBERÁN *et al*., 2016a). A transformação metabólica destes compostos pela microbiota intestinal permite classificar seres humanos em produtores ou não produtores dos metabólitos provenientes dos polifenóis. Por exemplo, a daidzeína é uma isoflavona, proveniente da soja, que pode ser metabolizada a equol pela microbiota do indivíduo, sendo que este metabólito é apontado como tendo maior relevância na contribuição à saúde cardiovascular do que o composto original daidzeína (HAZIM *et al*., 2016). No entanto, estes possíveis benefícios são restritos a 25-60% da população que possuem um microbioma intestinal adequado para a bioconversão da daidzeína a equol (FRANKENFEL, 2016).

De forma similar, a metabolização de outros compostos fenólicos vem sendo intensamente estudada. Cerdá *et al*. (2004) demonstraram pela primeira vez a possibilidade da bioconversão dos elagitaninos pela microbiota humana, gerando metabólitos específicos. O metabotipo intestinal é capaz de determinar um fenótipo

metabólico em função dos metabólitos produzidos, a partir de compostos “pais”, como drogas e polifenóis, por exemplo, pelo microbioma intestinal. Desta forma, o metabotipo ou fenótipo não é definido apenas pelos metabólitos que o indivíduo produz, mas também pela composição e atividade da sua microbiota (ESPÍN *et al*., 2017). Portanto, recentemente, tem sido proposta a estratificação de indivíduos de acordo com a sua habilidade em produzir metabólitos microbianos específicos, a partir do consumo de elagitaninos. Três metabotipos de elagitaninos são sugeridos: A, B e 0, sendo A: caracterizado por indivíduos que apresentam na urina Uro-A e seus conjugados, B: produzem Uro-A juntamente com Uro-B e/ou IsoUro-A, e por último 0: não produzem nenhum destes compostos, embora Uro-C possa ser encontrada em todos os grupos por ser um metabólito intermediário entre a bioconversão dos elagitaninos a Uro-A e/ou Uro-B (TOMÁS-BARBERÁN *et al*., 2014).

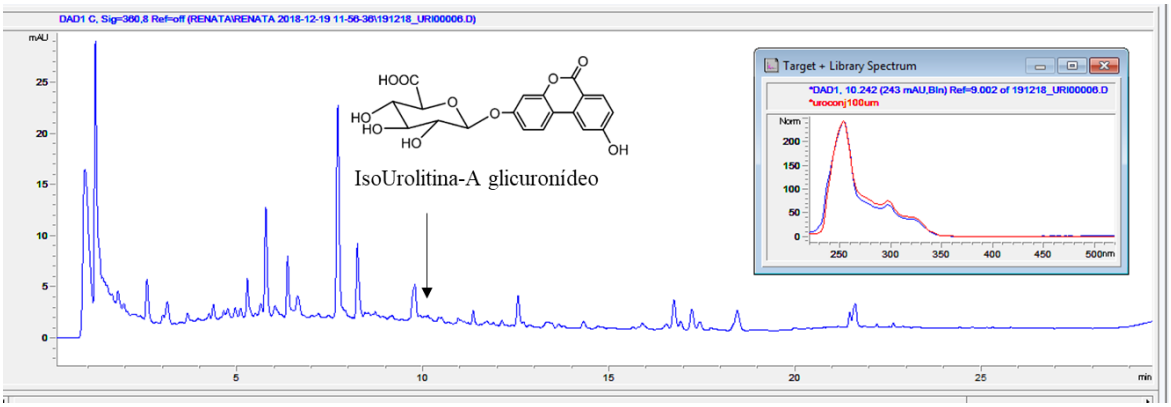
No presente estudo, pela primeira vez foi possível observar a metabolização dos elagitaninos, presentes na cagaita, a urolitinas. As mesmas Uro aqui identificadas foram também detectadas quando indivíduos saudáveis consumiram romã e morango (GONZALES-SARRÍAS *et al*., 2015; TRUCHADO et al., 2012). As urolitinas identificadas nas urinas dos voluntários apresentaram-se na forma de metabólitos que sofreram reações de fase II (glicuronidação) (**Tabela 7 e Figura 12**). Em outros estudos, as urolitinas presentes na urina de animais e seres humanos, após a ingestão de elagitaninos, também foram identificadas principalmente na sua forma conjugada com ácido glicurônico (TOMÁS-BARBERÁN *et al*., 2016b).

Tabela 7. Identificação de metabólitos presentes na urina de 24 h de indivíduos saudáveis que consumiram o suco não clarificado de cagaita.

Voluntário	Metabólito	TR	Experimental mass m/z	Concentração µm/L	Massa exata *m/z*	Metabotipo
1	Uro B-glic[a]	9.77		6.32		B
2	IsoUro A-glic[a]	10.23		20.44		B
	Uro B-glic[a]	14.26		29.12		
3	Uro A-glic[a]	9.7		14.40		A
4	Uro A-glic[a]	9.7		10.22		A
7	IsoUro A-glic[a]	9.78		22.13		B
	IsoUro A-glic[a]	10.22				
8	Uro A-glic[a]	9.72		4.15		A
9	Uro A-glic[a]	9.74		6.96		A
10	Uro B-glic[a]	14.27		7.75		B
11	Uro A-glic[a]	9.73		7.78		B
	Uro B-glic[a]	14.24		0.40		
12	IsoUro A-glic[a]	10.22		3.47		B
13	Uro A-glic[a]	9.77		2.27		B
	IsoUro A-glic[a]	10.23		2.26		
14	N.d[b]					0
15	N.d[b]					0
16	N.d[b]					0
17	Uro A-glic[a]	6.32	403.0666		403.0671	A
18	Uro A-glic[a]	6.31	403.0668		403.0671	A

[a] Compostos identificados e quantificados por CLAE-DAD-ESI-Q (MS). [b] Compostos identificados por CLUE-ESI-QTOF. N.d: não detectado.

Figura 12. Perfil cromatográfico a 305 nm e espectro ultravioleta-visível de IsoUro-A glicuronídeo presente na urina de 24 h de um voluntário, após o consumo do suco não clarificado de cagaita.



Dos 16 voluntários estudados, 37% podem ser classificados com metabotipo A (n=6), 44% como metabotipo B (n=7), e 19% metabotipo 0 (n=3) (**Tabela 7**). Como previamente reportado para a população europeia, 3 metabotipos de urolitinas foram observados no presente estudo. No entanto, as proporções destes metabotipos foram diferentes do que já foi previamente descrito em outros trabalhos. Em um ensaio clínico que administrou extrato de romã, rico em elagitaninos, a 20 indivíduos saudáveis, 65% pertenciam ao metabotipo A, 20% ao metabotipo B e 15% ao metabotipo 0. Resultados similares foram observados em outro ensaio, conduzido em voluntários saudáveis, onde 80% eram metabotipo A, 10% metabotipo B e 10% metabotipo 0 (TOMÁZ-BARBERÁN *et al*., 2014).

Um estudo realizado com 839 indivíduos, homens e mulheres saudáveis de diferentes faixas etárias, demonstrou que a distribuição dos metabotipos de urolitinas pode ser determinada pela idade. Isto indica que a microbiota intestinal, envolvida no metabolismo de elagitaninos, é regulada pelo desenvolvimento do indivíduo ao longo da vida. Enquanto 10% dos indivíduos não são produtores de urolitinas (metabotipo 0), independentemente da idade, a proporção de indivíduos tipo A diminui concomitantemente com o aumento de B, especialmente na faixa etária de 20 a 40 anos.

Estes resultados podem ser relevantes para a compreensão da variabilidade interindividual da população, em resposta a alimentos ricos em elagitaninos. No entanto, a etiologia por trás desta distribuição dos metabotipos, em função da idade, permanece sem resposta (CORTÉS-MARTÍN *et al*., 2018). Esta variação da proporção entre os metabotipos A e B pode explicar os resultados do presente estudo, uma vez que os voluntários apresentaram idade média entre 20 a 40 anos.

Outra situação que pode alterar a distribuição dos metabotipos a partir do consumo de elagitaninos é a presença da disbiose, presente em portadores de síndrome metabólica ou câncer colorretal. A maioria destes pacientes são metabotipo B (45%), ao passo que 40% correspondem ao metabotipo A e 16% são metabotipo 0 (TOMÁZ-BARBERÁN *et al*., 2014). Selma *et al*. (2016) descreveram pela primeira vez que a disbiose intestinal associada com o sobrepeso e obesidade é capaz de alterar a metabolização do ácido elágico, em comparação aos indivíduos saudáveis. Embora os três metabotipos fossem encontrados nos dois grupos, o metabotipo B prevaleceu nos obesos (31%) em comparação com eutróficos (20%), ao passo que o metabotipo A foi mais prevalente nos eutróficos (70%), em comparação aos obesos (57%). Ainda, nos indivíduos metabotipo A, foi observada maior concentração de *Gordonibacter* spp nas suas fezes, em relação ao metabotipo B.

A **Tabela 8** apresenta que dos 7 voluntários disglicêmicos, portadores de síndrome metabólica, 2 são considerados metabotipo 0 (29%,), 2 metabotipo A (29%) e 3 metabotipo B (42%).

Tabela 8. Identificação de metabólitos presentes na urina de 24 h de indivíduos disglicêmicos portadores de síndrome metabólica.

Voluntário	Metabólito	TR	Massa experimental m/z	Massa exata *m/z*	Fórmula Molecular	Metabotipo
101	N.d[b]	-	-	-	-	0
102	Uro B-glic[b]	9.807	387.0722	387.0714	$C_{19}H_{16}O_9$	B
103	Uro B-glic[a]	14.22	-		$C_{19}H_{16}O_9$	B
104	Uro A-glic[b]	6.32	403.0676	403.0671	$C_{19}H_{16}O_{10}$	A
105	Uro A-glic[b]	6.33	403.0674	403.0671	$C_{19}H_{16}O_{10}$	A
106	N.d[b]	-	-	-	-	0
107	IsoUro A-glic[b]	6.74	403.0671	403.0671	$C_{19}H_{16}O_{10}$	B
	Uro A-glic[b]	6.32	403.0661	403.0671	$C_{19}H_{16}O_{10}$	

[a] Compostos identificados e quantificados por CLAE-DAD-ESI-Q (MS). [b] Compostos identificados por CLUE-ESI-QTOF. N.d: não detectado.

Pelo fato de nem todos os metabólitos, provenientes de polifenóis, terem a mesma atividade biológica, a estratificação dos indivíduos de acordo com seu metabotipo abre um campo de exploração necessário para elucidar os efeitos dos compostos fenólicos na saúde, em particular os elagitaninos. González-Sarrías *et al*. (2016) avaliaram se o efeito dos polifenóis no perfil lipídico poderia sofrer diferença interindividual. Para tanto, indivíduos portadores de sobrepeso ou obesidade foram divididos de acordo com seu metabotipo A, B ou 0. Todos os grupos consumiram cápsulas contendo extrato de romã, rico em elagitaninos, e controle, por 3 semanas. Os primeiros resultados mostraram que antes das intervenções preconizadas pelo estudo, os indivíduos pertencentes ao metabotipo B apresentavam características clínicas diferentes dos metabotipos A e 0, em relação aos níveis de colesterol total, fração LDL, LDL oxidada e apoliproteína B, que eram acima da média destes outros grupos. Estes achados indicam que pessoas com sobrepeso e obesidade que são metabotipo B podem ter maior risco cardiovascular que as pessoas pertencentes ao metabotipo A e 0, com similar excesso de peso. No entanto, o

destaque do estudo é voltado para a melhora dos riscos associados à saúde cardiovascular, somente dos indivíduos com metabotipo B, devido à redução significativa de colesterol total, fração LDL e não-HDL, após o consumo das cápsulas de romã, o que sugere que o tipo de urolitina produzida pelo indivíduo poderia reduzir o risco de complicações cardiovasculares. Os autores concluíram que estes efeitos poderiam ser atribuídos aos níveis individuais de *Gordonibacter* spp, uma vez que este gênero bacteriano aumentou significativamente nas fezes dos metabotipos B, após o consumo das cápsulas de romã. Outros estudos recentes sugerem que este gênero bacteriano, isolado de fezes de seres humanos, saudáveis e sem disbiose, é capaz de converter urolitina M5 a Uro-C, ao passo que outras espécies desconhecidas metabolizam Uro-C em Uro-A ou IsoUro-A, o que caracteriza os indivíduos como metabotipo A ou B (ROMO VAQUERO *et al*., 2015; SELMA *et al*., 2014). A identificação dos gêneros bacterianos produtores destas formas finais de urolitinas pode levar à compreensão das relações interindividuais no metabolismo de polifenóis, possibilitando o estudo de novas abordagens terapêuticas que contribuam com a promoção de saúde.

Estudos epidemiológicos, ensaios clínicos e meta-análises têm demonstrado as possíveis ações dos elagitaninos e ácido elágico na saúde (CROZIER, *et al*., 2009; HANHINEVA *et al*., 2010). Contudo, estas propriedades benéficas poderiam ser atribuídas, em parte, às urolitinas que são os compostos, que de fato, circulam no sangue, alcançam as células alvo e possivelmente ativariam cascatas de sinalização. Propriedades antioxidantes, anticâncer, anti-inflamatória e hipolipidêmica têm sido demonstradas por estes metabólitos (ESPÍN *et al*., 2017; TOMÁS-BARBERÁN *et al*., 2016b), embora os possíveis efeitos biológicos das urolitinas na saúde ainda sejam muito pouco explorados. A maior parte dos estudos relacionados a este tema é *in vitro*, seguido de modelos animais com roedores e outros mamíferos, mas são bastante escassos em seres humanos.

O presente estudo mostrou que os elagitaninos presentes nos sucos não clarificado e clarificado de cagaita sofrem bioconversão pela microbiota intestinal dos indivíduos saudáveis e disglicêmicos portadores de SM, respectivamente. Está cada vez mais claro que a variabilidade individual da microbiota pode determinar os efeitos benéficos à saúde, atribuídos aos polifenóis. Assim, a estratificação dos indivíduos, de acordo com seus respectivos metabotipos, pode contribuir com a elucidação de mecanismos de ação dos compostos fenólicos na saúde, e conseguinte, em estudos futuros, traçar novas abordagens terapêuticas.

5. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

O perfil de compostos fenólicos da cagaita, identificado pela primeira vez, através de CLUE-ESI-QTOF, se caracteriza pela presença de elagitaninos, tais como telimagrandina I, pedunculagina e galoil-HHDP-hexose, além de proantocianidinas, flavonois e ácidos hidroxicinâmicos;

Os efeitos na redução da glicemia pós-prandial de indivíduos disglicêmicos, após o consumo do suco clarificado de cagaita são, provavelmente, relacionados à ação dos CBF, uma vez que não foi detectada a presença de fibras no suco. Além disso, fica demonstrado que o suco de cagaita não atua na modulação da via incretínica, indicando que a redução da quantidade de glicose absorvida nestes indivíduos ocorra por outras vias;

Em relação à biodisponibilidade, fica demonstrado, de forma inédita, que os elagitaninos da cagaita são passíveis de bioconversão a urolitinas pela microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e de disglicêmicos portadores de síndrome metabólica.

6. Referências

ABE, L. T., LAJOLO, F. M., : GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jabuticaba (Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, n.8, p.1679-1687, 2012.

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.

ALMINGER, M., AURA, A.M., BOHN, T., DUFOUR, C., EL, S.N., GOMES, A., KARAKAYA, S., MARTÍNEZ-CUESTA, M.C., MCDOUGALL, G.J., REQUENA, T., SANTOS, C.N. In vitro models for studyind secondary plant metabolite digestion and bioacessibility, **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, n.4, p.413-436, 2014.

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.

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, Glossario de definições Legais Portaria n.3.916/MS,GM, de 30 de outubro de 1998. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/glossário/glossario_b.htm. Acesso em: 07/06/2017.

ARONOFF, S.A., BERKOWITZ, K., SHREINER, R.N., WANT, L. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. **Diabetes Spectrum**, v.17, n.3, 2004.

ASZYK, J., KOT-WASIK, A. The use of HPLC-Q-TOF-MS for comprehensive screening of drugs and psychoactive substances in hair samples and several “legal highs” products. **Monatshefte fur Chemie**, v. 147, n.8, p. 1407-1414, 2016.

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.

BALISTEIRO, D.M., De Araujo, R.L., GIACAGLIA, L.R., GENOVESE, M.I. Effect of clarified Brazilian native fruit juices on postprandial glycemia in healthy subjects. **Food Research International**, v.100, p. 196-203, 2017.

BARBOSA-FILHO, J. M., VASCONCELOS, T. H. C., ALENCAR, A. A., BATISTA, L. M., OLIVEIRA, R. A. G., GUDES, D. N., FALCÃO, H. S., MOURA, M, D., DINIZ, M. F. F. M., MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituints from South, Central and North América with hypoglicemic 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.

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.

BIAZOTTO, K.R., MESQUITA, L.M.S., NEVES, B.V., BRAGA, A.R.C., TANGERINA, M., VILEGAS, W., MERCADANTE, A.Z., De ROSSO, V. Brazilian

Biodiversity Fruits: Discovering Bioactive Compounds from Underexplored Sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.67, p.1860-1876, 2019.

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.

BRESCIANI, L., MARTINI, D., MENA, P., TASSOTTI, M., CALANI, L., BRIGATI, G., BRIGHENTI, F., HOLASEK, S., MALLIGA, D.E., LAMPRECHT, M., DEL RIO, D. Absorption Profile of (Poly)Phenolic Compounds after Consumption of Three Food Supplements Containing 36 Different Fruits, Vegetables, and Berries. **Nutrients**, v.9, n.3, p.1-17, 2017.

BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R. Textbook of Clinical Chemistry. 2nd ed. WB Saunders Company: **WB Saunders Company**, 1994

CASTRO-ACOSTA, M.L., SMITH, L., MILLER, R.J., MCCARTHY, D.I., FARRIMOND, J.A., HALL, W.L. Drinks containing anthocyanin-rich blackcurrant extract decrease postprandial blood glucose, insulin and incretin concentrations. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.38, n.154-161, 2016.

CERDÁ, B., ESPÍN, B., PARRA, S., MARTÍNES, P., TOMÁS-BARBERÁN, F.A. The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolized into bioavailable but poor antioxidant hydroxyl-6H-dibenzopyran-6-one derivates by the colonic microflora of healthy humans, **European Journal of Nutrition**, v.43, n.4, p.205-220, 2004.

CHAUDHURY, A., DUVOOR, C., DENDI, V.S.R., KRALETI, S., CHADA, A., RAVILLA, R., MARCO, A., SHEKHAWAT, N.S., MONTALES, M.T., KURIAKOSE, A.S., SASAPU, A., BEEBE, A., PATIL, N., MUSHAN, C.K., LOHANI, G.P., MIRZA, W. Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. 6, p.1-12, 2017.

COE, S : RYAN, L. Impact of polyphenol-rich sources on acute postprandial glycaemia: a systematic review, **Journal of Nutritional Science**, v.5, n.24, p.1-11, 2016.

CORRÊA, F., NOGUEIRA, V.G., BEVILÁCQUIA, 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.

CORRÊA, V. G. et al. Estimate of consumption of phenolic compounds by Brazilian population. **Revista de Nutricão**, v. 28, p. 185–196, 2015.

CORTÉS-MARTÍN, A., GARCÍA-VILLALBA, R., GONZÁLES-SARRÍAS, A., ROMO-VAQUERO, M., LORIA-KOHEN, V., RAMÍREZ-DE-MOLINA, A., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., SELMA, M.V., ESPIN, J.C. The gut microbiota urolithin metabotypes revisited: The human metabolism of ellagic acid is mainly determined by aging. **Food and Function**, v.xx, pxx-xx, 2018.

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.

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 ARAÚJO, F.F., NERI-NUMA, I.A., FARIAS, D.P., Da CUNHA, G.R.M.C., PASTORE, G.M. Wild Brazilian species of Eugenia genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Research International**, v. 121, p. 57-72, 2019.

DE BOCK, M., DERRAIK, J.G.B., BRENNAN, C.M., BIGGS, J.B., MORGAN, P.E., HODGKINSON, S.C., HOFMAN, P.L., CUTFIELD, W. Olive (Olea europaea L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo controlled, crossover trial. **Plos One**, v.8, n.3, p.1-8, 2013.

DE, A., SINGH, M.F. Diabetes Mellitus and its relationship with Ghrelin-A. **Austin Journal of Endocrinology and Diabetes**, v.3, n.2, id1044, 2016.

DECODE Study Group. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-h diagnostic criteria. **Archives of Internal Medicine,** v.161, p.397-405, 2001.

DEL-RIO, D., RODRIGUEZ-MATEOS, A., SPENCER, J.P.E., TOGNOLINI, M., BORGES, G., CROZIER, A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.18, n.14, p.1818-1892, 2013.

DÍAZ-MULA, M.H., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., GARCÍA-VILLALBA, R . Pomegranate Fruit and Juice (cv. Mollar), Rich in Ellagitannins and Anthocyanins, Also Provide a Significant Content of a Wide Range of Proanthocyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p.xxxx-xxxx, 2019.

DONADO-PESTANA, C. M., BELCHIOR, T., FESTUCCIA, W.T., GENOVESE, M. I. 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**, v. 69, p. 170–178, 2015b.

DONADO-PESTANA, C. M., BELCHIOR, T., GENOVESE, M. I. Phenolic compounds fromcagaita (Eugenia dysenterica DC.) fruit prevent body weight and fat mass gain induced by a high-fat, high-sucrose diet. **Food Research International**, v. 77, p. 177–185, 2015a.

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.

ENGLISH, P.J., GHATEI, M.A., MALIK, I.A., BLOOM, S.R., WILDING, J.P.H. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, n.2, p.2984-2987, 2002.

ESPÍN, J.C., GONZÁLEZ-SARRÍAS. A., TOMÁS-BARBERÁN, F.A. The gut microbiota: A key fator in therapeutic effects of (poly)phenols, 2017 https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.033

ESTÉVEZ, M., XIONG, Y. Intake of oxidized proteins and amino acids and causative oxidative stress and disease: recent scientific evidences and hypotheses. **Journal of Food Science**, v.84, p. 387-396, 2019.

FANDRIKS, L. Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview, **Journal of Internal Medicine**, v.281, p.319-336, 2016.

FARREL, T., ELLAM, S., FORRELLI, WILLAMSON, G. Attenuation of glucose transport across Caco-2 cell monolayers by a polyphenol-rich herbal extract: Interactions with SGLT1 and GLUT2 transporters, **Biofactors**, v.39, n. 4, p.448-456, 2013.

FONSECA, V. A. New Developments in Diabetes Management: Medications of the 21st Century**. Clinical Therapeutics**, v.36 n.4, p. 477-484, 2014.

FRANKENFELD, C.L. Cardiometabolic risk and gut microbial phytoestrogen metabolite phenotypes. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.61, n. 1, p.xx-xx, 2016.

FUJITA, A., SARKAR, D., WU, S., KENNELLY, E., SHETTY, K., & GENOVESE, M. I. Evaluation of phenolic-linked bioactives of camu-camu (Myrciaria dubia Mc. Vaugh) for antihyperglycemia, antihypertension, antimicrobial properties and cellular rejuvenation. **Food Research International**, v.77, p.194–203, 2015.

GARCÍA-VILLALBA, R., ESPÍN J.C., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., Chromatographic and spectroscopic characterization of urolithins for their determination in biological simples. **Journal of Chromatography A**, v. 1428, p. 162-175, 2016.

GARCÍA-VILLALBA, R., ESPÍN, J.C. AABY, K., ALASALVER, C., HEINONEN, M., JACOBS, G., VOORPOELS, S., KOIVYUMAKI, T., KROON, P.A., PELVAN, E., SAHA, S., TOMÁS-BARBERÁN, F.T. Validated Method for the Characterization and Quantification of Extractable and Nonextractable Ellagitannins after Acid Hydrolysis in Pomegranate Fruits, Juices, and Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p.65555-6566, 2015.

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.

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.

GONZÁLES-SARRÍAS, A., GARCÍA-VILALBA, R., NUÑES-SANCHES, M.A., TOMÉ-CARNEIRO, J., ZAFRILLA, P., MULERO, J., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., ESPÍN, J.C. Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. **Journal of functional foods**, v.19, p.225-235, 2015.

GONZÁLES-SARRÍAS, A., GARCÍA-VILALBA, R., ROMO-VAQUERO, M., ALASALVAR, C.,ÖREM, A., ZAFRILLA, P., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., SELMA, M.V., ESPÍN, J.C. Clustering according to urolithin metabotype explains the interindividual variability in the improvement of cardiovascular risk biomarkers in overweight-obese individuals consuming pomegranate: A randomized clinical trial. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.61, n.5, 1600830, 2016.

GORBOULEV, V., SCHÜRMANN, A., VALLON, V.,KIPP, H., JASCHKE, A., KLESSEN, D., FRIEDRICH, A., SCHERNECK, S., RIEG, T., CUNARD, R., VEYHL-WICHMANN,M., SRINIVASAN, A., BALEN, D., BRELJAK, D., REXHEPAJ, D., PARKER, H.E., GRIBBLE F.M., REIMANN, F., LANG, F., WIESE, S., SABOLIC, I., SENDTNER, M., KOEPSELL, H. Na^{+}-D-glucose Cotransporter SGLT1 is Pivotal for Intestinal Glucose Absorption and Glucose-Dependent Incretin Secretion. **Diabetes**, n.61, v.1, p.187-196, 2012.

GRANDL, G., WOLFRIM, C. Hemostasis, endothelial stress, inflammation, and the metabolic syndrome. **Seminars in Immunopathology**, v.40, p.215-224, 2017.

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.

HAZIM, S.,CURTIS, P.J., SCHÄR, M.Y., OSTERTAG, L.M.,KAY, C.D., MINIHANE, A.M., CASSIDY. A. Acute benefits of the microbial-derived isoflavone metabolite equol on arterial stiffness in men prospectively recruited according to equol producer phenotype: a double-blind randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.103, n.3, p.694-702, 2016.

HOGGARD, N., MORVEN, C., MOAR, K.M., BESTWICK, C., HOLST, J.J., RUSSELL, W., HORGAN, G. A single supplement of a standardized bilberry (Vaccinium myrtillus L.) extract (36 % wet weight anthocyanins) modifies glycaemic response in individuals with type 2 diabetes controlled by diet and lifestyle. **Journal of Nutritional Science**, v.22, p.1-9, 2013.

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.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF. Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. Disponível em: <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>. Acesso em: 16/05/2017.

INTERNATIONAL DIABTES FEDERATION. Guidelines for management of postmeal glucose in diabetes. Diabetes Research and Clinical Practice, v.103, p.256-268, 2014.

ISRAILI, Z. H., HALL, W. D. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. **Annals of Internal Medicine**, v.117, p.234−242, 1992.

JUNG, C., JANG, J. E PARK, J. A novel therapeutic agent for type 2 diabetes mellitus : SGLT2 inhibitor. **Diabetes & Metabolism Journal**, v.38, pp. 261-273, 2014.

KARONEN, M., LEIKAS, A., LOPONEN, J., SINKKONEN, J., OSSIPOV, V., PIHLAJA, K. Reversed-phase HPLC-ESI/MS analysis of birch leaf proanthocyanidins after their acidic degradation in the presence of nucleophiles. **Phytochemical Analysis**, v. 18, n.5, p.378-386, 2007.

KIM, Y., KEOGH, J.B., CLIFTION, P.M. Polyphenols and glycemic control. **Nutrients**, v.8, p.1-27, 2016.

KOH, L.W., WONG, L.L., LOO, Y.Y., KASAPIS, S., HUANG, D. Evaluation of Different Teas against Starch Digestibility by Mammalian Glycosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.58, v.1, p.148-154, 2010.

LANDETE, J.M. Ellagitannins, ellagic acid and their derives metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v.44, p. 1150-1160, 2011.

LANDSBERG, L., ARONNE, L.J., BEILIN, L.J., BURKE, V., IGEL, L.I., LLOYD-JONES, D., SOWERS, J. I. Obesity-Related Hypertension: Pathogenesis, Cardiovascular Risk, and Treatment. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 15, n. 1, p. xx-xx, 2013.

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., GROSSIDE- 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.

LORENZO, J.M., MUNEKATA, P.E., PUTNIK, P., KOVACEVIC, B., MUCHENJE, V., BARBA, F.J. Sources, chemistry and biological potential of ellagitannins and ellagic acid derivatives. Título: Studies in Natural Products, In: ATTA-UR, RAHMAN, p. 189-221, 2018.

MACE, O.J., SCHINDLER, M., PATEL, S. the regulation of K-cell and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. **The Journal of Physiology**, v.590, n.12, p.2917-2936, 2012.

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.

MARTINOTTO, C., PAIVA, R., SOARES, F.P., SANTOS, B.R., NOGUEIRA, R.C. **CAGAITEIRA (Eugenia dysenterica DC.)**. Boletim Técnico n.º 78 - p. 1-21, Lavras, UFL, 2008.

MARTÍN-PELÁEZ, S., CASTAÑER, O., KONSTANTINIDOU, V., SUBIRANA, I., MUÑOZ-AGUAYO, D., BLANCHART, G., GAIXAS, S., TORRE, R., FARRÉ, M., SÁEZ, G.T., NYYSSONEN, K., ZUNFT, H.J., COVAS, M.I., FITÓ, M. Effect of olive oil phenolic compounds on the expression of blood pressure-related genes in healthy individuals, **European Journal of Nutrition**, v.56, p.663-670, 2017.

MARUNAKA, Y., MARUNAKA. R., SUN, H., YAMAMOTO, T., KANAMURA, N., TOSHIO INUI, T., TARUNO, A. Actions of quercetin, a polyphenol, on blood pressure. **Molecules**, v.22, n.2, p.1-12, 2017.

McCRAKEN, E., MONAGHAN, M., SREENIVASAN, S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. **Clinics in Dermatology**, v. 36, p. 14-20, 2018.

MCDOUGALL, G.J., STEWART, D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **Biofactors**, *v.23*, n.4, p.184-195, 2005.

MEDINA-REMÓN, A., CASAS, R., TRESSSERRA-RIMBAU, A., ROS, E., MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.A., FITÓ, M., CORELLA, D., SALAS-SALVADÓ, J., LAMUELA-RAVENTOS, R.M., ESTRUCH, R. Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a substudy of the PREDIMED trial. **British Journal of Clinical Nutrition**, v.84, n.1, p.114-128, 2017.

MUBARAK, A., BONDONNO, C.P., LIU, A.H., CONSIDINE, M.J. RICH, L., MAS, E., CROFT, K.D., HODGSON, J.M. Acute Effects of Chlorogenic Acid on Nitric Oxide Status, Endothelial Function, and Blood Pressure in Healthy Volunteers: A Randomized Trial. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** n. 60, p.9130-9136, 2012.

NAKAGAMI, T., QIAO, Q., TUOMILEHTO, J., BALKAU, B., TAJIMA, N., HU, G., BORCH-JOHNSEN, K. Screen-detected diabetes, hypertension and hypercholesterolemia as predictors of cardiovascular mortality in five populations of Asian origin: the DECODA study. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 13, p.555-561, 2006.

NAM HAN, C. *et al*. Diabetes Atlas Eighth edition. **International Diabetes Federation**, 2017.

NAUCK, M., MEIER, J. The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions, **Lancet Diabetes Endocrinology**, n.4, v.6, p.525-536, 2016.

NUÑES-SANCHEZ, M.A., GARCÍA-VILLALBA, R., MONEDERO-SAIZ, T., GARCÍA-TALAVERA, N.V., GÓMEZ-SÁNCHEZ, M.B., SÁNCHEZ-ÁLVAREZ, C., GARCÍA-ALBERT, A.M., RODRÍGUEZ-GIL, F.J., RUIZ-MARÍN, M., PASTOR-QUIRANTE, F.A., MARTÍNEZ-DÍAZ, F., YÁÑEZ-GASCÓN, M.J., GONZÁLEZ-SARRÍAS. A., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., ESPÍN, J.C. Targeted metabolic profile pf pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. **Molecular Nutrition & Food Research,** v.58, p.1199-1211, 2014.

OH, I.K., BAE, I.Y., LEE H.G. In vitro starch digestion and cake quality: Impact of the ratio of soluble and insoluble dietary fiber. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.63, p.98-103, 2014.

PALAFOX-CARLOS, H., AYALA, ZAVALA, J.F., GONZÁLZ-AGUIAR, G.A. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. **Journal of Food Science**, v.76, n.1, p.6-15, 2011.

PALHARES, D. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae Jussieu). **Revista Lecta**, v.21, n.1/2, p.29-36, 2003.

PAQUETTE, M., LARQUÉ, A.S.M., WEISNAGEL, S.J. DESJARDINS. Y., MAROIS, J., PILON, G., DUDONNÉ, S., MARETTE, A., JACQUES, H. Strawberry and cranberry polyphenols improve insulin sensitivity in insulin-resistant, non-diabetic adults: a parallel, double-blind, controlled and randomized clinical trial. **British Journal of Nutrition**, v.117, p.519-531, 2017.

PUUPPONEN-PIMIA, R., SEPPANEN-LAAKSO, T., KANKAINEN, M., MAUKONEN, J., TORRÖONEN, R., KOLEHMAINEN, M., LEPPANEN, T., MOILANEN, E., NOHYNEK, L., AURA, A.M., POUTANEN, K., TOMAS-BARBERÁN, F.A., ESPÍN, J.C., OKSMAN-CALDENTEY, K.M. Effects of ellagitannin-rich berries on blood lipids, gut microbiota, and urolithin production in human subjects with symptoms of metabolic syndrome. **Food & Function**, n.57, p.2258-2263, 2013.

RANGEL-HUERTA, O.D., PASTOR-VILLAESCUSA, B., AGUILERA, C.M., GIL, A. A systematic review of the efficacy of bioactive compounds in cardiovascular disease: phenolic compounds. **Nutrients**, v.7, p.5177-5216, 2015.

RAUF, A., IMRAN, M., ABU-IZNEID, T., UL-HAQ, I., PATEL, S., PAN, X., NAZ, S., SILVA, A.S., SAEED, F., SULERIA, H.A.R. Proanthocyanidins: A comprehensive review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, 2019.

RIED, K., SULLIVAN, T., FLAKER, P., FRANK, O.R., STOCKS, N.P. Does chocolate reduce blood pressure? A meta-analysis. **BioMed Central**, v.8, n.39, p.1-11, 2010.

ROCHLANI, Y., POTHINENI, N.V., KOVELAMUDI, MEHTA, J.L. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v.11, n.8, p.215-225, 2017.

ROMO-VAQUERO, M., GARCÍA-VILLALBA, R., GONZÁLEZ-SARRÍAS, A., BELTRÁN, D., A., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., ESPÍN, J.C., SELMA, M.V. Interindividual variability in the human metabolism of ellagic acid: Contribution of *Gordonibacter* to urolithins production, **Journal of Functional Foods**, v.17, p.785-791, 2015.

SELMA, M.V., BELTRÁN, D., GARCÍA-VILLALBA, R., ESPÍN, J.C., TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Description of urolithin production capacity from ellagic acid of two human intestinal *Gordonibacter* species. **Journal of Functional Foods**. v.5, n.8, p.1779-1784, 2014.

SELMA, M.V., ROMO-VAQUERO, M., GARCÍA-VILLALBA, R., GONZÁLEZ-SARRÍAS, A., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., ESPÍN, J.C. The human microbial ecology associated with overweight and obesity determines ellagic acid metabolism. **Food & Function**, n.7, p.1769-1774, 2016.

SILVA, D. B., SILVA, J. A., JUNQUEIRA, N. T. V., ANDRADE, L. R. M. **Frutas do Cerrado**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.178, 2001.

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.

SIQUEIRA, M. I. D. de, GERALDINE, R. M., QUEIROZ, K. da S., TORRES, M. C. L., SILVEIRA, M. F. A. **Processamento de geleia, doce de corte e pastoso e néctar de cagaita**. Goiânia: UFG, 1997.

SOLAYMAN, M., ALI, Y., ALAM, F., ISLAM, M.A., ALAM, N., KHALIL, M.I., GAN, S.H. Polyphenols: Potential Future Arsenals in the Treatment of Diabetes. **Current Pharmaceutical Design**, v.22, p.549-565, 2016.

SONG, I., MULLER, C., LOUW, J., BOUWENS, L. Regulating the Beta cell mass as a strategy for type 2 diabetes. **Current Drug Targets**, v.16, n. 3, p.xx-xx, 2015.

SPARKS, M. A., CROWLEY, S.D., GURLEY, S.B., MIROTSOU, M., COFFMAN, T.M. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n.3, p. 1201–1228, 2014.

STEIN, S.A., LAMOS, E.M., DAVIS, S.N. A review of the efficacy and safety of oral antidiabetic drugs. **Expert Opinion on Drug Safety**, v.12, p.153–175, 2013.

TAUBERT, M.D., ROESEN, R., LEHMAN, C., JUNG, N., SCHÖMIG, E. Effects of Low Habitual Cocoa Intake on Blood Pressure and Bioactive Nitric Oxide, **Journal of American Medical Association,** v.298, n.1, p.49-60, 2007.

THOMAS, T., & PFEIFFER, A.F.H. Foods for the prevention of diabetes: how do they work? **Diabetes/Metabolism Research Reviews**, v.28, p.25-49, 2012.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A., GARCÍA-VILLALBA, R., GONZÁLEZ-SARRÍAS, A., SELMA, M.V., ESPÍN, J.C. Ellagic Acid Metabolism by Human Gut Microbiota: Consistent Observation of Three Urolithin Phenotypes in Intervention Trials, Independent of Food Source, Age, and Health Status. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.62, p.6536-6538, 2014.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A., R., GONZÁLEZ-SARRÍAS, A. GARCÍA-VILLALBA, NUÑES-SANCHES, M.A SELMA, M.V., GARCÍA-CONESA, M.T., ESPÍN, J.C. Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. **Molecular Nutrition & Food Research**, n.61 p. 1-35, 2016a.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A., SELMA, M.V., ESPIN, J.C. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.19, n.6, p.471-476, 2016b.

TORRONEN, R., KOLEHMAINEN, M., SARKKINEN, E., POUTANEN, K., MYKKÄNEN, H., NISKANEN, L. Berries Reduce Postprandial Insulin Responses to Wheat and Rye Breads in Healthy Women. **Journal of Nutrition**, v.143, n.4, P.430-436, 2013.

TRUCHADO, P., LARROSA, M., GARCÍA-CONESA, M.T., CERDÁ, B., VIDAL-GUEVARA, M.L., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., ESPÍN, J.C. Strawberry Processing Does Not Affect the Production and Urinary Excretion of Urolithins, Ellagic Acid Metabolites, in Humans**. Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 60, p.5749-5754, 2012.

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/BrazilFoods (1998). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, - USP, Version 5.0. http://www.fcf.usp.br/tabela

VELDERRAIN-RODRÍGUES, G.R., PALAFOX-CARLOS, H., WALL-MEDRANO, A., AYALA-ZAVALA, J.F., CHIEN, C.Y.O.; ROBLES-SÁNCHEZ, M., ASTIAZARAN-GARCÍA, H., ALVAREZ-PARRILLA, E., GONZÁLEZ-AGUIAR, G.A. Phenolic compounds: their journey after intake. **Food Function**, v.5, p.189-197, 2014.

VILLALBA, K.J.O., BARKA, F., PASOS, C.V., RODRÍGUEZ, P.E. Food Ellagitannins: Structure, Metabolomic Fate, and Biological Properties. Título: IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.86420.

WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **The Clinical Biochemist Reviews**, v.26, n.2, p.19-39, 2005.

World Health Organization. **European Action Plan for Food and Nutrition Policy** 2007–2012, World Health Organization: Copenhagen, Denmark, 2008.

YAHFOUFI, N., ALSADI, N., JAMBI, M., MATAR, C. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. **Nutrients**, v.10, p. 1-23, 2018.

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

ZAMORA-ROS, R., KNAZE, V., ROTHWELL, J.A., HÉMON, B., MOSKAL, A., OVERVAD, K., TJONNELAND, A., KYRO, C., FAGHERAZZI, G., BOURTON-RUALT, M.C., TOUILLAUD, M., KATZE, V., KÜHN, T., BOEING, H., FÖSTER, J. et al. Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. **European Journal of Nutrition**, v.55, p.1359-1375, 2016.

ZAMORA-ROS, R., ROBASSA, M., LLORACH, R., GONZÁLEZ, C.A., ANDRES-LACUEVA, C. Application of dietary phenolic biomarkers in epidemiology: past, present, and future. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.27, p.6648-6657, 2012.

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo HCFMUSP

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa – Efeito dos compostos fenólicos de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) e Cambuci (*Campomanesia phea* Berg) sobre a função das células β pancreáticas de indivíduos portadores de síndrome metabólica e disglicemia,

Pesquisador principal – Dra, Rosa Ferreira dos Santos

Departamento/Instituto – Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio (LIM-18); Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do HCFMUSP

Convidamos o Sr (a) a VOLUNTARIAMENTE a participar desta pesquisa:

1 – **Justificativa e objetivos do estudo -** 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,

2 – Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados - 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 (TTOG) duas vezes, com intervalo de uma semana entre um e outro, O TTOG será realizado com o intuito de confirmar o diagnóstico de pré-diabetes, Após a confirmação do diagnóstico de pré-diabetes o paciente será submetido ao **TESTE DA DIETA** que consta do seguinte: A veia do antebraço é puncionada e, mantida com cateter apropriado para retirada de 14 ml de sangue nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutos, 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, no terceiro e último teste o paciente receberá 300 ml de suco de cambuci mais um pãozinho de 50 gr, Além da coleta de sangue a pressão arterial será medida de hora em hora durante 3 horas (180 minutos) e a coleta de urina durante 24 horas, após a refeição, será solicitada,

3 – Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa - 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, Poucos riscos são associados à punção venosa: sangramento excessivo, desmaio ou tontura, hematoma (surgimento de mancha roxa na pele que desaparece em 15 dias, aproximadamente), infecção (pequeno risco que se corre cada vez que a pele é rompida) e várias punções para localizar as veias, Como o tamanho das veias e artérias varia de um paciente a outro e de um lado do corpo ao outro, a obtenção da amostra de sangue em algumas pessoas pode ser mais difícil do que em outras, Danos decorrentes da participação do paciente na pesquisa serão indenizados,

4 – Benefícios para o participante – Não haverá benefícios diretos ao participante mas a pesquisa contribuirá para o avanço científico na área do diabetes,

5– O paciente terá a garantia de liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição; **Direito de confidencialidade** – Os resultados das coletas de sangue são confidenciais, Não será divulgada a identificação de nenhum paciente; **Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas** - **Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento,**

6 - Descrição de procedimentos de assistência – O paciente passará por consultas com profissionais da área médica, nutricional e psicológica, sempre que necessário, durante a pesquisa,

7 – Despesas e compensações: Não estão previstas despesas pessoais para o paciente em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, Também não há compensação financeira relacionada à sua participação, exceto para transporte de casa para instituição e vice e versa, Ao final da pesquisa o paciente receberá uma quantia em dinheiro equivalente ao valor gasto com transporte público, e um lanche, ambos fornecidos pela verba financeira da pesquisa, Outras despesas decorrentes da participação do paciente serão reembolsadas,

8 – O material biológico como sangue e urina obtidos para esta pesquisa será armazenado somente para fins desta pesquisa, Há um compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa, Caso as amostras de sangue e urina estocadas precisem ser utilizadas no futuro, será pedido um novo consentimento ao paciente e ao sistema CEP-CONEP,

9 – Em qualquer etapa do estudo, o paciente 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 farmacêutica* ***Profa, Dra, Maria Inés Genovese*** e a nutricionista ***MSc, 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 98313-1727; a farmacêutica Dra Maria Ines Genovese, e a nutricionista MSc, Renata Luise de Araujo, nos telefones 3091-3712 e 3091-1525, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av Prof Lineu Prestes, 580 Bloco 13A, Se o paciente tiver 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: (11) 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, ou (11) 2661-7585 – E-mail

Eu discuti as informações acima com a Pesquisadora Responsável Dra, Rosa Ferreira dos Santos ou pessoa por ela indicada MSc, Renata Luise de Araujo sobre a minha decisão em participar nesse estudo, Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias, Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador,

Assinatura do paciente: Data ___/___/___

Data ___/___/___

Assinatura do responsável pelo estudo

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

1, NOME: ,:,,, ,,,

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,SEXO- M □ F DATA NASC,

,,,,,,,,/,,,,,,,,/,,,,,, CPF:,,,

ENDEREÇO ,,
Nº,,,,,,,,,,,,,,,,APT,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,

BAIRRO:,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,, CIDADE,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,CEP:,,,,,,,,,,,,,,,,,,

TELEFONE: DDD (,,,,,,,,,,,,) ,,

ANEXO B - Termo De Consentimento Livre e Esclarecido da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1, Informações do Participante da Pesquisa

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº,:	Sexo: ( ) M ( ) F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº,:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

2, Informações do Responsável Legal

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº,:	Sexo: ( ) M ( ) F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº,:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

3, Título do Projeto de Pesquisa

Efeito dos compostos fenólicos de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) e Cambuci (*Campomanesia phea* Berg) sobre a função das células β pancreáticas de indivíduos portadores de síndrome metabólica e disglicemia,

4, Duração da Pesquisa

24 meses

5, Nome do Pesquisador Responsável

ROSA FERREIRA DOS SANTOS	
Cargo/ Função: PROFESSOR DOUTOR	Nº de registro do Conselho Regional:15871

6, Instituição/Instituições

Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Eu, Dra Rosa Ferreira dos Santos, médica e as colaboradoras deste estudo, a Profa, Dra, Maria Inés Genovese, farmacêutica-bioquímica e a nutricionista MSc, Renata Luise Araujo, **Convidamos o Sr (a) a VOLUNTARIAMENTE** a participar desta pesquisa:

1 – **Justificativa e objetivos do estudo -** 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 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, mas para isso é necessário avaliar a digestão destas frutas em pessoas saudáveis também,

2 – Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados - O estudo consta do seguinte : O paciente comparece às 7 hs da manhã, em jejum de 8 horas, no laboratório de compostos bioativos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, Será acomodado, por colaboradores do projeto, em cadeira confortável, onde permanecerá para consumir um copo de água (300mL), Logo após o consumo, o(a) senhor(a) receberá um frasco coleta da urina e um para a coleta de fezes, Toda a urina produzida até as 7 horas da manhã do dia seguinte deverá ser recolhida neste frasco e a uma pequena parte das fezes eliminadas (a colher que vem no frasco já é a medida certa), nos próximos dois dias deverá ser

coletada, O senhor(a) irá participar de mais dois testes em outros dias, um dia para tomar o suco de cagaita e o outro para consumir o suco de cambuci, no mesmo local e horário, e o procedimento de coleta de urina e fezes será repetido,

3 – Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa - O desconforto do dos testes estão associados a coleta da urina e fezes, Algumas pessoas têm dificuldades em manejar seus fluidos biológicos por constrangimento pessoal, Por isso, serão selecionadas APENAS pessoas que se consideram aptas a realizar estes procedimentos, Danos decorrentes da participação do paciente na pesquisa serão indenizados,

4 – Benefícios para o participante – Não haverá benefícios diretos ao participante mas a pesquisa contribuirá para o avanço científico na área do diabetes,

5– O paciente terá a garantia de liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição; **Direito de confidencialidade** – Os resultados das coletas de fezes e urina são confidenciais, Não será divulgada a identificação de nenhum paciente; **Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas** - **Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento,**

6 - Descrição de procedimentos de assistência – O paciente passará por consultas com profissionais da área médica, nutricional e psicológica, sempre que necessário, durante a pesquisa,

7 – Despesas e compensações: Não estão previstas despesas pessoais para o paciente em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, Também não há compensação financeira relacionada à sua participação, exceto para transporte de casa para instituição e vice e versa, Ao final da pesquisa o paciente receberá uma quantia em dinheiro equivalente ao valor gasto com transporte público, e um lanche, ambos fornecidos pela verba financeira da pesquisa, Outras despesas decorrentes da participação do paciente serão reembolsadas,

8 – O material biológico como urina e fezes obtidos para esta pesquisa será armazenado somente para fins desta pesquisa, Há um compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa, Caso as amostras de urina e fezes estocadas precisem ser utilizadas no futuro, será pedido um novo consentimento ao paciente e ao sistema CEP-CONEP,

9 – Em qualquer etapa do estudo, o paciente 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 farmacêutica* ***Profa, Dra, Maria Inés Genovese*** e a nutricionista ***MSc, 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 98313-1727; a farmacêutica Dra Maria Ines Genovese, e a nutricionista MSc, Renata Luise de Araujo, nos telefones 3091-3712 e 3091-1525, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av Prof Lineu Prestes, 580 Bloco 13A,

Consentimento Pós-Esclarecido

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

São Paulo, _____ de _____ de _____,

_____	_____
Assinatura do Participante de Pesquisa ou do Responsável Legal	Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** da **Universidade de São Paulo**: Av, Prof, Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP 05508-000, Telefones 3091-3622 e 3091-3677, e-mail: **cepfcf@usp,br**,

ANEXO C - Efeito do suco clarificado de cagaita sobre a glicemia pós-prandial de indivíduos disglicêmicos.

	Controle	Suco clarificado	*p*
Dg (mg glicose/dL)	37 ±17[a]	21 ± 8[b]	0,0090
PIg (%)	36 ± 14[a]	20 ± 7[b]	0,0086
VIg (mg glicose/mL,minuto)	0,68 ± 0,33[a]	0,52 ± 0,18[a]	0,2105
VPg (mg glicose/mL)	138 ± 27[a]	122 ± 17[b]	0,0234
VPi (pg insulina/mL)	2197 ± 955[a]	1426 ± 630[b]	0,0070
	AUC incremental		
Glicose (mg/dL)	3705 ± 2123[a]	1743 ± 921[b]	0,0010
Insulina (pg/mL)	133490 ± 67192[a]	83438 ± 38227[b]	0,0055
Glucagon (pg/mL)	2054 ± 1097[a]	2393 ± 1497[a]	0,5325
GIP (pg/mL)	22794 ± 7994[a]	5096 ± 1833[b]	0,0001
GLP-1 (pg/mL)	1520 ± 1899[a]	1498 ± 1677[a]	0,3394
Peptídeo C (pg/mL)	257775 ± 281682[a]	107203 ± 93186[b]	0,0034
Grelina (pg/mL)	1367 ± 1171[a]	1386 ± 670[a]	0,3125

Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão (n=12). Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). AUC= área abaixo da curva; Dg= incremento absoluto de glicose; PIg= incremento percentual de glicose; VIg= velocidade de incremento de glicose; VPg= valor do pico de glicose; VPi= valor do pico de insulina.