

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos**  
**Área de Bromatologia**

**Compostos bioativos de cultivares brasileiras de morango**  
**(*Fragaria x ananassa* Duch.): caracterização e estudo da**  
**biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico**

**MÁRCIA DA SILVA PINTO**

**Tese para obtenção do grau de**

**DOUTOR**

**Orientadora: Prof. Dr. MARIA INÉS GENOVESE**

**São Paulo**

**2008**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos**  
**Área de Bromatologia**

**Compostos bioativos de cultivares brasileiras de morango**  
**(*Fragaria x ananassa* Duch.): caracterização e estudo da**  
**biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico**

**MÁRCIA DA SILVA PINTO**

**Tese para obtenção do grau de**

**DOUTOR**

**Orientadora: Prof. Dr. MARIA INÉS GENOVESE**

**São Paulo**

**2008**

**MARCIA DA SILVA PINTO**

**Compostos bioativos de cultivares brasileiras de morango (*Fragaria x ananassa*  
Duch.): caracterização e estudo da biodisponibilidade dos derivados de ácido  
elágico**

**Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor**

**Profa. Dra. Maria Inés Genovese**

**Orientador/Presidente**

---

**1o. examinador**

---

**2o. examinador**

---

**3o. examinador**

---

**4o. examinador**

**São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.**

*"As pessoas raramente reconhecem a oportunidade  
porque ela surge disfarçada em trabalho árduo."*

Henry Louis Mencken (1880-1956)

*Dedico à minha mãe, meu pai (in memoriam), meu irmão e*

*Shamil Sadigov que me apoiaram nesta jornada*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo presente da vida e por tantas oportunidades recebidas nessa presente existência. À força superior que sempre me ajudou nos momentos em que era chamada aos caminhos do aprendizado. A vida realmente é uma escola onde somos chamados a fazer provas do que aprendemos.

Enormes agradecimentos à minha família que sempre me incentivou e me apoiou nas minhas decisões. Minha mãe, essa pessoa maravilhosa, alicerce e exemplo a ser seguido de determinação e coragem. Ao meu irmão que me descontraíu em muitos momentos em que necessitava relaxar. Ao meu pai (*in memoriam*) que me ensinou a retidão de caráter e a seguir os meus sonhos mesmo que em muitos momentos houvessem quedas. Aos meus tios Vitor e Lucia e primos Luiz Augusto e Carlos Augusto que tanto me auxiliaram e incentivaram nessa jornada. Gertrudes, amiga inseparável e conselheira enormes agradecimentos por ter me apoiado em muitos momentos difíceis e me fazendo acreditar que eu podia um pouco mais.

Ao meu noivo Shamil Sadigov, por ter aparecido na minha vida para me apoiar em muitos momentos difíceis e pelo amor incondicional. Acredito que nada nesta vida seja fruto do acaso, e ter encontrado você foi o maior presente que poderia receber da vida. Confiança, respeito e amizade foram algumas das coisas que recebi e aprendi com você. “Я Тебя люблю”

Agradeço imensamente a Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Inés Genovese que acreditou no meu potencial e me ensinou tudo que sei. Também agradeço pela orientação, pelo seu exemplo, incentivo, dedicação, confiança, apoio e amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Kalidas Shetty pelo período de bolsa sanduíche na *University of Massachusetts*, Amherst, Estados Unidos. Nesse período cresci muito não só como pesquisadora mas também como pessoa, através de edificantes discussões a respeito do nosso papel nesse mundo. Nunca esquecerei do apoio que recebi quando cheguei em um país com cultura e língua totalmente diferentes. “*Be good*” “*Be happy*” (heheheehh). Também agradeço aos meus colegas de laboratório no *Department of Food Science*: Young In-Kwon, Emmanouil Apostolidis, Reena Rhandir, Chandra e Dipayan. À Lena Galvez Ranilla que dividiu não somente o quarto comigo durante esse período mas também as experiências e as dúvidas, me agüentando e me auxiliando em

vários momentos (hehehehehe). E tantos outros que fizeram da minha experiência em Amherst, inesquecível...

*Ninguém cresce sozinho.* Por isso, não poderia deixar de agradecer a muitos pesquisadores que ajudaram com sugestões valiosas e auxílios no desenvolvimento de metodologias como: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho da Divisão de Farmacologia e Toxicologia (CPQBA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelas análises da atividade antiproliferativa; Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa da Universidade Estadual de São Paulo pelas valiosas sugestões na purificação dos compostos; Prof. Dr. Antonio Salatino e a Prof. Dra. Maria Luiza Salatino do Instituto de Biociências (USP) pelas valiosas discussões e ajudas durante a execução desse projeto. Agradeço também Felipe Augusto Dörr pelo auxílio técnico nas análises do LC/MS e Dr. Aderuza Horst pelo auxílio dado no experimentos com os ratos.

Agradeço também aos professores deste laboratório que durante todos esses anos de convivência me auxiliaram e me ensinaram muito do que sei: Prof. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi, Prof. Dra. Elizabeth Wenzel, Prof. Dr. Eduardo Purgatto, Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento, Prof. Dr. Franco Lajolo que em vários momentos me brindaram com seu auxílio e contribuíram para minha formação.

Durante esse período muitas amizades verdadeiras foram construídas e pessoas muito especiais fizeram parte de momentos muito importantes na minha vida. Por isso, não poderia deixar de agradecer imensamente a Ana Cristina Lopes Barbosa, minha amiga e irmã do coração, Eliana Bistriche minha mãe do coração, Neuza Mariko Aymoto Hassimotto minha amiga e conselheira um exemplo a ser seguido, Lucile Tiemi Abe pela amizade construída durante todo esse tempo. Vocês são muito especiais na minha vida.... Lúcia Justinos, Márcia Moraes e Tania Shiga pelo constante auxílio na execução desse projeto além do carinho e amizade.

Ainda, agradeço de forma muito especial a tantos amigos que enriqueceram minha experiência e me fizeram crescer muito: Adair, Adriana, Amanda, Any Elisa, Cintia, Claudinéia, Débora, Diully, Fernanda Peroni, Fernanda (estagiária), Janaína, Jacqueline, João Paulo, Juliana, Kátia, Malu, Marcela, Maurício, Melina, Michele, Milana, Paola, Priscila, Renato Astorino Filho, Renato Heidor, Roberta, Silvia.

Ao pessoal da Secretaria de Alimentos e Nutrição Experimental, Mônica, Cléo e Edilson, e da Secretaria de Pós-Graduação, Jorge e Elaine, sempre solícitos e gentis.

À CAPES pela bolsa-sanduiche nos Estados Unidos, e à FAPESP pela bolsa no período do doutorado e pelo suporte financeiro do laboratório. Sou grata a todos aqueles que de certa forma fizeram parte deste trabalho. Obrigada.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1. Compostos bioativos de alimentos	03
1.2. Flavonóides	05
1.3. Ácido elágico e derivados	08
1.4. Determinação de ácido elágico e derivados	10
1.5. Atividade biológica de ácido elágico e derivados	13
1.6. Biodisponibilidade de flavonóides e ácido elágico e derivados	15
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
3.1. Materiais	21
3.2. Métodos	21
3.2.1. Determinação de flavonóides e ácido elágico livre	21
3.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	22
3.2.3. Otimização da determinação dos teores totais de ácido elágico em morangos	22
3.2.4. Determinação dos teores totais de ácido elágico	23
3.2.5. Determinação de fenólicos totais	23
3.2.6. Determinação da capacidade antioxidante – DPPH	24
3.2.7. Determinação da capacidade antioxidante – sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico	24
3.2.8. Determinação do teor de ácido ascórbico	25

<b>3.2.9. Determinação do teor de antocianinas</b>	<b>25</b>
<b>3.2.10. Purificação de elagitaninos do morango</b>	<b>25</b>
<b>3.2.10.1. Resinas de poliamida (PA) e C18</b>	<b>26</b>
<b>3.2.10.2. Resina Sephadex LH 20</b>	<b>26</b>
<b>3.2.10.3. Resinas de celulose microcristalina, PVPP (polivinilpolipirrolidona) e Amberlite XAD-2</b>	<b>26</b>
<b>3.2.10.4. Precipitação com albumina de soro bovino (BSA)</b>	<b>27</b>
<b>3.2.10.5. Precipitação com acetato de itérbio (YbAc)</b>	<b>27</b>
<b>3.2.11. Caracterização estrutural dos derivados de ácido elágico e elagitaninos</b>	<b>27</b>
<b>3.2.12. Determinação da atividade antiproliferativa</b>	<b>28</b>
<b>3.2.12.1. Linhagens celulares</b>	<b>28</b>
<b>3.2.12.2. Teste de atividade anticâncer em cultura de células tumorais humanas</b>	<b>28</b>
<b>3.2.13. Determinação <i>in vitro</i> das atividades inibitórias de <math>\alpha</math>-glicosidase, <math>\alpha</math>-amilase e enzima conversora de angiotensina I (ECA)</b>	<b>29</b>
<b>3.2.13.1. Inibição da enzima <math>\alpha</math>-glicosidase</b>	<b>30</b>
<b>3.2.13.2. Inibição da enzima <math>\alpha</math>-amilase</b>	<b>30</b>
<b>3.2.13.3. Inibição da Enzima Conversora de Angiotensina I</b>	<b>31</b>
<b>3.2.14. Determinação da fração indigerível (FI)</b>	<b>32</b>
<b>3.2.15. Determinação da interação ácido elágico – BSA</b>	<b>33</b>
<b>3.2.16. Estudo de biodisponibilidade de elagitaninos <i>in vivo</i></b>	<b>33</b>
<b>3.2.16.1. Animais</b>	<b>33</b>

3.2.16.2. Desenho experimental	33
3.2.16.3. Determinação de elagitaninos e ácido elágico livre no material biológico	34
3.2.16.3.1. Sangue	34
3.2.16.3.2. Rins, estômago, fígado, intestino delgado e intestino grosso	34
3.2.16.4. Determinação da capacidade antioxidante do plasma	35
3.2.16.4.1. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)	35
3.3. Análise dos resultados	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Caracterização química das diferentes cultivares brasileiras de morango maduro	37
4.2. Otimização do método de determinação dos teores de ácido elágico livre e total em morangos	47
4.2.1. Teste das condições de hidrólise	47
4.2.2. Teste de solvente para extração	48
4.2.3. Teste de recuperação de ácido elágico	50
4.3. Quantificação do teor de ácido elágico total	51
4.4. Purificação e caracterização estrutural dos derivados de ácido elágico do morango	52
4.4.1. Purificação dos elagitaninos	52
4.4.2. Caracterização estrutural dos elagitaninos	63
4.5. Estudo <i>in vitro</i> das atividades antiproliferativa, anti-diabetes tipo 2 e anti-hipertensão dos elagitaninos	69

4.5.1. Atividade antiproliferativa	69
4.5.2. Atividades anti-diabetes tipo 2 e anti-hipertensão	74
4.6. Fração indigerível	78
4.7. Interação ácido elágico – BSA	81
4.8. Estudo da biodisponibilidade dos elagitaninos <i>in vivo</i>	84
4.8.1. Efeito sobre a capacidade antioxidante do plasma	88
5. CONCLUSÕES	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
7. ANEXOS	115
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	
FICHA DO ALUNO	
CURRICULUM LATTES	

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Teores de umidade (%), antocianinas (mg/100 g b.u.), fenólicos totais (mg/100 g b.u.) e ácido ascórbico total (mg/100 g b.u.) das diferentes cultivares de morango.	<b>38</b>
<b>TABELA 2</b>	Composição e teor de flavonóides (mg/100 g b.u.) presentes nas diferentes cultivares de morango.	<b>41</b>
<b>TABELA 3</b>	Capacidade antioxidante ( $\mu$ moles equivalentes de BHT/g amostra b.u.), determinada através do método do DPPH, de diferentes cultivares de morango.	<b>43</b>
<b>TABELA 4</b>	Capacidade antioxidante ( $\mu$ moles equivalentes de BHT/g amostra b.u.), determinada através do descoramento no sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, de diferentes cultivares de morango.	<b>44</b>
<b>TABELA 5</b>	Teor de ácido elágico livre (mg/100 g amostra b.u.) das diferentes cultivares de morango.	<b>46</b>
<b>TABELA 6</b>	Condições de hidrólise e teor de ácido elágico total (mg/100 g amostra b.u.) de morangos cv. Dover.	<b>47</b>
<b>TABELA 7</b>	Teor de ácido elágico total (mg/100 g amostra b.u.) nos diferentes extratos obtidos a partir de morangos cv. Dover.	<b>48</b>
<b>TABELA 8</b>	Condições de hidrólise e teores de ácido elágico total (mg/100 g de amostra base úmida b.u.).	<b>49</b>
<b>TABELA 9</b>	Teores de ácido elágico total (mg/100 g b.u.) de diferentes cultivares de morango.	<b>51</b>
<b>TABELA 10</b>	Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados nos diferentes eluatos após extração em fase sólida utilizando-se resina de poliamida (PA).	<b>53</b>
<b>TABELA 11</b>	Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados nos diferentes eluatos após extração em fase	<b>56</b>

sólida utilizando-se a resina de C18.

<b>TABELA 12</b>	Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados nos diferentes eluatos após extração em fase sólida utilizando-se a resina de Amberlite XAD2.	<b>57</b>
<b>TABELA 13</b>	Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados nos diferentes eluatos após extração em fase sólida utilizando-se a resina de polivinilpolipirrolidona (PVPP).	<b>58</b>
<b>TABELA 14</b>	Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados nos diferentes eluatos após extração em fase sólida utilizando-se a resina de Sephadex LH-20.	<b>59</b>
<b>TABELA 15</b>	Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados nos diferentes eluatos após extração em fase sólida utilizando-se a resina de celulose microcristalina.	<b>60</b>
<b>TABELA 16</b>	Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados após precipitação com albumina de soro bovino (BSA).	<b>61</b>
<b>TABELA 17</b>	Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) Recuperados após precipitação com acetato de itérbio (AcYb).	<b>61</b>
<b>TABELA 18</b>	Identificação dos derivados de ácido elágico e elagitaninos do morango através de Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.	<b>63</b>
<b>TABELA 19</b>	Análise das frações de elagitaninos purificadas através da eluição da resina de C18 com metanol 5% e pela precipitação com acetato de itérbio.	<b>68</b>
<b>TABELA 20</b>	Comparação das atividades inibitórias (Unidades Inibitorias/mg) de $\alpha$ -amylase, $\alpha$ -glucosidase e Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) dos elagitaninos purificados (ET), ácido elágico livre (AE) (Sigma, EUA) e	<b>76</b>

extratos aquosos de cultivares brasileiras de morango.

**TABELA 21** Teores de fração indigerível (FI) do morango (cv. Dover) (%).

**79**

**TABELA 22** Teores de ácido elágico (AE) livre e total na fração indigerível do morango (cv. Dover) (mg/100 g amostra b.u.).

**79**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Estrutura química dos derivados de ácido elágico da framboesa. A: ácido elágico 4-arabinosídeo, B: ácido elágico 4-acetilarabinosídeo, C: ácido elágico 4-acetilxilósídeo.	<b>8</b>
<b>FIGURA 2</b>	Estruturas de elagitaninos.	<b>9</b>
<b>FIGURA 3</b>	Hidrólise de elagitaninos a ácido elágico	<b>10</b>
<b>FIGURA 4</b>	Estruturas dos metabólitos de elagitaninos e/ou ácido elágico: Urolitinas.	<b>18</b>
<b>FIGURA 5</b>	Espectro de massas do pico identificado como ácido elágico livre no extrato de morango, demonstrando $m/z$ 301 (modo negativo).	<b>64</b>
<b>FIGURA 6</b>	Espectros de massas dos picos identificados como pedunculagina no morango, demonstrando $m/z$ 783 (modo negativo).	<b>65</b>
<b>FIGURA 7</b>	Espectro de massas do pico identificado como ácido hexahidroxidifênico (HHDP) - galoil- glucosídeo no morango, demonstrando $m/z$ 935 (modo negativo).	<b>66</b>
<b>FIGURA 8</b>	Espectro de massas do pico identificado como Sanguiina H-6 no extrato de morango, demonstrando $m/z$ 1870 (modo negativo).	<b>67</b>
<b>FIGURA 9</b>	Atividade antiproliferativa do quimioterápico doxorubicina frente a diversas linhagens celulares.	<b>70</b>
<b>FIGURA 10</b>	Atividade antiproliferativa do padrão ácido elágico (A), dos purificados de elagitaninos (B) e extrato total de morango (C) frente a diversas linhagens celulares.	<b>71</b>

<b>FIGURA 11</b>	Inibição da enzima $\alpha$ -amilase (%) pelos elagitaninos purificados do morango ( $\mu\text{g/mL}$ ).	<b>75</b>
<b>FIGURA 12</b>	Inibição da enzima $\alpha$ -glicosidase (%) pelos elagitaninos purificados do morango ( $\mu\text{g/mL}$ ).	<b>75</b>
<b>FIGURA 13</b>	Porcentagem (%) de interação do ácido elágico e quercetina com BSA em diferentes concentrações (mM).	<b>82</b>
<b>FIGURA 14</b>	Avaliação da capacidade antioxidante do plasma nos intervalos de 15 minutos a 24 horas após administração por gavagem de elagitaninos purificados a partir do morango (concentração 20 mg/200 g peso corpóreo).	<b>88</b>

## ABREVIACES

**AAC** – rea abaixo da curva

**AAPH** – 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto

**Abs** – absorbância

**ABTS•** – radical 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiozolina)-6-sulfnico

**AE** – cido elágico

**AH** - cido hipúrico

**BHT** – butilhidroxitolueno

**b.s.** – base seca

**BSA** – “*bovine serum albumin*” albumina de soro bovina

**b.u.** – base úmida

**CEAGESP** - Companhia de Entrepertos e Armazéns Gerais de São Paulo

**CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**cv** – cultivar

**DAD** – “*Diode Array Detector*” detetor com arranjo de diodo

**DMSO** - dimetilsulfóxido

**DNS** - cido 3,5-dinitrosalicílico

**DPPH•** – radical  $\alpha,\alpha$ -difetil- $\beta$ -picrilhidrazina

**ECA** – enzima conversora de angiotensina I

**EDTA** – cido etilenodiamino tetracético

**ERN** - Espécies reativas de nitrogênio

**ERO** – Espécies reativas de oxigênio

**ET** - elagitaninos

**FI** – fração indigerível

**HHDP** - ácido hexahidroxidifênico

**HHL** - substrato hipuril-histidil-leucina

**HO<sub>2</sub>•** – radical hidroperoxila

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogênio

**HPLC** – *High-Performance Liquid Chromatography*

**IFR** - intensidade de fluorescência relativa

**MS** – espectrometria de massas

**MWCO** – “*molecular weight cut-off*”

*m/z* – relação massa/carga

**<sup>1</sup>O<sup>2</sup>** – oxigênio singlete

**O<sup>2•-</sup>** – radical superóxido

**OH•** – radical hidroxila

**ORAC** – capacidade de absorção do radical oxigênio

**PA** – poliamida

**PTFE** – politetrafluoroetileno

**PVPP** – polivinilpolipirrolidona

**RPMI** – “*Roswell Park Memorial Institute*” meio de cultura

**SDS** – dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

**SFB** - soro fetal bovino

**SRB** - sulforrodamina B

**TCA** – ácido tricloroacético

**TFA** – “*trifluoroacetic acid*” ácido trifluoroacético

**YbAc** – acetato de itérbio

**PINTO, M.S. - Compostos bioativos de cultivares brasileiras de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.): caracterização e estudo da biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico.**

**RESUMO**

O morango representa boa fonte de vitamina C, flavonóides e derivados de ácido elágico e tem ampla aceitação pela população brasileira. Os objetivos deste trabalho foram: caracterizar diferentes cultivares quanto aos teores de compostos bioativos, otimizar a metodologia para quantificação do conteúdo de ácido elágico total, purificar e caracterizar estruturalmente os elagitaninos, avaliar sua potencial atividade antiproliferativa, anti-diabetes tipo 2 e anti-hipertensão, estudar a biodisponibilidade desses compostos *in vivo*. Os resultados demonstraram que existem diferenças significativas nos teores de compostos bioativos entre as cultivares. As melhores condições para determinação dos teores de ácido elágico total foram: extração em acetona 80% e posterior hidrólise com ácido trifluoracético (TFA) 2N a 120 °C por 60 minutos. A precipitação com acetato de itérbio foi o método mais eficiente para a purificação dos elagitaninos. Após administração por gavagem a ratos de um purificado de elagitaninos, nenhum composto foi detectado no plasma e tecidos analisados.

**PALAVRAS-CHAVE:** ácido elágico, elagitaninos, biodisponibilidade, capacidade antioxidante, compostos bioativos.

**PINTO, M.S. – Bioactive compounds from Brazilian strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.): Characterization and bioavailability of ellagic acid derivatives**

**ABSTRACT**

Strawberries are a good source of vitamin C, flavonoids and ellagic acid derivatives and are consumed in Brazil in large quantities. The objectives of the present work were: characterization of different cultivars with respect to the content of bioactive compounds, optimization of the method for quantification of total ellagic acid content, purification and structural identification of ellagitannins, evaluation of their antiproliferative, anti-type 2 diabetes and anti-hypertension potentials, investigation of their in vivo bioavailability. The results indicated that there were significant differences in bioactive compounds among the strawberry cultivars. The best conditions for the determination of the total ellagic acid content in strawberries were extraction with 80% acetone, and hydrolysis using 2N TFA at 120 °C for 60 minutes. The precipitation method using ytterbium acetate was the most efficient in purifying the ellagitannins. After administration of purified ellagitannins to rats by gavage, no compound was detected in plasma or tissue samples analyzed.

**KEY WORDS:** ellagic acid, ellagitannins, bioavailability, antioxidant capacity, bioactive compounds.

## 1. INTRODUÇÃO

Os seres humanos estão expostos a uma série de agentes oxidantes que podem causar danos a biomoléculas tais como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, o que parece estar implicado em um grande número de patologias, incluindo doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer. Diversos estudos epidemiológicos mostram menor incidência de doenças crônicas não-transmissíveis associada à participação elevada de frutas e hortaliças na dieta. Esse efeito é provavelmente decorrente da presença de uma série de compostos antioxidantes nas plantas, que neutralizariam a ação dos radicais livres envolvidos nos processos patológicos. Dessa forma, a identificação de fontes vegetais dietéticas com alta capacidade antioxidante, seja esta derivada de compostos fenólicos e/ou vitaminas, é de extrema importância.

Nesse contexto, o morango apresenta uma enorme potencialidade devido ao fato de representar uma boa fonte de vitamina C e flavonóides, apresentar ampla aceitação pela população brasileira e, graças ao desenvolvimento de novas variedades, ser produzido o ano inteiro. Além disso, a composição em flavonóides do morango, caracterizada pelo alto teor de antocianinas, e a presença de derivados de ácido elágico, compostos com alto potencial biológico e distribuição mais limitada, o torna especialmente interessante.

Um estudo realizado por nosso grupo verificou uma ampla variação na capacidade antioxidante de frutas e vegetais, e as amostras ricas em antocianinas, tais como o morango, foram as que apresentaram as capacidades mais elevadas, avaliadas através de dois diferentes sistemas *in vitro* (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005). Além disso, o morango representa a principal fonte de derivados de ácido elágico na dieta brasileira, e estes correspondem a mais de 50% dos compostos fenólicos encontrados no fruto (HÄKKINEN *et al.*, 2000, PINTO; GENOVESE; LAJOLO, 2008a). Wang e Jiao (2000) analisaram sucos de morango feitos a partir de seis diferentes cultivares e verificaram que exibiam alta capacidade antioxidante contra espécies reativas de oxigênio incluindo os superóxidos, peróxidos de hidrogênio, radicais hidroxila e oxigênio singlete, sendo que a porcentagem de inibição variou entre as cultivares estudadas.

Dessa forma, torna-se de extrema importância caracterizar as diferentes

cultivares comerciais de morango em relação à sua capacidade antioxidante e composição em compostos fenólicos e verificar possíveis diferenças entre estas, permitindo a identificação dos potencialmente promissores em termos de efeitos benéficos à saúde humana. Por outro lado, a falta de dados sobre a biodisponibilidade e metabolismo dos derivados de ácido elágico associada ao seu enorme potencial biológico justifica a realização destes estudos.

## 1.1. Compostos bioativos de alimentos

Os alimentos de origem vegetal apresentam compostos não nutrientes (fitoquímicos) com atividades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como atividades antioxidante, antiinflamatória e hipocolesterolêmica. Entre estes podemos citar as catequinas do chá verde, as antocianinas dos frutos vermelhos, os flavonóis das hortaliças e as isoflavonas da soja. A possibilidade de reduzir o risco de doenças através da dieta tem atraído a atenção tanto da comunidade científica como das indústrias alimentícias com o objetivo comum de desenvolver os atualmente conhecidos como "alimentos funcionais", ou alimentos ricos em um ou mais compostos/componentes bioativos que apresentam efeitos positivos na saúde.

Os compostos fenólicos representam a maior categoria de agentes fitoquímicos e encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal. Eles são derivados das vias do ácido chiquímico e acetato-malonato. Os três maiores grupos de fenólicos da dieta são os flavonóides, os ácidos fenólicos e os polifenóis (taninos). Os ácidos fenólicos compreendem os ácidos benzóicos e derivados (hidroxibenzóico, gálico, elágico, etc.) e os ácidos cinâmicos e derivados (cumárico, caféico, ferúlico, clorogênico, etc.). Os taninos são polímeros de alto peso molecular divididos em duas classes: taninos hidrolisáveis, que compreendem polímeros de ácido gálico ou elágico, encontrados em frutas como o morango, a uva muscadine (*Vitis rotundifolia*) e nas nozes; e os taninos condensados, polímeros de catequina ou epicatequina (KING; YOUNG, 1999).

Visto que os radicais livres podem causar danos oxidativos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos, podendo levar a um grande número de patologias incluindo câncer e aterosclerose, presume-se que a ingestão de antioxidantes capazes de neutralizar os radicais livres possa ter um papel importante na redução do risco destas doenças (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Dessa forma, a identificação de fontes vegetais com alta capacidade antioxidante, seja esta derivada de compostos fenólicos e/ou vitaminas, é de extrema importância.

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é um fruto não climatérico de consumo humano freqüente (AVIGDORI-AVIDOV, 1986). Ao lado de cor e sabor atrativos, o morango é também uma boa fonte de vitamina C e outros compostos antioxidantes, tais como flavonóides e outros fenólicos (ROBARDS *et al.*, 1999).

A cor atrativa do morango é devida aos derivados de antocianidinas ligados a açúcares, já que as agliconas são raramente encontradas nas plantas. A quantidade de antocianinas é importante para a avaliação da maturidade dos morangos. A principal antocianina encontrada no morango é a pelargonidina 3-glucosídeo, com cianidina 3-glucosídeo e pelargonidina 3-rutinosídeo presentes em quantidades menores (CORDENUNSI *et al.*, 2005, GIL; HOLCROFT; KADER, 1997). Além das antocianinas, o morango também apresenta outros flavonóides, especificamente derivados glicosilados de quercetina e campferol (CORDENUNSI *et al.*, 2002).

A vitamina C (L-ascorbato) é um dos mais importantes seqüestradores de radicais livres encontrados em plantas, animais e humanos (AGAR; STREIF; BANGERTH, 1997). O L-ascorbato (L-treo-hex-2-enono-1,4-lactona) é um derivado de um açúcar hexose e o grupo ene-diol nos átomos de carbono 2 e 3 é responsável por suas propriedades ácidas e redutoras, pois ele pode se ionizar e doar elétrons. Dessa forma, o ascorbato reage com espécies reativas de oxigênio tais como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), resultando em sua capacidade antioxidante (ASARD; MAY; SMIRNOFF, 2004).

Wang, Cao e Prior (1996) relataram que entre 12 frutas diferentes analisadas, os morangos foram os que apresentaram a maior capacidade antioxidante, e a contribuição da vitamina C foi estimada como sendo < 15%. De modo similar, Kalt *et al.* (1999) observaram que em frutos tais como morango, framboesa (*Rubus idaeus* Michx.) e mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.), a contribuição do ascorbato para a capacidade antioxidante total *in vitro* era reduzida (0,4 - 9,4%). Os autores encontraram uma forte correlação com o conteúdo de fenólicos totais (r= 0,83) e antocianinas (r= 0,90). Resultados semelhantes foram relatados por Beekwilder *et al.* (2005) para a framboesa, cuja capacidade antioxidante total parece resultar principalmente de compostos fenólicos, e, em menos de 20%, da vitamina C.

## 1.2. Flavonóides

Os flavonóides são compostos bioativos amplamente distribuídos entre os alimentos e caracterizados estruturalmente como difenilpropanos (C6-C3-C6) (HERTOG; HOLLMAN; KATAN, 1992). Muitos ocorrem naturalmente como flavonóides glicosilados, e os carboidratos mais encontrados são D-glicose, L-ramnose, glicoramnose, galactose e arabinose. Esses compostos podem ser agrupados em diversas subclasses incluindo antocianinas, flavonas, flavan-3-óis, flavanonas, isoflavonas e flavonóis. Eles são encontrados nos alimentos geralmente como O-glicosídeos com o açúcar normalmente ligado na posição C3, ou, no caso das isoflavonas, C7 (KING; YOUNG, 1999).

Estudos *in vivo* em animais e *in vitro* demonstraram que os flavonóides apresentam diversas atividades biológicas, incluindo capacidade antioxidante, antimutagênica entre outras. O “Paradoxo Francês” resulta de evidências epidemiológicas de que certas populações com alto consumo de vinho tinto, rico em flavanóis e outros compostos fenólicos, apresentam menores taxas de doenças coronarianas em relação a outros países ocidentais, mesmo com um consumo elevado de colesterol (PASCAL, 1996). Em alguns estudos epidemiológicos observou-se que o risco de doenças coronarianas foi reduzido devido à alta ingestão de flavonóides como as flavonas apigenina e luteolina e os flavonóis campferol, miricetina e quercetina (HERTOG *et al.*, 1992; 1993).

Observou-se que os flavonóides atuam benéficamente através da capacidade antioxidante e inibição na síntese dos eicosanóides e agregação plaquetária (GERMAN; DILLARD, 2000). Uma diversidade de estudos *in vitro* tem mostrado que os flavonóides podem inibir e, às vezes, induzir uma grande variedade de enzimas, envolvidas em importantes processos reguladores como a divisão e proliferação celular, agregação plaquetária, detoxificação, atuação da resposta inflamatória e imune do organismo humano. Em virtude de sua propriedade antioxidante *in vitro* e sua ação inibitória durante vários estágios do desenvolvimento de tumores, demonstrada em estudos experimentais com animais, os flavonóides podem contribuir com os efeitos protetores atribuídos aos alimentos vegetais, entre os quais proteção aos tecidos contra os radicais livres e peroxidação lipídica, estes últimos envolvidos em sérias condições patológicas como aterosclerose, câncer e inflamação crônica (HOLLMAN; KATAN,

1997; 1999).

De acordo com Soares (2002), a oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres no organismo gerados por fontes exógenas ou endógenas. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, pesticidas, entre outros. As fontes endógenas originam-se de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo como resultado da atividade das lipoxigenases, cicloxigenases, desidrogenases, peroxidases; da presença de metais de transição e de sistemas de transporte. Na geração de radicais estão envolvidas organelas celulares como as mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos e membranas. A variedade de radicais livres formados engloba espécies reativas de oxigênio como o íon superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ); complexos de metais de transição como  $Fe^{+3}/Fe^{+2}$  e  $Cu^{+2}/Cu^+$ ; radicais de carbono como triclorometil ( $CCl_3^{\bullet}$ ), assim como espécies reativas de nitrogênio como o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ).

Os radicais livres desencadeiam reações de oxidação na membrana lipoprotéica que afetam a integridade estrutural e funcional da membrana celular. Os antioxidantes inibem a oxidação através de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação dos radicais e o segundo envolve a eliminação dos radicais formados através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a cadeia de reação. Os antioxidantes fenólicos atuam como sequestradores de radicais livres e como quelantes de metais (SOARES, 2002).

O potencial antioxidante e de inibição da peroxidação lipídica exercido pelos flavonóides deve-se predominantemente à capacidade sequestrante de radicais livres em relação à atuação quelante de metais. Esta propriedade sozinha não implica um efeito benéfico uma vez que ocorre a formação de um radical flavonóide. Um radical flavonóide muito reativo irá propagar os efeitos deletérios iniciados pelo ataque do radical. Entretanto, um radical flavonóide com alta estabilidade não irá reagir e, como consequência, este flavonóide irá atuar como antioxidante (HOLLMAN; KATAN, 1997a).

Três grupos estruturais aumentam a estabilidade do radical flavonóide e de sua propriedade antioxidante: a presença de grupamentos hidroxilas no anel B; a presença da dupla ligação no anel C (heteroanel), além da presença de grupamentos hidroxilas

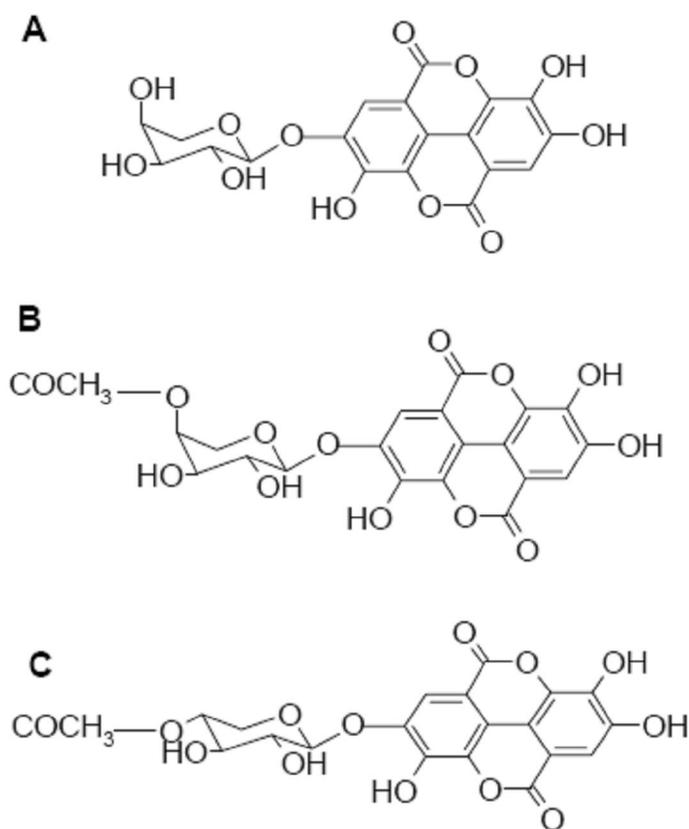
nas posições 5 e 7 do anel A. Os flavonóis são mais potentes do que as respectivas flavonas devido à presença da hidroxila na posição 3. A presença de hidroxila na posição 2' do anel A das hidrochalconas possibilita sua atuação antioxidante de maneira mais potente em relação às suas respectivas flavanonas (NAKAMURA *et al.*, 2003). As flavanonas são antioxidantes fracos devido à ausência da dupla ligação (PIETTA, 2000; ROBARDS *et al.*, 1999). A quercetina, 3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona, uma das maiores representantes dos flavonóis, apresenta os três grupos estruturais e é considerada excelente antioxidante (HOLLMAN; KATAN, 1997).

A quercetina é o flavonóide mais utilizado nos estudos de mutagenicidade. Em geral, os flavonóides inibem as enzimas da fase I que ativam os carcinógenos, inibem a proliferação de células cancerígenas e a ligação estrogênica aos sítios envolvidos na regulação das células de crescimento. A quercetina também inibe a citocromo P450 sintetase estrógeno-dependente, além da atividade de ciclo-oxigenase, lipoxigenase e xantina oxidase. A apigenina, o campferol, a naringenina, e a rutina também podem inibir a lipoxigenase. A quercetina, a genisteína e a rutina atuam na proteção contra a injúria celular causada pela oxidação do LDL, inibindo a oxidação da lipoproteína e protegendo as células dos danos citotóxicos causados pelo LDL oxidado (PETERSON; DWYER, 1998a; VISIOLI; BORSANI; GALLI, 2000).

Os flavonóides são capazes de proteger o ascorbato da oxidação graças a suas propriedades complexantes de metais, através do grupo *orto* di-hidroxila. As antocianinas também demonstraram prevenir a oxidação *in vitro* do ácido ascórbico por íons metálicos, não apenas através da quelatação de metais, mas também através da formação de um complexo ácido ascórbico (co-pigmento) – metal - antocianina (SARMA *et al.*, 1997).

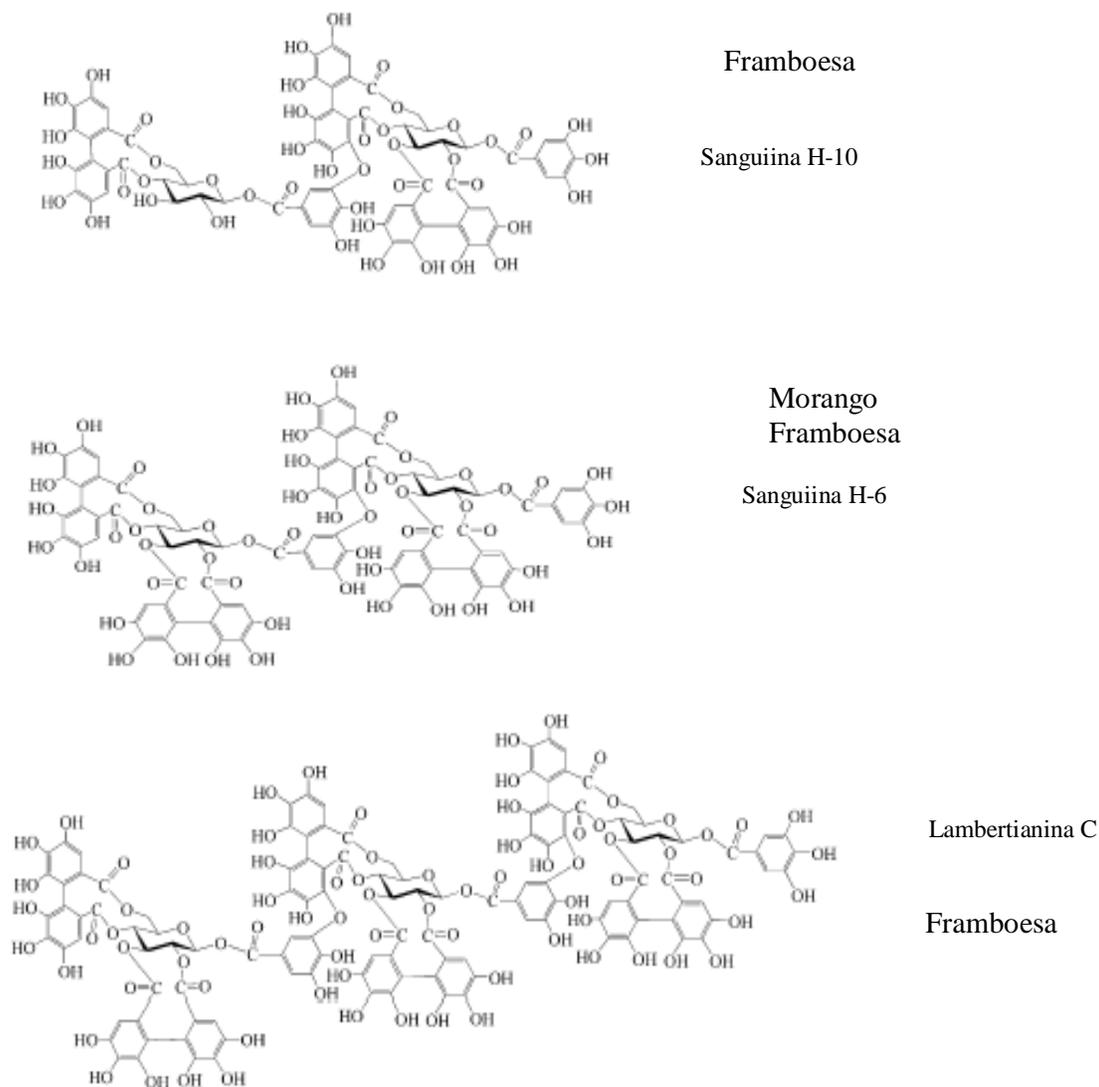
### 1.3. Ácido elágico e derivados

O ácido elágico é um composto fenólico encontrado em nossa dieta principalmente em morango, framboesa (*Rubus idaeus* L.) e amora-preta (*Rubus fruticosus* L.) (TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000). O ácido elágico pode ocorrer na forma livre, glicosilada (**Figura 1**), ou ligado como elagitaninos, esterificado com glicose (BATE-SMITH, 1972; HADDOCK *et al.*, 1982; MAAS; GALLETTA, 1991a).



**Figura 1.** Estrutura química dos derivados de ácido elágico da framboesa. A: ácido elágico 4-arabinosídeo, B: ácido elágico 4-acetilarabinosídeo, C: ácido elágico 4-acetilxilosídeo.

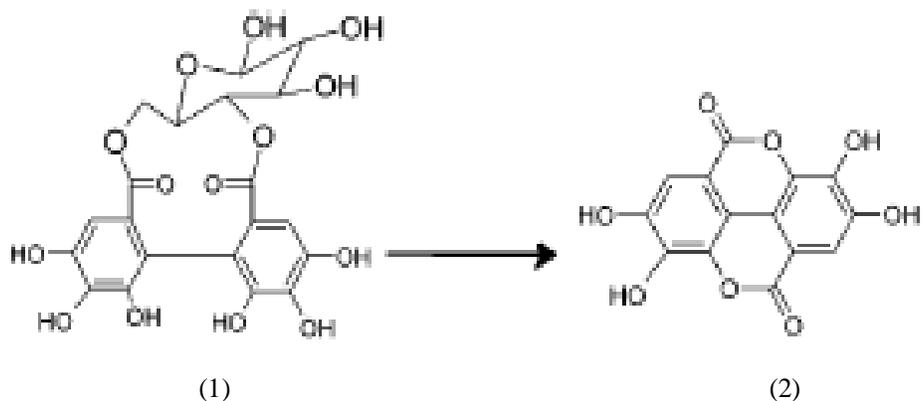
Os elagitaninos são compostos fenólicos solúveis em água de alto peso molecular e com capacidade de precipitação de proteínas e alcalóides (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000) (**Figura 2**). São ésteres do ácido hexahidroxi-difênico (HHDP) e um poliol, geralmente glicose e ácido quínico (HASLAM, 1989). Os monômeros de elagitaninos podem ser oxidados nas plantas e formar dímeros, trímeros e tetrameros com pesos moleculares de até 4000 Da.



**Figura 2.** Estruturas de elagitaninos presente em frutas.

#### 1.4. Determinação de ácido elágico e derivados

A detecção e a quantificação de elagitaninos se baseiam no fato de que quando esses compostos são expostos a ácidos ou bases, as ligações ésteres são hidrolisadas e o ácido hexahidroxidifênico espontaneamente se rearranja formando o ácido elágico, que é insolúvel em água (CLIFFORD; SCALBERT, 2000) (**Figura 3**).



**Figura 3.** Hidrólise de elagitaninos (1) a ácido elágico (2).

Segundo Hakkinen *et al.* (1999) os derivados de ácido elágico representam mais de 50% do teor total de fenólicos presentes em morangos e framboesas. O teor de ácido elágico livre varia bastante comparando-se framboesa (0,58 mg/100 g base úmida), morango (1,8 mg/100 g base úmida) e amora-preta (8,8 mg/100 g base úmida) (AMAKURA *et al.*, 2000). Porém, sabe-se que os teores de ácido elágico livre são geralmente baixos, embora quantidades substanciais possam ser detectadas após hidrólise ácida dos extratos, como resultado da quebra dos elagitaninos (BEATTIE; CROZIER; DUTHIE, 2005). Esta reação de hidrólise constitui a base dos métodos comumente empregados para a detecção e quantificação do teor total de ácido elágico, que na grande maioria dos estudos é realizada posteriormente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Tomás-Barberán e Clifford (2000) relataram que embora as técnicas analíticas comumente empregadas para a quantificação do teor de ácido elágico total possam apresentar boa reprodutibilidade e exatidão, os resultados obtidos diferem consideravelmente já que dependem do método e solvente utilizados na extração, como também se o extrato obtido foi previamente hidrolisado para a análise. Desde que o

ácido elágico é insolúvel em água, é fácil subestimar o conteúdo se um solvente aquoso for usado. Se o extrato é hidrolisado antes da análise, o conteúdo de ácido elágico é mais exato porque inclui ambas as formas, livre e conjugada, desse ácido fenólico.

Daniel *et al.* (1989) analisaram 18 diferentes frutos quanto ao teor total de ácido elágico. Para esta determinação, realizaram testes prévios para verificar qual o melhor solvente a ser utilizado na extração e concluíram que tanto a mistura acetona: água (4:1, v/v) quanto o metanol puro apresentavam a melhor eficiência. Após a extração, a hidrólise foi efetuada durante 2 horas a 100 °C utilizando ácido trifluoracético 2 N (TFA), e os autores verificaram que tempos maiores de hidrólise não liberavam mais ácido elágico. Para o morango, obtiveram um conteúdo de ácido elágico de 63 µg/g (base úmida).

Maas, Wang e Galletta (1991) avaliaram o teor total de ácido elágico presente em diferentes cultivares de morango. Para tanto, fizeram algumas modificações no método desenvolvido por Daniel *et al.* (1989). As amostras foram extraídas com acetona aquosa (4:1, v/v), porém a hidrólise foi realizada por apenas 1 hora. Os resultados obtidos mostraram grande diferença entre as cultivares, variando de 43 a 464 µg/g (base úmida).

Hakkinen *et al.* (2000) otimizaram as condições para a determinação do teor total de ácido elágico presente em morangos. Observaram que usando HCl 1,2 M (concentração final) e tempo de hidrólise de 20 horas, 50% mais ácido elágico era detectado (38 mg/100 g base úmida) do que quando a hidrólise era de somente 2 horas (19,4 mg/100 g base úmida). Os autores também testaram as condições propostas por Daniel *et al.* (1989), porém a quantidade de ácido elágico obtida foi muito menor (5,5 mg/100 g base úmida) que a encontrada para a hidrólise de 20 horas. Portanto, nesse trabalho foi proposto como condição ótima para detecção do teor total de ácido elágico um tempo de 20 horas a  $85 \pm 5$  °C em metanol 50% e HCl 1,2 M (concentração final).

Além dos métodos de hidrólise utilizados para morangos, outros foram propostos para diversos alimentos que também possuem teores significativos de ácido elágico livre e conjugado. Wilson e Hagerman (1990) hidrolisaram amostras de castanha (*Castanea sativa* Mill.) durante 10 horas a uma temperatura de 100 °C, porém propuseram que a determinação do teor total (após hidrólise) poderia ser realizada através de método colorimétrico. Amostras de uvas muscadine foram hidrolisadas por 1

hora a 95 °C com HCl 2N (LEE; TALCOTT, 2004). Bushman *et al.* (2004) submeteram à hidrólise amostras de semente de framboesa e amora-preta por 2 horas a 100 °C com TFA 2N em metanol, após prévia extração com metanol puro por 24 horas a 100 °C. Esses autores não testaram a recuperação do ácido elágico nas condições adotadas.

Portanto, pode-se verificar que existem diversos métodos já descritos na literatura para a quantificação do teor total de ácido elágico e que, em alguns casos, é relatada a falta de concordância entre eles. Outro fator a ser levado em consideração é se a análise será efetuada em um fruto ou vegetal *in natura*, onde o ácido elágico se encontra na forma de derivados hidrossolúveis (elagitaninos), ou em alimentos processados/armazenados, onde certa parte do ácido elágico pode encontrar-se na forma livre e, portanto insolúvel em água. Dessa forma, torna-se necessária uma otimização das condições de extração e hidrólise de ácido elágico e/ou derivados de acordo com as diferentes matrizes a serem analisadas.

## 1.5. Atividade biológica de ácido elágico e derivados

Existe um interesse particular na determinação das quantidades de ácido elágico presentes em frutos devido a crescentes evidências de seus efeitos quimiopreventivos. Estudos com animais utilizando carcinógenos químicos têm demonstrado que a administração do ácido elágico na dieta inibe o desenvolvimento de cânceres de esôfago, fígado e pulmão, dependendo do tipo de composto utilizado. A aplicação tópica de ácido elágico também demonstrou diminuir a incidência de câncer de pele induzido quimicamente, em camundongos (HANNUM, 2004).

Em ratos, o ácido elágico administrado na dieta inibiu o desenvolvimento de câncer de esôfago induzido por N-nitrosometilbenzilamina (NMBA) em 25 a 50% e as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas foram reduzidas (MANDAL; STONER, 1990; DANIEL; STONER, 1991). No entanto, estes pesquisadores observaram que a inibição do tumor ocorria somente quando o ácido elágico era administrado continuamente antes, durante e após a dose de NMBA.

Em estudo realizado por Kresty *et al.* (2001), a administração de framboesas liofilizadas a ratos tratados previamente com NMBA inibiu eventos carcinogênicos de iniciação e pós-iniciação como evidenciado pela diminuição na incidência e multiplicidade de tumores, inibição da formação de adutos de DNA, redução dos índices proliferativos, e inibição da formação de lesões pré-neoplásicas.

Diversos estudos também já relataram as propriedades antioxidantes *in vitro* dos elagitaninos e do ácido elágico (GIL *et al.*, 2000; ANDERSON *et al.*, 2001; MULLEN *et al.*, 2002; SRINIVASAN *et al.*, 2002). Priyadarsini *et al.* (2002) testaram a capacidade antioxidante do ácido elágico através da medida da habilidade de inibição da peroxidação lipídica induzida pela irradiação gama em microssomos. O ácido elágico mostrou capacidade antioxidante através do seqüestro de ERO (espécies reativas de oxigênio) e ERN (espécies reativas de nitrogênio), tais como radicais hidroxila, peroxila, NO<sub>2</sub> e peroxinitrila, com constantes de velocidade comparáveis às de antioxidantes conhecidos tais como as vitaminas C e E. Elagitaninos como Sanguiina H-6 e lambertianina C (presentes em altas concentrações em framboesa e amora-preta) apresentam alta capacidade antioxidante, podendo exercer efeitos protetores ao passarem pelo trato gastrointestinal, onde também podem ser despolimerizados

liberando ácido elágico, o qual seria mais facilmente absorvido (BEATTIE; CROZIER; DUTHIE, 2005). Cao *et al.* (1998) verificaram que a ingestão de suco de morangos frescos (240 g/copo) por mulheres aumentava a capacidade antioxidante do plasma em 14-30% após quatro horas, indicando que os compostos antioxidantes presentes eram absorvidos.

McDougall e Stewart (2005) relataram efeitos inibitórios dos polifenóis presentes em frutos ricos em antocianinas e elagitaninos tais como framboesa e morango sob enzimas do sistema digestório. As antocianinas inibiram significativamente a atividade da enzima  $\alpha$ -glicosidase, levando à uma diminuição da glicemia após a ingestão de uma dieta rica em carboidratos. Por sua vez, os elagitaninos inibiram a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase. Esses autores sugeriram esses frutos como potenciais candidatos a futuros estudos clínicos no que diz respeito ao controle da glicemia pós-prandial no caso da diabetes tipo 2. Porém, maiores estudos sobre os possíveis efeitos benéficos desses compostos ainda se fazem necessários.

## 1.6. Biodisponibilidade de flavonóides e ácido elágico e derivados

A biodisponibilidade dos compostos fenólicos é uma característica extremamente importante, já que esta varia amplamente entre os diversos compostos e não necessariamente os mais abundantes em nossa dieta, ou os que apresentam maior capacidade antioxidante *in vitro*, são os mais biodisponíveis. Um composto com alta capacidade antioxidante intrínseca pode, ao ser ingerido através da dieta, ser pobremente absorvido, extensamente metabolizado ou rapidamente eliminado, resultando em baixa atividade biológica. Ainda, os metabólitos produzidos pela atividade digestiva ou hepática podem ser completamente inativos ou apresentar atividade maior que o composto original (MANACH *et al.*, 2004).

De forma geral, os compostos fenólicos se apresentam na forma de glicosídeos, ésteres ou polímeros e só podem ser absorvidos após hidrólise por enzimas intestinais ou da microbiota colônica. Alguns flavonóides podem sofrer absorção gástrica desde que não estejam glicosilados, e os glicosídeos podem ser absorvidos no intestino delgado desde que não estejam ligados a açúcares, tais como a ramnose, que só podem ser hidrolisados pela microbiota. Os compostos fenólicos são conjugados (metilação, sulfatação e glucuronidação) no intestino delgado e posteriormente no fígado, o que facilita sua eliminação através da urina e bile por aumentar sua polaridade (MANACH *et al.*, 2004).

Após a ingestão, as isoflavonas da soja são hidrolisadas pelas glicosidases intestinais (XU *et al.*, 1995; IZUMI *et al.* 2000), liberando as agliconas, daidzeína, genisteína e gliciteína, que podem ser excretadas ou absorvidas e posteriormente metabolizadas em vários metabólitos específicos. A daidzeína é convertida nos metabólitos equol (com atividade estrogênica igual ou maior que a da aglicona), dehidrodaidzeína e O-desmetilangolensina (ODMA), e a genisteína é convertida no composto inativo *p*-etilfenol (SETCHELL *et al.*, 1984; HUTCHINS; SLAVIN; LAMPE, 1995; SETCHELL; CASSIDY, 1999). A extensão deste metabolismo é altamente variável entre indivíduos e é influenciada pela microbiota e por outros componentes da dieta; e.g. apenas 30 a 40% dos ocidentais produzem equol (CASSIDY; HANLEY; LAMUELA-RAVENTOS, 2000). Assim como os estrógenos endógenos, as isoflavonas apresentam circulação enterohepática e são secretadas na bile (KURZER;

XU, 1997). A absorção tem lugar em todo o intestino, possivelmente por difusão passiva não-iônica, e a conjugação das isoflavonas ao ácido glucurônico se dá principalmente no fígado e também ocasionalmente no intestino durante a fase de absorção (SETCHELL *et al.*, 2002). Após absorção, as isoflavonas podem ser encontradas na urina e no plasma, em geral sob a forma de glucuronídeos conjugados (~ 90 %), e apenas 3-5 % como sulfatos (ADLERCREUTZ; MAZUR, 1995). A eliminação ocorre via renal, principalmente como glucuronídeos conjugados (KULLING; HONIG; METZLER, 2001). Segundo Izumi *et al.* (2000), a forma aglicona é mais rapidamente e melhor absorvida que a glicosídica, porém outros autores encontraram uma maior biodisponibilidade para os glicosídeos que para as agliconas (SETCHELL *et al.*, 2001), indicando que a biodisponibilidade das isoflavonas pode ser influenciada pela forma de consumo da soja. Os produtos de soja fermentados apresentam como forma principal as agliconas, enquanto os não-fermentados (soja e seus derivados, farinha, isolado protéico, concentrado protéico) apresentam como forma principal os glicosídeos (WANG; MURPHY, 1994). Hutchins, Slavin e Lampe (1995) relataram que a biodisponibilidade das isoflavonas em alimentos fermentados é maior que para os não-fermentados.

Muitos estudos foram também realizados com a quercetina, o flavonol mais amplamente encontrado em vegetais. Hollman *et al.* (1995) determinaram a absorção de quercetina administrada a nove indivíduos ileostomizados e verificaram que a absorção dos glicosídeos de quercetina presentes no suplemento alimentar preparado à base de cebolas foi de 52%, a absorção da quercetina na forma de aglicona foi de 24%, e a absorção da quercetina rutinosídeo, presente no chá, foi de 17%. Eles observaram que a quercetina presente nas cebolas é melhor absorvida do que a aglicona pura. A absorção do glicosídeo presente nas cebolas pode ser explicada através do mecanismo de transporte ativo (sódio/glicose).

Hollman *et al.* (1997b) compararam a biodisponibilidade dos glicosídeos de quercetina presentes nas cebolas, nas maçãs e no chá, através da análise dos níveis plasmáticos de quercetina em indivíduos saudáveis. Eles observaram que a biodisponibilidade dos glicosídeos de quercetina presentes na maçã e dos rutinosídeos presentes no chá, com relação aos glicosídeos presentes nas cebolas, foi de 30%. A maior diferença encontrada entre as fontes alimentares foi devida ao tipo de glicosídeo. A quercetina presente nas cebolas foi rapidamente absorvida enquanto a quercetina 3-

rutinosídeo, presente no chá, foi lentamente absorvida. A taxa de absorção dos glicosídeos de quercetina presentes nas maçãs foi intermediária. Estes resultados demonstraram a importância do tipo de glicosilação com relação à absorção e biodisponibilidade de quercetina no organismo humano.

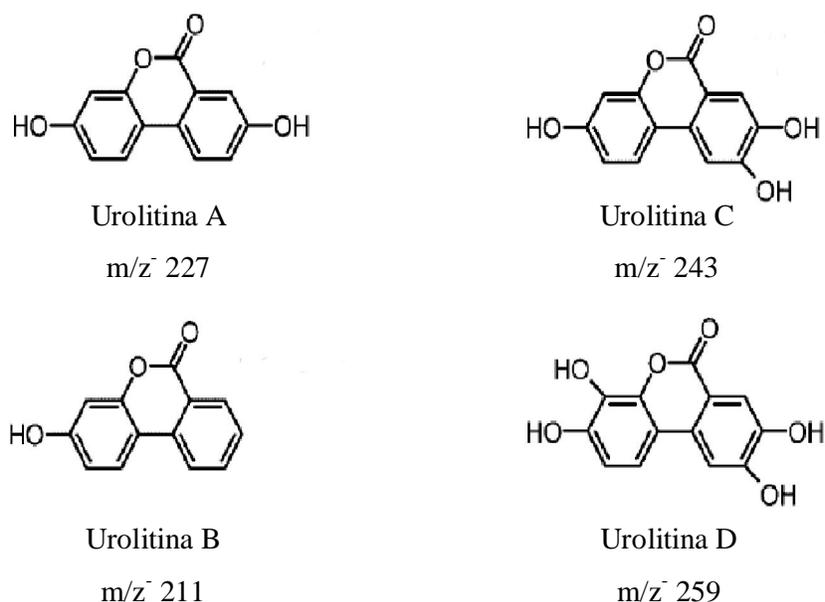
Muito pouco se sabe sobre a biodisponibilidade do ácido elágico e dos elagitaninos. Embora esteja claro a partir de resultados obtidos de experimentos *in vitro* com conteúdo intestinal e estudos *in vivo* com animais que os elagitaninos podem ser hidrolisados, ainda não está claro se isto ocorre quimicamente no pH fisiológico do intestino ou por ação da microbiota intestinal. Ainda, a baixa solubilidade do ácido elágico poderia acarretar na sua não absorção, porém não há evidências definitivas sobre a possível absorção das moléculas intactas de elagitaninos (CLIFFORD; SCALBERT, 2000).

Após administração de elagitaninos provenientes de framboesa ou de romã (*Punica granatum* L.) a camundongos (60-600 mg/Kg de peso corpóreo, por gavagem), quantidades muito baixas de ácido elágico foram detectadas na urina (0,05% da dose) e pulmões (0,01% da dose). No entanto, em outro estudo realizado não foi detectada a presença de ácido elágico no sangue ou tecidos dos camundongos alimentados durante 1 semana com uma dieta contendo 1% de ácido elágico (~1mg/kg peso corpóreo). Em ratos, após administração oral de ácido elágico, detectou-se o metabólito (~10% da dose) 3,8-dihidróxi-6H-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona na urina e fezes, resultado da ação da microbiota. Quando a administração foi feita intraperitonealmente, encontrou-se ácido elágico precipitado na cavidade abdominal durante a autópsia. Já em camundongos, 28% da dose oral (0,12 mg/kg) foi absorvida, e ácido elágico intacto foi detectado em urina, bile e sangue, sendo a metade conjugado com sulfato, ácido glucurônico ou glutationa (CLIFFORD; SCALBERT, 2000).

Seeram, Lee e Heber (2004) observaram que após o consumo de suco de romã (contendo 25 mg de ácido elágico e 318 mg de elagitaninos em 180 mL de suco) detectava-se uma concentração máxima de ácido elágico em plasma humano após 1 hora da ingestão, porém esse composto era rapidamente eliminado (4 horas) e nenhum elagitanino intacto foi encontrado. Os autores não calcularam a porcentagem de ácido elágico recuperado nem determinaram a sua proveniência (ácido elágico livre ou hidrólise dos elagitaninos). Stoner *et al.* (2005) relataram que após a administração de amoras-pretas liofilizadas (45 g/dia) a 11 voluntários por 7 dias as concentrações

máximas de antocianinas e ácido elágico no plasma foram de 1-2 horas e na urina de 0 a 4 h; porém, menos de 1% destes compostos foram absorvidos e excretados.

Cerdá *et al.* (2005) estudaram a metabolização de elagitaninos e ácido elágico pela microbiota. Esses autores demonstraram que após incubação desses compostos com fezes humanas houve a formação dos metabólitos urolitinas (**Figura 4**). Além disso, esses autores foram os primeiros a propor uma possível metabolização desses compostos exclusivamente pela microbiota.



**Figura 4.** Estruturas dos metabólitos de elagitaninos e/ou ácido elágico: Urolitinas.

Cerdá, Tomás-Barberán e Espín (2005) relataram que após ingestão de alimentos com conteúdo variado de elagitaninos (morangos, framboesas, vinhos envelhecidos em barris de carvalho e nozes), a urolitina B (6H-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona) conjugada com ácido glucurônico foi o principal metabólito detectado na urina de humanos, entre 16 e 48 horas após a ingestão, sendo que nenhum derivado de ácido elágico ou elagitaninos foram encontrados. Os autores atribuíram a formação da urolitina B à ação da microbiota intestinal sobre o ácido elágico e/ou elagitaninos.

Seeram *et al.* (2006a) relataram que após consumo de suco de romã, picos referentes a metabólitos de ácido elágico tais como urolitinas foram detectados no plasma dos voluntários. Porém, alguns indivíduos não apresentaram urolitinas

demonstrando que a metabolização desses compostos depende de outros fatores tais como das diferenças interindividuais da microbiota.

Mais recentemente, Espín *et al.* (2007) estudaram a biodisponibilidade dos elagitaninos utilizando como modelo porcos ibéricos. Esses autores sugeriram que os elagitaninos seriam hidrolisados a ácido elágico e então metabolizados pela microbiota intestinal às urolitinas. A presença de ácido elágico na bile e urina foi atribuída à absorção do ácido elágico no estômago. Porém, os autores não explicaram como essa absorção seria realizada uma vez que o ácido elágico não é hidrossolúvel. Além disso, faltam informações a respeito do mecanismo e/ou tecido em que os elagitaninos são hidrolisados a seus monômeros.

## 2. OBJETIVOS

- Caracterização de diferentes cultivares brasileiras de morango maduro quanto a:
  - Conteúdo de fenólicos totais;
  - Conteúdo de antocianinas totais;
  - Conteúdo de vitamina C;
  - Composição e teor total de flavonóides;
  - Capacidade antioxidante *in vitro*;
  - Conteúdo de ácido elágico (livre e total).
  
- Otimização do método de determinação do conteúdo de ácido elágico livre e total em morangos;
  
- Purificação e caracterização estrutural dos derivados de ácido elágico do morango;
  
- Determinação das atividades antiproliferativa, anti-diabetes tipo 2 e anti-hipertensão dos elagitaninos purificados através de modelos *in vitro*;
  
- Estudo da biodisponibilidade dos elagitaninos *in vivo* em ratos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Materiais**

As diferentes cultivares de morangos maduros foram obtidas no CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo), a saber: Piedade, Oso Grande, Camp Dover, Dover, Camarosa, Sweet Charlie e Toyonoka doce. As amostras foram trituradas sob nitrogênio líquido, liofilizadas e posteriormente armazenadas a -18 °C (freezer) até o momento da análise.

#### **3.2. Métodos**

##### **3.2.1. Determinação de flavonóides e ácido elágico livre**

As amostras foram extraídas com uma mistura de metanol/água/ácido acético (70:30:5, v/v) (armazenado em freezer) na proporção de 1:25 (m/v), com Ultra-Turrax (Polytron®-Kinematica GnbH, Kriens-Luzern, Suíça), por 1 minuto em velocidade 5, em banho de gelo. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman n° 6. O resíduo foi re-extraído mais 2 vezes. Para concentração dos extratos foi utilizado Rotaevaporador (RE 120 – Büchi, Flawil, Suíça), em temperaturas de banho de 40 °C (até ~20 mL). O volume foi então ajustado com água para balão volumétrico de 25 mL e uma alíquota de 10 mL (pipetada sob agitação lenta) foi passada em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel, GmbH & Co., Alemanha), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 20 mL de água e a eluição dos flavonóides foi feita com 50 mL de metanol seguido de 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5), ocorrendo a eluição do ácido elágico livre. Foi utilizado manifold Visiprep 24 DL da Supelco. Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol e filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 µm de poro (Millipore Ltd., Bedford, EUA). As extrações foram realizadas em duplicata e a quantificação dos flavonóides e ácido elágico livre presentes nas diferentes cultivares foi realizada por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### 3.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise dos flavonóides foi realizada em coluna Prodigy 5  $\mu$  ODS(3) 250 x 4,60 mm (Phenomenex Ltd, Reino Unido). Foi utilizado gradiente de solventes constituído por A. Água: Tetrahydrofurano: Ácido trifluoroacético (98 : 2: 0,1) e B. Acetonitrila, na proporção de 17% de B por 2 min aumentando para 25% B após 5 min, 35% B após mais 8 min e 50% B após mais 5 min. Para limpeza da coluna foi aumentada então para 90 % B e a seguir re-equilibrada nas condições iniciais por 10 min. Para a identificação de ácido elágico foi alterada a percentagem inicial do solvente B para 25%. O cromatógrafo líquido utilizado foi o da Hewlett Packard série 1100, equipado com detector com arranjo de diodo (DAD) (Palo Alto, EUA). A identificação foi feita a partir dos tempos de retenção e dos espectros. As amostras foram injetadas em duplicata. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de amostra, base úmida (b.u.).

### 3.2.3. Otimização da determinação dos teores totais de ácido elágico em morangos

Para a determinação do teor total de ácido elágico presente nas diferentes cultivares de morango foram preparados extratos em metanol 70% da cultivar previamente escolhida com base no maior teor de ácido elágico livre. Para tanto, foram testadas as seguintes condições de hidrólise citadas na literatura:

1- Daniel *et al.* (1989)

Foram utilizados 2 mL do extrato metanólico e 2 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 4N, sendo realizado refluxo por 2 horas a 100 °C.

2- Wilson e Hagermann (1990)

Hidrólise com HCl 2N aquoso (5-10 mg amostra/mL ácido) por 10 horas a 100 °C sob vácuo.

3- Häkkinen *et al.* (2000)

Hidrólise com HCl 6 M (concentração final HCl 1,2 M), refluxo de 20 horas a aproximadamente 85 °C.

4- Maas *et al.* (2001b)

Hidrólise com TFA (0,1 mL/10 mL extrato), refluxo por 1 hora a 100 °C.

5- Lee e Talcott (2004)

Extrato metanólico submetido à hidrólise com HCl 2 N por 1 hora a 95 °C.

6- Bushman *et al.* (2004)

Hidrólise com TFA 2N metanólico por 2 horas a 100 °C.

7- Carpita (1983)

Hidrólise por 90 minutos a 120 °C de 2 mL do extrato metanólico e 2 mL de TFA 2N.

Após a hidrólise nas diferentes condições testadas, os teores totais de ácido elágico foram quantificados por CLAE. Além disso, diferentes solventes também foram testados para determinar o mais eficiente na extração dos derivados de ácido elágico. Todos os resultados foram expressos em mg por 100 g de amostra (b.u.). A porcentagem de recuperação do método também foi avaliada através da adição do padrão de ácido elágico às amostras submetidas às condições de hidrólise otimizadas.

#### **3.2.4. Determinação dos teores totais de ácido elágico**

Todas as cultivares de morango foram hidrolisadas segundo as condições otimizadas. Para tanto, uma alíquota de 2 mL do extrato em acetona 80% foi completamente seca sob N<sub>2</sub> e 2 mL de TFA 2N aquoso foram adicionados. A hidrólise foi realizada a 120 °C por 60 minutos. Todos os resultados foram expressos como mg/100 g amostra (b.u.).

#### **3.2.5. Determinação dos fenólicos totais**

Foi realizada de acordo com Singleton *et al.* (1999), utilizando-se 0,25 mL dos extratos obtidos em 3.2.1 adicionados a 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 min à temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio, e os tubos foram colocados em banho a 37 °C durante 30 min para desenvolvimento de cor. A absorbância a 750 nm foi determinada em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, Reino Unido) e o conteúdo de fenólicos totais calculado utilizando-se curva-padrão de ácido gálico. Os resultados obtidos foram expressos como mg de ácido gálico por 100g de amostra (b.u.).

### 3.2.6. Determinação da capacidade antioxidante – DPPH

A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) pelos antioxidantes presentes na amostra, método proposto por Brand-Williams *et al.* (1995) com algumas modificações (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Para tanto, foram tomadas alíquotas de 50 µL dos extratos em metanol obtidos em 3.2.1 e adicionados 250 µL de solução metanólica de DPPH (0,05 M). Foram efetuadas leituras do decréscimo de absorvância a 517 nm no tempo zero e após 20 minutos, utilizando-se espectrofotômetro (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, Reino Unido). Como controle foi utilizada uma solução metanólica de butilhidroxitolueno (BHT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). Os cálculos foram efetuados com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ descolorimento do DPPH} = \frac{(\text{abs. da amostra} - \text{abs. do branco da amostra}) \times 100}{\text{abs. do branco do ensaio DPPH}}$$

Os resultados foram expressos como µmoles equivalentes de BHT/g de amostra (b.u.).

### 3.2.7. Determinação da capacidade antioxidante – sistema β-caroteno/ácido linoléico

A capacidade antioxidante foi avaliada pelo método de descolorimento do β-caroteno (MILLER, 1971), com pequenas modificações (HASSIMOTTO *et al.*, 2005). Para o preparo da solução reativa, alíquotas de 20 µL de uma solução de β-caroteno em clorofórmio (2 mg/mL) foram misturadas com 0,4 mL de ácido linoléico, 1 mL de clorofórmio e 0,4 mL de Tween 40. Posteriormente, o clorofórmio foi evaporado até secagem completa, sob nitrogênio. Após evaporação do clorofórmio, foram adicionados aproximadamente 20 mL de água destilada saturada de oxigênio. A absorvância da solução foi então ajustada com água para 0,6. Para a reação de oxidação, uma alíquota (100 µL) do extrato foi adicionada a 2400 µL da mistura reativa em cubetas de plástico. As amostras foram então submetidas à autooxidação a 50 °C por 2 h. A absorvância da

solução a 470 nm foi medida no tempo zero e em intervalos de 15 min utilizando-se espectrofotômetro Hewlett Packard 8453 (Palo Alto, EUA). Para o controle, foram utilizados metanol e BHT. As análises foram realizadas em quintuplicata. A capacidade antioxidante foi calculada pela porcentagem de inibição relativa ao controle (100% de oxidação) e os resultados expressos como  $\mu$ moles equivalentes de BHT/g de amostra (b.u.).

### **3.2.8. Determinação do teor de ácido ascórbico**

As análises do ácido ascórbico (AA) foram realizadas segundo Rizzolo, Forni e Polesello (1984) com pequenas modificações. As amostras foram homogeneizadas com solução de ácido acético a 0,1%, em proporção 1:10. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore® de 0,45  $\mu$ m, e diluído 1 vez com ácido acético para a análise do AA e com ditiotreitol (DTT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) 0,5 M para análise do ácido ascórbico total (AT). As amostras foram analisadas em CLAE utilizando coluna  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> 300 mm de comprimento e porosidade 10  $\mu$ m, fase móvel composta por: A- acetonitrila com ácido acético 0,1% e B: ácido acético 0,1% em água, fluxo de 1,5 mL/min. A curva padrão foi feita com padrão de AA em concentrações entre 10 e 100  $\mu$ g/mL. A detecção foi realizada por UV a 254 nm e os resultados expressos como mg ácido ascórbico/100 g amostra (b.u.).

### **3.2.9. Determinação do teor de antocianinas**

Amostras de morango liofilizados (1 g) foram trituradas com 20 mL de metanol contendo HCl 1% usando um homogeneizador Brinkmann (Polytron; Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça), centrifugadas a 2000 g por 15 minutos (4 °C). O conteúdo de antocianinas foi estimado como pelargonidina 3-glicosídeo a 510 nm, usando um coeficiente de extinção molar de 36000 e expresso como mg de antocianina/100 g de amostra (b.u.) (CORDENUNSI *et al.*, 2002).

### **3.2.10. Purificação de elagitaninos do morango**

Primeiramente foram utilizados extratos obtidos em metanol 70% para a purificação dos elagitaninos presentes no morango. Para tanto, diversas resinas foram testadas: poliamida (PA) (CC 6, Macherey-Nagel, GmbH & Co., Alemanha), C18

(Supelco, Bellefonte, PA, EUA), Sephadex LH 20 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suíça), celulose microcristalina (Merck, Darmstadt, Alemanha), Polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Sigma, St. Louis, EUA), Amberlite XAD-2 (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) além dos métodos de precipitação (BSA – albumina de soro bovino, acetato de itérbio). Em todos os testes foram realizadas análises antes (ácido elágico livre) e após hidrólise dos extratos (ácido elágico total) e a quantificação por CLAE. Todos os resultados foram expressos como mg/100 g (b.u.).

#### **3.2.10.1. Resinas de poliamida (PA) e C18**

O procedimento de utilização destas resinas é similar ao descrito no item 3.2.1.1. As amostras foram primeiramente extraídas em metanol 70%, rotaevaporadas até ~ 10 mL e o volume foi então ajustado com água para balão volumétrico de 25 mL e uma alíquota de 10 mL (pipetada sob agitação lenta) foi passada em coluna de 1 g de resina de PA ou C18 preparadas em seringa própria de 6 mL. As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 20 mL de água e a eluição foi realizada com os diferentes solventes testados.

#### **3.2.10.2. Resina Sephadex LH 20**

O extrato seco foi dissolvido no solvente teste e cromatografado através de uma coluna de 16 x 70 cm empacotada com Sephadex LH 20 previamente equilibrada com o solvente em questão. As frações coletadas foram analisadas antes e após hidrólise para a determinação de ácido elágico total.

#### **3.2.10.3. Resinas de celulose microcristalina, PVPP (polivinilpolipirrolidona) e Amberlite XAD-2**

Os extratos de morango em água foram adsorvidos por meio de 10 g das resinas de celulose microcristalina, PVPP ou Amberlite XAD-2, previamente condicionadas com metanol e água. A amostra e a resina ficaram sob agitação por 20 minutos em temperatura ambiente (25 °C), e após filtração a resina foi lavada com água e eluída com metanol 100%. Os eluatos completamente secos foram analisados antes e após hidrólise para determinação de ácido elágico total.

#### **3.2.10.4. Precipitação com albumina de soro bovino (BSA)**

A metodologia utilizada para a precipitação dos elagitaninos presentes com BSA (Sigma, St. Louis, EUA) foi descrita por Hagerman e Butler (1978), com modificações (MAKKAR *et al.*, 1988). Aproximadamente 1 g de morango liofilizado foi extraído com acetona 80% e rotaevaporado para eliminação da acetona. Uma alíquota de 1 mL do extrato aquoso foi adicionada a 2 mL da solução contendo BSA (1 mg/mL). A solução foi agitada e deixada a temperatura ambiente por cerca de 15 minutos e então foi centrifugada por 15 minutos a 5000 g e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi lavado com tampão acetato 0,2 M (pH 5,0) sem dissolução do mesmo. O precipitado foi dissolvido em 4 mL de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (Sigma, St. Louis, EUA) e analisado antes e após hidrólise ácida para determinação dos teores de ácido elágico total.

#### **3.2.10.5. Precipitação com acetato de itérbio**

A metodologia utilizada para a precipitação dos elagitaninos presentes com acetato de itérbio foi descrita por Giner-Chávez *et al.* (1997). Aproximadamente 1 g de morango liofilizado foi extraído com acetona 80% e rotaevaporado para eliminação da acetona. Uma alíquota de 4 mL de acetato de itérbio [ $\text{Yb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 M] (Sigma, St. Louis, EUA) foi adicionada ao extrato aquoso de morango (20 mL) e a mistura foi armazenada de um dia para outro a 5 °C. O precipitado formado (tanino-Yb) foi recuperado após centrifugação a 3000 g por 10 minutos a 5 °C. O precipitado foi lavado três vezes, duas vezes com 10 mL de acetona 70% e uma vez com 10 mL de acetona 100%. Após isso, o precipitado foi dissolvido com uma solução de ácido oxálico 0,1Mn (Merck, Darmstadt, Alemanha), formando um novo precipitado oxalato-itérbio. O sobrenadante resultante foi rotaevaporado e analisado antes e após hidrólise ácida para determinação dos teores de ácido elágico total.

#### **3.2.11. Caracterização estrutural dos derivados de ácido elágico e elagitaninos**

A identificação dos derivados de ácido elágico e elagitaninos presentes no morango foi conduzida em equipamento composto de um espectrômetro de massas tipo *ion trap*, modelo Esquire HCT (Bruker Daltonics, Alemanha), acoplado a um cromatógrafo líquido modelo Prominence (Shimadzu, Japão) e interface de ionização por elétron spray (ESI). A metodologia empregada foi a utilizada por Seeram *et al.*

(2006b), com algumas modificações. Foi utilizada uma coluna de C18 Luna (Waters, MA, EUA), fluxo de 1 mL/min e gradiente de solventes constituído por A: água: ácido fórmico 1% e B: acetonitrila, na proporção de 10% de B por 10 min aumentando para 20% B após 10 min, 90% B após mais 20 min, retornando à condição inicial da corrida após 5 minutos. A coluna foi mantida a 25 °C. Após a passagem pelo detector de DAD, o fluxo foi alterado para 0,2 mL/min para passagem no espectrômetro de massas. A ESI foi conduzida em modo negativo ( $m/z$  M-H<sup>+</sup>). Para a análise no espectrômetro de massas foi utilizado voltagem do capilar de 4,00 kV, e temperatura capilar de 275 °C.

### **3.2.12. Determinação da atividade antiproliferativa**

Extratos totais de morango obtidos após extração em acetona 80% e completa secagem, purificados de elagitaninos obtidos segundo item 3.2.10.5. e ácido elágico (Sigma, St. Louis, EUA) foram avaliados quanto a potencial atividade antiproliferativa, na Divisão de Farmacologia e Toxicologia (CPQBA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em colaboração com o Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho.

#### **3.2.12.1. Linhagens celulares**

Para a realização da triagem *in vitro* foram selecionadas as linhagens: MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), UACC-62 (melanoma), NCI460 (pulmão), PCO3 (próstata), HT29 (cólon), OVCAR (ovário) e 786-0 (rim). Essas linhagens foram cultivadas em meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) com 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C e ambiente úmido.

#### **3.2.12.2 Teste de atividade anticâncer em cultura de células tumorais humanas**

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1 g/mL resultando em soluções estoques. Para a adição na cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo menos 400 vezes em RPMI / SFB / gentamicina, evitando a atividade do DMSO.

Para o teste de atividade, foram plaqueados 100 µL de células em meio RPMI/SFB/gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação, em microplacas

de 96 compartimentos. Estas placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e ambiente úmido, para readaptação ao ambiente. Depois desse período uma placa controle foi fixada através da adição de ácido tricloroacético (TCA) para determinação da quantidade de células no momento da adição das amostras. Nas demais placas foram adicionados os compostos nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL e incubadas por 48 horas. Após este período, as placas de 96 compartimentos foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm, e fixadas com 50 µL de TCA 50 % para as células aderidas e 80% para as células em suspensão (leucemia). Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C. Após esse tempo, foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e produtos secundários. Estas placas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem completa.

A seguir, as placas foram coradas pela adição de 50 µL do corante protéico sulforrodamina B (SRB) a 0,4% (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1%, e incubadas a 4 °C, durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente.

O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base na concentração de 10 µM e pH 10,5 por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas.

Para análise dos resultados, foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos, e calculada a porcentagem de inibição de crescimento. Com os dados obtidos, foram construídos gráficos relacionando a porcentagem de inibição de crescimento com a concentração da substância teste. Como controle positivo foi padronizado o quimioterápico doxorubicina.

### **3.2.13. Determinação *in vitro* das atividades inibitórias de $\alpha$ -glicosidase e $\alpha$ -amilase**

Os purificados de elagitaninos também foram avaliados quanto a potencial inibição *in vitro* das enzimas  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase.

### 3.2.13.1. Inibição da enzima $\alpha$ -glicosidase

O ensaio foi realizado de acordo com o **Worthington Enzyme Manual** (1993), com algumas modificações (McCUE; KWON; SHETTY, 2005) 50  $\mu$ L dos extratos purificados de elagitaninos (50 mg/mL) e 100  $\mu$ L de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,9) contendo a enzima (1 U/mL) (Sigma, St. Louis, EUA) foram incubados em microplaca a 25 °C por 10 minutos. Após pré-incubação, 50  $\mu$ L de uma solução de *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (Sigma, St. Louis, EUA) em tampão fosfato foram adicionados a mistura e incubados a 25 °C por 5 minutos. Antes e após a incubação foram realizadas leituras a 405 nm por um leitor de microplacas (Thermomax, Molecular Device Co., Sunnyvale, CA) e comparadas com o controle o qual continha apenas tampão fosfato. A porcentagem de inibição da atividade enzimática foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs}^{\text{controle}} - \text{Abs}^{\text{amostra}}}{\text{Abs}^{\text{controle}}} \times 100$$

Os resultados obtidos foram expressos como % de inibição da atividade enzimática referente ao controle.

### 3.2.13.2. Inibição da enzima $\alpha$ -amilase

A atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase foi determinada de acordo com **Worthington Enzyme Manual** (1993), com algumas modificações. Para tanto, foi preparada uma solução 0,5 mg/mL da enzima  $\alpha$ -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) em tampão fosfato 0,2 M (pH 6,9). O substrato utilizado na reação foi amido 1% (m/v), também dissolvido em tampão fosfato 0,2 M após breve aquecimento. Neste ensaio, 500  $\mu$ L do purificado de elagitaninos (concentração de 50 mg/mL) e 500  $\mu$ L da solução enzimática foram incubados a 25 °C por 10 minutos. Após a pré-incubação, 500  $\mu$ L da solução de amido 1% foram adicionados e a mistura novamente incubada a 25 °C por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução de DNS 96 mM (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e levada diretamente para

banho fervente por 5 minutos. A mistura foi retirada do banho e diluída com 10 mL de água destilada. A atividade de  $\alpha$ -amilase foi determinada pela leitura a 540 nm em espectrofotômetro. A porcentagem de inibição da atividade enzimática foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs}^{\text{controle}} - \text{Abs}^{\text{amostra}}}{\text{Abs}^{\text{controle}}} \times 100$$

Os resultados obtidos foram expressos como % de inibição da atividade enzimática referente ao controle.

#### **3.2.14. Inibição da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA)**

A determinação da porcentagem de inibição da ECA foi avaliada de acordo com um método modificado por Kwon, Vattem e Shetty (2006). O substrato hipuril-histidil-leucina (HHL) (Sigma, St. Louis, EUA) e a enzima conversora de angiotensina (ECA) (EC 3.4.15.1, Sigma, St. Louis, EUA) de pulmão de coelho foram utilizados. 50  $\mu$ L do extrato purificado de elagitatinos (50 mg/mL) foram incubados com 100  $\mu$ l do tampão NaCl-borato 1M (pH 8.3) contendo 2 mU da enzima ECA a 37 °C por 10 minutos. Após pré-incubação, 100  $\mu$ l de uma solução 5 mU de substrato (HHL) foram adicionados a mistura de reação. As misturas foram então incubadas a 37 °C por 1 hora. A reação foi parada pela adição de 150  $\mu$ l de HCl 0,5 N. 5  $\mu$ l da amostra foram injetados em CLAE acoplado a detector DAD. Os solventes usados foram: A: ácido fosfórico 10 mM (pH 2,5) e B: metanol 100%. A concentração de B foi aumentada para 60% nos primeiros 8 minutos e para 100% por 5 minutos, após o qual a concentração foi diminuída para 0% nos próximos 5 minutos (tempo total de corrida de 18 minutos). A coluna usada foi Nucleosil 100-5C18, 250 mm x 4.6 mm, i.d. 5  $\mu$ m. Fluxo de 1 mL/min à temperatura ambiente. Durante cada corrida, a absorbância foi monitorada a 228 nm para detecção da liberação do ácido hipúrico (AH). Diferentes concentrações de ácido hipúrico foram injetadas para construção da curva de calibração.

A porcentagem de inibição da ECA foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{AH^{\text{controle}} - AH^{\text{amostra}}}{AH^{\text{controle}} - AH^{\text{branco}}} \times 100$$

Os resultados obtidos foram expressos como % de inibição da atividade enzimática referente ao controle.

### 3.2.14. Determinação da fração indigerível (FI)

A determinação da fração indigerível do morango (cv. Dover) foi realizada de acordo com Saura-Calixto *et al.* (2000). Amostras de morango (300 mg) foram homogeneizadas (Brinkmann, Polytron) com 8 mL de tampão KCl/HCl 0,1 M (pH = 1,5). Uma alíquota de 0,2 mL de pepsina (65000 U/mL tampão KCl/HCl 0,1M, pH = 1,5) foi adicionada e as amostras colocadas em banho sob agitação a 37 °C por 60 minutos. Após a incubação, o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 4M. Em seguida, foram adicionados 8 mL de tampão trismaleato/NaOH 0,1M (pH = 7,0) contendo 5 mg de pancreatina (Sigma P-1750), 14 mg de lipase (Sigma L-3126), 35 mg de extrato de bile de porco (Sigma B-8631) e 120 mg de  $\alpha$ -amilase (Sigma A-3176). Novamente as amostras foram colocadas em banho sob agitação a 37 °C por 16 horas. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 3000 g e temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram recolhidos e os resíduos lavados com 10 mL de água e centrifugados, tendo este procedimento sido repetido por duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados e os resíduos reservados.

A quantificação da FI insolúvel foi realizada gravimetricamente através da pesagem dos resíduos finais após secagem em estufa a 105 °C por 18 h.

A quantificação da FI solúvel foi realizada pelo ajuste do pH dos sobrenadantes para 4,75 com HCl 1M. Em seguida foi adicionado 1 mL de amiloglicosidase (12 mg/mL tampão Acetato de sódio/Ácido acético 1,2M, pH=4,75), submetendo-se à incubação em banho sob agitação a 60 °C por 45 minutos. Após a incubação, as soluções foram dialisadas em membranas de diálise de 12000-14000 MWCO (*molecular weight cut-off*) por 48 h, a 37 °C. Os dialisados foram então transferidos para frascos e colocados em estufa a 105 °C por 36 h. Os teores de FI solúvel foram

calculados gravimetricamente. Após a determinação da fração indigerível solúvel e insolúvel, estas frações foram analisadas quanto aos teores de ácido elágico livre e total. Os resultados foram expressos como mg/100 g amostra (b.u.)

### **3.2.15. Determinação da interação ácido elágico - BSA**

A metodologia empregada foi a descrita por Papadopoulou, Green e Frazier (2005). Para tanto, diluições seriadas de ácido elágico e quercetina (0,01 a 0,5 mM) foram preparadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 e DMSO (9:1). Para cada ponto, foram adicionados 0,25 mL da solução do composto fenólico e 3 mL de uma solução de BSA 1,5  $\mu$ M, dando uma concentração final de ácido elágico ou quercetina variando entre 0,001 a 0,05 mM. As mudanças na intensidade de emissão de fluorescência foram medidas durante 1 min após a adição do composto fenólico a BSA. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. Os valores de fluorescência foram colocados em um gráfico como intensidade de fluorescência relativa (IFR) versus concentração do composto fenólico

### **3.2.16. Estudo de biodisponibilidade de elagitaninos *in vivo* em animais**

Todos os experimentos com animais foram previamente aprovados pela Comissão de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Protocolo nº 72 de 05/09/2005).

#### **3.2.16.1. Animais**

Para o estudo de biodisponibilidade de elagitaninos do morango foram utilizados 36 ratos Wistar machos de peso aproximado de 200 g. Na noite anterior ao experimento, os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em 9 grupos de 4 animais e mantidos em jejum com acesso a água *ad libitum*.

#### **3.2.16.2. Desenho experimental**

O purificado de elagitaninos (20 mg de ácido elágico total/200 g peso corpóreo) foi dissolvido em água e administrado aos animais por gavagem, com exceção do grupo controle ao qual foi administrada somente água. Após a gavagem, os animais foram devolvidos às gaiolas e providos de água, sem a ração.

Os ratos foram anestesiados pela administração intraperitoneal de hidrato de cloral (400 mg/Kg em solução salina) e submetidos a eutanásia após 15 e 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 24 horas após a administração do purificado de elagitaninos (n= 4 para cada tempo). O sangue foi coletado através da artéria abdominal em tubo a vácuo com EDTA (3 mL) (Becton Dickinson, Curitiba, Brasil). Os rins, estômago, fígado, intestino delgado e o intestino grosso também foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C.

### **3.2.16.3. Determinação de elagitaninos e ácido elágico livre no material biológico**

Todo o material biológico coletado foi analisado antes e após hidrólise ácida, de acordo com as condições previamente otimizadas, para detecção de ácido elágico livre e/ou presença de elagitaninos.

#### **3.2.16.3.1. Sangue**

O sangue coletado foi centrifugado a 2000 g, 15 min a 4 °C e o plasma estocado a -20 °C. Uma alíquota do plasma foi aplicada em coluna de 0,2 g de Supelclean LC-18 preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology) e pré-condicionada pela passagem de 10 mL de metanol e 20 mL água. Após a aplicação do plasma, a coluna foi lavada com 20 mL de água e a eluição dos elagitaninos foi realizada com 15 mL de metanol. Os eluatos assim obtidos foram secos completamente em rotavaporador a 40 °C sob vácuo e ressuspensos em 1 mL de metanol grau cromatográfico para quantificação por CLAE/DAD.

#### **3.2.16.3.2. Rins, estômago, fígado, intestino delgado e intestino grosso**

Os órgãos liofilizados foram homogeneizados por 2 minutos com 100 mL de acetona 80% utilizando Ultra-Turrax. O extrato assim obtido foi centrifugado a 10.000 g/10 min/4 °C e o resíduo re-extraído nas mesmas condições. O sobrenadante das duas extrações foi concentrado em rotavaporador a 40 °C até a remoção completa da acetona. Uma alíquota do extrato aquoso foi aplicada em coluna de 1 g de C18 e posterior eluição com metanol. Os eluatos foram secos completamente em rotavaporador a 40 °C sob vácuo e ressuspensos em 1 mL de metanol para quantificação por CLAE/DAD.

#### 3.2.16.4. Determinação da capacidade antioxidante do plasma

A capacidade antioxidante das amostras de plasma foi avaliada por dois diferentes métodos: seqüestro de radicais livres do DPPH, metodologia anteriormente descrita no item 3.2.1.5 “*Materiais e Métodos*”, e ORAC (Capacidade de absorção do radical oxigênio).

##### 3.2.16.4.1. ORAC

Utilizou-se a metodologia descrita por Dávalos, Gomez-Cordoves e Bartolome (2004), adaptada para leitura em cubetas individuais. Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4 e o volume final da mistura foi de 2 mL. Neste ensaio, 200 µL de amostra foram misturados a 1200 µL de uma solução de fluoresceína (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA ) a 70 nM e incubados a uma temperatura constante de 37 °C por 15 minutos antes da adição de 600 µL da solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) (Wako Chemicals Inc., Richmond, EUA) a 24 mM, que dá início à reação. A intensidade de fluorescência (485 nm<sub>ex</sub> / 525 nm<sub>em</sub>) foi verificada a cada 10 minutos durante 80 minutos em cubeta de quartzo. O tampão fosfato também foi usado para zerar o equipamento. Como controle da reação, adicionou-se 200 µL de metanol à solução de fluoresceína (HUANG; OU; PRIOR 2005; OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR 2001). O cálculo da perda de fluorescência da fluoresceína, ou área abaixo da curva (AAC), foi efetuado com o auxílio da seguinte fórmula:

$$AAC = 1 + f_1/f_0 + \dots + f_i/f_0 + \dots + f_{80}/f_0$$

onde  $f_0$  é representado pela fluorescência obtida no tempo 0 e  $f_i$  a fluorescência obtida nos tempos intermediários entre 0 e 80 minutos.

Utilizou-se curva padrão de Trolox (Sigma, St. Louis, EUA), realizada a cada ensaio, nas concentrações de 0,4 a 4,8 µM. A área da perda de fluorescência de uma

amostra foi calculada subtraindo-se a área correspondente à do controle. A determinação de fluorescência foi realizada utilizando-se espectrofotômetro de fluorescência modelo F-3010 (HITACHI, Tóquio, Japão). Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos em  $\mu$ moles equivalentes de Trolox/mL de plasma.

### **3.3. Análise dos resultados**

Para a análise dos resultados utilizou-se o programa Statistica versão 5.0 da StatSoft (Tulsa, E.U.A.). A comparação das médias foi realizada por ANOVA ( $P < 0,05$ ) e LSD (least significant difference).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS CULTIVARES DE MORANGO

Para a realização do projeto sete diferentes cultivares de morangos maduros foram obtidas no CEAGESP, a saber: Piedade, Camarosa, Camp Dover, Dover, Toyonoka Doce, Oso Grande e Sweet Charlie. Os morangos foram liofilizados e armazenados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  (freezer) até o momento de análise.

Na primeira parte do projeto foi realizada a caracterização química das diferentes cultivares quanto aos teores de umidade, fenólicos totais, antocianinas (medida espectrofotométrica), vitamina C, flavonóides (CLAE), ácido elágico livre além da capacidade antioxidante por dois diferentes métodos (DPPH e  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico).

A **Tabela 1** apresenta os valores obtidos para os teores de umidade, antocianinas, fenólicos totais e vitamina C nas diferentes cultivares de morango. Observou-se que não houve diferença significativa quanto ao teor de umidade das diferentes cultivares maduras, obtendo-se um valor de aproximadamente 90%, valor de acordo com o encontrado em outro estudo com cultivares brasileiras de morangos (CORDENUNSI *et al.*, 2002). Com relação aos teores de antocianinas e fenólicos totais, as cultivares Dover e Camarosa apresentaram os maiores teores enquanto que a cultivar Camp Dover apresentou os menores. O teor de ácido ascórbico total também variou significativamente já que a cultivar Piedade apresentou 112 mg/100 g enquanto que as cultivares Oso grande e Camarosa apresentaram somente 65 mg/100 g (b.u.). Esses valores são maiores do que os relatados por Cordenunsi *et al.* (2005), entre 47 e 80 mg/100 g (b.u.), para as cultivares Dover, Campineiro e Oso grande.

**Tabela 1.** Teores de umidade (%), antocianinas (mg/100 g b.u.), fenólicos totais (mg/100 g b.u.) e ácido ascórbico total (mg/100 g b.u.) das diferentes cultivares de morango.

Constituinte	Cultivar						
	Piedade	Oso grande	Sweet Charlie	Camp Dover	Dover	Camarosa	Toyonoka doce
Umidade (%)	88 ± 2 <sup>a</sup>	90,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	90,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	92 ± 1 <sup>a</sup>	89 ± 1 <sup>a</sup>	91 ± 1 <sup>a</sup>	87,9 ± 0,2 <sup>a</sup>
Antocianinas (mg/100 g)	20,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	13,8 ± 0,5 <sup>b</sup>	21 ± 1 <sup>a</sup>	6,9 ± 0,4 <sup>c</sup>	32 ± 5 <sup>d</sup>	22,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	11 ± 1 <sup>b</sup>
Fenólicos totais (mg/100 g)	252 ± 8 <sup>a</sup>	230 ± 5 <sup>b</sup>	209 ± 3 <sup>c</sup>	205 ± 6 <sup>c</sup>	318 ± 3 <sup>d</sup>	262 ± 8 <sup>a</sup>	212 ± 4 <sup>c</sup>
Ácido ascórbico total (mg/100 g)	112 ± 5 <sup>a</sup>	65 ± 6 <sup>b</sup>	73 ± 5 <sup>b</sup>	71 ± 1 <sup>b</sup>	93 ± 9 <sup>c</sup>	65 ± 3 <sup>b</sup>	97 ± 7 <sup>c</sup>

Resultados expressos como média ± desvio-padrão

A composição e o teor de flavonóides presentes nas diferentes cultivares de morango foram determinados por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (**Tabela 2**).

Observou-se que dentre as antocianinas presentes, pelargonidina e cianidina glicosiladas, os derivados de pelargonidina apresentaram-se em teores mais elevados em todas as cultivares analisadas. A cultivar Camarosa apresentou o maior teor total de antocianinas (44,2 mg/100 g b.u.) enquanto que a cultivar Camp Dover apresentou o menor (12,4 mg/100 g b.u.). De acordo com Wang e Zheng (2001) a pelargonidina 3-glucosídeo e a cianidina 3-glucosídeo são quase que exclusivamente responsáveis pela coloração vermelha do morango. Em estudo realizado por Skupien e Oszmianski (2004) com seis cultivares de morango da Polônia também a pelargonidina foi a antocianidina predominante em todas as cultivares (de 78 a 92%), e os valores variaram de 25,3 a 39,8 mg/100 g amostra (b.u.).

Esse perfil das cultivares para os teores de antocianinas está de acordo com o encontrado pelo método espectrofotométrico (**Tabela 1**), porém observou-se que os valores obtidos por espectrofotometria foram significativamente menores que os obtidos por CLAE. Uma explicação para isto seria o fato de na medida espectrofotométrica ser levado em conta somente o coeficiente de extinção molar da pelargonidina 3-glucosídeo e não através de uma curva-padrão para cada antocianina como no caso das medidas por CLAE.

Com relação aos flavonóis, observou-se a presença de derivados de quercetina e campferol, sendo que os derivados de quercetina apresentaram-se em teores mais elevados em todas as cultivares. Esses resultados também estão de acordo com os obtidos para as cultivares brasileiras de morango estudadas por Cordenunsi *et al.* (2002).

Os flavanóis apresentaram-se em quantidades muito baixas, com predomínio de catequina, embora algumas cultivares não tenham apresentado valores detectáveis. Em seis cultivares de morango estudados por Skupien e Oszmianski (2004) os teores de catequina variaram de 6,1 a 18,7 mg/100 g amostra (b.u.), sendo esses teores maiores do que os encontrados para as cultivares brasileiras.

O teor total de flavonóides presentes nas diferentes cultivares variou de 48 mg/100 g (Camarosa) a 24 mg/100 g b.u. (Camp Dover).

Os resultados encontrados para a caracterização das cultivares analisadas estão de acordo com estudos anteriores em que os principais flavonóides presentes no morango são descritos como sendo derivados de pelargonidina, cianidina, campferol, quercetina e catequina (CO; MARKAKIS, 1968).

Essas variações encontradas entre as cultivares eram esperadas já que a concentração de nutrientes e compostos bioativos é fortemente influenciada por fatores extrínsecos tais como as condições climáticas, época de plantio e colheita, e grau de maturidade dos frutos.

**Tabela 2.** Composição e teor de flavonóides (mg/100 g b.u.) presentes nas diferentes cultivares de morango.

Constituinte	Cultivar						
	Piedade	Oso grande	Sweet Charlie	Camp Dover	Dover	Camarosa	Toyonoka doce
Antocianinas							
Pelargonidina	34,9±0,8 <sup>a</sup>	17,0±0,2 <sup>b</sup>	29 ± 2 <sup>c</sup>	11,9±0,2 <sup>d</sup>	22,8±0,6 <sup>e</sup>	43 ± 2 <sup>f</sup>	18 ± 1 <sup>b</sup>
Cianidina	0,85±0,04 <sup>a</sup>	2,1±0,2 <sup>b</sup>	0,31±0,02 <sup>c</sup>	0,54±0,03 <sup>d</sup>	1,1±0,1 <sup>e</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>e</sup>	1,3 ± 0,1 <sup>e</sup>
Flavonóis							
Derivados de Quercetina	1,21±0,04 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,27±0,04 <sup>c</sup>	3,1 ± 0,1 <sup>d</sup>	3,3 ± 0,1 <sup>d</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,4 ± 0,2 <sup>e</sup>
Derivados de Campferol	0,60±0,04	1,02±0,02	0,58±0,02	0,77±0,02	2,3 ± 0,1	0,79±0,03	1,11±0,05
Flavanóis							
Catequina	3,0±0,4 <sup>a</sup>	2,8±0,6 <sup>a</sup>	n.d.	5,7±0,1 <sup>b</sup>	2,7±0,3 <sup>a</sup>	n.d.	3,3±0,5 <sup>a</sup>
Epicatequina	2,1±0,2 <sup>a</sup>	1,4±0,2 <sup>b</sup>	n.d.	2,0±0,2 <sup>a</sup>	2,2±0,2 <sup>a</sup>	n.d.	2,2±0,1 <sup>a</sup>
<i>Flavonóides totais</i>	42,7± 0,6 <sup>a</sup>	27,1± 0,5 <sup>b</sup>	32 ± 1 <sup>c</sup>	24,0± 0,4 <sup>d</sup>	34,4± 0,6 <sup>e</sup>	48 ± 2 <sup>f</sup>	30 ± 2 <sup>c</sup>

Resultados expressos como média ± desvio-padrão. n.d. não detectado

Muitos estudos têm demonstrado que o morango apresenta alta capacidade antioxidante, relacionada com os níveis de compostos fenólicos no fruto (HEINONEN; MEYER; FRANKEL, 1998; VINSON *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2002). Para tanto, a capacidade antioxidante das diferentes cultivares de morango foi avaliada através de dois métodos diferentes: seqüestro de radicais livres do DPPH e descoramento pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico (**Tabelas 3 e 4**).

O método do DPPH (2,2-difenil-1, picrilhidrazil) foi primeiramente descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Baseia-se na medida da habilidade redutora dos antioxidantes sobre o radical colorido DPPH• através de uma reação de transferência de elétrons, a qual é medida através do decréscimo da absorbância a 517 nm (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

No sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico é avaliada a capacidade do composto antioxidante em inibir o descoramento do  $\beta$ -caroteno causado pelos radicais livres formados durante a peroxidação do ácido linoléico (YANISHILIEVA; MARINOVA, 1995).

Na **Tabela 3** estão apresentados os valores obtidos para a avaliação da capacidade antioxidante através do método do DPPH. Observou-se que para todas as cultivares de morango os valores foram similares, exceto para a cultivar Toyonoka doce que apresentou o menor valor. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos para fenólicos totais, mostrando que há uma correlação entre os valores de capacidade antioxidante obtidos pelo método do DPPH e fenólicos totais determinados pelo método do Folin-Ciocalteu ( $r=0,71$ ). O método do Folin-Ciocalteu vem sendo indicado também como método de avaliação de capacidade antioxidante de extratos já que seu mecanismo de ação está baseado em reação de oxidação/redução (PRIOR *et al.*, 2005). Esse fato foi também observado em outro estudo realizado por Genovese *et al.* (2003). Portanto, a correlação entre esses dois métodos se deve principalmente ao fato de estarem baseados em mecanismos de ação semelhantes, ou seja, na transferência de elétrons.

**Tabela 3.** Capacidade antioxidante ( $\mu$ moles equivalentes de BHT/g amostra b.u.), determinada através do método do DPPH, de diferentes cultivares de morango.

<b>Cultivar</b>	<b><math>\mu</math>moles equivalentes de BHT/g amostra (b.u.)</b>
<b>Piedade</b>	$14,8 \pm 0,3^a$
<b>Oso grande</b>	$13 \pm 1^a$
<b>Sweet Charlie</b>	$9,2 \pm 0,9^b$
<b>Camp Dover</b>	$10,7 \pm 0,1^b$
<b>Dover</b>	$14,2 \pm 0,1^a$
<b>Camarosa</b>	$14 \pm 2^a$
<b>Toyonoka doce</b>	$6,7 \pm 0,4^c$

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão

Na **Tabela 4** estão apresentados os valores obtidos de capacidade antioxidante pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Observou-se que novamente as cultivares apresentaram valores similares, exceto para as cultivares Sweet Charlie e Piedade que apresentaram os menores valores.

Quando comparamos esses resultados com os obtidos para fenólicos totais, observamos que não há correlação ( $r= 0,27$ ). Apesar de ser conhecido que o ácido ascórbico apresenta alta capacidade antioxidante, nesse sistema ele apresenta capacidade pró-oxidante proporcional a sua concentração. Isto ocorre porque o ácido ascórbico após doar os dois hidrogênios redutores fica passível de receber elétrons, porque origina o radical ascorbila, que é um agente oxidante (BORS; BUETTNER, 1997). Como o morango apresenta um alto teor total de ácido ascórbico, a sua capacidade antioxidante estará subestimada por esse sistema.

**Tabela 4.** Capacidade antioxidante ( $\mu$ moles equivalentes de BHT/g amostra b.u.), determinada através do descoramento no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, de diferentes cultivares de morango.

<b>Cultivar</b>	<b><math>\mu</math>moles equivalentes de BHT/g amostra (b.u.)</b>
<b>Piedade</b>	$3,7 \pm 0,6^a$
<b>Oso Grande</b>	$5,0 \pm 0,2^b$
<b>Sweet Charlie</b>	$3,55 \pm 0,03^a$
<b>Camp Dover</b>	$4,5 \pm 0,3^b$
<b>Dover</b>	$4,6 \pm 0,5^b$
<b>Camarosa</b>	$4,4 \pm 0,2^b$
<b>Toyonoka doce</b>	$4,1 \pm 0,4^b$

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão

Wang, Cao e Prior (1996) determinaram a capacidade antioxidante através do método do ORAC (*oxygen radical absorption capacity*) de 12 diferentes frutos dentre os quais observaram que o morango apresentava o maior valor, correlacionando os valores de capacidade antioxidante com os teores dos compostos fenólicos. Wang e Lin (2000) também encontraram uma correlação linear entre os valores de capacidade antioxidante, pelo método do ORAC, e o teor total de fenólicos em amostras de amora-preta, framboesa e morango.

Porém, em estudo realizado por Kähkönen *et al.* (1999) nenhuma correlação entre o teor total de fenólicos e capacidade antioxidante foi encontrada. A explicação para esse fato é que a medida de fenólicos totais foi realizada pelo procedimento de Folin-Ciocalteu e a capacidade antioxidante pelo método metil linoleato (MeLo). Como já explicado anteriormente, o método de Folin-Ciocalteu não fornece valores exatos do teor de

fenólicos, já que outros compostos redutores, como o ácido ascórbico, também reagem. Além disso, sabe-se que a resposta antioxidante dos compostos fenólicos varia consideravelmente quando o modelo de oxidação MeLo é utilizado, já que se alguns desses compostos forem mais lipossolúveis como consequência apresentarão maior capacidade antioxidante por este método.

Wang *et al.* (1996) relataram que a contribuição da vitamina C na capacidade antioxidante total de frutas, determinada através do ORAC, era menor que 15%. Em estudo realizado por Kalt *et al.* (1999) os teores de fenólicos e de antocianinas foram fortemente correlacionados com a capacidade antioxidante, enquanto que o teor de vitamina C e a capacidade antioxidante, determinada através do ORAC, foram inversamente correlacionados.

Wang e Jiao (2000) analisaram sucos de morango feitos a partir de seis diferentes cultivares, e verificaram que exibiam alta capacidade antioxidante contra espécies de radicais livres incluindo os superóxidos, peróxidos de hidrogênio, radicais hidroxila e oxigênio singlete; a porcentagem de inibição de cada espécie reativa de oxigênio variou entre as cultivares estudadas.

O efeito do processamento e armazenamento sobre o teor de fenólicos e capacidade antioxidante também já foi estudado. Cordenunsi *et al.* (2005) estudaram o efeito da temperatura de armazenamento na composição química e capacidade antioxidante de três cultivares de morango. Os autores observaram que em baixas temperaturas os teores de antocianinas e vitamina C eram afetados negativamente, enquanto os teores de fenólicos totais e ácido elágico livre não eram afetados. Embora tenham ocorrido diferenças nos teores de antocianinas entre as cultivares, não houve diferença na capacidade antioxidante, a qual diminuiu após a colheita, independentemente da temperatura de armazenamento.

Na **Tabela 5** estão apresentados os teores de ácido elágico livre, obtidos por CLAE, para as diferentes cultivares de morango. Observou-se que os teores variaram consideravelmente entre as cultivares, tendo a cultivar Dover apresentado o maior teor (2,6 mg/100 g b.u.) e a Piedade o menor (0,61 mg/100 g b.u.).

**Tabela 5.** Teor de ácido elágico livre (mg/100 g amostra b.u.) das diferentes cultivares de morango.

<b>Cultivar</b>	<b>mg/100 g amostra (b.u.)</b>
<b>Piedade</b>	0,61 ± 0,05 <sup>a</sup>
<b>Oso grande</b>	2,22 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b>Sweet Charlie</b>	0,75 ± 0,02 <sup>c</sup>
<b>Camp Dover</b>	1,3 ± 0,1 <sup>d</sup>
<b>Dover</b>	2,60 ± 0,05 <sup>e</sup>
<b>Camarosa</b>	2,2 ± 0,1 <sup>b</sup>
<b>Toyonoka doce</b>	1,05 ± 0,04 <sup>f</sup>

Resultados expressos como média ± desvio-padrão

Sabe-se que o ácido elágico está naturalmente presente nas plantas juntamente com os elagitaninos ou é formado durante o processamento dos alimentos. A proporção varia muito podendo exceder 50% dos teores de ácido elágico total em algumas amostras, dependendo das condições de armazenamento e processamento (CLIFFORD; SCALBERT, 2000). Portanto, a presença de ácido elágico livre parece ser resultante de degradação dos elagitaninos durante o processo de preparo da amostra e extração. Este fato é de extrema importância dada a insolubilidade em água do composto livre, o que deve ser levado em conta na sua extração e quantificação. Além disso, por conta das diferentes propriedades físico-químicas, diferenças em sua atividade biológica também são esperadas.

## **4.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDO ELÁGICO TOTAL**

### **4.2.1. TESTE DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE**

A quantificação do teor total de ácido elágico se baseia no fato de quando os elagitaninos são submetidos à hidrólise eles originam o ácido elágico livre, o qual é geralmente quantificado por CLAE. Diversos métodos já foram propostos visando essa quantificação (BUSHMAN *et al.*, 2004; DANIEL *et al.*, 1989; HÄKKINEN *et al.*, 2000; LEE; TALCOTT, 2004; MAAS *et al.*, 2001; WILSON; HAGERMANN, 1990), porém estes diferem muito entre si principalmente no que se refere ao tipo de ácido e concentração utilizados, assim como tempo e temperatura da reação de hidrólise. Portanto, existe uma necessidade de otimização das condições de hidrólise e conseqüentemente determinação do teor total de ácido elágico já que existe um crescente interesse nesses compostos devido aos seus possíveis efeitos benéficos.

Primeiramente, foram testadas as diversas condições de hidrólise descritas na literatura para a determinação de ácido elágico total (**Tabela 6**). Os resultados obtidos em cada condição testada também estão apresentados na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Condições de hidrólise e teor de ácido elágico total (mg/100 g amostra b.u.)\* de morangos cv. Dover.

Condições de hidrólise	Ácido elágico mg/100 g amostra (b.u.)
TFA 2N / 120 °C / 90 min (Carpita, 1983)	34 ± 1 <sup>a</sup>
HCl 2N / 95 °C / 1 hora (Lee e Talcott, 2004)	23,5 ± 0.4 <sup>b</sup>
TFA 2N metanólico /100°C / 2 horas (Bushman <i>et al.</i> , 2004)	5,5 ± 0.5 <sup>c</sup>
HCl 2N / 100 °C / 10 horas (Wilson e Hagermann, 1990)	27 ± 2 <sup>d</sup>
TFA (0.1mL/10mL amostra) / 100 °C / 1 hora (Maas <i>et al.</i> , 2001)**	6,1 ± 0.5 <sup>c</sup>
TFA 2N / 100 °C / 2 horas (Daniel <i>et al.</i> , 1989)**	8,0 ± 0.2 <sup>e</sup>
HCl 1,2M / 85 °C / 20 horas (Häkkinen <i>et al.</i> , 2000)**	28 ± 2 <sup>d</sup>

\*Extratos obtidos em metanol 70%      \*\*Hidrólise sob refluxo

Observou-se pelos resultados apresentados na **Tabela 6** que as condições de hidrólise propostas por Bushman *et al.* (2004), Maas *et al.* (2001) e Daniel *et al.* (1989) foram as que resultaram nos menores teores de ácido elágico total. A condição proposta por Häkkinen *et al.* (2000), com um tempo de hidrólise de 20 horas, resultou em um alto teor de ácido elágico total, semelhante ao encontrado utilizando-se o método proposto por Wilson e Hagermann (1990). Porém, esses resultados ainda foram menores do que os obtidos utilizando-se as condições de hidrólise segundo Carpita (1983).

Portanto, pode-se concluir que as melhores condições de hidrólise para a quantificação dos teores totais de ácido elágico são através de hidrólise durante 90 minutos a 120 °C utilizando-se TFA (ácido trifluoracético) 2N.

#### 4.2.2. TESTE DE SOLVENTE PARA EXTRAÇÃO

Objetivando a otimização do método de determinação de ácido elágico total foram também efetuados testes para a escolha do solvente utilizado na extração das amostras. Isso foi feito porque nos diferentes métodos propostos na literatura os solventes utilizados variavam, inclusive para as mesmas amostras. Após a obtenção dos diferentes extratos, os mesmos foram submetidos à hidrólise nas condições previamente determinadas como ideais.

Na **Tabela 7** estão apresentados os resultados para o teor de ácido elágico total nos diferentes extratos obtidos.

**Tabela 7.** Teor de ácido elágico total (mg/100 g amostra b.u.) nos diferentes extratos obtidos a partir de morangos cv. Dover.

<b>Solvente</b>	<b>Ácido elágico mg/100 g (b.u.)</b>
<b>Metanol puro</b>	19,32 ± 0,04 <sup>a</sup>
<b>Metanol 70%</b>	34,64 ± 1,03 <sup>b</sup>
<b>Metanol 80%</b>	36,95 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>Acetona 80%</b>	48,34 ± 0,10 <sup>c</sup>

\* condições de hidrólise: TFA 2N, 120 °C, 90 min

Observou-se que os extratos obtidos com metanol puro apresentaram os menores teores de ácido elágico total (19,32 mg/100 g b.u.) enquanto que os extratos obtidos com acetona 80% apresentaram os maiores teores (48,34 mg/100 g b.u.). Esses resultados demonstraram que para uma quantificação adequada dos teores de ácido elágico total, os extratos devem ser obtidos utilizando-se como solvente acetona aquosa a 80%.

Entre as condições de hidrólise encontradas na literatura, aquela utilizando TFA 2N por 90 minutos a 120 °C se mostrou a melhor para a determinação de ácido elágico total. Desta forma, condições similares foram testadas nos extratos obtidos em acetona 80%, para verificar se seria possível diminuir o tempo e/ou a temperatura e substituir o ácido

trifluoroacético por ácido clorídrico. Na **Tabela 8** estão apresentados os resultados obtidos para as diversas condições de hidrólise testadas.

**Tabela 8.** Condições de hidrólise e teores de ácido elágico total (mg/100 g de amostra base úmida b.u.)\*.

Condições de hidrólise	Ácido elágico mg/100g (b.u.)
HCl 2N / 120° C / 90 min	34,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
TFA 2N / 100° C / 90 min	29,4 ± 0,4 <sup>b</sup>
TFA 2N / 100° C / 120 min	24,9 ± 0,3 <sup>c</sup>
TFA 2N / 120° C / 60 min	49,0 ± 0,5 <sup>d</sup>
TFA 2N / 120° C / 120 min	50 ± 1 <sup>d</sup>
TFA 2N / 120° C / 90 min	49 ± 1 <sup>d</sup>

\*cv. Dover em extrato acetona 80%

Observou-se pelos resultados apresentados que dentre as condições testadas, a utilizando HCl resultou no menor teor total de ácido elágico enquanto que a condição utilizando TFA se mostrou mais eficiente na quebra dos polímeros. Além disso, dentre as condições de hidrólise utilizando TFA 2N aquelas a 100 °C resultaram nos menores teores totais de ácido elágico enquanto que as condições a 120 °C por 60, 90 ou 120 minutos não apresentaram diferenças significativas nos teores. Portanto, concluiu-se que a melhor condição para a determinação dos teores totais de ácido elágico em morangos é a que utiliza TFA 2N a 120 °C, e que o tempo de 60 minutos já é suficiente para a hidrólise total.

### **4.2.3. TESTE DE RECUPERAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO**

Testes de recuperação do ácido elágico também foram realizados para que se pudessem avaliar possíveis perdas do composto durante a hidrólise. Para tanto, quantidades conhecidas de padrão de ácido elágico foram adicionadas à amostra a ser hidrolisada. Observou-se que a recuperação do ácido elágico durante a hidrólise foi em torno de 100% para a triplicata. Concluiu-se que o método otimizado apresenta uma ótima recuperação do composto analisado, além de ser o que resultou nos maiores teores.

No método de hidrólise proposto por Häkkinen *et al.* (2000) a recuperação de ácido elágico também foi analisada, sendo de 80% para o morango e de 85% para geléias de morango. Os autores consideraram a recuperação ótima já que segundo Mangels *et al.* (1993) a recuperação de um composto acima de 80% seria aceitável, considerando-se a baixa solubilidade desses compostos.

### 4.3. QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO ELÁGICO TOTAL

Conforme anteriormente descrito, após a realização dos testes de otimização das condições de hidrólise e do solvente a ser utilizado na extração das amostras, concluiu-se que as melhores condições para a quantificação dos teores totais de ácido elágico são: extração da amostra com acetona 80% e hidrólise por 60 minutos a 120 °C utilizando-se TFA 2N.

Na **Tabela 9** estão apresentados os teores de ácido elágico total das diferentes cultivares de morango utilizando-se as condições otimizadas.

**Tabela 9.** Teores de ácido elágico total (mg/100 g b.u.) de diferentes cultivares de morango.

Cultivar	mg/100 g (b.u.)
<b>Piedade</b>	19 ± 1 <sup>a</sup>
<b>Oso grande</b>	28 ± 2 <sup>b</sup>
<b>Sweet Charlie</b>	24,7 ± 0,5 <sup>c</sup>
<b>Camp Dover</b>	32 ± 1 <sup>b</sup>
<b>Dover</b>	47 ± 1 <sup>d</sup>
<b>Camarosa</b>	42 ± 1 <sup>e</sup>
<b>Toyonoka doce</b>	17 ± 2 <sup>a</sup>

Resultados expressos como média ± desvio-padrão

Observou-se que a cultivar Dover foi a que apresentou o maior teor de ácido elágico total (47 mg/100 g b.u.) enquanto que as cultivares Toyonoka doce e Piedade foram as que apresentaram os menores valores (17 e 19 mg/100 g b.u., respectivamente). Esses dados estão de acordo com os obtidos para os teores de ácido elágico livre (**Tabela 5**). Portanto, verificou-se pelos resultados apresentados que as cultivares que apresentaram os maiores teores de ácido elágico livre também foram as que apresentaram os maiores teores totais, indicando que realmente a maior parte desses derivados de ácido elágico se encontra na forma de elagitaninos.

## **4.4. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS ELAGITANINOS DO MORANGO**

### **4.4.1. PURIFICACAO DOS ELAGITANINOS**

Após a otimização das condições de hidrólise para a quantificação dos teores totais de ácido elágico foram realizados diversos testes visando à purificação dos elagitaninos presentes no morango. Inicialmente foram utilizados extratos obtidos em metanol 70% da cultivar Dover, já que esta cultivar apresentou o maior teor total de ácido elágico. A seguir, extratos obtidos em acetona 80% foram utilizados, para tentar aumentar o rendimento. Foram efetuadas análises antes e após hidrólise ácida, de acordo com as condições previamente otimizadas.

Primeiramente foi testada a resina de poliamida (PA) já que é amplamente utilizada na purificação de flavonóides assim como de ácido elágico livre. Para tanto, a resina foi pré-condicionada e alíquotas do extrato foram aplicadas, após isso foi realizada a tentativa de eluição dos elagitaninos com diferentes solventes e condições.

A **Tabela 10** apresenta os resultados obtidos para os diversos testes realizados com a resina de PA, tanto antes como após a hidrólise.

**Tabela 10.** Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados nos diferentes eluatos após extração em fase sólida utilizando-se resina de poliamida (PA).

Testes	Solventes	mg/100 g (b.u.)	
		Ácido elágico livre	Ácido elágico total
1	Água	n.d.	n.d.
	Metanol puro	0,60	2,82
	Metanol: NH <sub>3</sub> (99,5:0,5)	0,57	2,13
2	Água		
	Metanol puro		
	Metanol: NH <sub>3</sub> (99,5:0,5)		
	Metanol/HCl 0,1%	0,73	2,99
3	Água		
	Metanol 100%		
	Metanol/HCl 3%	0,65	2,52
4	Água		
	Metanol puro		
	Metanol: NH <sub>3</sub> (99,5:0,5)		
	Metanol:NH <sub>3</sub> (95:5)	1,23	3,40
5	Acetona:NH <sub>3</sub> (95:5)	n.d.	n.d.
	Água		
	Metanol puro		
6	Acetona 80%	n.d.	n.d.
	Água		
	Metanol puro		
7	Dimetilformamida pura	1,04	8,00
	Água		
	Metanol puro		
8	Metanol/HCl 10%	n.d.	1,37
	Água		
	Metanol puro		
9	Metanol: NH <sub>3</sub> (99,5:0,5)		
	Dimetilformamida pura	3,44	16,02
	Água		
10	Metanol puro		
	Metanol: NH <sub>3</sub> (99,5:0,5)		
	Água:NH <sub>3</sub> 5%	0,44	0,82
	Água		
10	Metanol puro		
	Metanol:NH <sub>3</sub> (90:10)	1,82	2,18
	Dimetilformamida pura	n.d.	0,23
	Acetato de etila pura	n.d.	0,02

Continuação da **Tabela 10**

	Água	n.d.	n.d.
11 *	Metanol puro	0,45	3,82
	Metanol/HCl 3%	0,52	1,54
12 **	Água	n.d.	11,79
	Metanol puro	0,11	0,51
	Metanol: NH <sub>3</sub> (99,5:0,5)	0,05	n.d.
13***	Água	0,60	2,57
	Metanol puro	1,46	5,92
	Metanol: NH <sub>3</sub> (99,5:0,5)	0,02	0,03
	Água		
	Metanol puro		
14	Acetonitrila pura	n.d.	0,04
	Dimetilformamida 80%	n.d.	4,16
	Dimetilformamida pura	0,01	0,05

Nos testes 1, 2, 4, 8 e 9 as eluições foram realizadas de forma seqüencial e nos testes 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13 e 14 primeiramente foi realizada eluição com metanol puro e após o solvente a ser testado. \* resina foi pré-condicionada com água pH 2 \*\* extrato em pH 9 \*\*\* extrato em pH 11 n.d. – não detectado

No teste 1 foi realizada a eluição de forma semelhante à empregada na purificação dos flavonóides (vide “*Materiais e Métodos*” item 3.2.1.1.). Observou-se que pequena quantidade dos elagitaninos foi co-eluída com os flavonóides e que apesar desses compostos serem hidrossolúveis eles não se encontravam na fração aquosa. Nos testes de 2 a 7 essa eluição seqüencial foi mantida com o acréscimo de diferentes solventes na seqüência. Pode-se observar que a acidez ou alcalinidade dos solventes não favoreceu a eluição desses compostos.

Nos testes em que a eluição foi realizada com dimetilformamida os teores de ácido elágico total (após hidrólise ácida) foram os maiores. Porém, observou-se que além da eluição dos elagitaninos também houve a eluição dos flavonóides, não havendo, portanto completa separação dos compostos.

De acordo com Claeson *et al.* (1998), um método eficiente para remoção dos taninos de soluções é através da passagem em uma coluna de poliamida, já que as fortes ligações de hidrogênio formadas entre esses compostos e os grupamentos amida são praticamente irreversíveis. Loomis e Battaile (1966) relataram que a diminuição do pH de 7,5 para 3,0 aumentaria em aproximadamente 10 vezes a capacidade de ligação dos taninos

hidrolisáveis à resina, demonstrando uma forte dependência do pH. Para tanto, no teste 11, a resina foi pré-condicionada com água em pH 2 e os resultados obtidos demonstraram que existe uma forte influência do pH na interação dos elagitaninos com a resina. Já no teste 12 o extrato aplicado à resina foi previamente alcalinizado até pH 9 e os resultados indicaram que a interação elagitaninos-poliâmida se torna mais fraca e em água uma grande quantidade dos elagitaninos foi eluída, porém novamente os flavonóides foram co-eluídos. No teste 13 o extrato foi alcalinizado até pH 11 porém não houve aumento do teor total de ácido elágico nas frações coletadas. No teste 14 a eluição seqüencial com acetonitrila e dimetilformamida também não resultou em aumento dos teores recuperados.

Liu *et al.* (2002) também relataram que a passagem pela resina de poliâmida é muito eficiente para a remoção dos taninos presentes na amostra porém os autores sugeriram que a eluição com amônia 5% seria eficiente para a recuperação desses compostos da resina, o que não foi observado neste estudo (vide teste 9).

Portanto, os resultados demonstraram que a purificação dos elagitaninos através da resina de PA não é adequada já que há uma ligação irreversível dos elagitaninos.

A resina de C18 também foi testada para a purificação dos elagitaninos. Esta resina é mais apolar que a resina de PA, interagindo com os compostos orgânicos através de interações hidrofóbicas. Os resultados obtidos nos diversos testes estão apresentados na **Tabela 11**.

**Tabela 11.** Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados nos diferentes eluatos após extração em fase sólida utilizando-se a resina de C18.

Testes *	Solventes	mg/100 g (b.u.)	
		Ácido elágico livre	Ácido elágico total
1	Água	n.d.	n.d.
	Metanol puro	2,35	29,43
	Metanol : NH <sub>3</sub> (99,5:0,5)	n.d.	n.d.
2	Água	n.d.	1,82
	Acetona pura	2,01	28,24
	Acetona 50%	n.d.	0,20
	Metanol puro	n.d.	0,06
3	Metanol 5%	n.d.	10,24
	Metanol 25%	n.d.	21,10
	Metanol 50%	2,30	7,64
	Metanol puro	0,03	0,35
	Metanol 50%	0,03	0,35
4	Metanol 2,5%	0,31	6,56
	Metanol 5%	0,45	5,79
	Metanol 7,5%	n.d.	2,94
	Metanol 10%	n.d.	2,03
	Metanol 12,5%	n.d.	2,41
	Metanol 15%	1,24	3,32
	Metanol 17,5%	0,98	3,28
	Metanol 20%	0,52	3,94
	Metanol 25%	0,82	3,36
	Metanol 50%	0,04	2,39
5	Acetona 5%	0,30	3,47
	Acetona 25%	0,96	9,82
	Acetona 50%	0,31	8,18
	Acetona pura	n.d.	0,10

\* todas as eluições nos diferentes testes foram realizadas de forma sequencial

n.d. não detectado

Podemos observar pelos resultados apresentados que a resina de C18 não interagiu tão fortemente com os elagitaninos quanto a resina de poliamida, provavelmente porque a resina de C18 é mais apolar que a resina de PA.

No primeiro teste foi realizada a mesma eluição seqüencial que para a resina de poliamida e verificou-se que os elagitaninos foram, na sua maioria, eluídos com metanol 100%, porém os flavonóides também o foram, não havendo, portanto, separação. Os testes seguintes foram realizados utilizando-se gradientes de concentração tanto de metanol quanto de acetona visando à separação dos elagitaninos dos flavonóides. No teste 3, por exemplo, observamos que nas frações metanol 5% e 25% foram obtidos altos valores de ácido elágico total, respectivamente 10 e 21 mg/100 g b.u., porém observou-se que apenas na fração metanol 5% somente elagitaninos foram eluídos.

Porém como os resultados indicavam que o cultivar Dover apresentava um teor total de ácido elágico de aproximadamente 40 mg/100 g b.u., outras resinas também foram testadas visando um aumento na quantidade dos elagitaninos purificados. Para tanto, foi utilizada a resina Amberlite XAD-2 que apresenta como característica principal a natureza hidrofóbica. Os resultados obtidos para a resina Amberlite XAD-2 estão apresentados na **Tabela 12**.

**Tabela 12.** Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados nos diferentes eluatos após extração em fase sólida utilizando-se a resina de Amberlite XAD2.

Solvente *	mg/100 g (b.u.)	
	Ácido elágico livre	Ácido elágico total
Água	1,27	10,24
Etanol puro	0,44	0,75

\* eluição foi realizada de forma seqüencial

Observou-se pelos resultados obtidos que devido à natureza hidrofóbica da resina Amberlite XAD2 os elagitaninos não apresentaram afinidade por esta resina sendo principalmente eluídos em água, aproximadamente 10 mg/100 g (b.u.). Porém os

flavonóides, principalmente as antocianinas, também foram co-eluídas.

Também foi testada a resina de polivinilpirrolidona (PVPP). Esta resina interage com os compostos por adsorção sendo que os grupos amida da resina de PVPP formam pontes de hidrogênio com os grupamentos hidroxila dos compostos polifenólicos. Na **Tabela 13** estão apresentados os resultados obtidos para a resina de PVPP.

**Tabela 13.** Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados nos diferentes eluatos após extração em fase sólida utilizando-se a resina de polivinilpirrolidona (PVPP).

Solventes *	mg/100 g (b.u.)	
	Ácido elágico livre	Ácido elágico total
Metanol 100%	n.d.	n.d.
Metanol 50%	n.d.	0,14
Acetona 50%	0,15	0,11
Acetona 80%	0,13	0,25

\* eluição foi realizada de forma seqüencial n.d. – não detectado

Os resultados obtidos demonstraram que os elagitaninos não são facilmente eluídos desta resina, o que está de acordo com a literatura já que tanto a resina de PVPP quanto a de PA interagem fortemente com os elagitaninos, inclusive alguns trabalhos citam que a interação desses compostos com essas resinas é irreversível (COLLINS *et al.*, 1998, MAKKAR *et al.*, 1993).

Diversos autores utilizam a resina de Sephadex LH-20 para a purificação dos elagitaninos, por exemplo, da romã (*Punica granatum*) (EL-TOUMY, RAUWALD, 2002, SEERAM *et al.*, 2004). Esta resina apresenta uma matriz de hidroxipropileno tendo tanto características hidrofílicas quanto lipofílicas, e a separação dos compostos se dá por peso molecular. Na **Tabela 14** estão apresentados os resultados obtidos para a resina de Sephadex LH-20.

**Tabela 14.** Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados nos diferentes eluatos após extração em fase sólida utilizando-se a resina de Sephadex LH-20.

Solventes*	mg/100 g (b.u.)	
	Ácido elágico livre	Ácido elágico total
Etanol 80%	0,09	4,59
Acetona 70%	1,70	24,65
Acetona 50%	n.d.	3,39
Metanol 70% acidificado	n.d.	0,14
Etanol 80%	1,91	4,16
Etanol puro	0,08	0,63
Acetona 70%	n.d.	22,50
Etanol 80%		
Etanol puro		
Acetona 70% **	n.d.	11,70

\* eluição foi realizada de forma seqüencial      \*\*mesmo procedimento do teste anterior com análise somente da fração acetona 70%      n.d. não detectado

Os resultados mostraram que a separação dos compostos presentes no morango por Sephadex-LH20 não foi eficiente. Apesar da eluição com acetona 70% apresentar os maiores teores de ácido elágico total, não houve total separação dos elagitaninos dos flavonóides presentes. Além disso, observou-se que os valores obtidos com esta resina não são reprodutíveis.

Ainda visando aumentar o teor de elagitaninos purificados, a resina de celulose microcristalina foi testada. Essa resina foi previamente hidratada com o extrato em acetona 80% após o qual efetuou-se a eluição seqüencial. Sabe-se que os grupamentos hidroxila da

celulose têm forte afinidade por solventes polares como, por exemplo, água. Na **Tabela 15** estão apresentados os valores obtidos para a resina de celulose microcristalina.

**Tabela 15.** Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados nos diferentes eluatos após extração em fase sólida utilizando-se a resina de celulose microcristalina.

Solventes *	mg/100 g (b.u.)	
	Ácido elágico livre	Ácido elágico total
Água	n.d.	24,87
Metanol puro	2,20	5,32
Metanol : NH <sub>3</sub> (99,5:0,5)	0,03	0,12
* eluição foi realizada de forma sequencial		n.d. não detectado

Podemos observar pelos resultados apresentados que os elagitaninos não apresentam alta afinidade pela resina de celulose microcristalina, porém os flavonóides também foram co-eluídos.

Sabe-se que uma propriedade muito importante apresentada pelos taninos é a sua capacidade de precipitação com proteínas. Para verificar se essa propriedade poderia ser utilizada na sua purificação adicionou-se albumina de soro bovina (BSA) ao extrato aquoso de morango, após eliminação da acetona, com o objetivo de avaliar se após dissociação do precipitado com SDS 1% seria possível obter os elagitaninos purificados. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 16**.

**Tabela 16.** Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados após precipitação com albumina de soro bovino (BSA).

	mg/100 g (b.u.)
<b>Ácido elágico livre</b>	n.d.
<b>Ácido elágico total</b>	0,61
n.d. não detectado	

Podemos observar pelos resultados obtidos que a quantidade de elagitaninos precipitados com BSA foi muito baixa utilizando-se o método proposto por Hagerman e Butler (1978). Isso pode ser explicado pelo fato de os elagitaninos apresentarem uma baixa afinidade pelas proteínas quando comparados com os galotanimos (polímeros de ácido gálico). McManus *et al.* (1985) constataram que a afinidade da Telimagrandina (elagitanino) por BSA era muito menor quando comparada com pentagaloilglucose (galotanimino).

Outro método de precipitação dos taninos citado na literatura é o proposto por Reed *et al.* (1985) que se baseia na capacidade do itérbio trivalente precipitar polifenóis presentes em extratos de plantas. Na **Tabela 17** estão apresentados os resultados obtidos por este método.

**Tabela 17.** Teores de ácido elágico livre e total (mg/100 g amostra b.u.) recuperados após precipitação com acetato de itérbio (AcYb).

	mg/100 g (b.u.)
<b>Ácido elágico livre</b>	n.d.
<b>Ácido elágico total</b>	13,52
n.d. não detectado	

Os resultados obtidos através da precipitação com acetato de itérbio demonstraram que os teores são praticamente similares aos obtidos através da utilização da resina de C18 (eluição com metanol 5%). Além disso, pode-se observar que após sucessivas lavagens do precipitado com acetona este se encontrava livre de outros compostos polifenólicos.

Portanto, dentre todos os testes realizados visando à purificação dos elagitaninos presentes no morango, as melhores metodologias foram as utilizando a resina de C18 com posterior eluição com metanol 5% e a precipitação dos compostos com acetato de itérbio, que separam completamente os compostos dos demais polifenóis presentes no morango, apesar de apresentarem um baixo rendimento (25%). Porém uma das desvantagens muito citadas dos métodos de precipitação é a baixa reprodutibilidade dos resultados, o que parece não ocorrer com a resina de C18.

#### 4.4.2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS ELAGITANINOS

Muitos estudos já descreveram os compostos fenólicos presentes em morangos baseados em métodos espectrofotométricos (MEYERS *et al.*, 2003) ou CLAE com detecção por DAD (GIL *et al.*, 1997, KOSAR *et al.*, 2004, WANG; ZHENG, 2001). Contudo, sabe-se que a detecção por ultravioleta tem suas limitações já que se baseia principalmente na comparação dos espectros de absorção dos compostos e os respectivos tempos de retenção. Por outro lado, o uso de CLAE associada à espectrometria de massas fornece informações estruturais muito importantes, principalmente quando os padrões dos compostos a serem analisados não estão disponíveis, como no caso dos elagitaninos do morango.

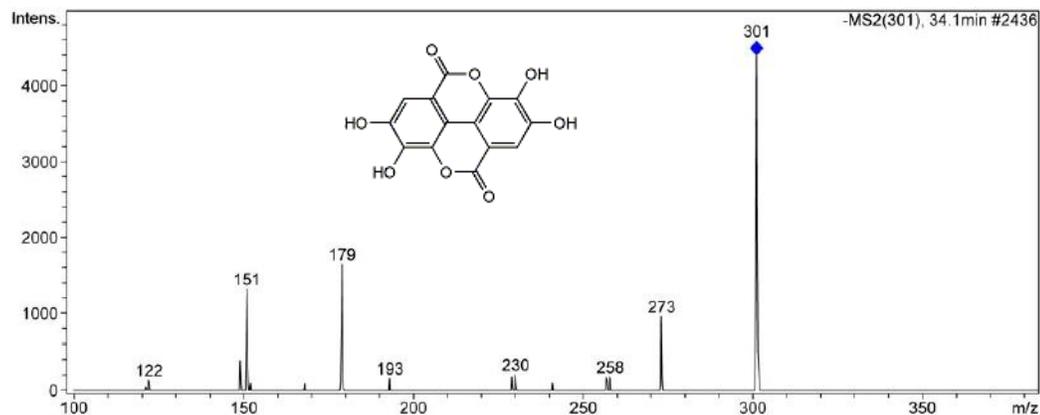
Para tanto, um extrato de morango em acetona 80% foi preparado e aplicado em equipamento de cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massas. A **Tabela 18** apresenta os picos identificados como elagitaninos e derivados de ácido elágico no extrato de morango.

**Tabela 18.** Identificação dos derivados de ácido elágico e elagitaninos do morango através de Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

Tempo de retenção (min)	Massa molecular	Massa		
		MS	MS/MS	Composto
3,0	784	783	481, 301, 257, 229	Pedunculagina
6,5	784	783	481, 301, 257, 229	Pedunculagina
9,5	784	783	481, 301, 257, 229	Pedunculagina
26,4 – 27,3	936	935	898, 633, 463, 301, 257, 229	HHDP-galoil-glucosídeo
32,1 – 33,1	1870	1869	1567, 1265, 935, 633, 301, 257, 229	Sanguina H-6
34,1	302	301	257, 229	Ácido elágico

Podemos observar que no extrato de morango em acetona 80% a maior parte dos picos identificados foi de elagitaninos, além de um pico identificado como ácido elágico livre. Os espectros de massas desses compostos estão apresentados a seguir (**Figuras 5 -**

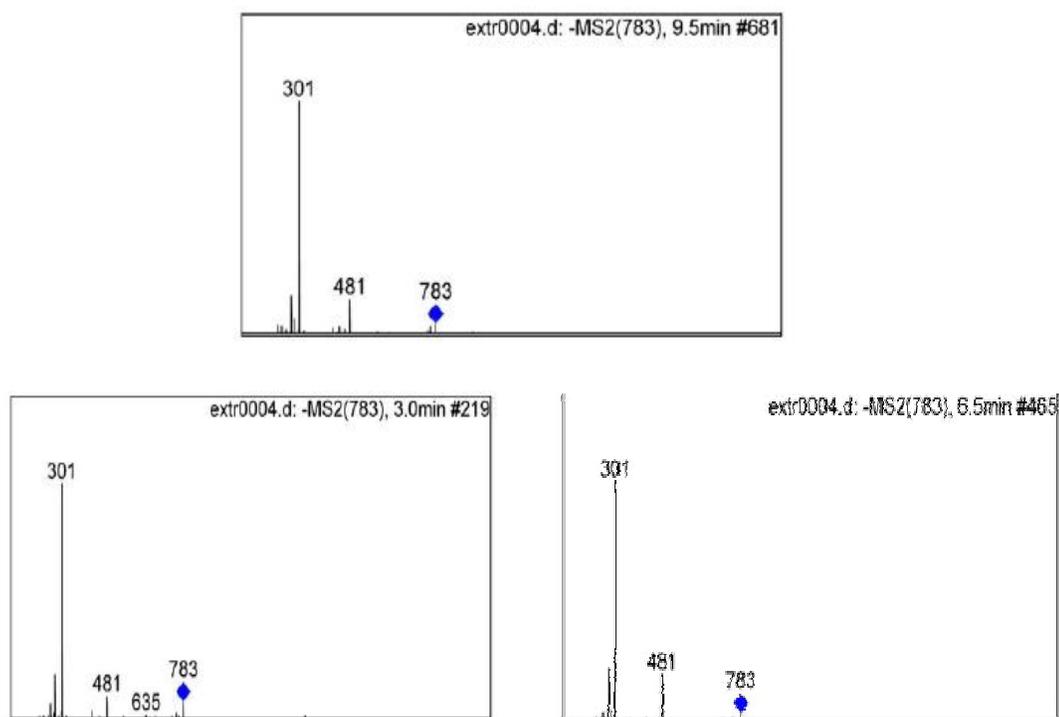
8).



**Figura 5.** Espectro de massas do pico identificado como ácido elágico livre no extrato de morango, demonstrando  $m/z$  301 (modo negativo).

Os elagitaninos apresentam como unidade básica o ácido elágico (Massa molecular = 302) (**Figura 5**), o qual é formado a partir da hidrólise dos polímeros para liberação dos grupos HHDP (ácido hexahidroxidifênico) que rapidamente sofrem lactonização.

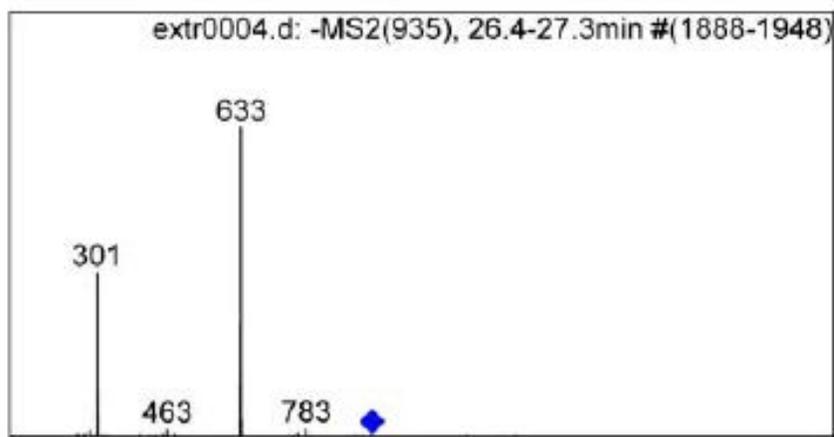
Os elagitaninos estão presentes em quantidades abundantes em frutos como framboesas, amora-preta e morango e, após hidrólise, são detectados e quantificados como ácido elágico (AMAKURA *et al.*, 2000). Na **Figura 6** estão apresentados os espectros de massas de três picos identificados como pedunculagina.



**Figura 6.** Espectros de massas dos picos identificados como pedunculagina no morango, demonstrando  $m/z$  783 (modo negativo).

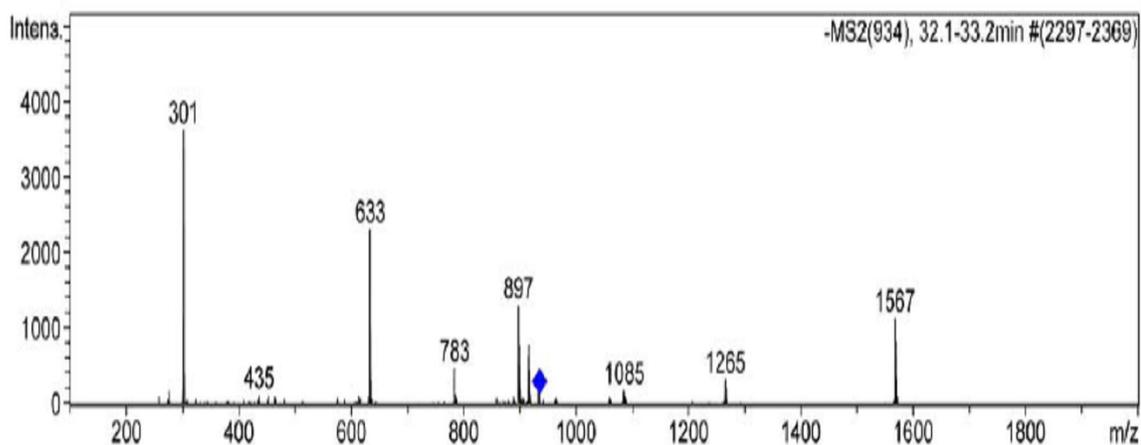
Mullen *et al.* (2003) analisaram extratos de framboesa para a identificação de derivados de ácido elágico porém não encontraram nenhum pico correspondendo à massa molecular de 783. Lee *et al.* (2005) e Ito *et al.* (2007) identificaram os conjugados de ácido elágico em uvas muscadine e nozes, respectivamente, e nenhum pico foi identificado com essa massa. No entanto, Hager *et al.* (2008) e Hassimoto *et al.* (submetido) identificaram esses mesmos picos em amora-preta como sendo isômeros de pedunculagina. Esses compostos já foram identificados por Seeram *et al.* (2006b) em extratos de morango.

Na **Figura 7** está apresentado o espectro de massas do pico identificado como HHDP – galoiil – glucosídeo (Massa molecular= 935).



**Figura 7.** Espectro de massas do pico identificado como ácido hexahidroxiidifênico (HHDP) - galoil- glucosídeo no morango, demonstrando  $m/z$  935 (modo negativo).

O pico identificado como HHDP – galoil- glucosídeo já havia sido identificado por Seeram *et al.* (2006b) em morangos e Maatta-Riihinen *et al.* (2004) em frutas dos gêneros *Rubus* e *Fragaria*. Sabe-se que esta molécula é a unidade básica de muitos elagitaninos como, por exemplo, Sanguina H-6 que contém duas unidades. Na **Figura 8** está apresentado o espectro de massas do elagitanino Sanguina H-6.



**Figura 8.** Espectro de massas do pico identificado como Sanguina H-6 no extrato de morango, demonstrando  $m/z$  1870 (modo negativo).

O elagitanino Sanguina H-6 está presente em grandes quantidades tanto em morangos como em framboesas. Quantidades significativas de elagitaninos (sanguina H-6 e lambertianina C) em framboesas foram detectadas, além de quantidades traço de ácido elágico livre e seus derivados (MULLEN *et al.*, 2002a).

Além da caracterização estrutural dos compostos presentes no extrato em acetona 80% do morango, foi realizada a análise por CLAE associada à espectrometria de massas dos elagitaninos purificados através da resina de C18 com posterior eluição com metanol 5% e através da precipitação com acetato de itérbio (**Tabela 19**).

**Tabela 19.** Análise das frações de elagitaninos purificadas através da eluição da resina de C18 com metanol 5% e pela precipitação com acetato de itérbio.

Composto	Massa molecular	Fração	
		C18	Acetato de itérbio
Pedunculagina	784	+	+
Pedunculagina	784	+	+
Pedunculagina	784	+	+
HHDP-galoil-glicosídeo	936	+	+
Sanguiina H-6	1870	-	+
Ácido elágico	302	+	+

(+) presença do composto, (-) ausência

Pode-se observar pelos resultados apresentados na **Tabela 19** que dos elagitaninos originalmente presentes no extrato em acetona 80%, a eluição da resina de C18 com metanol 5% resultou na perda do elagitanino Sanguiina H-6. A precipitação com acetato de itérbio foi a mais eficiente já que todos os elagitaninos originalmente presentes no extrato em acetona 80% foram encontrados nessa fração.

Para tanto, a precipitação dos elagitaninos com acetato de itérbio foi utilizada para a purificação dos elagitaninos a serem administrados a ratos para o estudo da biodisponibilidade assim como para a avaliação através de modelos *in vitro* da atividade antiproliferativa e atividades inibitórias das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, relevantes para diabetes tipo 2.

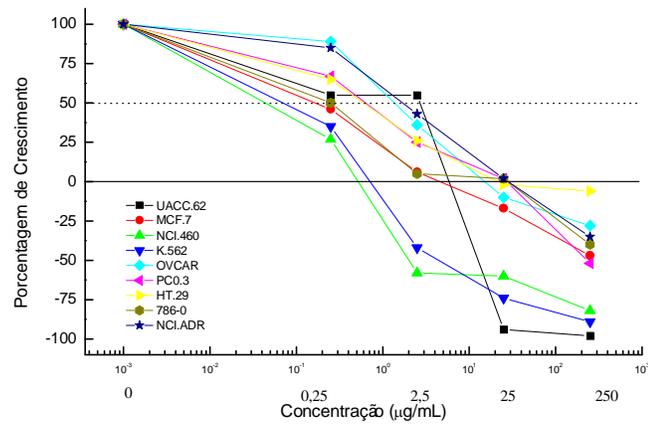
## 4.5. ESTUDO *IN VITRO* DAS ATIVIDADES ANTIPROLIFERATIVA, ANTI-DIABETES TIPO 2 E ANTI-HIPERTENSÃO DOS ELAGITANINOS DO MORANGO

### 4.5.1. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Muitos estudos têm demonstrado que extratos de morangos e framboesas apresentam efeito inibitório *in vitro* na proliferação de células cancerosas (YOSHIZAWA *et al.*, 2000, LIU *et al.*, 2002, MEYERS *et al.*, 2003, KATSUBE *et al.*, 2003, OLSSON *et al.*, 2004, HAN *et al.*, 2005, SCHIMDT *et al.*, 2005). De maneira geral, esses frutos são considerados boas fontes de flavonóides e compostos fenólicos. Além disso, muitos estudos têm relatado os efeitos benéficos do consumo desses frutos em diversos tipos de câncer (JURANIC; ZIZAK 2005, SEERAM, 2008a), doenças neurodegenerativas (SHUKITT-HALE; LAU; JOSEPH, 2008) e síndrome metabólica (TSUDA, 2008). Esses efeitos benéficos tem sido geralmente atribuídos a habilidade de alguns compostos fenólicos em reduzir, ou mesmo reparar os danos causados pelo estresse oxidativo e inflamação.

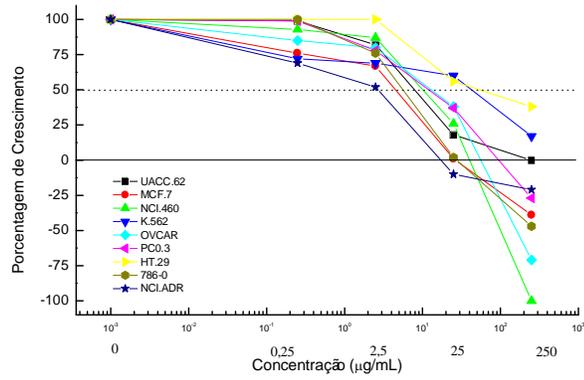
Nesse estudo, foi avaliada a atividade antiproliferativa do ácido elágico livre, dos elagitaninos purificados e do extrato total de morango em diversas linhagens celulares: MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), UACC-62 (melanoma), NCI460 (pulmão), PCO3 (próstata), HT29 (cólon), OVCAR (ovário), K-562 (leucemia mielóide aguda) e 786-0 (rim). Foram consideradas ativas as amostras que produziram inibição de crescimento (atividade citostática) acima de 50% (abaixo da linha tracejada). A atividade citocida (morte celular) corresponde aos valos de inibição abaixo da linha zero.

O quimioterápico doxorrubicina foi utilizado como controle positivo (**Figura 9**).

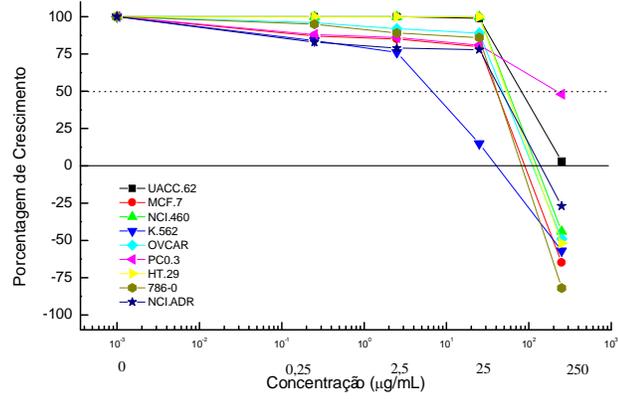


**Figura 9.** Atividade antiproliferativa do quimioterápico doxorrubicina frente a diversas linhagens celulares.

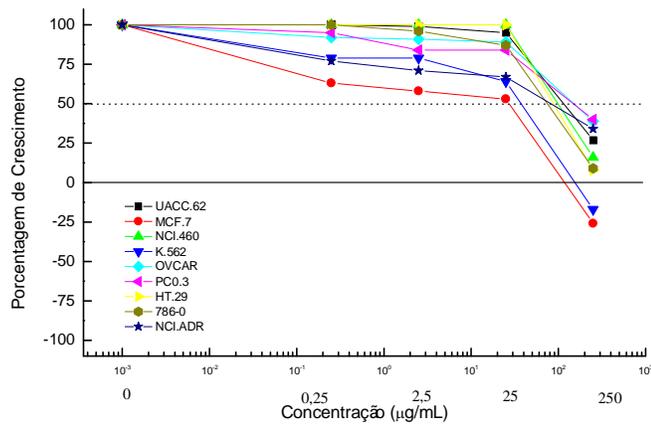
Na **Figura 10** estão apresentados os resultados obtidos da avaliação de atividade antiproliferativa do padrão de ácido elágico (Sigma, EUA), dos elagitaninos purificados e do extrato total de morango, respectivamente.



A



B



C

Figura 10. Atividade antiproliferativa do padrão de ácido elágico (A), dos elagitaninos

purificados (B) e do extrato total de morango (C) frente a diversas linhagens celulares.

Podemos observar que o ácido elágico livre apresentou uma boa relação entre concentração e efeito, com morte celular nas maiores concentrações. Nas linhagens celulares NCI 460 (pulmão) e OVCAR (ovário) foram observadas as maiores porcentagens de inibição da proliferação celular.

Com relação aos elagitaninos purificados a relação dose-dependente praticamente não existiu e efeito significativo foi obtido somente na concentração mais elevada. Na linhagem celular 786-0 (rim) foi observada a maior porcentagem de inibição da proliferação celular. Já o extrato total de morango teve um perfil semelhante ao dos elagitaninos purificados mas com menor potência.

Ross, McDougall e Stewart (2007) avaliaram a atividade antiproliferativa de extratos de framboesa e observaram que a inibição da proliferação celular era devido à presença dos elagitaninos. Além disso, em ensaio realizado com coelhos para avaliar possível efeito de vasodilatação, verificou-se que as frações que continham os elagitaninos eram as que apresentavam maior atividade (MULLEN *et al.*, 2002b).

De acordo com os resultados anteriormente apresentados (vide “4.1. *Caracterização das diferentes cultivares de morango*”) no extrato total de morango os principais compostos fenólicos são as antocianinas e os derivados de ácido elágico. Alguns estudos relatam que embora as antocianinas estejam presentes em maiores concentrações, esses compostos são menos efetivos do que os elagitaninos (ROSS *et al.*, 2007). No entanto, Yi *et al.* (2005) analisaram frações ricas em antocianinas de mirtilo e esses compostos foram relatados como sendo os responsáveis pelo efeito antiproliferativo em linhagens celulares de câncer de cólon.

Malik *et al.* (2005) avaliaram o efeito *in vitro* e *in vivo* do suco de romã na inibição do crescimento de células humanas de carcinoma de próstata. Os autores sugeriram que a romã representa uma boa fonte para o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra câncer de próstata. Sabe-se que dentre os principais compostos presentes na romã, os elagitaninos são considerados os responsáveis pelos efeitos biológicos além da capacidade antioxidante (BEEKWILDER *et al.*, 2005).

Pantuck *et al.* (2006) conduziram o primeiro estudo clínico (fase II) utilizando suco de romã com pacientes diagnosticados com câncer de próstata. Os autores observaram diferenças significativas no crescimento celular e apoptose das células cancerosas.

Mertens-Talcott *et al.* (2006) avaliaram o efeito de frações ricas em ácido elágico,

provenientes de uvas muscadine, na indução de morte celular em carcinoma de cólon. Os autores observaram que todas as frações induziram apoptose (morte celular), diminuição no número de células e causaram alterações dose-dependentes na cinética do ciclo celular. Além disso, as propriedades quimiopreventivas dos extratos apresentaram boa correlação com os teores de ácido elágico.

Estudos com animais têm sugerido que o ácido elágico tem uma limitada biodisponibilidade quando administrado via oral (TEEL, MARTIN, 1988) e a concentração plasmática de ácido elágico em humanos após consumo de suco de romã (SEERAM *et al.*, 2004) ou framboesa preta (STONER *et al.*, 2005) é muito baixa. Apesar de muitos estudos relativos a atividade biológica desses compostos, poucas informações estão disponíveis a respeito da metabolização desses compostos.

De acordo com Shetty e Wahlqvist (2004) cada composto fenólico tem seu modo de ação contra um alvo em particular. Vatterm e Shetty (2006) propuseram um mecanismo para explicar a ação de compostos fenólicos com baixa solubilidade em água como é o caso do ácido elágico. Por esse mecanismo, esses composto fenólicos auxiliariam não somente através da capacidade antioxidante mas também estimulando vias na diminuição dos danos celulares como por exemplo a via das pentoses-fosfato através de receptores de membrana. Segundo esses autores, a estimulação da via das pentoses-fosfato resultaria no aumento de espécies redutoras na forma de NADPH além de outros precursores que juntos levariam a uma eficiente resposta antioxidante enzimática (SHETTY; WAHLQVIST, 2004; SHETTY 2004).

No presente estudo, observou-se que o extrato de morango não apresentou atividade antiproliferativa significativa em nenhuma das linhagens celulares avaliadas, sugerindo ausência de sinergismo dos compostos bioativos nesse fruto.

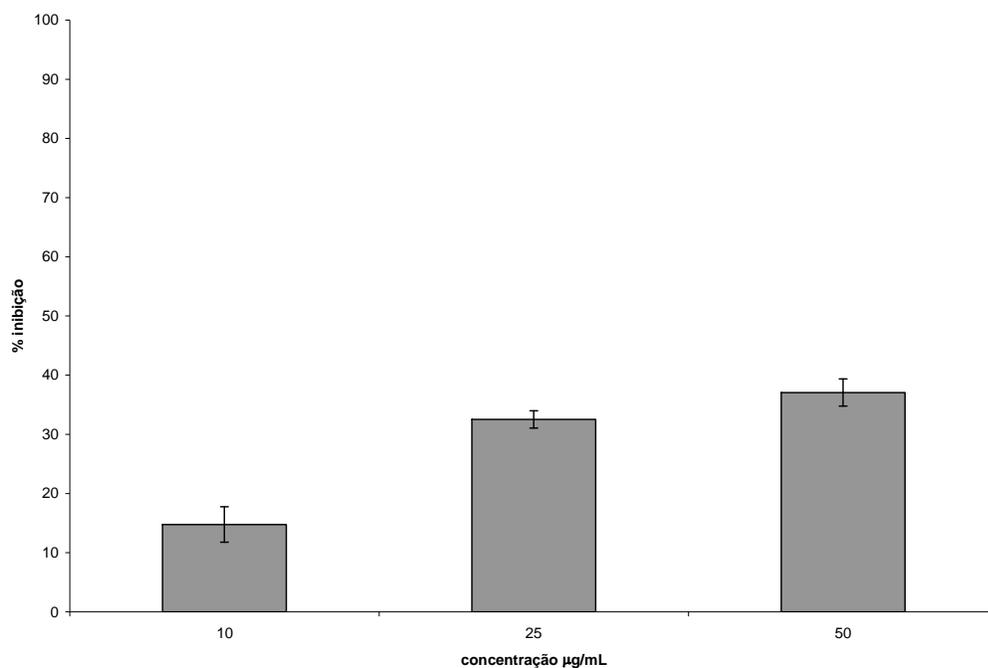
#### 4.5.2. ATIVIDADES ANTI-DIABETES TIPO 2 E ANTI-HIPERTENSÃO

Sabe-se que a ingestão de frutas e hortaliças tem sido relacionada a efeitos benéficos na redução da incidência de doenças crônicas não-transmissíveis tais como diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares. Diversos estudos têm relacionado esses efeitos benéficos com a presença de compostos fenólicos (JOSHIPURA *et al.* 2001, COSTACOU, MAYER-DAVIS 2003, HUNG *et al.* 2004, ESPOSITO *et al.* 2004, NOTHLINGS *et al.* 2008).

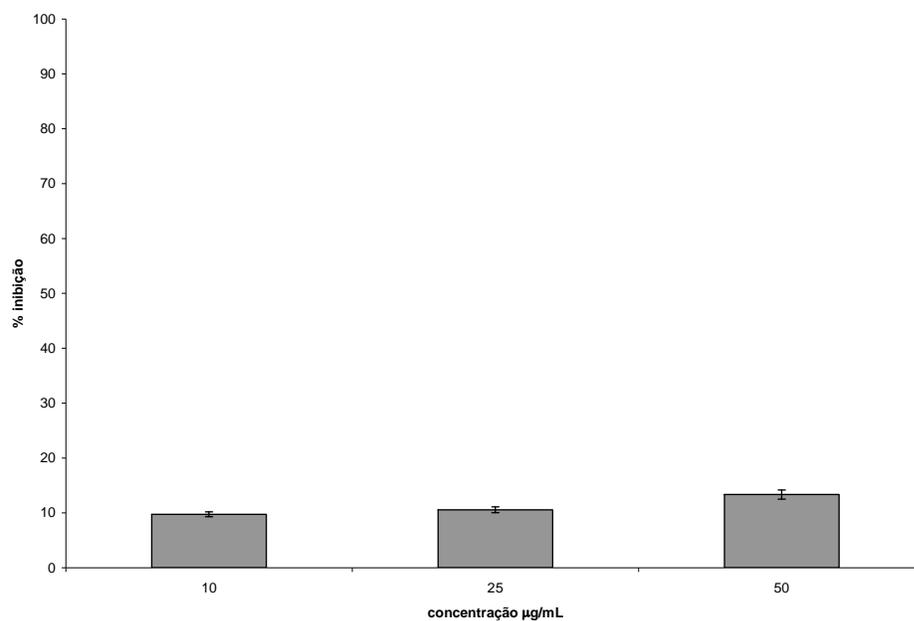
Mais de 90% dos pacientes diabéticos apresentam a diabetes tipo 2, a qual é geralmente caracterizada pela hiperglicemia não-insulino dependente em estágios iniciais. O tratamento terapêutico é baseado no retardo da quebra e absorção da glicose através da inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase pancreática e  $\alpha$ -glicosidase intestinal. Exemplos desses inibidores comerciais são acarbose e miglitol. No entanto, esses fármacos apresentam efeitos colaterais tais como distensão abdominal, flatulência e possivelmente diarreia devido à excessiva inibição da  $\alpha$ -amilase, resultando em fermentação dos carboidratos não digeridos pelas bactérias no cólon (BAILEY, 2003).

Diversos estudos têm relatado a presença de inibidores de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase em frutas e hortaliças comumente consumidas pela população, sugerindo que esses alimentos poderiam ser considerados no controle da hiperglicemia pós-prandial, visando a diminuição dos efeitos colaterais presentes nos fármacos disponíveis comercialmente (MATSUI *et al.*, 2001, McDOUGALL *et al.*, 2005, KWON *et al.*, 2006, KOTOWAROO *et al.* 2006, ALI *et al.* 2006, GAO *et al.* 2007, BHANDARI *et al.* 2008, PINTO *et al.*, 2008b).

Desta forma, extratos purificados de elagitaninos do morango foram avaliados quanto ao potencial efeito inibitório das enzimas  $\alpha$ -amilase (**Figura 11**) e  $\alpha$ -glicosidase (**Figura 12**) através de modelos *in vitro*.



**Figura 11.** Inibição da enzima  $\alpha$ -amilase (%) pelos elagitaninos purificados do morango ( $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 12.** Inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase (%) pelos elagitaninos purificados do morango ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Pode-se observar que os elagitaninos apresentaram uma inibição da enzima  $\alpha$ -amilase dose-dependente. No entanto, para a inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase essa porcentagem foi significativamente menor.

McDougall e Stewart (2005) relataram que os polifenóis presentes em frutos inibiram as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, resultando em diminuição dos níveis sanguíneos de glicose após refeições ricas em carboidratos. Além disso, McDougall *et al.* (2005) relataram que entre alguns frutos analisados, morangos, mirtilos, framboesas e amoras-pretas tiveram atividades inibitórias significativas de ambas as enzimas.

Pinto *et al.* (2008b) avaliaram extratos aquosos de cultivares brasileiras de morango quanto à possível inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase usando modelos *in vitro*. Os autores relataram que os morangos apresentam alta inibição da  $\alpha$ -glicosidase e baixa inibição da  $\alpha$ -amilase. Esses autores sugeriram esses frutos como boas fontes para o controle da hiperglicemia pós-prandial.

Na **Tabela 20** apresenta-se um comparativo das atividades inibitórias de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase (%) dos purificados de elagitaninos, ácido elágico (KWON *et al.*, 2006) e cultivares brasileiras de morango (PINTO *et al.*, 2008b).

**Tabela 20.** Comparação das atividades inibitórias (Unidades Inibitórias/mg) de  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) dos elagitaninos purificados (ET), ácido elágico livre (AE) (Sigma, EUA) e extratos aquosos de cultivares brasileiras de morango.\*

	$\alpha$ -amilase	$\alpha$ -glicosidase	ECA
ET	640 $\pm$ 10	260 $\pm$ 10	440 $\pm$ 10
Extrato aquoso de morango**	12,5 $\pm$ 1	40,5 $\pm$ 2	5,5 $\pm$ 0,2
AE***	n.a.	0,86	n.d.

\*As concentrações de elagitaninos e ácido elágico foram expressas como mg ácido elágico; a concentração do extrato aquoso de morango foi expressa como mg equivalentes de ácido gálico; \*\* de acordo com Pinto *et al.* (2008); \*\*\* de acordo com Kwon *et al.* (2006); n.a. não analisado; n.d. não detectado

Pode-se observar que os elagitaninos, em menor concentração, tiveram maiores % de inibição da  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase que os extratos de morango e ácido elágico.

Sugere-se que o controle da hiperglicemia associada à diabetes tipo 2 pode ser feito através da ingestão de alimentos que inibam significativamente a  $\alpha$ -glicosidase e moderadamente a  $\alpha$ -amilase já que excessiva inibição da  $\alpha$ -amilase pode levar à presença de amido não digerido no cólon e conseqüentemente flatulência (PULS *et al.*, 1977). Portanto, baseado nos resultados obtidos embora os elagitaninos e o ácido elágico tenham apresentado significativas porcentagens de inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, os morangos tiveram alta inibição da  $\alpha$ -glicosidase e baixa da  $\alpha$ -amilase, sugerindo que a ingestão desses frutos levaria a maiores efeitos benéficos referentes ao controle da glicemia.

Sabe-se que os indivíduos afetados pela diabetes tipo 2 tem fatores de risco associados, incluindo hipertensão e obesidade (HARRIS, 1995). A enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma importante enzima envolvida na manutenção da tensão vascular por duas distintas vias: conversão da inativa angiotensina I no potente vasoconstritor – angiotensina II, e inativação do vasodilatador bradicinina, que leva a diminuição da pressão arterial (JOHNSTON; FRANZ, 1992). A inibição dessa enzima é considerada importante na terapia de controle da pressão arterial em pacientes hipertensos.

Desta forma, os purificados de elagitaninos do morango foram avaliados quanto a possível inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA). Observou-se que os elagitaninos somente apresentaram atividade inibitória na máxima concentração testada (50  $\mu$ g/mL) e quando comparados com os extratos aquosos de morango, observou-se que esses compostos apresentam maior atividade inibitória (**Tabela 20**).

#### 4.6. FRAÇÃO INDIGERÍVEL

Os elagitaninos já foram anteriormente descritos por apresentarem diversas atividades biológicas tais como efeito inibitório da peroxidação lipídica, principalmente devido ao efeito seqüestrante de radicais livres pelo grupo HHDP (hexahidroxi-difênico), constituinte básico da estrutura de ácido elágico e elagitaninos (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1989). Estudos com animais utilizando carcinógenos químicos têm demonstrado que a administração do ácido elágico através da dieta inibe o desenvolvimento de cânceres de esôfago, fígado e pulmão, dependendo do tipo de composto utilizado. A aplicação tópica de ácido elágico também demonstrou diminuir a incidência de câncer de pele induzido quimicamente, em camundongos (HANNUM, 2004).

Para saber se os elagitaninos são capazes de exercer esses efeitos biológicos é necessário que eles sobrevivam à passagem pelo trato gastrointestinal e sejam hidrolisados a ácido elágico para serem posteriormente absorvidos, já que não há indícios de que sua absorção na forma íntegra seja possível, dado o tamanho molecular. No entanto, diversos compostos fenólicos são indisponíveis por estarem associados à fração fibra dos alimentos, constituída por polissacarídeos celulósicos, hemicelulósicos, betaglucanos, lignina, proteína resistente e amido resistente, que escapam do processo digestivo e chegam sem se degradar ao cólon (Cummings, 1996).

Saura-Calixto *et al.* (2000) definiram a fração indigerível (FI) como a parte dos alimentos que não é digerida ou absorvida no intestino delgado e que assim chega ao cólon, onde é utilizada como substrato de fermentação pela microbiota. A fração indigerível compreende a fibra dietética e outros compostos resistentes à ação das enzimas digestivas tais como amido resistente e polifenóis e é determinada simulando as condições fisiológicas (SAURA-CALIXTO, 2006).

Desta forma, determinou-se a fração indigerível do morango para avaliar se a quantidade seria significativa e assim poderia prejudicar a biodisponibilidade dos compostos fenólicos.

Na **Tabela 21** estão apresentados os valores de fração indigerível tanto solúvel quanto insolúvel.

**Tabela 21.** Teores de fração indigerível (FI) do morango (cv. Dover) (%).\*

<b>FI</b>	<b>%</b>
<b>Solúvel</b>	1,52 ± 0,01
<b>Insolúvel</b>	2,8 ± 0,2
<b>Total</b>	4,3 ± 0,1

\*resultados expressos em base úmida (b.u.)

Observou-se que a fração indigerível do morango representa 4,3% do total (b.u.), ou 39% em base seca, sendo a maior porcentagem (65%) correspondente à fração insolúvel, o que poderia ter significado biológico já que os compostos associados a esta fração não se dissolvem em condições fisiológicas e são normalmente excretados inalterados (Saura-Calixto, 2006). Menezes *et al.* (2004) analisaram os teores totais de FI de alimentos usualmente consumidos pela população brasileira e observaram que os teores variavam de 2,49 (batata cozida) a 13,54% (feijão) (b.u.). Dentre esses valores, o morango apresentou um teor total similar ao encontrado para o arroz integral (4,34%).

Após a determinação da FI, as frações foram isoladas e analisadas quanto aos teores de ácido elágico livre e total (**Tabela 22**).

**Tabela 22.** Teores de ácido elágico (AE) livre e total na fração indigerível do morango (cv. Dover) (mg/100 g amostra b.u.).

<b>FI</b>	<b>mg/100 g (b.u.)</b>	
	<b>AE livre</b>	<b>AE total</b>
<b>Solúvel</b>	0,17	0,51
<b>Insolúvel</b>	0,005	0,73

Os valores na **Tabela 22** demonstraram que os derivados de ácido elágico e elagitaninos não estão associados à FI do morango, já que uma quantidade muito baixa, de apenas 1,24 mg por 100 g de morango mostrou-se presente nesta fração. Esses resultados mostram que, a princípio, os elagitaninos e os outros derivados de ácido elágico se encontrariam disponíveis para hidrólise, absorção e metabolização durante sua passagem pelo trato gastrointestinal pois se dissolveriam nos fluidos intestinais.

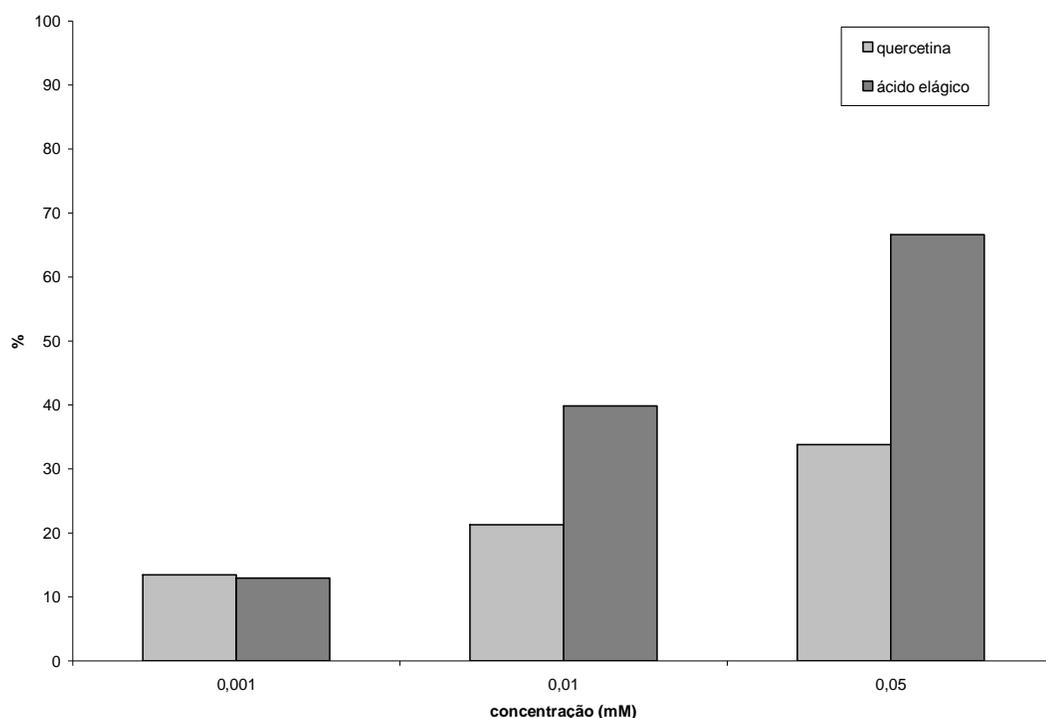
Portanto, observa-se que existe uma necessidade da realização de estudos mais detalhados de biodisponibilidade do ácido elágico e seus derivados, assim como de sua absorção a partir da dieta.

#### 4.7. CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO A BSA

Muitos estudos têm sugerido que fatores tais como ligação a proteínas poderiam impedir a absorção dos polifenóis ou diminuir a biodisponibilidade ou até mesmo mascarar a sua capacidade antioxidante (RIEDL; HAGERMAN, 2001, ARTS *et al.*, 2002). A associação de polifenóis a proteínas é um fenômeno bastante relatado na literatura, no entanto, somente mais recentemente tem-se obtido mais informações sobre o mecanismo como essa interação ocorre (BACON; RHODES, 2000, DE FREITAS; MATEUS, 2001, FRAZIER *et al.*, 2003, CHEN; HAGERMAN, 2004, JOBSTL *et al.*, 2004).

Sabe-se que as albuminas séricas são as principais proteínas solúveis constituintes do sistema circulatório além de terem muitas funções fisiológicas (HE; CARTER, 1992). A mais importante propriedade desse grupo de proteínas é que elas servem de transportadores de vários compostos. A albumina de soro bovina (BSA) é a proteína mais estudada desse grupo, particularmente devido à semelhança estrutural com a albumina de soro humana. Como a BSA tem dois resíduos triptofano que emitem fluorescência, métodos utilizando “quenching” de fluorescência podem ser considerados para medida de ligação de afinidade dos compostos fenólicos com a proteína.

Para tanto, foi avaliada a capacidade de ligação do ácido elágico a BSA através da metodologia descrita por Papadopoulou *et al.* (2005) (**Figura 13**). Além disso, o flavonóide quercetina foi avaliado para efeito de comparação com o ácido elágico.



**Figura 13.** Porcentagem (%) de interação do ácido elágico e quercetina com BSA em diferentes concentrações (mM).

Pode-se observar que o ácido elágico interagiu de forma mais significativa que a quercetina, especialmente nas maiores concentrações. No entanto, na menor concentração testada, os dois compostos tiveram a mesma porcentagem de interação com essa proteína.

Papadopoulou *et al.* (2005) estudaram a associação de flavonóides como quercetina, catequina, epicatequina e rutina com a BSA. Esses autores relataram que dentre os compostos estudados a quercetina teve a maior interação com a proteína.

Sabe-se que os compostos fenólicos geralmente não ocorrem na sua forma livre mas esterificados, glicosilados ou como polímeros como é o caso dos elagitaninos. Riihimaki *et al.* (2008) estudaram a ligação de agliconas de flavonas, flavanonas e isoflavonas a BSA. Esses autores relataram que o pH não alterava a ligação desses compostos com a proteína, e o complexo formado permanecia estável.

Portanto, a forte interação do ácido elágico com a BSA poderia explicar os resultados relatados na literatura quanto ao aparecimento desse composto no plasma de

indivíduos suplementados com alimentos ricos em elagitaninos.

De acordo com Espín *et al.* (2007) os elagitaninos seriam quebrados a ácido elágico e prontamente absorvidos no estômago, daí o aparecimento entre 30 minutos e 1 hora no plasma. Podemos sugerir que os elagitaninos, após serem hidrolisados a ácido elágico pelo pH do estômago, são absorvidos através de transportadores de ácidos orgânicos presentes no estômago. Esses compostos permaceriam então circulantes no sangue através da ligação com a albumina.

#### 4.8. ESTUDO DA BIODISPONIBILIDADE DOS ELAGITANINOS *IN VIVO*

Elagitaninos como Sanguina H-6 e lambertianina C apresentam alta capacidade antioxidante *in vitro*, o que indica que poderiam exercer efeitos protetores ao passar pelo trato gastrointestinal, onde poderiam ser despolimerizados liberando ácido elágico, o qual seria mais facilmente absorvido (BEATTIE *et al.*, 2005). Não há no entanto comprovação da formação de ácido elágico livre a partir de elagitaninos. Diversos estudos também já relataram que os elagitaninos ao serem ingeridos através da dieta seriam metabolizados pela microbiota a compostos derivados da urolitina (**Figura 4**) (CERDÁ *et al.*, 2004, CERDÁ *et al.*, 2005). No entanto, Seeram *et al.* (2006a) relataram que após consumo de suco de romã, picos referentes a ácido elágico e urolitina foram detectados no plasma dos voluntários. Porém, alguns indivíduos não apresentaram urolitina sugerindo que a metabolização desses compostos depende de outros fatores tais como das diferenças interindividuais da microbiota. Portanto, observa-se que não existem dados concisos sobre a extensão em que os elagitaninos são metabolizados ou mesmo se são ou não absorvidos ainda não está claro.

Desta forma, primeiramente, foi realizada a administração por via oral do ácido elágico (Sigma, EUA) (20 mg/200 g peso corpóreo) para os ratos. Em períodos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 24 horas foram coletadas amostras de sangue assim como de diferentes tecidos (estômago, fígado, rins, intestino delgado e intestino grosso). Os resultados demonstraram que no intervalo de tempo estudado (30 minutos a 24 horas) o composto ácido elágico não foi detectado em nenhum período no plasma. Além disso, foi realizada a análise dos tecidos após 4 horas da administração oral. Esse tempo foi escolhido já que é considerado o tempo aproximado para que haja metabolização de diversos compostos, por exemplo, no intestino grosso. Segundo a literatura, tanto o ácido elágico quanto os elagitaninos são metabolizados pela microbiota presente no intestino grosso, havendo a formação dos metabólitos urolitina A e B. Os resultados, no entanto, demonstraram que após 4 horas da administração oral de ácido elágico, todo o composto se encontrava precipitado no estômago.

Estes resultados indicaram que para que o ácido elágico pudesse ser absorvido a sua administração deveria ser feita na forma de um precursor mais solúvel, como seria o caso dos elagitaninos presentes no morango. Sendo assim, foi realizada a administração oral por gavagem a ratos de um purificado de elagitaninos (20 mg/200 g peso corpóreo)

(vide “4.3.1. *Purificação dos elagitaninos*”) e após 15, 30, 45 minutos, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas o sangue e diferentes tecidos (estômago, fígado, rins, intestino delgado e intestino grosso) foram coletados e analisados por CLAE antes e após hidrólise ácida, de acordo com a metodologia previamente otimizada.

Na análise dos tecidos após a administração oral dos elagitaninos purificados nenhum composto correspondente a ácido elágico ou derivados foi identificado, tanto antes como após hidrólise ácida. Esses resultados estão de acordo com Borges *et al.* (2007) que relataram que após administração por gavagem de suco de framboesa a ratos nenhum pico foi identificado como elagitanino ou ácido elágico. Os autores observaram que os elagitaninos desapareceram rapidamente e não foram detectados no plasma, urina, fezes, estômago, duodeno/jejuno, íleo e outras partes do trato gastrointestinal. Além disso, esses autores não detectaram o metabólito urolitina B ou seus conjugados/derivados na urina. Ainda, Cerdá *et al.* (2003) relataram que no caso de ratos como modelos experimentais, esses necessitariam de alguns dias após repetidas doses orais dos elagitaninos para serem capazes de metabolizar esses compostos. Por outro lado, Seeram *et al.* (2008b) detectaram ácido elágico no plasma de camundongos após 30 min da administração oral de extrato de casca de romã, rico em elagitaninos, mas, similar ao trabalho anterior, não encontraram urolitina nem seus conjugados em plasma e tecidos.

Espín *et al.* (2007) utilizaram porcos ibéricos como modelos experimentais para elucidar o metabolismo dos elagitaninos já que esses animais apresentariam maior similaridade no metabolismo com os humanos. Esses autores sugeriram que os elagitaninos seriam hidrolisados a ácido elágico no estômago e este então seria metabolizado pela microbiota intestinal aos derivados de urolitina. A presença de ácido elágico na bile e urina foi atribuída à absorção do ácido elágico no estômago.

Konishi, Zhao e Shimizu (2006) estudaram a eficiência de absorção pelo estômago de compostos fenólicos tais como ácido gálico e ácido clorogênico. Esses autores sugeriram que transportadores de ácidos monocarboxílicos estariam envolvidos na absorção desses compostos. Sabe-se que esses transportadores envolvem sistemas de transporte específicos que agem não somente para ácidos fenólicos mas também para metabólitos microbianos de polifenóis fracamente absorvidos mas com atividade biológica (KONISHI; KOBAYASHI, 2004; KONISHI, 2005). Esse tipo de transporte poderia explicar o aparecimento do ácido elágico no plasma apesar da baixa solubilidade desse

composto.

Os resultados aqui apresentados não permitiram afirmar se houve absorção dos elagitaninos, e embora dados importantes tenham sido obtidos, tais como a necessidade de administrar precursores de ácido elágico solúveis, já que a forma livre precipita em condições fisiológicas, mais estudos são ainda necessários.

Recentemente nosso grupo realizou um estudo sobre o efeito da matriz alimentar na biodisponibilidade dos principais compostos fenólicos encontrados na amora-preta, antocianinas (112 mg equivalente em cianidina/100g amostra b.u.) e elagitaninos (146 mg ácido elágico total/100g amostra b.u.) (HASSIMOTTO *et al.*, submetido). Duas preparações de sucos de amora-preta (água e leite desnatado) foram administradas a voluntários e amostras de sangue e urina foram coletadas em intervalos de tempos. As amostras coletadas após a administração das duas preparações de suco foram analisadas antes e após hidrólise ácida para detecção de ácido elágico tanto livre como total.

Após a ingestão de suco de amora-preta preparada com água, foi detectada no plasma pequena quantidade de AE livre, o que leva à hipótese de que os elagitaninos presentes foram previamente hidrolisados, liberando o AE livre (HASSIMOTTO *et al.*, submetido). Uma vez que esse composto é insolúvel em água, a sua presença no plasma poderia ser explicada pela associação com as albuminas séricas já que previamente o ácido elágico apresentou uma forte interação com a BSA (**Figura 13**).

A concentração máxima de ácido elágico foi de  $0,9 \pm 0,3$   $\mu\text{mol/mL}$  plasma, com pico máximo de concentração em 1 h para o suco preparado em água (HASSIMOTTO *et al.*, submetido). Após 1h da ingestão do suco preparado em água, o metabólito urolitina B conjugado ao ácido glicurônico (íon molecular  $m/z$  404, MS/MS  $m/z$  227) foi identificado no plasma dos voluntários. Outros dois picos também foram identificados apresentando MS/MS  $m/z$  301. Um pico com espectro de absorção similar ao AE livre foi identificado por LC-MS/MS, apresentando íon molecular ( $[M-H]^-$ )  $m/z$  301 produzindo os íons  $m/z$  257 e  $m/z$  229. Outro íon molecular identificado apresentou  $m/z$  602.5 sendo fragmentado aos íons  $m/z$  460 e  $m/z$  301. Posterior MS<sup>3</sup> do íon  $m/z$  301 mostrou ser o mesmo padrão de fragmentação do AE (HASSIMOTTO *et al.*, submetido).

Não foram detectados ácido elágico livre ou elagitaninos nas amostras de urina após 6 h de ingestão das duas preparações de suco. No entanto, Cerdá *et al.* (2005) relataram a presença do metabólito de ET, a urolitina B conjugada ao ácido glucurônico, em urina de voluntários entre 16 e 48 h após o consumo de diferentes alimentos<sup>87</sup>

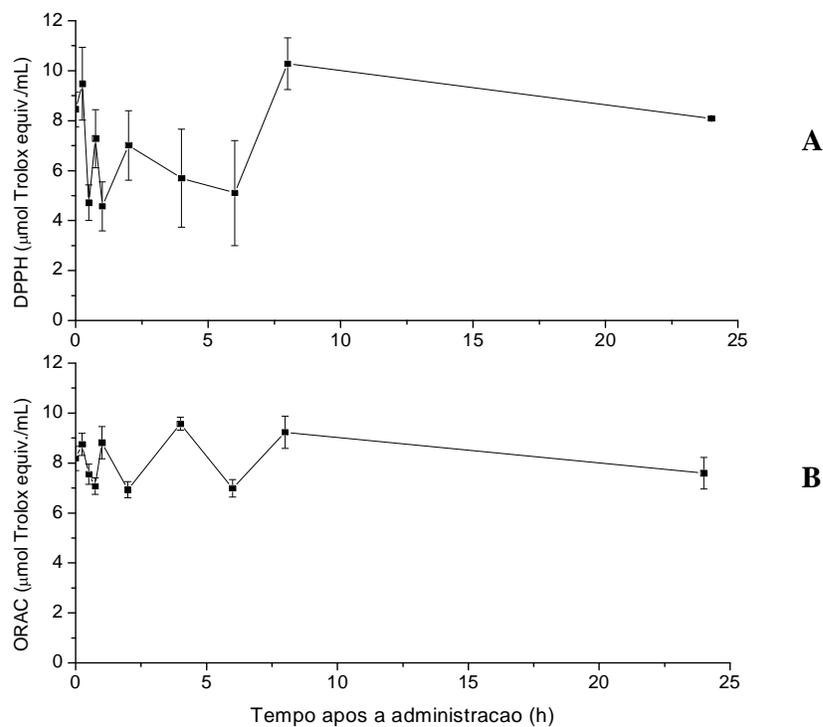
contendo ET (morango, framboesa, vinho e nozes), sugerindo a participação da microbiota no metabolismo de ácido elágico e/ou elagitaninos. Por outro lado, Seeram *et al.* (2006a) encontraram este metabólito no plasma 0.5 h após a ingestão de suco de romã.

Além disso, não foram detectados ácido elágico livre ou elagitaninos no plasma e urina dos voluntários após a ingestão de suco de amora-preta preparado com leite desnatado, sugerindo um efeito da matriz alimentar no metabolismo desses compostos.

#### 4.8.1. EFEITO SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO PLASMA

Embora a absorção dos elagitaninos/ácido elágico em ratos não tenha sido comprovada, a hipótese de que estes tenham sido rapidamente metabolizados não pode ser descartada. Como alguns metabólitos dos elagitaninos tais como as urolitinas já demonstraram serem biologicamente ativos, objetivou-se verificar se a administração por gavagem dos elagitaninos purificados a partir do morango teria algum efeito sobre a capacidade antioxidante do plasma de ratos.

As amostras de plasma após 15, 30, 45 minutos, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas da administração foram analisadas quanto a possíveis alterações na capacidade antioxidante através das metodologias de seqüestro de radicais livres do DPPH e ORAC (**Figura 14**)



**Figura 14.** Avaliação da capacidade antioxidante do plasma nos intervalos de 15 minutos a 24 horas após administração por gavagem de elagitaninos purificados a partir do morango (concentração 20 mg/200 g peso corpóreo). A: Seqüestro de radicais livres do DPPH; B: ORAC.

Os resultados apresentados mostram que não houve um aumento significativo da capacidade antioxidante do plasma, quando comparado com o controle, após a administração dos elagitaninos purificados. Em estudo realizado por Cerdá *et al.* (2004), verificou-se que embora a punicalagina (principal elagitanino da romã) apresente alta capacidade antioxidante, após o consumo de suco de romã este composto seria metabolizado pela microbiota a compostos mais biodisponíveis porém com baixa capacidade antioxidante. No entanto, Mertens-Talcott *et al.* (2006) relataram um aumento significativo na capacidade antioxidante do plasma após administração de cápsulas de extrato de romã a voluntários, provavelmente outros compostos fenólicos presentes no extrato seriam os responsáveis por esse efeito.

Ao contrário do relatado para os elagitaninos, Mazza *et al.* (2002) encontraram uma alta correlação ( $p < 0,01$ ) entre o aparecimento de antocianinas no plasma e a capacidade antioxidante (ORAC) após ingestão de mirtilo liofilizado. Ainda, alguns trabalhos relataram que as antocianinas atingiram concentração máxima entre 30 min a 1h após administração oral, tanto em ratos (HASSIMOTTO *et al.*, 2008) quanto em humanos (HASSIMOTTO *et al.*, submetido), coincidindo o aparecimento das antocianinas no plasma com o aumento da capacidade antioxidante plasmática.

## 5. CONCLUSÕES

Do presente trabalho pode-se concluir:

- ✓ Existem diferenças significativas nos teores de compostos bioativos entre as cultivares brasileiras de morango. As antocianinas e os derivados de ácido elágico são os principais compostos fenólicos presentes. Os teores de ácido elágico total variaram de 17 a 47 mg/100 g (b.u.), sendo que esse composto está presente principalmente na forma de elagitaninos (95%);
- ✓ As melhores condições para a determinação dos teores de ácido elágico total em morangos são: extração dos morangos em acetona aquosa a 80% com posterior hidrólise ácida utilizando ácido trifluoracético (TFA) 2N a 120 °C por 60 minutos;
- ✓ A melhor condição para a purificação dos elagitaninos do morango foi através da precipitação com acetato de itérbio, apesar do baixo rendimento (25 %). No entanto, dentre todas as técnicas testadas foi a única que impediu a contaminação por outros compostos fenólicos;
- ✓ A análise por LC/MS identificou Sanguina H-6, isômeros de pedunculagina e HHDP-galoil-glicosídeo como os principais elagitaninos presentes no morango;
- ✓ Ao contrário do que é relatado na literatura para taninos hidrolisáveis presentes na manga, por exemplo, os elagitaninos presentes no morango não estão associados à fração indigerível.
- ✓ Existe uma forte interação do ácido elágico com BSA *in vitro*, sugerindo que esse composto aparece no plasma ligado a proteínas, já que o ácido elágico é insolúvel em água.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W. Phyto-oestrogens and western diseases. **Ann. Med.**, v. 29, p. 95-120, 1997.
- AGAR, I.T.; STREIF, J.; BANGERTH, F. Effect of high CO<sub>2</sub> and controlled atmosphere (CA) on the ascorbic and dehydroascorbic acid content of some berry fruits. **Postharv. Biol. Technol.**, Amsterdam, v. 11, p. 47-55, 1997.
- ALI, H.; HOUGHTON, P.J.; SOUMYANATH, A. Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 107, p. 449-455, 2006.
- AMAKURA, Y.; OKADA, M.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. **J. Chromat. A**, Amsterdam, v. 896, p. 87-93, 2000.
- ANDERSON, K.J.; TEUBER, S.S.; GOBEILLE, A.; CREMIN, P.; WATERHOUSE, A.L.; STEINBERG, F.M. Walnut Polyphenolics Inhibit *in vitro* Human Plasma and LDL Oxidation. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 131, p. 2837-2842, 2001.
- ARTS, M. J. T. J.; HAENEN, G. R. M. M.; WILMS, L. C.; BEETSTRA, S. A. J. N.; HEIJNEN, C. G. M.; VOSS, H.-P.; BAST, A. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, p. 1184-1187, 2002.
- ASARD, H.; MAY, J.M.; SMIRNOFF, N. Ascorbate as an antioxidant. In: BUETTNER, G.R.; SCHAFER, F.Q. **Vitamin C – Functions and Biochemistry in animals and plants**, London: Taylor & Francis Group, p. 173-188, 1997.

- AVIGDORI-AVIDOV, H., Strawberry. In: MONSELISE, S.P. **Handbook of fruit set and development**, Boca Raton: CRC Press, 1986, p. 419-448.
- BACON, J. R.; RHODES, M. J. C. Binding affinity of hydrolysable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 48, p. 838-843, 2000.
- BAILEY, C. J. New approaches to the pharmacotherapy of diabetes. In: Textbook of Diabetes, third edition; Pickup, J.C., William, G., Eds.; Blackwell Science Ltd., UK, v. 2, p. 73.1–73.21, 2003.
- BATE-SMITH, E.C. Detection and determination of ellagitannins. **Phytochem.**, Oxford, v. 11, p. 1153-1156, 1972.
- BEATTIE, J.; CROZIER, A.; DUTHIE, G.G. Potential health benefits of berries. **Cur. Nutr. Food Sci.**, v. 1, p. 71-86, 2005.
- BEEKWILDER, J.; LONKER, H.; MEESTERS, P.; HALL, R.D.; VAN DER MEER, I.M.; DE VOS, C.H.R. Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 53, p. 3313-3320, 2005.
- BHANDARI, M.R., JONG-ANURAKKUN, N., HONG, G., KAWABATA, J.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). **Food Chem.**, Oxford, v. 106, p. 247-252, 2008.
- BORGES, G.; ROOWI, S.; ROUANET, J.M.; DUTHIE, G.G.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 51, p. 714-725, 2007.

- BORS, W.; BUETTNER, G.R. The vitamin C radical and its reactions in Vitamin C. In Health and Disease, ed. by L. Packer and J. Fuchs, Marcel Dekker, Inc., New York, Chapter 4, p. 75-94. 1997.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. – Wiss. u.- Technol.** , London, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BUSHMAN, B.S.; PHILLIPS, B.; ISBELL, T.; OU, B.; CRANE, J.M.; KNAPP, S.J. Chemical composition of caneberry (*Rubus spp.*) seeds and oils and their antioxidant potential. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 52, p. 7982-7987, 2004.
- CAO, G.; RUSSELL, R.M.; LISCHNER, N.; PRIOR, R.L. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of Strawberries, Spinach, Red wine or Vitamin C in elderly women. **J. Nutr.**, Bethesda , v. 128, p. 2383-2390, 1998.
- CARPITA, N.C. Hemicellulosic polymers of cell-walls of Zea coleoptiles. **Plant Physiology.**, Bethesda, v. 72, p. 515-521, 1983.
- CASSIDY, A.; HANLEY, B.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v. 80, p. 1044-1062, 2000.
- CERDA B., CERON J.J., TOMAS-BARBERAN F.A., ESPIN J.C. Repeated oral administration of high doses of pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 51, p. 3493– 3501, 2003.
- CERDÁ, B.; ESPÍN, J.C.; PARRA, S.; MARTÍNEZ, 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 derivatives by the colonic microflora of healthy humans. **Eur. J. Nutr.**, v. 43, p. 205-220, 2004.

CERDÁ, B.; PERIAGO, P.; ESPÍN, J.C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. **J. Agr. Food Chem.**, Columbus, v. 53, p. 5571-5576, 2005.

CERDÁ, B.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ESPÍN, J.C. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 53, p. 227-235, 2005.

CHEN, Y.; HAGERMAN, A. E. Characterization of soluble noncovalent complexes between bovine serum albumin and  $\alpha$ -1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-D-glucopyranose by MALDI-TOF MS. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 52, p. 4008-4011, 2004.

CLAESON, P.; GÖRANSSON, U.; JOHANSSON, S.; LUIJENDIJK, T.; BOHLIN, L. Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 77-81, 1998.

CLIFFORD, M.N.; SCALBERT, A. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v. 80, p. 1118-1125, 2000.

CO, H.; MARKAKIS, P. Flavonoid compounds in the strawberry fruit. **J. Food Sci.**, Chicago, v.33, p. 281-283, 1968.

COLLINS, R.A.; NG, T.B.; FONG, W.P.; WAN, C.C.; YEUNG, H.W. Removal of polyphenolics from aqueous plant extracts using polyamide minicolumns. **Biochem. Mol. Biol. Intern.**, v. 45, p. 791-796, 1998.

- CORDENUNSI, B.R.; GENOVESE, M.I.; NASCIMENTO, J.R.O.; HASSIMOTTO, N.M.A.; DOS SANTOS, R.J.; LAJOLO, F.M. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. **Food Chem.**, Oxford, v. 91, p. 113-121, 2005.
- CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 50, p. 2581-2586, 2002.
- COSTACOU, T., MAYER-DAVIS, E.J. Nutrition and prevention of type 2 diabetes. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 23, p. 147-170, 2003.
- DANIEL, E.M.; KRUPNICK, A.S.; HEUR, Y.H.; BLINZLER, J.A.; NIMS, R.W.; STONER, G.D. Extraction, stability and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. **J. Food Comp. Analysis.**, San Diego, v. 2, p. 338-349, 1989.
- DANIEL, E.M.; STONER, G.D. The effects of ellagic acid and 13-cis-retinoic acid on N-nitrosobenzylmethylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats. **Letters**, Amsterdam, v. 56, p. 117-124, 1991.
- DAVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVES, C.; BARTOLOME B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.52, p.48-54, 2004.
- DE FREITAS, V.; MATEUS, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 49, p. 940-945, 2001.

- DILLARD, C.J.; GERMAN J.B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v. 80, p. 1744-1756, 2000.
- EL-TOUMY, S.A.A., RAUWALD, H.W. Two ellagitannins from *Punica granatum* heartwood. **Phytochem.**, Oxford, v. 61, 971-974, 2002.
- ESPÍN, J.C.; GONZÁLEZ-BARRIO, R.; CERDÁ, B.; LÓPEZ-BOTE, C.; REY, A.I.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Iberian Pig as a Model To Clarify Obscure Points in the Bioavailability and Metabolism of Ellagitannins in Humans. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.55, p. 10476–10485, 2007
- ESPOSITO, K., NAPPO, F., MARFELLA, R., GIUGLIANO, G., GIUGLIANO, F., CIOTOLA, M., QUAGLIARO, L., CERIELLO, A., GIUGLIANO, D. Inflammatory Cytokine Concentrations Are Acutely Increased by Hyperglycemia in Humans: Role of Oxidative Stress. **Circulation**, v. 106, p. 2067-2072, 2002.
- FRAZIER, R. A.; PAPADOPOULOU, A.; MUELLER-HARVEY, I.; KISSOON, D.; GREEN, R. J. Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 51, p. 5189-5195, 2003.
- GAO H, HUANG YN, XU PY, KAWABATA J: Inhibitory effect on  $\alpha$ -glucosidase by the fruits of Terminalia chebula Retz. **Food Chem.**, Oxford, v. 105, p. 628-634, 2007.
- GENOVESE, M.I.; SANTOS, R.J.; HASSIMOTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, São Paulo, v.39, p. 67-69, 2003.
- GIL, M.I.; HOLCROFT, D.M.; KADER, A.A. Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 45, p. 1662-1667, 1997.

GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERAN, F.A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D.M.; KADER, A.A. Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 48, p. 4581-4589, 2000.

HADDOCK, E.A.; GUPTA, R.K.; AL-SHAFI, S.M.K.; LAYDEN, K.; HASLAM, E.; MAGNOLATO, D. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants: biogenetic and molecular taxonomic considerations. **Phytochem.**, Oxford, v. 21, p. 1049-1062, 1982.

HAGER TJ, HOWARD LR, LIYANAGE R, LAY JO, PRIOR RL. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 56, p. 661-669, 2008.

HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.26, p. 809-812, 1978.

HÄKKINEN, S.; HEINONEN, M.; KÄRENLAMPI, S.; MYKKÄNEN, H.; RUUSKANEN, J.; TÖRRÖNEN, R. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. **Food Res. Int.**, Oxford, v. 32, p. 345-353, 1999.

HÄKKINEN, S.H.; KÄRENLAMPI, S.O.; MYKKÄNEN, H.M.; HEINONEN, M.I.; TÖRRÖNEN, A.R. Ellagic acid content in berries: influence of domestic processing and storage. **Eur. Food Res. Tech.**, v. 212, p. 75-80, 2000.

HAN, C.H., DING, H.M., CASTO, B., STONER, G.D., D'AMBROSIO, S.M., Inhibition of the growth of premalignant and malignant human oral cell lines by extracts and components of black raspberries. **Nutr. Cancer-Int. J.**, v. 51, p. 207-217, 2005.

- HANNUM, S.M. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. **Crit. Rev Food Sci. Nutr.**, v. 44, p. 1-17, 2004.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochem.**, Oxford, v. 55, p. 481-504, 2000.
- HARRIS, M.I. Summary, in: National diabetes data group: diabetes in America. 2<sup>nd</sup>. ed., NIH pub. No. 95-1468. Washington, DC: Government Printing Office, p. 1-14, 1995.
- HASLAM, E. **Plant polyphenols, vegetable tannins revisited**, Cambridge University Press, Cambridge, 1989.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 53, p. 2928-2935, 2005.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. **Nutr. Res.**, v. 28, p. 198-207, 2008.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; PINTO, M.S.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Identification of ellagitannins and flavonoids in blackberry (*Rubus fruticosus* L.) fruits by HPLC-ESI-MS/MS. (submetido)
- HASSIMOTTO, N.M.A.; PINTO, M.S.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Effect of Defatted Milk Addition on the Bioavailability of Anthocyanins and Ellagitannins from Blackberries (*Rubus fruticosus* L.) (submetido)
- HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, v. 358, p. 209-215, 1992.

HEINONEN, I.M.; MEYER, A.S.; FRANKEL, E.N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 46, p. 4107-4112, 1998.

HENNING SM, NIU Y, LEE NH, THAMES GD, MINUTTI RR, WANG H, GO VL, HEBER D. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 80, p. 1558-1564, 2004.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAM, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusion, wines and fruit juices. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 41, p. 1242-1246, 1993.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.40, p. 2379-2383, 1992.

HOLLMAN, P.C.H.; DE VRIES, J.H.M.; VAN LEEUWEN, S.D.; MENGELERS, M.J.B.; KATAN, M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 62, p. 1276-1282, 1995.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomed. Pharmacother.**, Paris, v. 51, p. 305-310, 1997a.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 37, p. 937-942, 1999.

HOLLMAN, P.C.H.; VAN TRIJP, J.M.P.; BUYSMAN, M.N.C.P.; GAAG, M.S.; MENGELERS, M.J.B.; DE VRIES, J.H.M.; KATAN, M.B. Relative

bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 418, p. 152-156, 1997b.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUNG, H.C., JOSHIPURA, K.J., JIANG, R., HU, F.B., HUNTER, D., SMITH-WARNER, S.A., COLDITZ, G.A., ROSNER, B., SPIEGELMAN, D., WILLETT, W.C.. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. **J. Natl. Cancer Inst.**, Oxford, v. 96, p. 1577-84, 2004.

HUTCHINS, A. M.; SLAVIN, J. L.; LAMPE J. W. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v. 95, p. 545-551, 1995.

ITO, H.; OKUDA, T.; FUKUDA, T.; HATANO, T.; YOSHIDA, T. Two novel dicarboxylic acid derivatives and a new dimeric hydrolyzable tannin from walnuts. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 55, p. 672-679, 2007.

IZUMI, T.; PISKULA, M.K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KUBOTA, Y.; KIKUCHI, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and higher amounts than their glucosides in humans. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 130, p. 1695 - 1699, 2000.

JOBSTL, E.; O'CONNELL, J.; FAIRCLOUGH, J. P. A.; Williamson, M. P. Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. **Biomacromolecules**, Washington, v. 5, p. 942-949, 2004.

JOHNSTON, J.I., FRANZ, V. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal

system for cardiovascular control. **J. Hypertens.**, Milan, v. 10, p. 13-26, 1992.

JOSHIPURA, K.J., HU, F.B., MANSON, J.E., STAMPFER, M.J., RIMM, E.B., SPEIZER, F.E., COLDITZ, G., ASCHERIO, A., ROSNER, B., SPIEGELMAN, D., WILLETT, W.C. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 132, p. 1106-1114, 2001.

JURANIC, Z., ZIZAK, Z.. Biological activities of berries: from antioxidant activity to anti-cancer effects. **BioFactors**, Amsterdam, v. 23, p. 207-211, 2005.

KAHKONEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.47, p. 3954-3962, 1999.

KALT, W.; FORNEY, C.F.; MARTIN, A.; PRIOR, R.L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.47, p. 4638-4644, 1999.

KATSUBE, N., IWASHITA, K., TSUSHIDA, T., YAMAKI, K., KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 51, p. 68-75, 2003.

KEARNEY, P.M., WHELTON, M., REYNOLDS, K., MUNTNER, P., WHELTON, P.K., HE, J.. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, London, v. 365, n. 9455, p. 217-223, 2005.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KING, R.A.; BROADBENT, J.L.; HEAD, R.J. Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. **J Nutr.**, Bethesda, v. 126, p. 176-182, 1996.

- KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S. Microbial Metabolites of Ingested Caffeic Acid Are Absorbed by the Monocarboxylic Acid Transporter (MCT) in Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 52, p. 6418 -6424, 2004.
- KONISHI, Y. Transepithelial transport of microbial metabolites of quercetin in intestinal Caco-2 cell monolayers. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 53, p. 601-7, 2005.
- KONISHI, Y.; ZHAO, Z.; SHIMIZU, M. Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 54, p. 7539-7543, 2006.
- KOSAR, M.; KAFKAS, E.; PAYDAS, S.; BASER, K.H.C. Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 52, p. 1586-1589, 2004.
- KOTOWAROO, M.I., MAHOMOODALLY, M.F., GURIB-FAKIM, A., SUBRATTY, A.H. Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of Mauritius for possible  $\alpha$ -amylase inhibitory effects in vitro. **Phytother. Res.**, London, v. 20, p. 228-231, 2006.
- KRESTY, L.A.; MORSE, M.A.; ADAMS, C.A.; LU, J.; STONER, G.D. Inhibitory effect of lyophilized black raspberries on esophageal tumorigenesis and O<sup>6</sup>-methylguanine levels in the F344 rat. **Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.**, San Francisco, A120, 1998.
- KULLING, S.E.; HONIG, D.M.; METZLER, M. Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans *in vitro* and *in vivo*. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 49, n. 6, p. 3024-3033, 2001.

- KURZER, M.S., XU, X. Dietary Phytoestrogens. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v. 17, p. 353-381, 1997.
- KWON, Y.I., VATTEM, D.V., SHETTY, K.. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v. 15, p. 107-118, 2006.
- LEE, J.H.; JOHNSON, J.V.; TALCOTT, S.T. Identification of ellagic acid conjugates and other polyphenolics in muscadine grapes by HPLC-ESI-MS. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 53, p. 6003-6010, 2005.
- LEE, J.H.; TALCOTT, S.T. Fruit maturity and juice extraction influences ellagic acid derivatives and other antioxidant polyphenolics in muscadine grapes. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 52, p. 361-366, 2004.
- LIU, M., LI, X.Q., WEBER, C., LEE, C.Y., BROWN, J., LIU, R.H. Antioxidant and anti-proliferative activities of raspberries. **J. Agr. Food Chem.**, Columbus, v. 50, p. 2926-2930, 2002.
- LIU, S.; JIANG, S.; WU, Z.; LV, L.; ZHANG, J.; ZHU, Z.; WU, S. Identification of inhibitors of the HIV-1 gp41 six-helix bundle formation from extracts of Chinese medicinal herbs *Prunella vulgaris* and *Rhizoma cibotte*. **Life Sci.**, Amsterdam, v. 71, p. 1779-1791, 2002.
- LOOMIS, W.D.; BATTAILE, J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. **Phytochem.**, Oxford, v. 5, p. 423-438, 1966.
- MAAS, J.L.; GALLETTA, G.J. Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries: a review. **Hortscience**, Stanford, v. 26, p. 10-14, 1991.
- MAAS, J.L.; WANG, S.Y.; GALLETTA, G.J. Evaluation of strawberry cultivars for ellagic acid content. **Hortscience**, Stanford, v. 26, p. 66-68, 1991.

- MÄÄTTÄ-RIIHINEN, K.R.; KAMAL-ELDIN, A.; TÖRRÖNEN, A.R. Identification and quantification of phenolic compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 52, p. 6178-6187, 2004.
- MAKKAR, H.P.S.; BLÜMMEL, M.; BOROWY, N.K.; BECKER, K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **J. Sci. Food Agric.**, v. 61, p. 161-165, 1993.
- MALIK A, AFAQ F, SARFARAZ S, ADHAMI VM, SYED DN, MUKHTAR H: Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. **PNAS**, v. 102, p. 14813-14818, 2005.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda , v. 79, p. 727-747, 2004.
- MANDAL, S.; STONER, G.D. Inhibition of methylbenzyl nitrosamine-induced esophageal tumors in rats by ellagic acid. **Carcinogen.**, v. 11, p. 55-61, 1990.
- MANGELS , A.R.; HOLDEN, J.M.; BEECHER , G.R.; FORMAN, M.R.; LANZA, E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. **J. Am. Diet. Assoc.** , v. 93, p. 256-384, 1993.
- MARKHAN, K.R. **Techniques of flavonoids identification**. London, New York: Academic Press, 1982, p. 16.
- MATSUI T, UEDA T, OKI T, SUGITA K, TERAHARA N, MATSUMOTO K. □-  
Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of

natural pigments with potent inhibitory activity. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 49, p. 1948-1951, 2001.

MAZZA, G.; KA, C.D.; COTTRELL, T.; HOLUB, B.J. Absorption of anthocyanins from the blueberries and serum antioxidant status in human subjects. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 50, p. 7731-7737, 2002.

MCCUE, P., KWON, Y.I., SHETTY, K. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods. **J. Food Biotech.**, v. 29, p. 278-294, 2005.

MCDUGALL, G.J., SHPIRO, F., DOBOSON, P., SMITH, P., BLACK, A., STEWART, D.. Different polyphenolic compounds of soft fruits inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 53, p. 2760-2766, 2005.

MCDUGALL, G.J., STEWART, D. The inhibitory activity effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **BioFactors**, v. 23, p. 189-195, 2005.

MCMANUS, J.P.; DAVIS, K.G.; BEART, J.E.; GAFFNEY, S.H.; LILLEY, T.H.; HASLAM, E.J. Polyphenol interactions. I: Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. **J. Chem. Soc. Perk. Trans. II**, v. 9, p. 1429-1438, 1985.

MENEZES, E.W.; MELO, A.T.; LIMA, G.H.; LAJOLO, F.M. Measurement of carbohydrate components and their impact on energy value of foods. **J. Food Compos. Anal.**, v. 17, p. 331 –338, 2004.

MERTENS-TALCOTT SU, LEE JH, SUSAN S. PERCIVAL SS, TALCOTT ST:  
Induction of Cell Death in Caco-2 Human Colon Carcinoma Cells by Ellagic

Acid Rich Fractions from Muscadine Grapes (*Vitis rotundifolia*). **J Agric Food Chem.**, Columbus, v. 54, p. 5336 -5343, 2006.

MEYERS, K.J.; WATKINS, C.B.; PRITTS, M.P.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 6887-6892, 2003.

MILLER, H.E. A simplified method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 48, p. 91, 1971.

MULLEN, W.; MCGINN, J.; LEAN, M.E.J.; MACLEAN, M.R.; GARDNER, P.; DUTHIE, G.G.; YOKOTA, T.; CROZIER, A. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 50, p. 5191-5196, 2002b.

MULLEN, W.; STEWART, A.J.; LEAN, M.E.J.; GARDNER, P.; DUTHIE, G.G.; CROZIER, A. Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 50, p. 5197-5201, 2002a.

MULLEN, W.; YOKOTA, T.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MS<sup>n</sup>. **Phytochem.**, Oxford, v. 64, p. 617-624, 2003.

NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; MIYAKE, N.; KOHNO, H.; OSAWA, T. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 51, p. 3309-3312, 2003.

NÖTHLINGS, U., SCHULZE, M.B., WEIKERT, C., BOEING, H., VAN DER SCHOUW, Y.T., BAMIA, C., BENETOU, V., LAGIOU, P., KROGH, V., BEULENS, J.W.J., PEETERS, P.H.M., HALKJÆR, J., TJØNNELAND, A., TUMINO, R., PANICO, S., MASALA, G., CLAVEL-CHAPELON, F., DE LAUZON, B., BOUTRON-ROUAULT, M.C., VERCAMBRE, M.N., KAAKS, R., LINSEISEN, J., OVERVAD, K., ARRIOLA, L., ARDANAZ, E., GONZALEZ, C.A., TORMO, M.J., BINGHAM, S., KHAW, K.T., KEY, T.J.A., VINEIS, P., RIBOLI, E., FERRARI, P., BOFFETTA, P., BUENO-DE-MESQUITA, H.B., VAN DER A, D.L., BERGLUND, G., WIRFÄLT, E., HALLMANS, G., JOHANSSON, I., LUND, E., TRICHOPOULO, A. Intake of Vegetables, Legumes, and Fruit, and Risk for All-Cause, Cardiovascular, and Cancer Mortality in a European Diabetic Population. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 138, p. 775-781, 2008.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T. HATANO, T. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. **Planta Medica**, v. 55, p. 117-122, 1989.

OLSSON, M.E., GUSTAVSSON, K.E., ANDERSSON, S., NILSSON, A., DUAN, R.D. Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 52, p. 7264–7271, 2004.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

PANTUCK AJ, LEPPERT JT, ZOMORODIAN N, ARONSON W, HONG. J, BARNARD RJ, SEERAM N, LIKER H, WANG H, ELASHOFF R, HEBER D, AVIRAM M, IGNARRO L, BELLDEGRUN A: Phase II Study of Pomegranate Juice for Men with Rising Prostate-Specific Antigen following Surgery or Radiation for Prostate Cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, p. 4018-4026, 2006.

- PAPADOPOULOU, A; GREEN, R. J.; FRAZIER, R. A. Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 53, p. 158–163, 2005.
- PASCAL, G. Functional foods in the European Union. **Nutr. Rev.**, New York, v. 54, p. 29-32, 1996.
- PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutr. Rev.**, New York, v. 18, p. 1995-2018, 1998a.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- PINTO, M.S.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). **Food Chem.**, Oxford, v. 107, p. 1629-1635, 2008a.
- PINTO, M.S., KWON, Y-I., APOSTOLIDIS, E., LAJOLO, F.M., GENOVESE, M.I., SHETTY, K. Functionality of bioactive compounds of Brazilian strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars: Evaluation of hyperglycemia and hypertension potential. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 56, p. 4386-4392, 2008b.
- PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 53, p. 4290-4302, 2005.
- PRIYADARSINI, K.I.; KHOPDE, S.M.; KUMAR, S.S.; MOHAN, H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 50, p. 2200-2206, 2002.

- PULS, W., KEUP, U., KRAUSE, H., THOMAS, P.G., HOFFMEISTER, F. Glucosidase inhibition: a new approach to the treatment of diabetes, obesity, and hyperlipoproteinemia. **Naturwissenschaften**, v. 64, p. 536-537, 1977.
- REED, J.D.; HORVATH, P. J.; ALLEN, M.S.; VAN SOEST, P.J. Gravimetric determination of soluble phenolics including tannins from leaves by precipitation with trivalent ytterbium. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v. 36, n. 4 , p. 255 – 261, 1985.
- RIEDL, K. M.; HAGERMAN, A. E. Tannin-Protein Complexes as Radical Scavengers and Radical Sinks. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 49, p. 4917-4923, 2001.
- RIIHIMÄKI, L.H.; VAINIO, M.J.; HEIKURA, J.M.; VALKONEN, K.H.; VIRTANEN, V.T.; VUORELA, P.M. Binding of phenolic compounds and their derivatives to bovine and reindeer beta-lactoglobulin. **J Agric Food Chem.**, Columbus, v. 56, p. 7721-9, 2008.
- RIZZOLO, A., FORNI, E., POLESELLO, A. HPLC assay of ascorbic acid in fresh and Processed fruit and vegetables. **Food Chem.**, Oxford, v. 14, p. 189-199, 1984.
- ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chem.**, Oxford, v. 66, p. 401-436, 1999.
- ROSS, H.A., MCDUGALL, G.J., STEWART, D. Antiproliferative activity is predominantly associated with ellagitannins in raspberry extracts. **Phytochem.**, v. 68, p. 218–228, 2007.
- SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds –

nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v. 80, p. 1094-1117, 2000.

SARMA, A.D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. **Phytochem.**, Oxford, v. 45, p. 671-674, 1997.

SAURA-CALIXTO, F. Evolución del concepto de fibra. In **Carbohidratos en Alimentos Regionales Iberoamericanos**, Lajolo, F.M.; Menezes, E.W. (Ed.), Brasil, São Paulo, p. 235-253, 2006.

SAURA-CALIXTO, F.; GARCÍA-ALONSO, A.; GOÑI, I.; BRAVO, L. In Vitro Determination of the Indigestible Fraction in Foods: An Alternative to Dietary Fiber Analysis. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 48, n. 8, p. 3342 -3347, 2000.

SCHMIDT, B.M., ERDMAN, J.W., LILA, M.A. Differential effects of blueberry proanthocyanidins on androgen sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 231, p. 240–246, 2005.

SEERAM, N.P.; LEE, R.; HARDY, M., HEBER, D. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. **Separation and Purification Technology**, v. 41, p. 49-55, 2004.

SEERAM, N.P.; LEE, R.; HEBER, D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. **Clin. Chim. Acta**, v. 348, p. 63-68, 2004.

SEERAM, N.P.; HENNING, S.M.; ZHANG, Y.; SUCHARD, M.; LI, Z.; HEBER, D. Pomegranate Juice Ellagitannin Metabolites Are Present in Human Plasma and Some

Persist in Urine for Up to 48 Hours. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 136, p. 2481-2485, 2006a.

SEERAM, N.P.; LEE, R.; SCHEULLER, S.; HEBER, D. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. **Food Chem.**, Oxford, v. 97, p. 1-11, 2006b.

SEERAM, N.P. Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. **J Agr Food Chem.**, Columbus, v. 56, p. 630-635, 2008a.

SEERAM, N.P.; ZHANG, Y.; MCKEEVER, R.; HENNING, S.M.; LEE, R.P.; SUCHARD, M.A.; LI, Z.; CHEN, S.; THAMES, G.; ZERLIN, A.; NGUYEN, M.; WANG, D.; DREHER, M.; HEBER, D. Pomegranate juice and extracts provide similar levels of plasma and urinary ellagitannin metabolites in human subjects. **J. Medic. Food**, v. 11, p. 390-394, 2008b.

SETCHELL, K. D. R., BORRIELLO, S. P., HULME, P., KIRK, D. N., AXELSON, M. Non-steroidal oestrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda , v. 40, p. 569-578, 1984.

SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B.E.; BRASHEAR, W.T.; KIRSCHNER, A.S.; CASSIDY, A.; HEUBI, J.E. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 131, p. 1362-1375S, 2001.

SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.M.; NECHEMIAS, L.Z.; BRASHEAR, W.T.; WOLFE, B.E.; KIRSCHNER, A.S.; HEUBI, J.E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability . **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 76, p. 447-453, 2002.

SETCHELL, K.D.R.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 129, n. 3, p. 758-767S, 1999.

SHETTY K, WAHLQVIST ML: A model for the role of the proline-linked pentose-phosphate pathway in phenolic phytochemical bio-synthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v. 13, p. 1-24, 2004.

SHETTY, K. Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications; A review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 789-804, 2004.

SHUKITT-HALE, B., LAU, F.C., JOSEPH, J.A. Berry fruit supplementation and the aging brain. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 56, p. 636-641, 2008.

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 Enzymol.**, New York, v.299, p.152-178, 1999.

SKUPIEN, K.; OSZMIANSKI, J. Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria xananassa* Duch.) grown in northwest Poland. **Eur. Food Res. Tech.** 219: 66-70, 2004.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 15, p. 71-81, 2002.

SRINIVASAN, P.; VADHANAM, M.V.; ARIF, J.M.; GUPTA, R.C. A rapid screening assay for antioxidant potential of natural and synthetic agents *in vitro*. **Int. J. Onc.**, v. 20, p. 983-986, 2002.

- STONER, G.D.; SARDO, C.; APSELOFF, G.; MULLET, D.; WARGO, W.; POUND, V.; SINGH, A.; SANDERS, J.; AZIZ, R.; CASTO, B.; SUN, X. Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7 days. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 45, p. 1153-1164, 2005.
- SUN, J.; CHU, Y.F.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, 50: 7449-7454, 2002.
- TEEL, R.W., MARTIN, R.M. Disposition of the plant phenol ellagic acid in the mouse following oral-administration by gavage. **Xenobiotica**, v. 18, p. 397-405, 1988.
- TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; CLIFFORD, M.N. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. **J. Sc. Food Agric.**, Bognor Regis , v. 80, p. 1024-1032, 2000.
- TSUDA, T. Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. **J. Agr. Food Chem.**, Columbus, v. 56, p. 642-646, 2008.
- VATTEM, D.A. AND SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid; A Review. **J. Food Biochem.**, v. 29, p. 234-266, 2005.
- VINSON, J.A.; SU, X.; ZUBIQ, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 49, p. 5315-5321, 2001.
- VISIOLI, F.; BORSANI, L.; GALLI, C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. **Cardiovasc. Res.**, Amsterdam, v. 47, p. 419-425, 2000.

- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 44, p. 701-705, 1996.
- WANG, H.; MURPHY, P.A. Isoflavone composition of American and Japanese soybean in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 42, p. 1674-1677, 1994.
- WANG, S.Y.; JIAO, H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 48, p. 5677-5684, 2000.
- WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 48, p. 140-146, 2000.
- WANG, S.Y.; ZHENG, W. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 49, p. 4977-4982, 2001.
- WILSON, T.C.; HAGERMAN, A.E. Quantitative determination of ellagic acid. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 38, p. 1678-1683, 1990.
- WORTHINGTON, V. ed.: Alpha amylase. In: Worthington Enzyme Manual, Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ, p. 36-41, 1993.
- WORTHINGTON, V. ed.: Maltase- $\alpha$ -glucosidase. In: Worthington Enzyme Manual, Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ, p. 261, 1993.
- XU X., HARRIS K. S., WANG H.-J., MURPHY P. A., HENDRICH S. Bioavailability of

soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. **J. Nutr.**, Bethesda , v. 125, p. 2307-2315,1995.

YANISHILIEVA, N.V.I., MARINOVA, E. M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chem.**, Oxford, v. 54, p. 377-382, 1995.

YI, W., FISCHER, J., KREWER, G., CASIMIR, C., AKOH, Y. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 53, p. 7320–7329, 2005.

YOSHIZAWA, Y., KAWAI, S., URASHIMA, M., FUKASE, T., SATO, T., TANAKA, R., MUROFUSHI, N., NISHIMURA, H. Antiproliferative effects of small fruit juices on several cancer cell lines. **Anticancer Res.**, v. 20, p. 4285–4289, 2000.

ZHANG, Y.; WANG, G.J.; SONG, T.T.; MURPHY, P.A.; HENDRICH, S. Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein differs among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 129, n. 5, p. 957-962, 1999.

## **7. ANEXOS**