



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

JOSÉ JOAQUIM LOPES NETO

BIOACCESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS
DE SEMENTES DE *Triplaris gardneriana* Wedd (POLYGONACEAE)

FORTALEZA

2017

JOSÉ JOAQUIM LOPES NETO

BIOACCESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE
SEMENTES DE *Triplaris gardneriana* Wedd (POLYGONACEAE)

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L853b Lopes Neto, José Joaquim.
Bioacessibilidade e Biodisponibilidade de Compostos Fenólicos de Sementes de *Triplaris gardneriana* Wedd (POLYGONACEAE) / José Joaquim Lopes Neto. – 2017.
95 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho.

Coorientação: Prof. Dr. Davi Felipe Farias.

1. Digestão in vitro. 2. Estudo in vivo. 3. UPLC-QTOF. 4. Farmacocinética. I. Título.

CDD 572

JOSÉ JOAQUIM LOPES NETO

BIOACCESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE
SEMENTES DE *Triplaris gardneriana* Wedd (POLYGONACEAE)

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará(UFC)

Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas
Universidade Federal do Ceará(UFC)

Dr. Edy Sousa de Brito
Embrapa Agroindústria Tropical

A todos aqueles que compartilharam comigo
os seus bons sentimentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador do universo, por nos dar coragem para questionar realidades, transpor obstáculos e construir um mundo cheio de possibilidades.

Aos meus pais Francisco e Osmarina Lopes, pelo amor a mim conferido e por me mostrarem que com educação e humildade um horizonte superior cheio de realizações tanto pessoais quanto profissionais pode ser alcançado.

A minha orientadora Profa Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho, por me acompanhar durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pelos ensinamentos, pela paciência e confiança nas minhas atividades. Seu ígneo entusiasmo tem me inspirado na busca pelo amadurecimento do pensamento crítico e na excelência em ciência.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Davi Felipe Farias, com quem partilhei o que era simplesmente ideia e que agora veio a ser este trabalho. A finalização desta jornada não seria possível sem o seu apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica na pessoa do coordenador Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha, representando todos os docentes e colaboradores que contribuíram para o fechamento deste ciclo acadêmico.

A Embrapa Agroindústria Tropical, em especial, ao Prof. Dr. Edy Sousa de Brito e sua equipe técnica, principalmente aos que me auxiliaram na concepção deste trabalho, Paulo Riceli e Isabel Maia.

A Profa Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas, por sua agradável convivência desde a época da disciplina de Estágio de Docência e por gentilmente aceitar o convite de compor a banca examinadora deste trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais: Igor Pessoa, Fernanda Maia, Paulo Ricardo, Nayana Gomes, João Carlos, Gabriela de Lima, Cláudio Dahne, Wendell Cavalcante, Profa. Dra. Érika Mota, Chayenne Sá, Jackeline Medeiros, Lady Clarissa, Nathanna Matheus, Gabrielle de Paula, Leonardo Vieira, Luiz Carlos, Thaís Borges, Pedro Matheus, Emanuel Francelino e Thiago Almeida. Pessoas com personalidades distintas, mas com qualidades admiráveis que iluminaram de maneira tão singular os meus pensamentos e ações, tornando-me capaz de concretizar esta etapa especial da minha vida.

A Berenice Alves e José Valdenor, por sua amizade e por proporcionarem a mim um ambiente de trabalho harmonioso.

A Edilberto Cordeiro, Djany Souza, Fernando Barros e mais recentemente a Aurélia Oliveira, por serem minha “família” aqui no Ceará e por fazerem do apartamento 702 um lugar acolhedor e saudável de se viver. Muitíssimo obrigado a cada um de vocês.

A amiga Profa. Dra. Maria do Livramento de Paula, por ter me acompanhado ao longo da graduação e pelo auxílio durante a minha transferência de residência do Maranhão para o Ceará.

Aos meus queridos amigos, antes colegas do curso de graduação em Farmácia da Universidade Federal do Maranhão, agora os melhores farmacêuticos que conheço, que apesar da distância, não se fizeram ausentes. Grato pela energia positiva que emana de vocês, James Diniz, Carliane Rosa, Hugo Leonardo, Tássio Rômulo, Priscila Rodrigues, Kleyton Veras, Jéssyca Wan-Lume, Larissa Carvalhêdo, Gizele Oliveira, Simone Bom Jardim, Talison Taylon, Marina Cristine e Erisangela Valentim.

Aos amigos de toda uma vida Íkaro Matheus, Wilson Júnior, Pauline Nadler, Rhuana Drielly, Ítalo Bruno, Ana Karoline, Mikaellen Silva, Larissa Catarino e Matheus Gomes, pelo apoio em todas as ocasiões e por nunca deixarem de acreditar do meu potencial.

A todos as pessoas que cruzaram o meu caminho, ensinaram-me virtudes e contribuíram significativamente para que este momento se realizasse.

**ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXÍLIO DOS
SEGUINTESE UNIDADESE INSTITUIÇÕES**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará;

Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais, Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará;

Laboratório Multiusuário de Química e Produtos Naturais, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará.

“Não chores, meu filho;
Não chores, que a vida
É luta renhida:
Viver é lutar.
A vida é combate,
Que os fracos abate,
Que os fortes, os bravos
Só pode exaltar.”

Antônio Gonçalves Dias

RESUMO

Triplaris gardneriana Wedd é uma espécie vegetal do semiárido brasileiro com sementes ricas em compostos fenólicos e alta capacidade antioxidante. O consumo de frutas e vegetais tem sido associado à baixa incidência de doenças crônicas causadas por estresse oxidativo. Dentre os componentes alimentares capazes de combater o excesso de radicais livres, os compostos fenólicos, de caráter antioxidante, têm sido bastante estudados. Contudo, a quantidade total destas substâncias presente nos alimentos não reflete necessariamente a porção bioativa absorvida e metabolizada pelo organismo. Neste contexto, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de um extrato etanólico obtido a partir das sementes de *T. gardneriana* (EETg), e a partir deste, caracterizar sua composição fenólica, avaliar sua atividade antioxidante através de diferentes metodologias, além de investigar a bioacessibilidade *in vitro* dos polifenóis presentes em EETg após digestão gastrointestinal simulada e estimar a biodisponibilidade indireta dos mesmos a partir da análise química do plasma e urina em roedores após sua administração oral. Em linhas gerais, EETg apresentou níveis de atividade antioxidante pelos ensaios DPPH, ABTS⁺, FRAP e TBARS comparáveis àqueles descritos na literatura especializada. Os índices de bioacessibilidade de compostos fenólicos em EETg foram de 48,65 e 69,28% na presença e ausência de enzimas, respectivamente. Dentre as classes fenólicas identificadas, os flavonoides, representados por procianidinas acrescidas de grupos galoil, mostraram-se mais bioacessíveis (81,48 e 96,29% na fase pós-intestinal com e sem enzimas, respectivamente). A administração oral de EETg em ratos Wistar resultou em uma significativa diminuição da capacidade antioxidante total (CAT) do plasma pelo ensaio FRAP 4 h após o início do experimento. Para as amostras de urina, um aumento na CAT pelos testes DPPH e FRAP foi observado a partir de 1 e 4 h após a administração, respectivamente. Análises por UPLC-QTOF da urina detectou 2 metabólitos oriundos da degradação de compostos fenólicos: ácido hipúrico e fenilacetil glicina. Estes resultados sugerem que os compostos fenólicos de *T. gardneriana*, apesar do seu potencial antioxidante, são instáveis em condições gastrointestinais, sendo flavonoides os componentes com maior bioacessibilidade. Além disto, mostraram biodisponibilidade limitada devido à sua rápida biotransformação e eliminação urinária.

Palavras-chave: Digestão *in vitro*. Estudo *in vivo*. UPLC-QTOF. Farmacocinética.

ABSTRACT

Triplaris gardneriana Wedd is a plant species from Brazilian semiarid region with seeds rich in phenolic compounds and high antioxidant capacity. The consumption of fruits and vegetables has been associated to low incidence of chronic diseases caused by oxidative stress. Among the food components capable of combating excess free radicals are the phenolic compounds, with antioxidant capacity, which have been extensively studied. However, the total quantity of these substances present in foods does not necessarily reflect the bioactive amount absorbed and metabolized by the body. In this context, the present work aimed the development of an ethanolic extract obtained from the seeds of *T. gardneriana* (EETg), and from this, to evaluate its antioxidant activity through different methodologies, to investigate the bioaccessibility of EETg by determination of phenolic composition before and after *in vitro* digestion as well as to estimate its indirect bioavailability by chemical analysis of plasma and urine in rodents after oral administration. In general, EETg presented levels of antioxidant activity by DPPH, ABTS^{•+}, FRAP and TBARS tests comparable to those described in specialized literature. The bioaccessibility indexes of phenolic compounds in EETg were 48.65 and 69.28% in the presence and absence of enzymes, respectively. Among the identified phenolics classes, flavonoids, represented by galloylated procyanidins, proved to be more bioaccessible (81.48 and 96.29% in the post-intestinal phase with and without enzymes, respectively). The oral administration in Wistar rats resulted in a significant decrease in plasma total antioxidant capacity (TAC) by FRAP assay 4 h after beginning the experiment. As to urine analysis, an increase in TAC by DPPH and FRAP was observed from 1 and 4 h after administration, respectively. UPLC-QTOF analysis of urine detected 2 metabolites originated from the degradation of phenolic compounds: hippuric acid and phenylacetyl glycine. These results suggest that phenolic compounds in *T. gardneriana*, despite their antioxidant potential, are unstable under gastrointestinal conditions, being flavonoids the components with higher bioaccessibility; besides that, they showed limited bioavailability due to their rapid biotransformation and urinary elimination.

Keywords: *In vitro* digestion. *In vivo* study. UPLC-QTOF analysis. Pharmacokinetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Micrografia eletrônica de eritrócitos humanos sob condições de equilíbrio redox e de estresse oxidativo..... 22
- Figura 2 – Classificação dos compostos fenólicos presentes na dieta humana com destaque para seus esqueletos carbonados..... 25
- Figura 3 – Estrutura geral dos ácidos fenólicos..... 26
- Figura 4 – Estrutura básica das diversas classes de flavonoides com base no grau de oxidação do anel pirano..... 27
- Figura 5 – Estrutura geral de outros compostos fenólicos encontrados nas dietas humanas: estilbenos e lignanas..... 28
- Figura 6 – Principais vias de ramificação na biossíntese de compostos fenólicos em vegetais..... 29
- Figura 7 – Características estruturais definem a ação antioxidante dos compostos fenólicos..... 30
- Figura 8 – Bioacessibilidade de compostos fenólicos..... 31
- Figura 9 – Número de estudos na base de dados Scopus encontrado para as palavras-chave "compostos fenólicos e biodisponibilidade" em março de 2015..... 32
- Figura 10 – Principais metodologias utilizadas na avaliação da bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos..... 33
- Figura 11 – Metabolismo de compostos fenólicos no sistema digestivo humano..... 36
- Figura 12 – Fotografias de *Triplaris gardneriana* Wedd..... 38
- Figura 13 – Atividades previstas para o desenvolvimento do estudo subdivididas em

	quatro etapas.....	44
Figura 14 –	Mapa ilustrativo da localização da cidade de Tamboril em relação ao Estado do Ceará e ao Brasil.....	45
Figura 15 –	Perfil UPLC-QTOF de compostos fenólicos presentes no extrato das sementes de <i>Triplaris gardneriana</i>	63
Figura 16 –	Estruturas químicas de compostos fenólicos identificados por UPLC-QTOF no extrato etanólico das sementes de <i>Triplaris gardneriana</i>	66
Figura 17 –	Capacidade antioxidante total (CAT) do plasma e urina de ratos Wistar após administração oral de extrato de sementes de <i>Triplaris gardneriana</i> (EETg) avaliada pelos ensaios DPPH e FRAP.....	70
Figura 18 –	Representação esquemática envolvendo o catabolismo de catequina por bactérias colônicas e enzimas hepáticas e sua subsequente excreção urinária sob a forma de ácido hipúrico.....	75
Figura 19 –	Rota proposta para o catabolismo de flavonoides exemplificado pela quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo resultando na produção de diferentes formas do ácido fenilacético antes de sua conjugação com a glicina e posterior excreção urinária.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Propriedades terapêuticas atribuídas à utilização de <i>Triplaris gardneriana</i> Wedd.....	39
Tabela 2 –	Atividades biológicas e farmacológicas encontradas na literatura para <i>Triplaris gardneriana</i> Wedd.....	40
Tabela 3 –	Rendimento do extrato das sementes de <i>Triplaris gardneriana</i>	54
Tabela 4 –	Caracterização fitoquímica qualitativa do extrato das sementes de <i>Triplaris gardneriana</i>	55
Tabela 5 –	Polifenóis e flavonoides totais do extrato das sementes de <i>Triplaris gardneriana</i>	56
Tabela 6 –	Atividade antioxidante do extrato etanólico das sementes de <i>Triplaris gardneriana</i> a partir de diferentes metodologias.....	57
Tabela 7 –	Polifenóis totais, flavonoides totais, atividades antioxidantes e índices de bioacessibilidade nos sobrenadantes antes e após digestão gastrointestinal simulada.....	59
Tabela 8 –	Compostos fitoquímicos detectados no extrato das sementes de <i>Triplaris gardneriana</i> (EETg) via UPLC-QTOF em modos de ionização positivo e negativo.....	64
Tabela 9 –	Compostos fitoquímicos detectados via UPLC-QTOF em modos de ionização positivo e negativo no extrato das sementes de <i>Triplaris gardneriana</i> (EETg) após digestão <i>in vitro</i>	68
Tabela 10 –	Metabólitos excretados pela urina 0-8 h após a administração do extrato das sementes de <i>Triplaris gardneriana</i> (EETg) em 24 ratos Wistar machos.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	absorbância
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico
ABTS ^{•+}	radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico
ATP	trifosfato de adenosina
BCF	bioacessibilidade de compostos fenólicos
BF	bioacessibilidade de flavonoides
BIOCEN-UFC	Biotério Central da Universidade Federal do Ceará
Caco-2	<i>caucasian colon adenocarcinoma cell line</i>
CAT	capacidade antioxidante total
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CEUA/UFC	Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará
CI ₅₀	concentração necessária para inibir em 50%
CN ₅₀	concentração necessária para neutralizar em 50%
CTE	cadeia transportadora de elétrons
Da	Dalton
DPPH	radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EETg	extrato etanólico das sementes de <i>Triplaris gardneriana</i>
ERCl	espécie reativa de cloro
ERN	espécie reativa de nitrogênio
ERO	espécie reativa de oxigênio
ERS	espécie reativa de enxofre
ESI	ionização por electrospray modo negativo
ESI ⁺	ionização por electrospray modo positivo

FRAP	<i>ferric reducing antioxidant power</i>
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione
IAAB	índice de atividade antioxidante bioacessível
LC-MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
MDA	malondialdeído
MS ^E	espectrometria de massas de alta energia
N%	percentual de neutralização
pH	potencial hidrogeniônico
PTFE	politetrafluoroetileno
SOD	superóxido dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances assay</i>
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
Tr	tempo de retenção
Trolox	6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
UPLC-QTOF	<i>ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time of flight</i>
WCRF	<i>World Cancer Research Funding International</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Geração de radicais livres e seu controle em sistemas biológicos.....	20
2.2	Atividade antioxidante de produtos naturais	23
2.3	Compostos fenólicos: definição e classificação	24
2.4	Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos	30
2.5	<i>Triplaris gardneriana</i> Wedd.....	36
3	OBJETIVOS.....	42
3.1	Objetivo geral	42
3.2	Objetivos específicos	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	Reagentes	43
4.2	Animais	43
4.3	Desenho experimental.....	43
4.4	Coleta e preparação do extrato.....	45
4.4.1	<i>Prospecção fitoquímica</i>	46
4.4.2	<i>Determinação de polifenóis totais</i>	46
4.4.3	<i>Determinação de flavonoides totais</i>	47
4.4.4	<i>Identificação de compostos fenólicos por UPLC-QTOF</i>	47
4.5	Ensaio de atividade antioxidante	48
4.5.1	<i>Ensaio do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)</i>	48
4.5.2	<i>Ensaio do radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico (ABTS.+)</i> ...	49
4.5.3	<i>Ensaio do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)</i>	49
4.5.4	<i>Ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	50
4.6	Bioacessibilidade de compostos fenólicos <i>in vitro</i>	50

4.6.1 <i>Digestão gastrointestinal simulada</i>	50
4.6.2 <i>Quantificação e identificação de compostos fenólicos após digestão</i>	51
4.6.3 <i>Índices de bioacessibilidade</i>	51
4.7 Bioacessibilidade de compostos fenólicos <i>in vivo</i>	52
4.7.1 <i>Procedimento experimental</i>	52
4.7.2 <i>Identificação compostos fenólicos e determinação da capacidade antioxidante total em fluidos biológicos</i>	53
4.8 Análises estatísticas	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Caracterização fitoquímica	54
5.1.1 <i>Rendimento e prospecção fitoquímica</i>	54
5.1.2 <i>Concentração de polifenóis e flavonoides totais</i>	55
5.2 Avaliação da atividade antioxidante	56
5.3 Bioacessibilidade <i>in vitro</i> de compostos fenólicos após digestão simulada	58
5.3.1 <i>Perfil de compostos fenólicos antes e após digestão in vitro.</i>	62
5.4 Biodisponibilidade de compostos fenólicos em ratos	70
6 CONCLUSÃO	79
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos são os metabólitos secundários mais amplamente distribuídos no reino vegetal. Seu potencial bioativo mais estudado corresponde à atividade antioxidante, que por sua vez, está associada à redução na incidência de várias doenças humanas. Entretanto, a quantidade total dessas substâncias em alimentos e preparações medicinais não reflete a porção absorvida e metabolizada pelo corpo (SAURA-CALIXTO, 2011).

Matrizes fenólicas com pronunciada atividade antioxidante *in vitro* podem não apresentar a mesma eficácia quando estudos *in vivo* são realizados. A possível eficácia dos compostos fenólicos, no corpo humano, por exemplo, é grandemente determinada pela bioacessibilidade (liberação da matriz e sua estabilidade durante o processo digestivo) e biodisponibilidade dessas moléculas bioativas (fração do composto ingerido que, através da circulação sistêmica, alcança específicos alvos) (MARTINS; BARROS; PEREIRA, 2016).

Pesquisas relacionadas à bioacessibilidade e à biodisponibilidade de compostos fenólicos em matrizes sólidas a partir de abordagens *in vitro* e *in vivo*, assim como em técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), têm contribuído para um melhor entendimento da eficiência na digestão gastrointestinal, absorção e metabolismo desses fitoquímicos (GLEICHENHAGEN; SCHIEBER, 2016). Por exemplo, modelos de digestão *in vitro* baseados na fisiologia humana são amplamente utilizados para estudo de mudanças estruturais, digestibilidade e liberação de componentes alimentares sob condições gastrointestinais simuladas. Metodologias *in vivo* de biodisponibilidade incluem estudos animais onde a cinética e a extensão da absorção são mensuradas pelas concentrações plasmáticas e/ou urinárias em adultos após a ingestão de uma única dose de compostos fenólicos, sob a forma purificada, inserida em extratos vegetais ou alimentos/bebidas ricos em tais substâncias (SANTOS et al., 2014).

Dentre as espécies vegetais selvagens e ricas em compostos fenólicos, está a *Triplaris gardneriana* Wedd (Polygonaceae), que ocorre naturalmente em várias regiões do Brasil, sendo utilizada em arborização urbana e apresentando grande importância etnomedicinal (LUCENA et al., 2007). Apesar das informações já conhecidas a respeito de *T. gardneriana*, poucos trabalhos científicos tratam da caracterização fitoquímica, além de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, uma vez que, para a sua utilização medicinal, estudos adicionais são requeridos para provar possíveis atividades e estabelecer sua ação no organismo dos indivíduos que a consumirem (LAPA et al., 2007).

A fim de promover a bioprospecção e a utilização racional e segura de recursos naturais locais, estudo prévio do nosso grupo com *T. gardneriana* apontou como promissor o potencial antioxidante dessa espécie vegetal (FARIAS et al., 2013; MACÊDO et al., 2015). Além disso, o nosso grupo de pesquisa tem conduzido trabalhos que visam caracterizar, tanto do ponto de vista químico quanto biológico, os extratos obtidos a partir de *T. gardneriana*. Nesse contexto, o presente estudo objetivou estabelecer o perfil de compostos fenólicos e o potencial antioxidante do extrato etanólico proveniente das sementes de *T. gardneriana*, bem como investigar a bioacessibilidade *in vitro* de tais compostos durante digestão gastrointestinal simulada e, em seguida, estimar indiretamente a biodisponibilidade dos mesmos após administração em modelo animal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Geração de radicais livres e seu controle em sistemas biológicos

Mitocôndrias são organelas dinâmicas encontradas no citoplasma de células eucarióticas. São responsáveis por uma gama de funções, dentre as quais se destacam: a degradação e síntese de metabólitos e a geração de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP), através da fosforilação oxidativa e da cadeia transportadora de elétrons (CTE) (BIRCH-MACHIN; BOWMAN, 2016). Sob condições aeróbias, mais de 90% do oxigênio consumido é reduzido diretamente à água pela enzima citocromo oxidase na CTE. No entanto, menos de 10% do oxigênio que se consome são convertidos em espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical peroxila (RO_2^{\cdot}) e o radical hidroxila ($\cdot OH$), subprodutos naturais do metabolismo mitocondrial (DAIBER, 2010; VENDITTI; DI STEFANO; DI MEO, 2013).

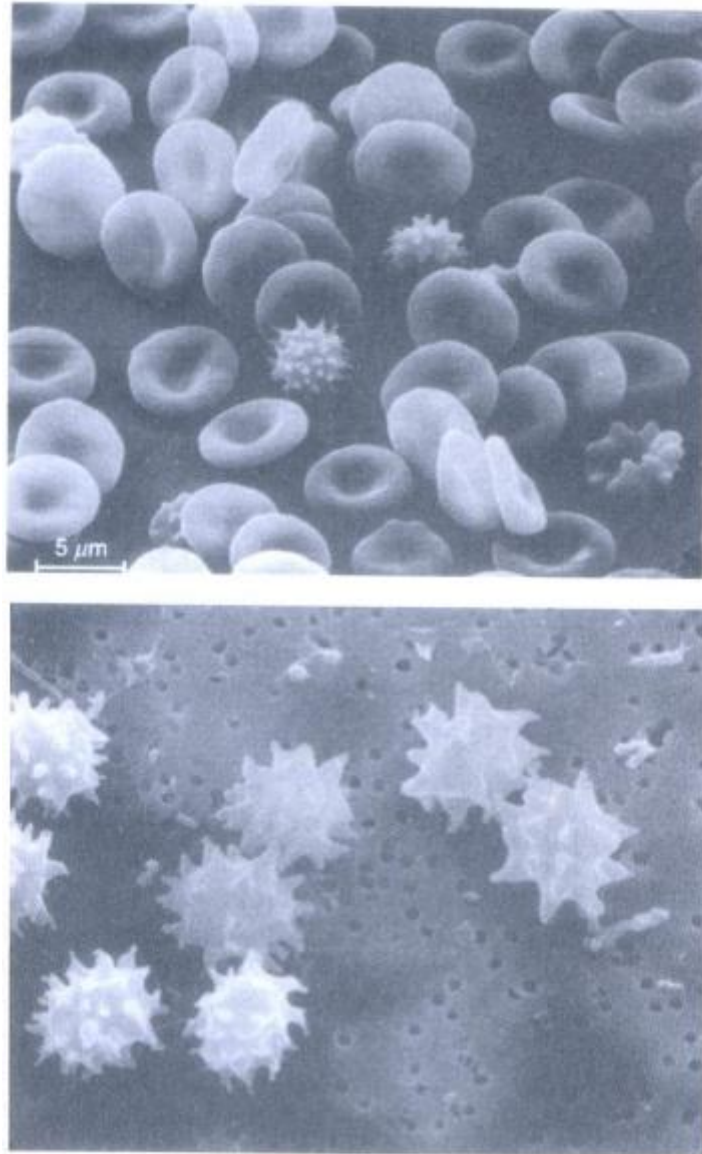
Espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), de enxofre (ERS), de cloro (ERCl), entre outras, genericamente tratadas como radicais livres, correspondem a átomos ou moléculas altamente instáveis e reativos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada eletrônica mais externa (VASCONCELOS et al., 2007). Sua produção é observada em diversas condições fisiológicas: contração muscular; inflamação mediada por neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, além da regulação do crescimento e sinalização celulares. Contudo, sua função nociva reside na ação oxidativa sobre lipídios de membranas, proteínas e ácidos nucleicos (DRÖGE, 2002; ABRAHÃO et al., 2010). Similarmente, fontes exógenas tais como luz ultravioleta, radiações ionizantes e poluição ambiental, assim como fatores relacionados ao estilo de vida humana, onde é conveniente citar a prática de exercícios físicos, o consumo de bebidas alcoólicas e o tabagismo contribuem para a formação de radicais livres (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006; DARVIN et al., 2008; RAO et al., 2011).

Para se defender da ação deletéria dos radicais livres oxigenados e outros oxidantes, as células desenvolveram um sistema de defesa antioxidante bem integrado, incluindo componentes enzimáticos e não-enzimáticos. Superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase são as enzimas frequentemente mencionadas na literatura (DURACKOVA, 2010). SOD catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2); catalase atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O e a glutatona peroxidase (GPx) opera sobre peróxidos em geral, com

utilização de glutathione como cofator (CAITO; ASCHNER, 2015). Dentre os componentes não-enzimáticos com ação protetora, destacam-se moléculas de baixa massa molecular como a glutathione (GSH), principal antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e carotenoides evitando a oxidação de macromoléculas e/ou atuando como agentes redutores de metais de transição; esses últimos são potenciais formadores de espécies reativas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O sistema não-enzimático conta ainda com a participação de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte de ferro) e ceruloplasmina (transporte de cobre) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Compostos fenólicos provenientes de vegetais também têm desempenhado um papel antioxidante em sistemas biológicos, como demonstrado por estudos em animais e humanos (GUO et al., 2003). De modo geral, o sistema antioxidante enzimático e a glutathione estão presentes, predominantemente, no meio intracelular. Por outro lado, o sistema não enzimático localiza-se, principalmente, no meio extracelular (VALKO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

Disfunções celulares ocasionadas por anormalidades no sistema antioxidante encontram-se associadas ao aumento intracelular dos níveis de espécies reativas. Esse fenômeno induz mudanças no balanço redox (redução-oxidação) de sistemas biológicos, levando o organismo a um quadro de estresse oxidativo. Esse, por sua vez, é capaz de provocar efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA; modificando assim a fisiologia e a arquitetura das células (BOLTON et al., 2000; WALLACE; FAN; PROCACCIO, 2010; ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011). Os eritrócitos, por exemplo, são células sanguíneas anucleares, em formato de disco bicôncavo e sem mitocôndrias. Sob condições de estresse oxidativo, deformações nas suas membranas decorrentes da peroxidação de lipídios e danos às proteínas transformam os eritrócitos normais em equinócitos, células hemáticas caracterizadas pela presença de espículos e rigidez membranares, além de reduzida capacidade de transporte de oxigênio (Figura 1) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Figura 1 – Micrografia eletrônica de eritrócitos humanos sob condições de equilíbrio redox (acima) e de estresse oxidativo (abaixo). A membrana dos eritrócitos é composta por 44% de lipídios, 49% de proteínas e 7% de carboidratos. Danos às proteínas e lipídios mediados por peróxidos ocasionam mudanças morfológicas nos eritrócitos, transformando-os em equinócitos



Fonte: Halliwell e Gutteridge(2007)

Pesquisas apontam que o estresse oxidativo está diretamente relacionado aos processos de envelhecimento, transformação e morte celulares, com consequências diretas em muitos processos patológicos, entre eles, indução de câncer, bem como na fisiopatologia de uma ampla variedade de doenças de ordens degenerativas e metabólicas, tais como Alzheimer, Parkinson, diabetes, cardiopatias, dislipidemias e intoxicação por xenobióticos (INDO et al., 2015).

2.2 Atividade antioxidante de produtos naturais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças, através da ingestão de ervas e folhas, talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização desses produtos (VIEGAS JR; BOLZANI; BARRERO, 2006). Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem estimado que 80% dos habitantes do mundo fazem uso de extratos de ervas e seus componentes ativos para atender suas necessidades primárias de cuidados em saúde, haja vista que essas preparações mostram uma diversidade de propriedades farmacológicas contra várias patologias (ARULSELVAN et al., 2016; GOTHAI et al., 2016).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que dietas ricas em frutas e verduras estão associadas a uma menor incidência de doenças crônicas e degenerativas associadas ao estresse oxidativo. De acordo com o Fundo Internacional de Pesquisa Mundial sobre o Câncer (*World Cancer Research Funding International* - WCRF), uma alimentação com grande quantidade e variedade de frutas, legumes e verduras pode prevenir 20% ou mais dos casos de câncer. Dentre os componentes alimentares capazes de combater o excesso de radicais livres, as substâncias fitoquímicas, nas quais se destacam os compostos fenólicos, compostos nitrogenados, carotenoides, ácido ascórbico e tocoferóis, vêm recebendo grande atenção por sua significativa atividade antioxidante (PISOSCHI; NEGULESCU, 2011; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

O termo antioxidante pode ser definido como uma família heterogênea de moléculas endógenas ou oriundas da dieta, que, quando em baixas concentrações, diminuem ou impedem os efeitos adversos das espécies reativas sobre a função fisiológica normal do organismo (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009). Essas substâncias exercem o seu efeito inibitório contra os processos de oxidação através de diferentes mecanismos, sendo amplamente classificados como antioxidantes primários e secundários. Os antioxidantes primários inibem a reação em cadeia da oxidação através da doação de elétrons e/ou hidrogênios, gerando espécies mais estáveis. Enquanto que, os secundários suprimem a ação de promotores de oxidação, que incluem íons metálicos, enzimas pró-oxidantes e outros oxidantes exógenos (SHAHIDI; ZHONG, 2015). A partir dessas assertivas, é possível inferir que, investigações mais apropriadas a respeito do papel dos antioxidantes na prevenção de

doenças estão baseadas na quantificação e na avaliação *in vivo* de substâncias fitoquímicas presentes nos produtos de origem vegetal (PELLEGRINI et al., 2006).

Nos últimos anos, têm-se investigado os efeitos antioxidantes dos produtos naturais em relação às enfermidades, principalmente nos países desenvolvidos do ocidente. Tanto óleos essenciais como componentes não voláteis (extratos), obtidos de plantas são estudados quanto à avaliação do seu potencial antioxidante, demonstrando alta eficiência (MORAIS et al., 2009). Além disso, subprodutos da indústria alimentícia têm sido explorados para seu uso potencial como antioxidante, tendo em vista que a substituição de antioxidantes sintéticos por naturais pode apresentar vantagens devido a implicações na área de saúde (ausência de toxicidade) e na funcionalidade (facilidade na elaboração de formulações). Benefícios também são observados quanto ao aspecto conservacionista, onde resíduos orgânicos (cascas e sementes, fontes naturais de antioxidantes, por exemplo) gerados pelas indústrias podem ser reaproveitados, evitando assim o desperdício de alimentos e a contaminação do ambiente (OLIVEIRA et al., 2009).

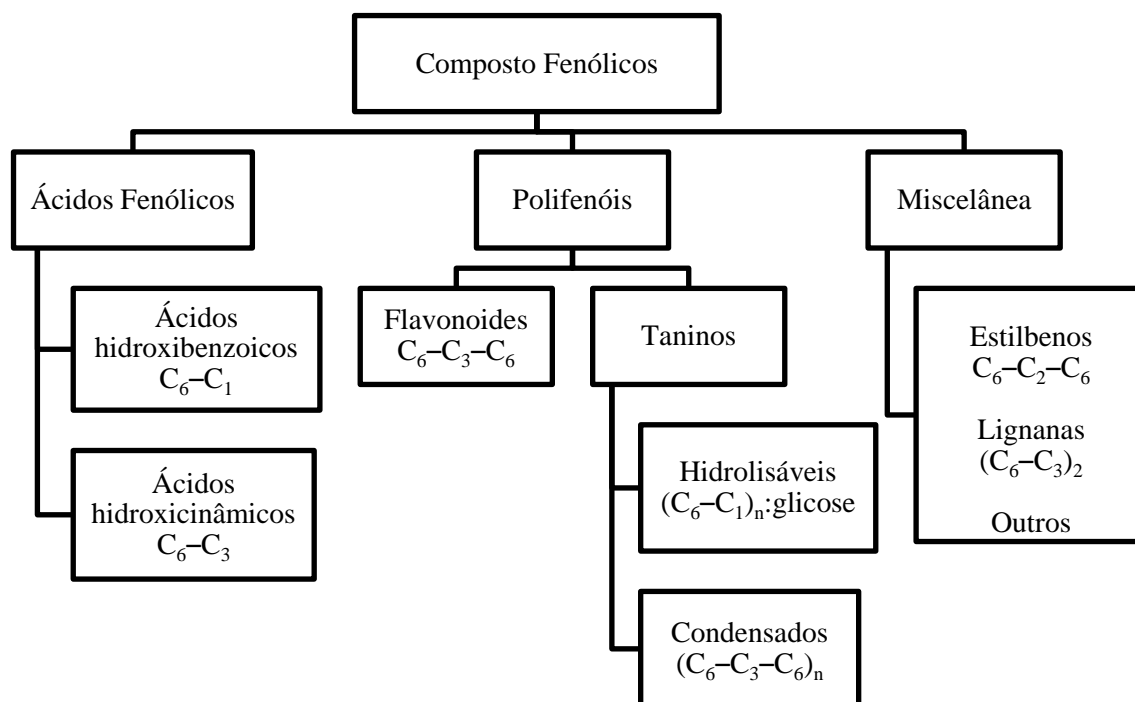
O estudo do poder antioxidante e a determinação dos ativos responsáveis por essa atividade são úteis para avaliação da eficácia e controle de qualidade dos produtos naturais, requerendo diferentes métodos analíticos, isto é, métodos colorimétricos, biológicos e eletroquímicos, entre outros métodos instrumentais. Essas metodologias diferem, fundamentalmente, no mecanismo de geração de radicais livres e/ou moléculas alvo e na maneira em que os produtos finais são mensurados (RAMADAN; KROH; MOERSEL, 2003). No caso de extratos vegetais, assim como outros produtos de composição heterogênea, as variedades de interações químicas aumentam a complexidade desses sistemas. Por exemplo, a determinação da atividade antioxidante de extratos vegetais brutos ou parcialmente purificados é geralmente associada à composição de compostos fenólicos totais (REIS et al., 2009).

2.3 Compostos fenólicos: definição e classificação

Antioxidantes de origem fenólica estão amplamente distribuídos no reino vegetal e constituem um dos mais importantes grupos de metabólitos secundários das plantas. Do ponto de vista químico, possuem pelo menos um anel aromático contendo um ou mais substituintes hidroxílicos. O termo polifenóis refere-se àqueles com mais de um anel fenólico (ANTOLOVIC et al., 2002; ROLEIRA et al., 2015).

Nos vegetais, os compostos fenólicos são de vital importância para sua interação com o meio ambiente, combate ao estresse oxidativo intracelular, regulação de crescimento e desenvolvimento de mecanismos de defesa contra a radiação ultravioleta, vírus, bactérias, fungos, insetos e herbívoros (BOUDET, 2007; KUMAR; PANDEY, 2013). Essas substâncias, devido aos seus múltiplos efeitos biológicos, tais como antioxidante, anti-inflamatório, hipolipidêmico e anticancerígeno, têm contribuído significativamente para a saúde humana (TRABELSI et al., 2013). Por conta disso, é conveniente ter conhecimento acerca dos compostos fenólicos consumidos pelos seres humanos. As principais classes de compostos fenólicos compreendem os ácidos fenólicos, os polifenóis, nos quais se destacam os flavonoides e, menos comumente, os estilbenos, as lignanas e outros fenólicos de estrutura complexa (KARAKAYA, 2004) (Figura 2).

Figura 2 –Classificação dos compostos fenólicos presentes na dieta humana com destaque para seus esqueletos carbonados

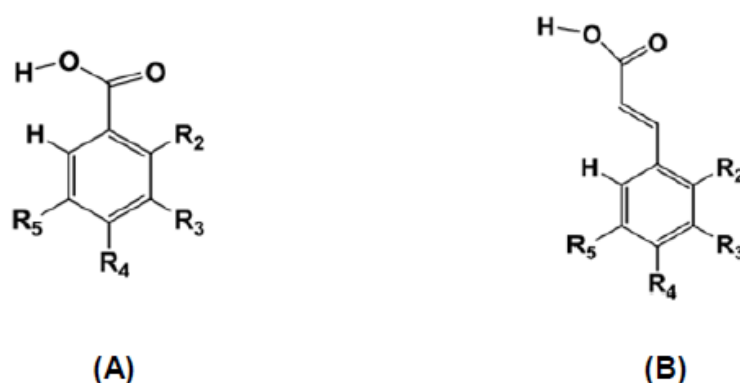


Fonte: Adaptado de Karakaya (2004)

Os ácidos fenólicos possuem um grupo funcional carboxila e são divididos em duas classes: os ácidos hidroxibenzoicos e os hidroxicinâmicos (Figura 3). Os primeiros apresentam estrutura C_6-C_1 e são menos abundantes nos vegetais consumidos pelo homem. Exemplos dessa classe compreendem os ácidos salicílico, gálico e siríngico. Os ácidos hidroxicinâmicos contêm estrutura do tipo C_6-C_3 , sendo considerados derivados hidroxilados

do ácido cinâmico. Estão presentes em vários alimentos e bebidas de origem vegetal, como maçã, café e erva mate. Exemplos de compostos hidroxicinâmicos são os ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

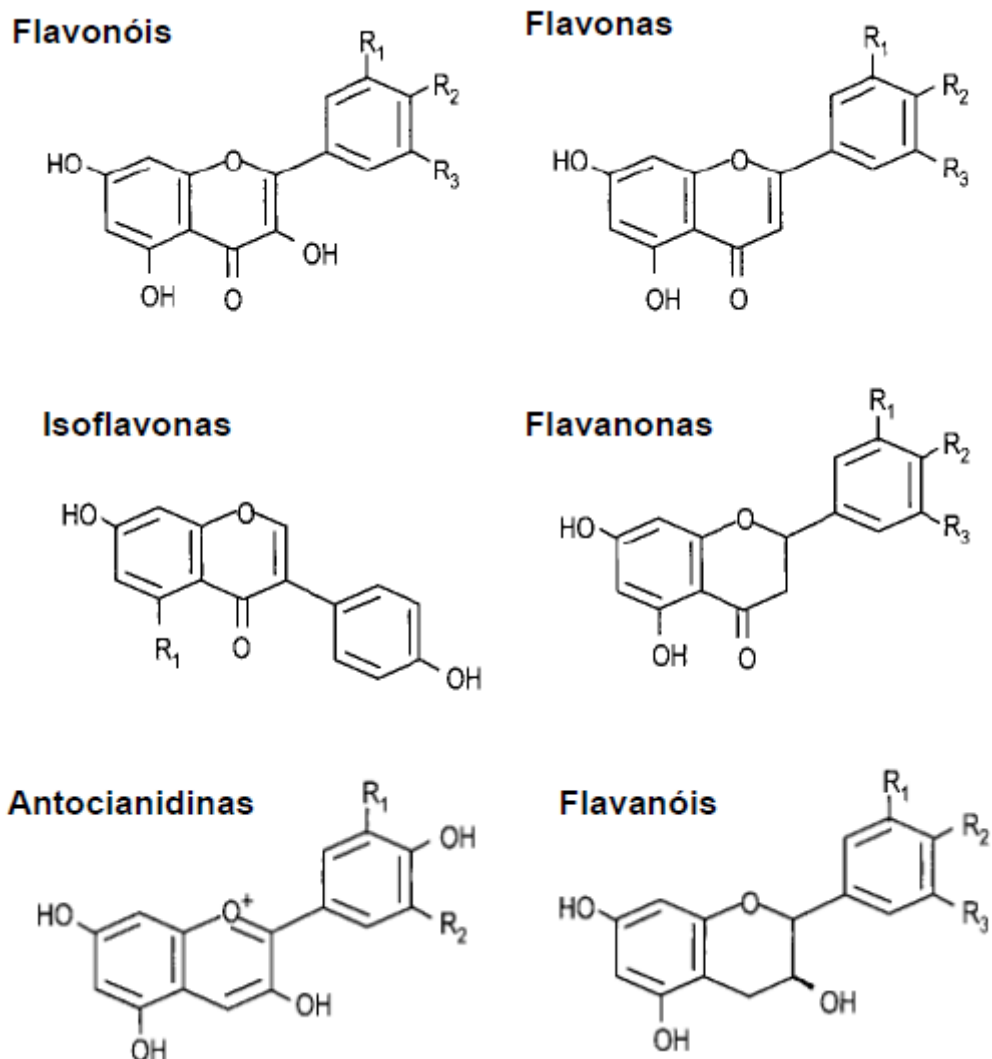
Figura 3—Estrutura geral dos ácidos fenólicos: (A) ácidos hidroxibenzóicos e (B) ácidos hidroxicinâmicos



Fonte: Pereira (2014)

Os flavonoides têm uma estrutura $C_6-C_3-C_6$ composta por dois anéis aromáticos ligados através de uma cadeia de três carbonos, normalmente organizada como um heterociclo oxigenado chamado pirano. Podem ser divididos em várias subfamílias de acordo com o grau de oxidação do pirano, sendo flavanóis, flavanonas, flavonas, flavonóis (essencialmente flavan-3-óis), isoflavonas e antocianidinas, as mais relevantes para dietas humanas (Figura 4). As fontes mais ricas em flavonoides são cebolas (até 1,2 g/kg de peso fresco), couve, alho-poró, brócolis e mirtilos (MANACH et al., 2004). Em certos casos, a polimerização de unidades fenólicas pode ocorrer em vegetais, dando origem à subclasse dos taninos, que por sua vez, são classificados em dois grupos, hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis são polímeros facilmente lisados por ácidos e bases nos seus componentes: um núcleo central constituído por um poliol (um açúcar, geralmente D-glucose) e um ácido fenólico. Já os taninos condensados, também chamados de proantocianidinas, contemplam oligômeros e polímeros de catequinas, um tipo de flavonoide. Alimentos ricos em taninos provocam sensações gustativas de adstringência resultantes de interação com proteínas presentes na saliva (AMAROWICZ, 2004).

Figura 4—Estrutura básica das diversas famílias de flavonoides com baseno grau de oxidação do anel pirano

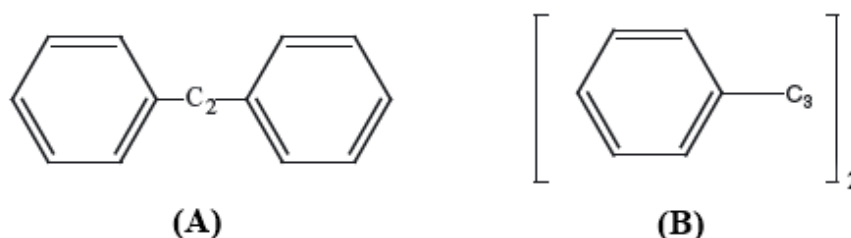


Fonte: Pereira (2014)

Dentre os outros compostos fenólicos encontrados em produtos vegetais, estilbenos e lignanas vêm ganhando atenção devido às ações biológicas propostas em animais (Figura 5). Os estilbenos tem estrutura do tipo C₆-C₂-C₆, consistindo em dois anéis aromáticos ligados através de uma ponte de dois carbonos com uma ligação dupla. O composto original dessa família é o resveratrol, encontrado em uvas e vinhos (FRAGA et al., 2010). Lignanas são fitoquímicos formados por 2 unidades de fenilpropano, com estrutura (C₆-C₃)₂. A fonte

alimentar mais rica é a linhaça, que contém secoisolariciresinol (até 3,7 g/kg de peso seco) (MANACH et al., 2004).

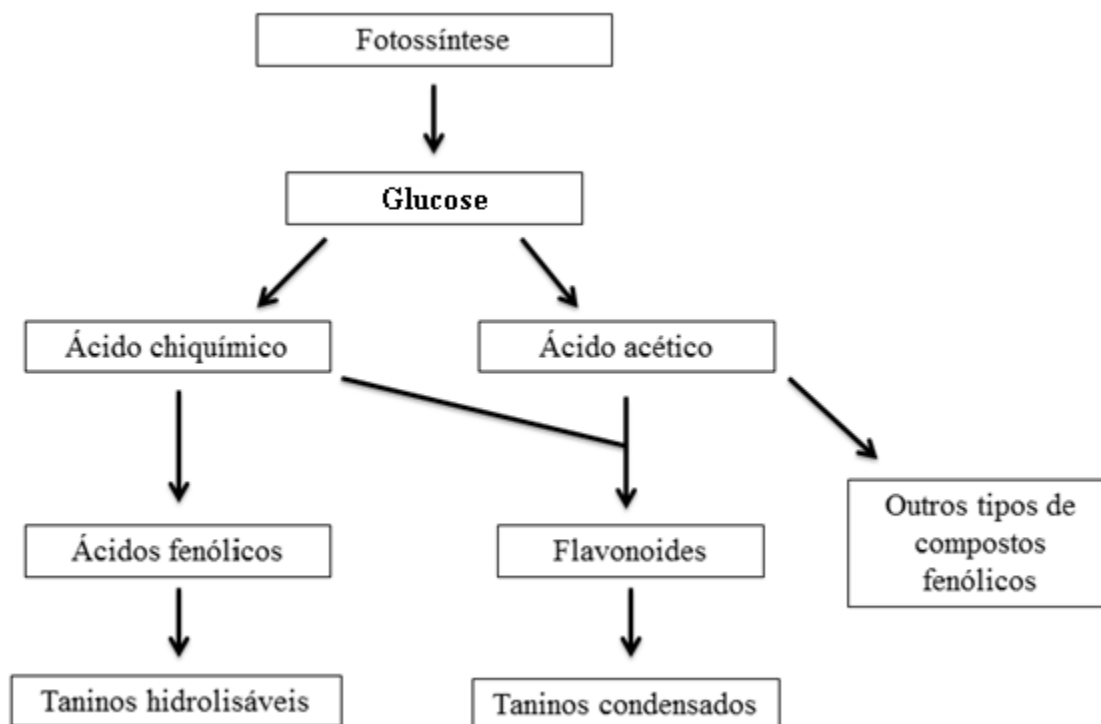
Figura 5—Estrutura geral de outros compostos fenólicos encontrados nas dietas humanas: (A) estilbenos e (B) lignanas



Fonte: Adaptado de Craft et al (2012)

Duas vias biossintéticas diferentes podem formar compostos fenólicos: (1) via do ácido chiquímico que produz ácidos fenólicos e suas formas poliméricas, os taninos hidrolisáveis e; (2) via do ácido acético, que mediante inserção do ácido cumárico gerado pela via do ácido chiquímico, é capaz de prover flavonoides, taninos condensados e compostos de estruturas mais complexas. Essas rotas biogénicas possuem como precursor primário a glucose, carboidrato oriundo da fixação do gás carbônico atmosférico através da fotossíntese (Figura 6). Compostos fenólicos estão, geralmente, localizados nos vacúolos das células vegetais e podem ocorrer tanto na forma livre, chamada de aglicona, quanto na forma ligada a outras substâncias, como a glucose (CHEYNIER et al., 2013).

Figura 6–Principais vias de ramificação na biossíntese de compostos fenólicos em vegetais



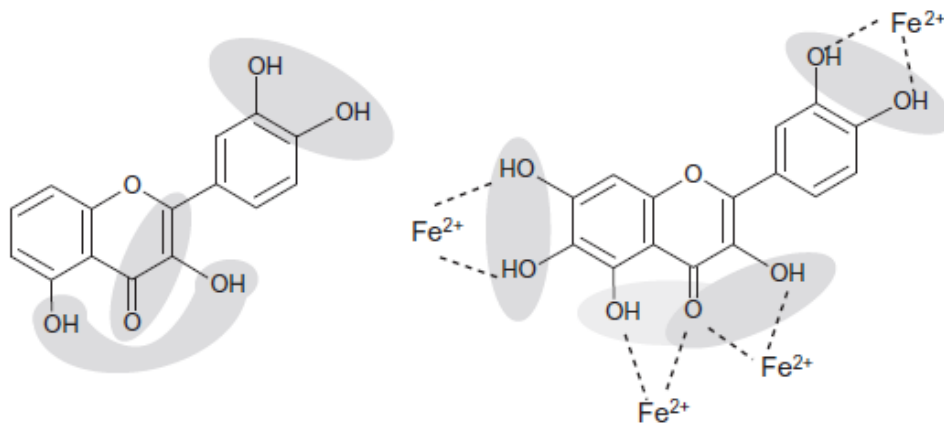
Fonte: Elaborado pelo autor

Compostos fenólicos apresentam-se geralmente como sólidos brancos, embora a conjugação eletrônica de alguns flavonoides possa resultar em alguns com coloração amarela ou até mesmo vermelha, como no caso das antocianinas. Fenólicos de baixa massa molecular são voláteis e muitas vezes possuem aromas característicos, tais como a vanilina e o eugenol. Quanto à polaridade, certos compostos fenólicos podem ser muito hidrofílicos (glicosídeos de ácidos hidroxicinâmicos, por exemplo), todavia outros aparentam ser bastante hidrofóbicos (flavonoides polimetoxilados, por exemplo) (CHEYNIER et al., 2013).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a ação antioxidante dos compostos fenólicos em animais. Esses fitoquímicos são altamente eficientes na quebra de reações em cadeia de radicais livres. Características químicas compartilhadas pela maioria dos compostos fenólicos são responsáveis pela sua eficiência na reação antioxidante: a) os grupos fenólicos são prontamente ionizados e atuam como ácidos fracos, sendo capazes de estabilizar

os radicais livres através da doação de um elétron e/ou hidrogênio, conseqüentemente, as estruturas aromáticas resultantes não são reativas, pois se estabilizam por ressonância e; b) os grupos hidroxila e carbonila presentes nos compostos fenólicos são centros de elevada afinidade para íons metálicos, atuando assim como quelantes de metais de transição (FRAGA et al., 2010) (Figura7).

Figura 7 –Características estruturais definem a ação antioxidante dos compostos fenólicos. As áreas destacadas definem os dois critérios para a atividade antioxidante: grupos fenólicos são capazes de estabilizar os radicais livres (fig. esquerda) e os grupos hidroxila e carbonila são centros de elevada afinidade para íons metálicos (fig. direita)



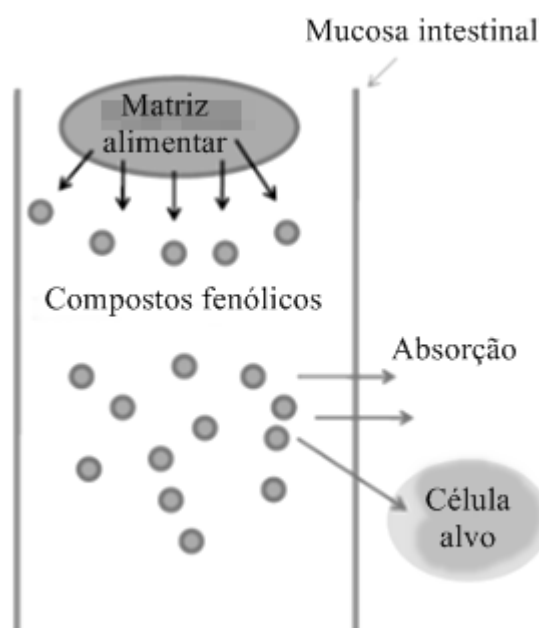
Fonte: Fraga et al (2010)

2.4 Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos

Estudos *in vitro* têm demonstrado que os compostos fenólicos são de considerável importância devido às suas diversas atividades biológicas, dentre as quais se destaca a antioxidante. No entanto, a quantidade total dessas moléculas presentes nos alimentos não reflete necessariamente a quantidade absorvida e metabolizada pelo organismo. Na realidade, os testes *in vitro* são essenciais para elucidar o mecanismo de ação antioxidante, porém, para que possuam credibilidade é essencial que esses compostos bioativos estejam presentes em concentrações fisiológicas relevantes no plasma. Além disso, as concentrações que atingem os tecidos alvos são muito baixas quando comparadas com as utilizadas em ensaios *in vitro*. Portanto, a possível eficácia dos compostos fenólicos no corpo humano é grandemente determinada pela sua bioacessibilidade e biodisponibilidade (HOLST; WILLIAMSON, 2004; PIMPÃO et al., 2015).

A bioacessibilidade pode ser definida como a fração de um composto que é liberada, a partir de uma matriz alimentar, no lúmen gastrointestinal e que se torna potencialmente disponível para absorção (PAUSTENBACH, 2000; FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009) (Figura 8). Sendo assim, a bioacessibilidade depende de uma série de parâmetros, incluindo a concentração inicial da substância na matriz alimentar e a composição dessa matriz, além das características físico-químicas dos fluidos gastrointestinais e a presença de enzimas digestivas (TAGLIAZUCCHI et al., 2010). Estudos de bioacessibilidade *in vitro* são importantes para estimar o impacto da digestão gastrointestinal e das matrizes alimentares nas mensurações subsequentes da biodisponibilidade dos compostos fenólicos (HELAL et al., 2014).

Figura 8 – Bioacessibilidade de compostos fenólicos. A porção bioacessível diz respeito à fração que é liberada a partir de uma matriz alimentar no lúmen gastrointestinal e que se torna disponível para absorção



Fonte: Elaborado pelo autor

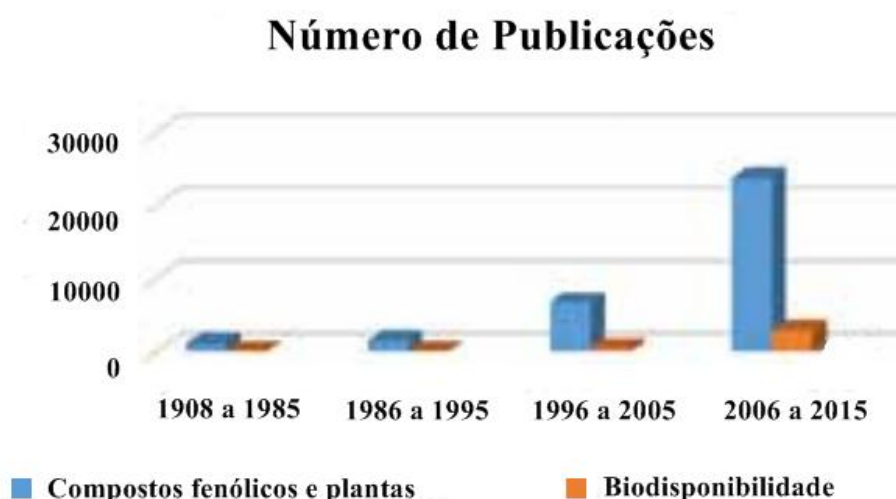
A biodisponibilidade compreende a fração de uma substância na sua forma original ou metabolizada que é absorvida pelo trato gastrointestinal e atinge a circulação sistêmica, tornando-se disponível para armazenamento ou utilização por órgãos e tecidos alvos em funções metabólicas (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016). Em vista disso, a biodisponibilidade dos compostos fenólicos não depende apenas de sua estrutura química, mas também de outros fatores, tais como a sua

liberação da matriz alimentar durante a digestão gastrointestinal, absorção celular, metabolismo, eliminação e ainda o seu transporte pelo sistema circulatório (BLANCAS-BENITEZ et al., 2015).

Apesar de muitas vezes os termos biodisponibilidade e bioacessibilidade serem empregados indistintamente, é importante salientar a diferença entre os mesmos. Nem todo o conteúdo de um determinado composto é liberado no trato gastrointestinal durante a digestão, apenas uma fração é bioacessível. Desse total considerado bioacessível, apenas uma porção será de fato absorvida pelo organismo para utilização, isto é, somente essa última porção compreenderá o conteúdo biodisponível do composto, ou seja, sua biodisponibilidade (SCHULZ, 2015).

Publicações envolvendo biodisponibilidade tiveram um aumento linear nos últimos 30 anos. No entanto, o número de trabalhos com biodisponibilidade associada às substâncias fenólicas é ainda pequeno em comparação com o número de publicações sobre tais compostos (Figura 9). Esse tema tem despertado grande interesse, principalmente, para os pesquisadores no campo da nutrição e farmacologia. Dentro desse contexto, as classes de compostos fenólicos mais estudadas compreendem ácidos fenólicos e flavonoides - substâncias comumente encontradas nos alimentos e preparações medicinais (SOUZA; CASANOVA; COSTA, 2015).

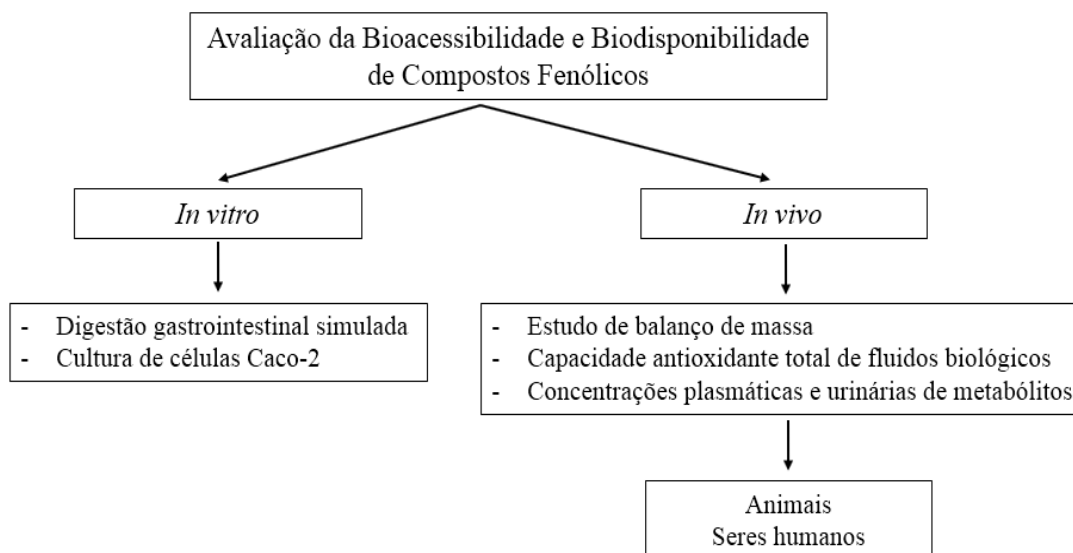
Figura 9 – Número de estudos na base de dados Scopus encontrado para as palavras-chave “compostos fenólicos e biodisponibilidade” em março de 2015



Fonte: Adaptado de Souza, Casanova e Costa (2015)

A bioacessibilidade e a biodisponibilidade dos compostos fenólicos costumam ser verificadas a partir de duas diferentes abordagens analíticas: estudos *in vivo* ou *in vitro* (Figura 10).

Figura 10 – Principais metodologias utilizadas na avaliação da bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos



Fonte: Elaborado pelo autor

Os testes *in vivo* podem ser baseados em estudos de balanço de massa que determinam a quantidade de uma substância absorvida através da diferença entre as quantidades ingeridas e as quantidades excretadas. Uma evidência indireta da absorção dos compostos fenólicos pelo intestino corresponde ao aumento da capacidade antioxidante total (CAT) do plasma, da urina e de outros fluidos biológicos após o consumo de alimentos que contêm essas substâncias. Contudo, estimativas mais precisas podem ser obtidas pela determinação das concentrações plasmática e urinária de metabólitos após a ingestão de fenólicos puros ou de gêneros alimentícios, sabidamente fontes do composto de interesse. Essas estratégias utilizam sujeitos experimentais tanto humanos quanto animais (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; FERRARI, 2010).

Macacos são a escolha ideal para estudos *in vivo* devido à sua estreita relação com o homem, porém aspectos éticos são bastante relevantes e o custo associado é proibitivo. Os roedores têm sido os modelos animais mais utilizados. No entanto, o tamanho de ratos e camundongos, além de alguns aspectos fisiológicos e metabólicos, torna a extrapolação para os seres humanos mais duvidosa. O porco é considerado o animal mais aceito pela comunidade científica, dada a notável semelhança fisiológica entre suínos e seres humanos.

Em relação ao uso de humanos, razões éticas proíbem quase que totalmente a realização de estudos dessa magnitude. Na realidade, essas abordagens, aplicadas em modelos animais experimentais ou em humanos, são complexas e caras (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009; CARDOSO et al., 2015).

Em contrapartida, os estudos *in vitro* são entre os mais requeridos por serem mais simples, rápidos e de custos moderados, apresentando-se como uma alternativa a estudos com humanos ou animais. Por exemplo, modelos de digestão *in vitro* baseados na fisiologia humana são amplamente utilizados para estudar as alterações estruturais, digestibilidade e liberação de compostos fenólicos dos alimentos sob condições gastrointestinais simuladas (HUR et al., 2011). Adicionalmente, culturas de células epiteliais de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) são utilizadas para mimetizar a barreira intestinal. Embora as células Caco-2 sejam as mais utilizadas, outras linhagens celulares são sugeridas para a simulação de absorção pela mucosa intestinal (TENORE et al., 2013).

O trato gastrointestinal pode ser considerado como um extrator onde tanto a ação mecânica como as ações química e enzimática contribuem para a extração de compostos fenólicos de matrizes sólidas. Por conta disso, para que os resultados dos estudos *in vitro*, com foco na digestão simulada, sejam semelhantes àqueles obtidos na digestão *in vivo*, condições como a composição química dos fluidos digestivos, o pH e tempo de permanência típico em cada compartimento devem ser iguais ou semelhantes às do sistema digestivo humano. Por exemplo, os sais biliares e as enzimas pancreatina, pepsina, tripsina, quimotripsina, α -amilase e lipase são comumente empregados nos processos *in vitro*; além disso, a temperatura de 37 °C e o tempo de 2 horas para cada compartimento digestivo são predominantemente empregados (TAGLIAZUCCHI et al., 2010; HUR et al., 2011).

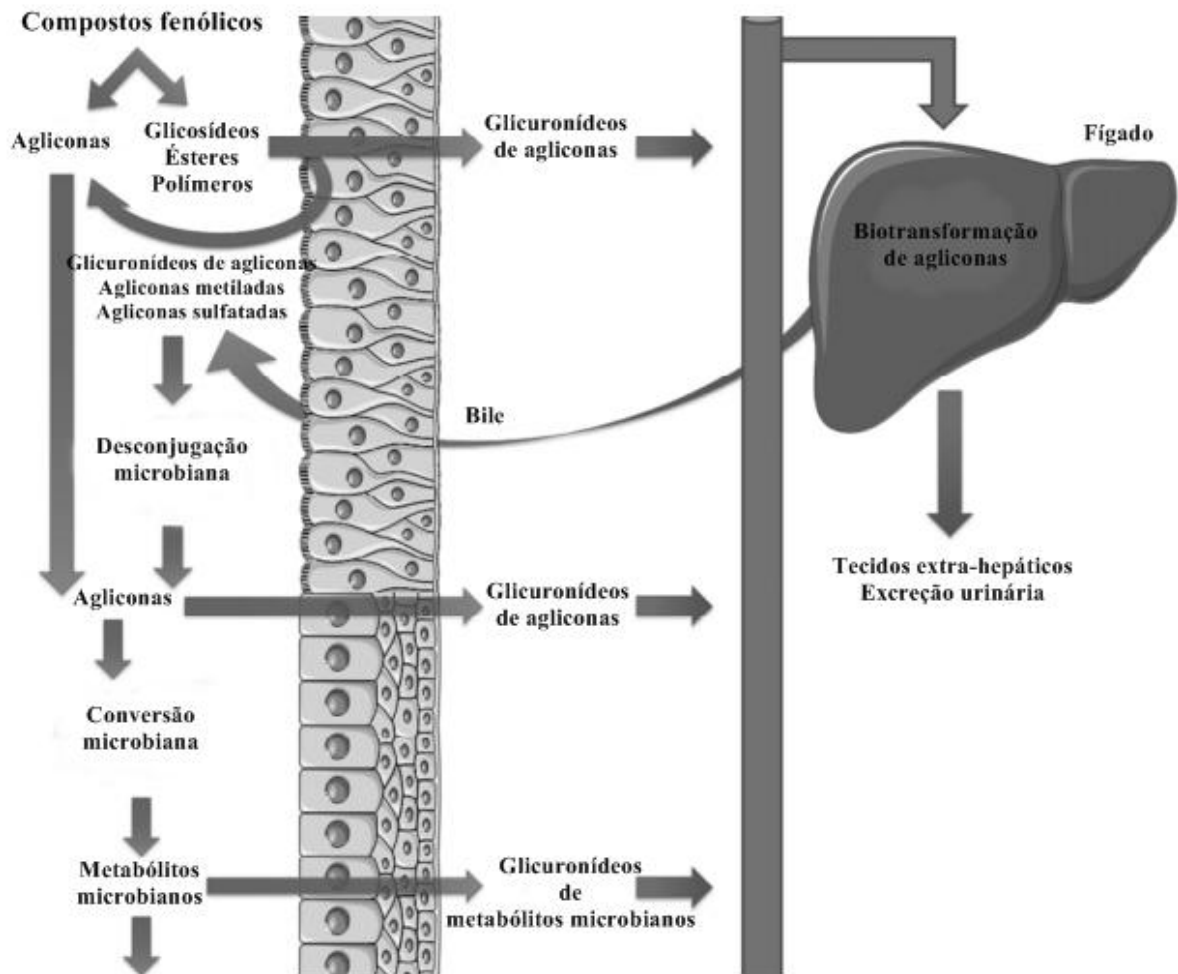
O efeito da digestão sobre as classes de compostos fenólicos é diferenciado, o qual parece ser dependente das condições de digestão e tempo, apesar de alguns estudos sugerirem que compostos fenólicos normalmente são estáveis em condições gástricas. No ambiente intestinal, a bioacessibilidade e estabilidade dos compostos fenólicos apresentam grande dependência do pH do meio. A classe de compostos mais relatada como resistente às condições de digestão duodenal são os flavonoides, com exceção das antocianinas (ALMINGER et al., 2014). Contudo, a eficiência antioxidante dos compostos fenólicos é afetada a partir da interação desses com proteínas, enzimas digestivas, carboidratos, lipídios além de outros constituintes da matriz alimentar (SWIECA et al., 2013).

A biodisponibilidade de compostos fenólicos, assim como sua bioacessibilidade, é variável. Sua estrutura química é determinante no grau de absorção intestinal e também nos

metabolitos gerados. É sabido que moléculas menores como ácidos fenólicos e alguns flavonoides, tais como isoflavonas, catequinas, flavonas e glicosídeos de quercetina, são facilmente absorvidos pela mucosa intestinal. Entretanto, os mecanismos de absorção intestinal não são claramente conhecidos, porém grande parte dos compostos que são absorvidos parecem apresentar características hidrofílicas as quais permitem o seu transporte por difusão passiva, mas também transportadores de membrana podem estar envolvidos (COZZOLINO, 2009).

O metabolismo dos compostos fenólicos ocorre através de uma via comum. Grande parte desses fitoquímicos está presente na alimentação sob a forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros que não são absorvidos na sua forma nativa. Em virtude disso, necessitam ser hidrolisados por enzimas intestinais ou pela microbiota do cólon antes de serem absorvidos. Quando essa última está envolvida, a eficiência de absorção é frequentemente reduzida, pois as enzimas da microbiota também degradam as agliconas produzindo diversos ácidos aromáticos simples. Depois de absorvidos, os compostos fenólicos são metabolizados, no intestino delgado e no fígado, sofrendo, principalmente metilação, sulfatação e glucuronidação. Os metabólitos formados são capazes de penetrar nos tecidos, mas a sua capacidade de se acumular no interior de tecidos-alvo específicos ainda necessita de mais investigações. De maneira geral, os compostos fenólicos e seus derivados são eliminados principalmente na urina e bile (MANACH et al., 2004; PEREIRA, 2014). Um esquema proposto para o metabolismo dos compostos fenólicos em humanos é ilustrado a seguir (Figura 11).

Figura 11 – Metabolismo de compostos fenólicos no sistema digestivo humano



Fonte: Adaptado de Santos et al (2014)

Com base nas informações supracitadas, a atribuição inequívoca de atividade antioxidante em sistemas biológicos, mesmo que detectada *in vivo*, a compostos isolados e identificados de alimentos, extratos vegetais ou preparações medicinais não é fácil, pois vários fatores devem ser avaliados.

2.5 *Triplaris gardneriana* Wedd

A família Polygonaceae compreende 51 gêneros, com aproximadamente 1.100 espécies vegetais distribuídas nas regiões temperadas e tropicais (MACÊDO et al., 2016). No Brasil, dentre os 7 gêneros de ocorrência natural, destaca-se a espécie *Triplaris gardneriana*

Wedd, arbórea conhecida popularmente na Região Nordeste como “pajeú”, “coaçu”, “novateiro” ou “pau-formiga”. Está presente nos biomas Caatinga e Pantanal; onde no primeiro é encontrada no Estado do Ceará e nas proximidades do vale do Rio São Francisco, que se estende de MinasGerais até Pernambuco, enquanto que no último, localiza-se nas várzeas inundáveis e encostas úmidas mato-grossenses (ARAUJO, 2009; MACÊDO, 2015).

T. gardneriana é uma planta dioica e caducifólia, capaz de alcançar até 15 metros de altura. Apresenta tronco tortuoso, ramificado e descamante, além de folhas oval-lanceoladas a elípticas de aspecto coriáceo, que lhe conferem potencial de utilização em várias áreas, desde madeireira, de arborização urbana até medicinal. Suas inflorescências são paniculadas e mudam de cor durante os estágios de maturação dos frutos. Esses, por sua vez, são secos e apresentam apenas uma semente brilhosa de coloração marrom-caramelada, facilmente disseminada pelo vento(Figura 12). Essa espécie floresce durante os meses de julho e agosto, enquanto que os frutos amadurecem logo em seguida, no mês de setembro (MELO, 2000; LUCENA et al., 2007).

Figura 12 – Fotografias de *Triplaris gardneriana* Wedd. A: planta adulta; B: folhas e inflorescências – flores femininas (ramo do lado esquerdo) e masculinas (ramo do lado direito); C: frutos; D: sementes



Fonte:

Elaborado pelo autor com base nas fotografias de (A), (C) e (D) Projeto Verde (2016) e (B) Lorenzi (2002)

Na prática popular, são referidas inúmeras propriedades terapêuticas a *T. gardneriana*, dentre as quais, anti-inflamatória, gastroprotetora e hipolipidêmica (ROQUE; ROCHA; LOIOLA, 2010; SILVA et al., 2010). Os demais usos etnomedicinais são listados a seguir (Tabela 1). Particularmente, aos extratos aquosos e etanólicos das cascas do caule são atribuídos a atividade moluscicida (ROUQUAYROI, 1984), enquanto que, para o extrato etanólico das sementes dessa espécie, a literatura relata as ações antibacteriana, anticolinesterásica e antioxidante (FARIAS et al., 2013). Outras atividades biológicas e farmacológicas associadas à *T. gardneriana* estão descritas abaixo (Tabela 2).

Tabela 1 – Propriedades terapêuticas atribuídas à utilização de *Triplaris gardneriana* Wedd

Material botânico	Preparação	Uso etnomedicinal	Referência bibliográfica
Casca do caule, raiz e folhas	Cozimento, decocção e banho de assento	Indicados para tratamento de gonorreia, leucorreia, hemorroidas, tosse e bronquite	Araujo (2009)
Casca do caule	Xarope e infusão	Tratamento de gastrite e úlceras	Roque; Rocha; Loiola (2010)
Folhas	Infusão	Hipolipidêmico e anorexígeno	Silva et al. (2010)
Casca do caule	Chá e lambedor	Combate ao câncer, gastrite, úlceras, azia, tosse, gripe, dores e reumatismo	Pereira Júnior et al. (2014)
Casca do caule	Decocção	Indicada para tratamento de gonorreia, leucorreia e inflamação de órgãos internos	Macêdo et al. (2015)

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 2 – Atividades biológicas e farmacológicas encontradas na literatura para *Triplaris*

Material botânico	Preparação	Atividade investigada	Referência bibliográfica
-------------------	------------	-----------------------	--------------------------

gardneriana Wedd

		Toxicidade aguda em camundongos Toxicidade aguda em peixe <i>Lebistes reticulatus</i>	
Casca do caule	Extrato aquoso	Efeito depressor sobre a respiração e pressão sanguínea de gatos Efeito estimulante sobre o coração de sapos Ocitócica sobre útero de ratas	Barros et al. (1970)
Casca do caule	Extrato aquoso Extrato etanólico (99%)	Moluscicida <i>Biomphalaria glabrata</i> <i>B. straminea</i>	Rouquayrol (1984)
Sementes	Extrato etanólico (99%)	Antioxidante Anticolinesterásica Antimicrobiana <i>Bacillus subtilis</i> <i>Salmonella choleraesuis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Farias et al (2013)
Casca do caule	Extrato hidroalcoólico (70%)	Antimicrobiana <i>Streptococcus oralis</i>	Teixeira (2014)
Folhas	Extrato etanólico (95%)	Antioxidante Fotoprotetora Antimicrobiana <i>B. cereus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>S. choleraesuis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i> resistente à metilina (MRSA) <i>Shigella flexneri</i>	Macêdo (2015)
Folhas e sementes	Óleos fixos	Antimicrobiana <i>Enterococcus faecalis</i> <i>S. aureus</i> MRSA <i>S. epidermidis</i>	Macêdo et al. (2016)

Fonte: Elaborado pelo autor

Em relação à composição química, *T. gardneriana* possui como principais constituintes químicos ligninas, flavonoides glicosilados e derivados terpenoides (DE PAULA, 1993; LORENZI, 2002). Estudo fitoquímico com extratos da madeira apontou a presença de hidrocarboneto alifático, sitosterol e ésteres do ácido ferúlico (BRAZ FILHO;

RODRIGUES, 1974). Além disso, foram identificados glicosídeos de quercetina e miricetina no extrato etanólico das folhas por LC-MS (MACÊDO et al., 2015). A caracterização química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) de óleos fixos das folhas e sementes de *T. gardneriana* destacou como constituintes majoritários os ésteres palmitato de metila e 10-octadecenoato de metila, respectivamente (MACÊDO et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos presentes no extrato etanólico de sementes de *Triplaris gardneriana*.

3.2 Objetivos Específicos

- Preparar o extrato etanólico das sementes de *T. gardneriana* (EETg) e calcular seu rendimento;
- Realizar a caracterização fitoquímica quali- e quantitativa de EETg através de técnicas fotolorimétricas e cromatográficas;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de EETg por diferentes metodologias (DPPH, FRAP, ABTS^{•+} e TBARS);
- Estimar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos presentes em EETg após a execução de teste de digestão *in vitro*;
- Investigar a biodisponibilidade indireta dos compostos fenólicos presentes em EETg a partir da determinação da capacidade antioxidante total e identificação de metabólitos em fluidos biológicos obtidos após a administração oral do extrato de *T. gardneriana* em roedores.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Ácido gálico, sulfato ferroso heptahidratado, cloreto férrico hexahidratado e cloreto de alumínio foram comprados da Merck (Darmstadt, Germany). 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), quercetina, catequina, reagente Folin-Ciocalteu, pepsina (EC 3.4.23.1), pancreatina (EC 232.468.9) e extrato de bile (EC 232.369.0) foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA). Todos os demais reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

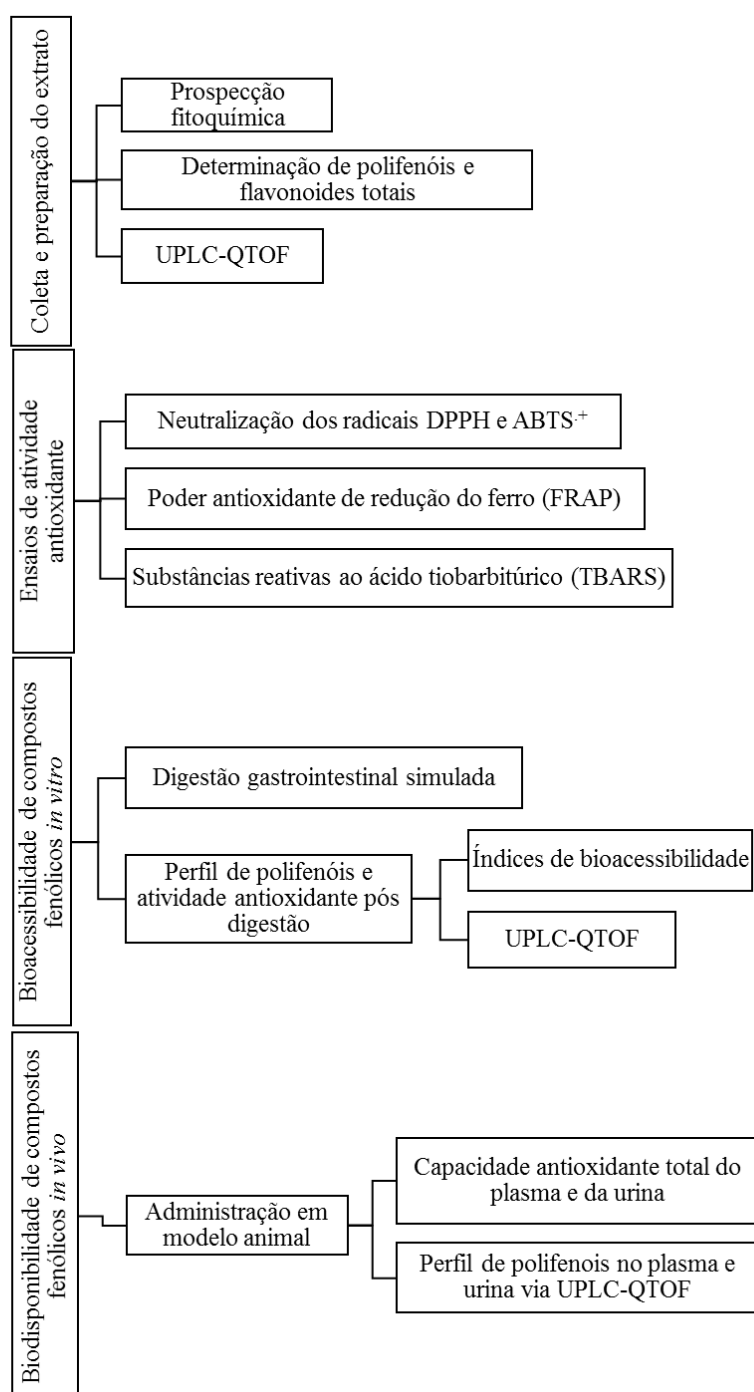
4.2 Animais

Foram utilizados um total de 24 ratos machos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*), convencionais, adquiridos com três semanas de idade do Biotério Central da UFC (BIOCEN-UFC). Os animais foram alojados no Biotério Experimental do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais, Departamento de Biologia da UFC, em condições de temperatura de $23,0 \pm 2,0$ °C, fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro e umidade do ar de 45-55%. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com substrato de raspa de pinho (Biotécnicas, São Paulo, Brasil), ração balanceada (Biobase, Biotécnicas, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum* até atingirem o peso médio aproximado de 250 g para início dos testes. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA/UFC) sob o registro nº 96/2015, obedecendo a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regula o uso de animais em pesquisas científicas.

4.3 Desenho experimental

Para melhor compreensão do tema abordado, o presente estudo teve seu desenho experimental dividido em quatro etapas: (1) coleta e preparação do extrato; (2) ensaios de atividade antioxidante; (3) bioacessibilidade de compostos fenólicos *in vitro* e (4) biodisponibilidade de compostos fenólicos *in vivo*, conforme o esquema abaixo (Figura 13).

Figura 13 – Atividades previstas para o desenvolvimento do estudo subdivididas em quatro etapas. UPLC-QTOF: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a sistema de quadrupolo/tempo de voo – *ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight*; DPPH: radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; ABTS^{•+}: radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico; FRAP: poder antioxidante de redução do ferro – *ferric reducing antioxidant power*; TBARS: ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – *thiobarbituric acid reactive substances assay*



4.4 Coleta e preparação do extrato

Sementes de *T. gardneriana* foram coletadas na cidade de Tamboril, interior do Estado do Ceará, em Março de 2013 (Figura 14). O taxonomista Dr. Edson de Paula Nunes confirmou a identidade da planta e um voucher com número EAC39600 foi depositado no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (Campus do Pici, Fortaleza).

Figura 14 – Mapa ilustrativo da localização da cidade de Tamboril em relação ao Estado do Ceará (acima) e ao Brasil (abaixo)



Fonte: IBGE (2016)

As sementes foram levadas ao Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais, Departamento de Biologia da UFC, onde foram selecionadas aquelas livres de insetos e danos macroscópicos e, em seguida, desidratadas em estufa a 50 °C até obtenção de peso constante. Posteriormente, foram moídas em moinho de café (Cadence, Itajaí, Brasil) até obtenção de um pó fino (tamanho das partículas < 1,0 mm). Esse, por sua vez, foi utilizado para a preparação do extrato das sementes de *T. gardneriana* (EETg), conforme protocolo descrito por Farias et al (2013). Brevemente, o material pulverizado foi submetido à extração

com etanol a 99% (1:2 m/v) à temperatura ambiente (25-27 °C) por 3 dias. O sobrenadante foi removido e filtrado através de filtros de papel (Whatman nº1). Após isso, a amostra em pó inicial foi submetida a mais duas extrações nas mesmas condições. As soluções extrativas resultantes foram misturadas e, em seguida, concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo (TE-210 Tecnal Piracicaba, Brasil) até a eliminação completa do solvente. Depois disso, o extrato obtido foi acondicionado em frasco âmbar e armazenado em freezer a - 20 °C. O rendimento de EETg foi calculado pela expressão:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato/massa das sementes pulverizadas}) \times 100$$

4.4.1 *Prospecção fitoquímica*

EETg foi submetido a um “screening” fitoquímico preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários por meio de reações químicas que resultam no desenvolvimento de cor e/ou precipitado distintivo para cada classe de substância (MATOS, 1997). Resíduos do extrato foram ressuspensos com solventes adequados para o teste de fenóis e taninos (reação com cloreto férrico); saponinas (teste de espuma); triterpenoides e esteroides (teste de Liebermann-Burchard); diferentes subclasses de flavonoides (testes de variação de pH com hidróxido de sódio e ácido sulfúrico) e alcaloides (reação com reagente de Dragendorff). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.4.2 *Determinação de polifenóis totais*

A concentração de fenóis totais foi determinada através da reação de 50 µL de EETg com 50 µL do reagente Folin-Ciocalteu na concentração de 10%, seguido da adição de 100 µL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura reacional foi incubada a 45 °C por um período de 15 min, e o valor de absorbância mensurado a 700 nm em espectrofotômetro (Epoch, Take 3 module, BioTek, Winooski, EUA). O ácido gálico foi utilizado como padrão de comparação de compostos fenólicos (SINGLETON et al., 1999). O teste foi feito em triplicata e os resultados expressos em microgramas de equivalente de ácido gálico por miligrama de amostra.

4.4.3 *Determinação de flavonoides totais*

O método do cloreto de alumínio foi utilizado para determinar o conteúdo de flavonoides na amostra (FUNARI; FERRO, 2006). Quercetina foi usada para fazer a curva de calibração. De forma breve, 10 mg de quercetina foram dissolvidos em etanol e depois diluídos (15,625 – 500 µg/mL). Em seguida, 0,5 mL das soluções diluídas foram misturados separadamente com 250 µL de cloreto de alumínio a 2,5% e 500 µL de etanol. Após incubação à temperatura ambiente por 30 min, o valor de absorvância da mistura reacional foi medido a 415 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, Curitiba, Brasil). O cloreto de alumínio foi substituído pela mesma quantidade de água destilada para constituir o branco do ensaio. Da mesma forma, 0,5 mL de amostra foi colocado para reagir com cloreto de alumínio a 2,5% como descrito acima. Os resultados foram expressos em microgramas de equivalente de quercetina por miligrama de amostra. Todas as análises foram feitas em triplicata.

4.4.4 Identificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a sistema de quadrupolo/tempo de voo (UPLC-QTOF)

A identificação dos compostos fenólicos presentes em EETg foi realizada em sistema Acquity UPLC acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo (QTOF) (Waters Corporation, Milford, EUA), gentilmente cedido pelo Laboratório de Química e Produtos Naturais, Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, Ceará).

As corridas cromatográficas foram realizadas em coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm; 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 µL. O modo ESI foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. O modo ESI⁺ foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h e voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MS^E (espectrometria de massas de alta energia). O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation, Milford, EUA).

4.5 Ensaios de atividade antioxidante

4.5.1 Ensaio do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante foi avaliada utilizando o método colorimétrico baseado na capacidade de neutralização do radical DPPH (FUKUMOTO; MAZZA, 2000, com adaptações). Utilizando placa de microtitulação de 96 poços, 22 µL de amostra diluída em diferentes concentrações (7,8 – 500 µg/mL) foram adicionados a 200 µL de solução etanólica de DPPH (150 µM). Como controle negativo, 222 µL de solução de DPPH foram utilizados. Após 30 min de reação sob abrigo de luz à temperatura ambiente, as leituras de absorvância foram feitas a 520 nm em espectrofotômetro (Epoch, Take 3 module, BioTek, Winooski, EUA). A atividade antioxidante por esse método foi estimada em concordância com a seguinte fórmula:

$$N\% = 100 \times (Abs_{controle} - Abs_{amostra}) / Abs_{controle}$$

Onde N% é o percentual de neutralização, $Abs_{controle}$ é a absorvância do controle negativo; e $Abs_{amostra}$ é a absorvância das amostras. A concentração necessária para neutralizar 50% do radical DPPH (CN_{50}) foi obtida através de regressão logística, representando graficamente as concentrações do extrato testadas em função do percentual de neutralização do DPPH. Ácido ascórbico, controle positivo, foi tratado sob as mesmas condições da amostra. Esse procedimento experimental foi realizado em triplicata.

4.5.2 Ensaio do radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+})

O método baseou-se na capacidade do antioxidante em neutralizar o radical catiônico ABTS^{•+} (KUSKOSKI et al., 2004, com modificações). A solução do radical ABTS^{•+} foi gerada a partir da reação química entre 88 µL de persulfato de potássio 140 µM e 5 mL de solução estoque de ABTS 7 mM. Uma vez formado o radical ABTS^{•+}, o mesmo foi diluído em etanol até a obtenção de uma medida de absorvância de 0,70 (± 0,02) a 734 nm, a temperatura de 30 °C. Os valores de absorvância foram medidos em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, Curitiba, Brasil) após 30 min da adição de diferentes concentrações da amostra (50 – 1000 µg/mL). Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) foi usado para construção da curva de calibração. Os resultados foram expressos em

micromolar de equivalente de Trolox por miligrama de amostra. Toda a análise foi feita em triplicata.

4.5.3 Ensaio do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

O método descrito por Benzie e Strain (1999), com modificações, foi utilizado para determinar a atividade antioxidante baseada na redução do ferro. O FRAP mensura a habilidade de redução do ferro por uma amostra em meio ácido (pH 3,6), apresentando intensa coloração azul quando o complexo tripiridiltiazina (Fe^{3+} -TPTZ) é reduzido a forma ferrosa (Fe^{2+} TPTZ). O reagente FRAP foi preparado antes da análise, misturando-se 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução de TPTZ (TPTZ 10 mM em HCl 40 mM), e 2,5 mL de cloreto férrico hexahidratado (20 mM) em solução aquosa. Diferentes concentrações da amostra (15,625 – 500 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionadas a 270 μL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. As misturas foram incubadas em banho-maria (Modelo 304/D, Vargem Grande Paulista, Brasil) a 37 °C por 30 min e, em seguida, tiveram seus valores de absorvâncias lidos a 593 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, Curitiba, Brasil), usando solução FRAP como branco. A curva de calibração foi construída, utilizando-se diferentes concentrações de sulfato ferroso heptahidratado. Os resultados foram expressos como micromolar de equivalente de sulfato ferroso por miligrama de amostra. Esse procedimento experimental foi realizado em triplicata.

4.5.4 Ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico são produtos da peroxidação lipídica, sendo detectadas com a utilização do ácido tiobarbitúrico (TBA). O malondialdeído (MDA) constitui um dos vários produtos gerados nesse processo. A produção de TBARS foi determinada usando fosfolipídios de gema do ovo de galinha (SABIR; ROCHA, 2008). Esses foram obtidos a partir de um homogenato da membrana da gema. Em 100 μL de solução de fosfolipídios, foram adicionados 50 μL de diferentes concentrações da amostra (15,625 – 500 $\mu\text{g/mL}$) e água destilada até completar volume de 500 μL . A mistura foi pré-incubada a 37 °C por 1 h na presença ou na ausência de 14 μL de ferro (75 μM), indutor de peroxidação lipídica. Um cromógeno foi formado a partir da adição de 500 μL de ácido acético a 20% (pH

3,0) e 500 μ L de solução aquosa de TBA a 0,6% e, logo, incubado a 100 °C em banho-maria por 1 h. Concomitantemente, uma série de diluições de MDA 0,03 mM foi incubada nas mesmas condições para construção da curva padrão. Os valores de absorbância foram mensurados a 532 nm em espectrofotômetro (Epoch, Take 3 module, BioTek, Winooski, EUA). Todo o procedimento experimental foi analisado em triplicata. A concentração de amostra necessária para inibir em 50% a peroxidação lipídica (CI_{50}) foi obtida através de regressão logística, representando graficamente as concentrações do extrato testadas em função do percentual de inibição da peroxidação lipídica (100% - percentual de MDA formado).

4.6 Bioacessibilidade de compostos fenólicos *in vitro*

4.6.1 Digestão gastrointestinal simulada

A digestão *in vitro* foi desenvolvida como descrito por Helal et al. (2014) com modificações. Brevemente, sobre 500 mg de amostra foram adicionados 5 mL de fluido gástrico artificial (pH 2,5; 300 U/mL de pepsina e 2g/L de NaCl). A mistura foi incubada em banho-maria (Modelo 304/D, Vargem Grande Paulista, Brasil) com agitação por 2 h a 37 °C. Em seguida, o pH foi ajustado para 7,5 com $NaHCO_3$ 0,1 M e então, 4 mL de fluido intestinal artificial (0,8 g/L de pancreatina e 5 g/L de extrato de bile) foram adicionados. A mistura foi novamente incubada por 2 h a 37 °C em banho-maria com agitação. O término da reação enzimática em cada fase ocorreu através do esfriamento da mistura por 10 min em banho de gelo. Após a fase intestinal, uma alíquota de 1 mL foi retirada da mistura e imediatamente acidificada a pH 2,5 para garantir a estabilidade dos compostos fenólicos presentes na amostra. Depois, 100 μ L de metanol foram acrescentados e então, a alíquota foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min a 4 °C em centrífuga (Hettich Rotina 380R, Tuttlingen, Alemanha). O sobrenadante foi filtrado e mantido a - 20 °C até o momento das análises. Digestão sem enzimas também foi realizada para distinguir o efeito do ambiente químico do efeito das enzimas digestivas. Esse processo foi executado em duplicata e utilizou ácido gálico e quercetina como padrões de comparação.

4.6.2 *Quantificação e identificação de compostos fenólicos após digestão*

Os sobrenadantes provenientes do final da digestão *in vitro* tiveram seus conteúdos de polifenóis e flavonoides totais determinados pelos reagentes de Folin-Ciocalteu e cloreto de alumínio (itens 4.4.2 e 4.4.3), respectivamente. Além disso, para os sobrenadantes de EETg, esses passaram por análise via UPLC-QTOF (item 4.4.4) para identificação dos compostos fenólicos presentes após o processo digestivo.

A atividade antioxidante dos sobrenadantes foi monitorada a partir da aplicação das técnicas DPPH e FRAP, comentadas anteriormente nos itens 4.5.1 e 4.5.3, respectivamente.

4.6.3 *Índices de bioacessibilidade*

Os seguintes índices foram calculados para melhor entendimento da relação entre os compostos fenólicos e sua bioacessibilidade em sistemas biológicos:

- Bioacessibilidade de compostos fenólicos (BCF), que indicou a fração bioacessível de compostos fenólicos provenientes das amostras:

$BCF = CF_D / CF_A \times 100$, onde CF_D representa a concentração de compostos fenólicos após a digestão *in vitro* e CF_A , a concentração de compostos fenólicos antes do processo digestivo;

- Bioacessibilidade de flavonoides (BF), que representou a fração bioacessível de flavonoides:

$BF = F_D / F_A \times 100$, onde F_D indicou a concentração de flavonoides após a digestão *in vitro* e F_A , a concentração de flavonoides originalmente detectada antes da digestão;

- Índice de atividade antioxidante bioacessível (IAAB), que constituiu um indicativo da bioacessibilidade de compostos antioxidantes:

$IAAB = A_D / A_A \times 100$, onde A_D correspondeu à atividade antioxidante após a digestão *in vitro* e A_A , a atividade antioxidante das amostras antes da submissão ao processo digestivo. IAAB foi determinado individualmente para cada resultado obtido em cada técnica utilizada para mensuração de atividade antioxidante (DPPH e FRAP, nesse caso).

4.7 *Biodisponibilidade de compostos fenólicos in vivo*

4.7.1 Procedimento experimental

A avaliação da biodisponibilidade dos compostos fenólicos de EETg foi realizada conforme a metodologia proposta por Hassimoto, Genovesse e Lajolo (2008), com modificações. Na noite anterior ao experimento, 24 ratos foram pesados e distribuídos aleatoriamente em 6 grupos, cada um contendo 4 animais, e mantidos em jejum por 8 horas com acesso à água *ad libitum*. EETg (25 mg de extrato/200 g peso corpóreo) foi dissolvido em água e administrado aos animais por gavagem, com exceção do grupo controle ao qual foi ofertado somente água. Após isso, os animais foram devolvidos às gaiolas com água e sem ração. Os ratos foram, um grupo por vez, submetidos à eutanásia com ‘overdose’ de halotano (Halocarbon Laboratories, River Edge, EUA) nos períodos de 1, 2, 4, 6 e 8 h após a administração do extrato. O grupo controle foi eutanasiado 30 min após a administração de água. Nesse momento, amostras de sangue foram coletadas por punção venosa do plexo retro-orbital utilizando tubos capilares de micro hematócrito heparinizado, sendo transferidas, em seguida, para tubos Vacutainer[®] contendo EDTA. O plasma foi separado por centrifugação (3.000 x g, 4 °C, 15 min) e acidificado com ácido fórmico a 5% (1:5). Urina foi coletada na mesma ocasião através de punção suprapúbica e centrifugada (1.500g, 20 °C, 5 min), sendo o sobrenadante acidificado com ácido fórmico a 1% (1:1). Todas as amostras biológicas foram armazenadas a -20 °C até o momento das análises.

4.7.2 Identificação de compostos fenólicos e determinação da capacidade antioxidante total em fluidos biológicos

As amostras de plasma e urina foram filtradas em filtros para seringa Acrodisc[®] 25 mm x 0,2 µm com membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) (PALL Corporation, Ann Arbor, EUA) para posterior identificação dos compostos fenólicos provenientes de EETg através de análise por UPLC-QTOF, conforme descrita no item 4.4.4.

A capacidade antioxidante total (CAT) das amostras de plasma e urina foi avaliada pelos métodos DPPH e FRAP, anteriormente descritos nos itens 4.5.1 e 4.5.3, respectivamente.

4.8 Análises estatísticas

Os resultados experimentais foram apresentados como médias \pm desvio padrão (SD). Teste *t* de Student foi usado para comparação entre duas médias; análise de variância simples (*One-way ANOVA*) seguida do Teste de Tukey foi aplicada quando múltiplas comparações foram requeridas. Uma diferença considerada estatisticamente significativa ocorreu quando $p < 0,05$.

No ensaio do radical DPPH para as amostras após digestão *in vitro* (item 4.6.2), os resultados foram expressos como o percentual de neutralização (N%).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização fitoquímica

5.1.1 Rendimento e prospecção fitoquímica

O extrato etanólico obtido das sementes de *Triplaris gardneriana*(EETg) apresentou rendimento de 22,25 % (Tabela 3). Esse número mostrou-se inferior, porém próximo ao valor de 26 %, encontrado para o rendimento do extrato seco das sementes de *T. gardneriana* determinado por Farias et al (2013).

Tabela 3 – Rendimento do extrato das sementes de *Triplarisgardneriana*

Massa de sementes pulverizadas (g)	Massa de EETg(g)	Rendimento (%)
60,98	13,57	22,25

EETg: extrato etanólico das sementes de *T. gardneriana*.

Através do screening fitoquímico de EETg, detectou-se na semente a ocorrência de compostos fenólicos, dentre os quais fenóis simples e flavonoides, e também a presença de esteroides e alcaloides (Tabela 4).

Tabela 4 – Caracterização fitoquímica qualitativa do extrato das sementes de *Triplaris gardneriana*

Teste Fitoquímico	EETg
Alcaloides	+
Esteroides	+
Fenóis simples	+
Flavonoides	+
Saponinas	-
Taninos	-
Triterpenos	-

EETg: extrato etanólico das sementes de *T. gardneriana*;

+: resultado positivo; -: resultado negativo.

Comparando-se os resultados do presente estudo com a literatura, encontraram-se concordâncias quanto a alguns metabólitos secundários detectados em espécies da família Polygonaceae. Por exemplo, ao investigar a constituição química dos órgãos vegetativos de *Rumex vesicarius*, Mostafa, Elbakry e Eman (2011) constataram a ocorrência de flavonoides e alcaloides, além da ausência de saponinas e taninos. Outro trabalho acerca do perfil fitoquímico das sementes de 3 espécies de trigo-sarraceno (gênero *Fagopyrum*) destacou a presença de flavonoides, fenóis simples e esteroides (JING et al. 2016).

5.1.2 Concentração de polifenóis e flavonoides totais

Em linhas gerais, EETg mostrou ser uma fonte de polifenóis e flavonoides totais (Tabela 5). Isso pode ser ratificado, em parte, pela ocorrência tanto de fenóis simples como flavonoides nas sementes de *T. gardneriana*, conforme salientado pela prospecção fitoquímica realizada no presente trabalho.

Tabela 5 – Polifenóis e flavonoides totais do extrato das sementes de *Triplaris gardneriana*

Ensaio Antioxidante	Polifenóis Totais	EETg	Flavonoides Totais	Padrão Utilizado*
Radical DPPH	(μg de acg/mg de extrato)	$50,97 \pm 0,18^b$	(μg de querc/ μg de extrato)	$35,30 \pm 2,07^a$

EETg: extrato etanólico das sementes de *T. Gardneriana*; acg: equivalentes de ácido gálico; querc: equivalentes de quercetina;

Resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

O conteúdo total de polifenóis mostrou-se inferior ao relatado por Macêdo (2015), que verificou o teor dos mesmos no extrato etanólico das folhas de *T. Gardneriana*. Esse autor cita ainda o resultado de 376,12 μg de equivalentes de ácido gálico/mg de extrato. Em relação ao conteúdo de flavonoides totais, EETg exibiu um perfil quantitativo superior àqueles de frutos comestíveis, como a maçã (*Mallus* sp.) com 0,07 μg /mg de fruto (AHERNE; O'BRIEN, 2002), porém inferior ao de outras espécies da família Polygonaceae, dentre as quais se destacam as sementes de *Calligonum azel* e as folhas de *Polygonum aviculare* cujos extratos metanólicos apresentaram quantidades de flavonoides de 8,33 μg /mg de extrato (BANNOUR et al., 2016) e 45,17 μg /mg de extrato (NUGROHO et al., 2014), respectivamente.

5.2 Avaliação da atividade antioxidante

O potencial antioxidante de EETg foi estimado a partir da aplicação de diferentes metodologias *in vitro*, a saber: neutralização dos radicais DPPH e ABTS⁺, poder de redução de íons Fe²⁺ (FRAP) e inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Tabela 6).

(CN ₅₀ em µg/mL)			Tab ela 6 – Ati vid ade anti oxi dan
Radical ABTS ^{·+} (µM de Trolox/mg de extrato)	2,63 ± 0,02 ^b	2,86 ± 0,01 ^a	
FRAP (µM de FeSO ₄ /mg de extrato)	3,35 ± 0,03 ^b	3,80 ± 0,04 ^a	
TBARS (CI ₅₀ em µg/mL)		-	
Sem Ferro	173,80 ± 2,26 ^b		
Com Ferro	88,57 ± 11,03 ^a		

te do extrato etanólico das sementes de *Triplaris gardneriana* a partir de diferentes metodologias

A atividade de neutralização do radical DPPH está expressa como concentração na qual ocorrem 50% de neutralização (CN₅₀);

A atividade de inibição da peroxidação lipídica (ensaio TBARS) está representada como concentração onde ocorrem 50% da inibição (CI₅₀);

Resultados são expressos como média ± desvio padrão;

a,b Diferenças significativas na mesma linha são mostradas por diferentes letras (Teste t de Student, p<0,05);

* Nos ensaios DPPH, ABTS^{·+} e FRAP, os padrões utilizados foram ácido ascórbico, quercetina e trolox, respectivamente;

EETg: extrato etanólico das sementes de *T. gardneriana*; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ABTS^{·+}: 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico; FRAP: poder antioxidante de redução do ferro; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; Trolox: 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico; FeSO₄: sulfato ferroso

Os ensaios com os radicais DPPH e ABTS^{·+} são métodos espectrofotométricos baseados na habilidade da amostra antioxidante de estabilizá-los através da doação de prótons ou transferência eletrônica (CRAFT et al., 2012). Em ambos os testes, os padrões antioxidantes mostraram-se similares a EETg em relação à capacidade de neutralizar diretamente tais radicais (Tabela 6).

Em relação ao ensaio DPPH, EETg obteve resultado de neutralização menos expressivo àquele descrito para o extrato etanólico das folhas de *T. gardneriana* (CN₅₀ = 2,27 µg/mL) (MACÊDO, 2015), porém mostrou-se superior quando comparado ao valor encontrado anteriormente para o extrato etanólico das sementes da mesma espécie vegetal (CN₅₀ = 69,73 µg/mL) (FARIAS et al., 2013). Segundo o teste ABTS^{·+}, EETg apresentou melhor performance de neutralização quando relacionado à polpa do fruto de *Coccoloba uvifera* (0,008976 µM de Trolox/mg de polpa), uma espécie da América Tropical pertencente à mesma família botânica que *T. gardneriana* (CAMPOS et al., 2015).

A reação química visualizada no teste FRAP envolve a redução do íon Fe³⁺ à Fe²⁺ através da doação de elétrons por parte do composto antioxidante (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). Nesse ensaio, por exemplo, ao avaliar a atividade antioxidante do

extrato metanólico do fruto de *Rumex crispus* (Polygonaceae), originário da República da Sérvia, Maksimović et al. (2011) obtiveram o valor de 9,9 $\mu\text{Mde FeSO}_4/\text{mg}$ de extrato, revelando uma capacidade de transferência eletrônica maior do que a determinada no presente trabalho ($3,35 \pm 0,03 \mu\text{Mde FeSO}_4/\text{mg}$ de extrato).

O ensaio TBARS quantifica produtos oriundos da decomposição oxidativa de ácidos graxos. Esses produtos são passíveis de reagir com o ácido tiobarbitúrico, formando cromóforos que são quantificados espectrofotometricamente (CRAFT et al., 2012). Nessas condições, EETg foi capaz de prevenir a formação de tais produtos de maneira mais efetiva na presença de ferro como indutor de estresse do que em condições basais ($\text{CI}_{50} = 88,57 \pm 11,03$ e $173,80 \pm 2,26 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Isso provavelmente decorreu do fato de EETg se mostrar mais efetivo na quelação do ferro, evitando que esse desencadeasse o processo oxidativo do que simplesmente inibindo a reação em cadeia da peroxidação dos fosfolipídios presentes no meio reacional. A pró-oxidação de compostos fenólicos em doses crescentes também é citada na literatura como um fator que leva ao incremento na quantidade de produtos resultantes da degradação de lipídios (PESSOA, 2015).

5.3 Bioacessibilidade *in vitro* de compostos fenólicos após digestão simulada

Após a digestão gastrointestinal, os índices de bioacessibilidade dos compostos fenólicos (BCF) em *T. gardneriana* foram de 48,65 e 69,28% na presença e ausência de enzimas digestivas, respectivamente (Tabela 7). Já o ácido gálico, considerado padrão de ácido fenólico para quantificação de compostos fenólicos totais, apresentou valores menos expressivos (32,58 e 28,43% nas digestões enzimática e não-enzimática, respectivamente). Esse comportamento foi também encontrado para outros ácidos fenólicos. Um caso similar é descrito para o ácido ferúlico que é parcialmente degradado no ambiente alcalino do intestino (D'ANTUONO et al., 2015). Alguns autores encontraram valores entre 0 e 14% para a bioacessibilidade de compostos fenólicos provenientes das sementes de *Opuntia albicarpa* cv. Reyna e *Opuntia ficus-indica* cv. Rojo pelon (RAMÍREZ-MORENO et al., 2011). Esses valores são considerados baixos, se comparados com os do presente trabalho. De fato, para matrizes vegetais sólidas, como é o caso de extratos vegetais, a bioacessibilidade de compostos fenólicos pode variar de 30 a 100% (ALMINGER et al., 2014). Esse intervalo de valores é devido, quase que exclusivamente, à

Tabela 7 - Polifenóis totais, flavonoides totais, atividade antioxidante e índices de bioacessibilidade nos sobrenadantes antes e após digestão gastrointestinal simulada

Amostra	Tratamento	Polifenóis totais (mg de acg/500 mg de extrato)	BCF	Flavonoides totais (mg de querc/500 mg de extrato)	BF	DPPH (N %)	IAAB	FRAP (mM de FeSO ₄ /500 mg de extrato)	IAAB	EET g: extr ato etan ólic o das sem ente s de Trip laris gard neri ana; acg: equi vale
EETg	Antes da digestão	1,07 ± 0,01 ^a		0,54 ± 0,01 ^a		115,60 ± 0,30 ^a		176,37 ± 1,89 ^a		
	Pós-intestinal	0,52 ± 0,01 ^c	48,65 ^b	0,44 ± 0,02 ^b	81,48 ^b	78,61 ± 0,17 ^c	68,00 ^d	159,04 ± 0,8 ^b	90,17 ^a	
	Pós-intestinal sem enzimas	0,74 ± 0,01 ^b	69,28 ^a	0,52 ± 0,003 ^a	96,29 ^a	90,21 ± 0,63 ^b	78,04 ^c	152,77 ± 1,01 ^c	86,62 ^b	
Ácido gálico	Antes da digestão	3,13 ± 0,05 ^a		-		114,65 ± 0,36 ^a		393,71 ± 3,06 ^a		
	Pós-intestinal	1,02 ± 0,02 ^b	32,58 ^c	-		97,78 ± 0,46 ^c	85,29 ^b	264,77 ± 2,60 ^c	67,25 ^c	
	Pós-intestinal sem enzimas	0,89 ± 0,002 ^c	28,43 ^d	-		105,93 ± 1,60 ^b	92,39 ^a	359,57 ± 1,01 ^b	91,33 ^a	
Quercetina	Antes da digestão	-		12,36 ± 0,02 ^a		114,15 ± 0,66 ^a		360,77 ± 24,51 ^a		
	Pós-intestinal	-		6,29 ± 0,03 ^c	50,89 ^c	33,93 ± 0,21 ^b	29,72 ^e	23,31 ± 1,41 ^b	6,46 ^e	
	Pós-intestinal sem enzimas	-		6,54 ± 0,02 ^b	52,91 ^c	31,77 ± 0,49 ^c	27,83 ^f	41,97 ± 2,66 ^b	11,63 ^d	

ntes de ácido gálico; BCF: bioacessibilidade de compostos fenólicos; BF: bioacessibilidade de flavonoides; querc: equivalentes de quercetina; IAAB: índice de atividade antioxidante/bioacessível; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila; N %: percentual de neutralização do radical DPPH; FRAP: poder antioxidante de redução do ferro; FeSO₄: sulfato ferroso;

Resultados são expressos como média ± desvio padrão para polifenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante;

^{a-c} Diferenças significativas dentro da mesma linha para cada amostra são mostradas por letras diferentes (teste de Tukey, p <0,05);

^{a-f} Diferenças significativas dentro da mesma coluna (BCF, BF e IAAB) são mostradas por letras diferentes (teste de Tukey, p <0,05).

ação de enzimas digestivas, que por sua vez, podem interferir na integridade e estabilidade de compostos fenólicos (GARBETTA et al., 2014).

A formação de complexos do tipo proteína-composto fenólico ocorre primeiramente por interações hidrofóbicas não covalentes que, em seguida, são estabilizadas por pontes de hidrogênio (NAGY et al., 2012). Uma associação irreversível entre esses dois elementos pode resultar também de ligações covalentes, onde os compostos fenólicos no meio reacional se auto-oxidam em quinonas, sendo capazes de reagir com grupos nucleófilos das moléculas de proteínas. Além disso, a ação de enzimas digestivas pode induzir mudanças nas estruturas químicas dos compostos fenólicos, principalmente, em seus grupamentos hidroxila. Conseqüentemente, sua solubilidade torna-se reduzida no lúmen intestinal, permanecendo indisponíveis para absorção, ou seja, com bioacessibilidade diminuída (KROLL; RAWEL; ROHN, 2003; JAKOBEK, 2015).

Em relação aos flavonoides totais em EETg, os índices de bioacessibilidade (BF) foram de 81,48 e 96,29% no pós-intestinal com e sem enzimas, respectivamente (Tabela 7). Conforme enfatizado pela literatura, os flavonoides, com exceção das antocianinas, são estáveis em pH alcalino, isto é, não costumam ser degradados no meio intestinal (TAGLIAZUCCHI et al., 2010). Essa circunstância explicaria o motivo pelo qual essa classe de compostos fenólicos apresentou altos valores de bioacessibilidade. A título de comparação, as porcentagens de flavonoides totais bioacessíveis após a fase intestinal para tomates (*Solanum lycopersicum*) e ameixas (*Prunus domestica*) homogêneos foram de 63 e 106%, respectivamente (TAGLIAZUCCHI et al. 2012). Os valores exibidos pelo flavonoide quercetina utilizado na digestão, quando confrontados com os apresentados por EETg, mostraram-se inferiores (50,89e 52,91% na presença e ausência de enzimas digestivas, respectivamente). Isso pode ser atribuído aos diferentes compostos de natureza flavonoide em EETg que resistiram ao processo digestivo, como evidenciado no perfil de compostos fenólicos pós-digestão obtido por UPLC-QTOF a ser discutido adiante.

Comparações da atividade antioxidante antes e após o processo digestivo (Tabela 7) revelou que a digestão aparentou ser um importante fator na manutenção dessa propriedade em EETg, assim como nas amostras de ácido gálico e quercetina. Esse fato foi explicado, mais uma vez, por meio da interação entre compostos fenólicos e proteínas. Conseqüentemente, as atividades antioxidantes foram influenciadas negativamente, como esperado com os índices reduzidos de bioacessibilidade de compostos fenólicos, mencionados acima.

É importante salientar que os valores de IAAB para EETg, em linhas gerais, mostraram-se inferiores aos do ácido gálico e superiores aos de quercetina, porém com a bioacessibilidade maior que 50%. Esse resultado possivelmente decorreu do efeito sinérgico entre os compostos fenólicos liberados da matriz vegetal durante a digestão, tornando-os assim, capazes de contribuir para a manutenção das atividades de neutralização de radicais e de poder redutor a níveis desejáveis (D'ANTUONO et al., 2015; STANISAVLJEVIC et al., 2015). Estudo similar também indicou elevada capacidade de neutralização do radical DPPH após a digestão *in vitro* de groselhas (*Ribes uva-crispa* var. Tixia), mesmo com um decréscimo no seu conteúdo total de compostos fenólicos (CHIANG; KADOUH; ZHOU, 2013). Outra informação a ser levada em consideração diz respeito ao fato das amostras terem sido submetidas à partição com metanol e, em seguida, diluídas antes das análises. Assim, é de se esperar que a presença de possíveis interferentes gerados durante a digestão (peptídeos e aminoácidos livres, por exemplo) não influenciasses nos resultados dos testes de atividade antioxidante (HELAL et al., 2014).

É sabido que a neutralização de radicais é pH dependente. À medida que o valor de pH aumenta, a capacidade de neutralização também se eleva devido à desprotonação da hidroxila presente no anel aromático dos compostos fenólicos, o que facilita a doação de hidrogênios e/ou elétrons (TAGLIAZUCCHI et al., 2010). Em virtude disso, a conservação das amostras em ambiente ácido após a digestão *in vitro* pode ter contribuído para um menor incremento das atividades antioxidantes.

5.3.1 Perfil de compostos fenólicos antes e após digestão *in vitro*

EETg foi submetido à análise por UPLC-QTOF para determinação de seu perfil fenólico antes e após a digestão *in vitro*. Os resultados permitiram a identificação de treze compostos fenólicos dentre os catorze picos gerados em cromatograma antes do processo digestivo (Figura 15A e Tabela 8). Os constituintes mais abundantes foram: epicatequina-3-*O*-galato, ácido gálico e procianidinas tipo B acrescidas de um e dois grupos galoil (unidades de ácido gálico) (Figura 15A). As estruturas químicas de alguns compostos fenólicos identificados em EETg estão representadas a seguir (Figura 16). Deve-se ressaltar que, esses achados de caracterização fenólica estão em conformidade com estudos anteriores que tratam da identificação de compostos fenólicos em plantas da família Polygonaceae. Por exemplo, a partir do fracionamento do extrato das cascas de *Coccoloba dugandiana*, ácido gálico e epigallocatequina galato foram isolados (LI et al., 1999). Além disso, com exceção de um

recente estudo envolvendo folhas de *T. gardneriana* onde somente flavonoides glicosilados foram detectados (MACÊDO, 2015), a maioria dos compostos fenólicos encontrados em exemplares do gênero *Triplaris* contem grupos galoil. Essa característica, além de servir como marcador quimiotaxonômico útil para espécies desse gênero (OLIVEIRA et al., 2008), é corroborada pela identificação de procianidinas ligadas a grupos galoil em *T. gardneriana*.

Figura 15 – Perfil UPLC-QTOF de compostos fenólicos presentes no extrato das sementes de *Triplaris gardneriana*: (A) extrato bruto, (B) pós-intestinal, (C) pós-intestinal sem enzimas. 1 = ácido 5-*O*-galoil-quínico; 2 = monogaloil glucose; 3 = ácido gálico; 4 = ácido 3-*O*-galoil-quínico; 5 = galoil hexosídeo; 6 = não identificado; 7 = digaloil hexosídeo; 8 = derivado de ácido gálico; 9 = derivado de ácido gálico I; 10 = catequina; 11 = galato de procianidina tipo B (P2G1); 12 = digalato de procianidina tipo B (P2G2); 13 = epicatequina-3-*O*-galato; 14 = galato de procianidina tipo B (P2G1) I; 15 = galato de metila; 16 = digalato de procianidina tipo B (P2G2) I; 17 = derivado de ácido gálico II; 18 = galato de metila I; 19 = digalato de procianidina tipo B (P2G2) II.

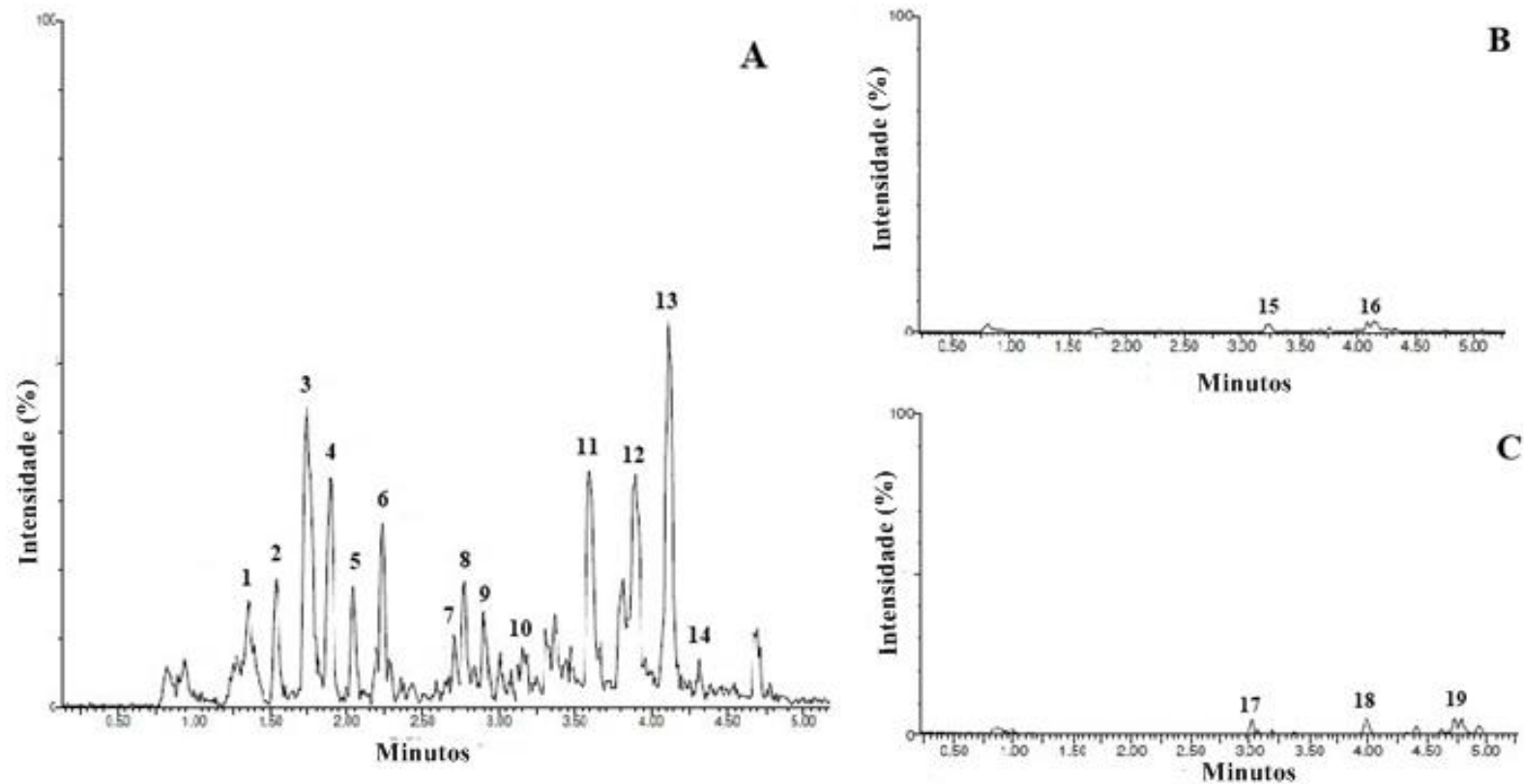


Tabela8 - Compostos fitoquímicos detectados no extrato das sementes de *Triplaris gardneriana* (EETg) via UPLC-QTOF em modos de ionização positivo e negativo

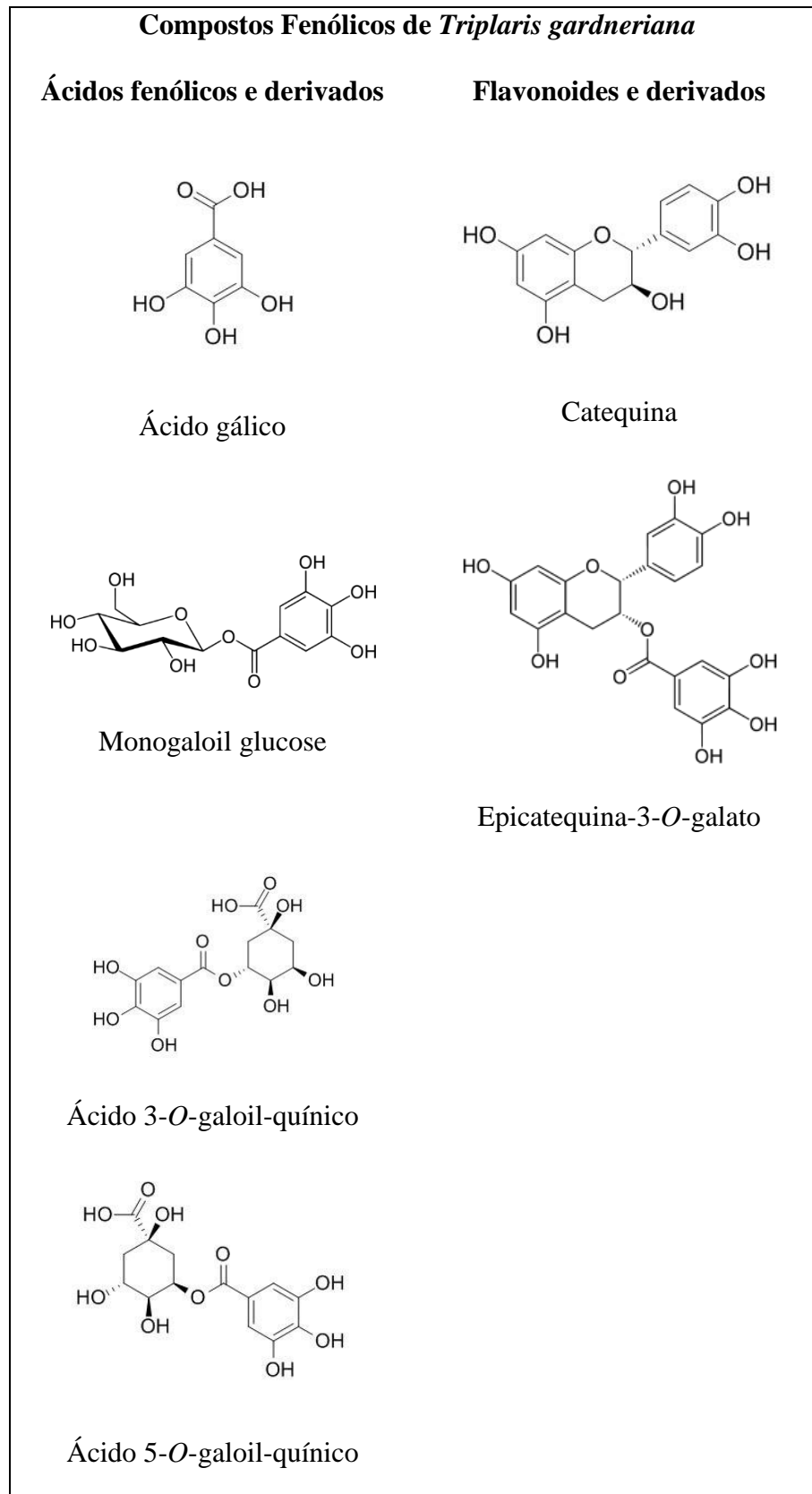
Pico no.	Tr min	[M+H] ⁺ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	Produtos Iônicos (MS/MS) ^a	Fórmula Molecular	Razão m/z Calculada	Erro (ppm)	Composto Proposto	Referência
1	1,35	345,0135	343,0667	191,0526 (65), 169,0121 (100)	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	343,0665	0,6	Ácido 5- <i>O</i> -galoil-quínico	Savić et al (2014)
2	1,55	333,0613	331,0645	271,0485 (12), 211,0288 (6), 169,0164 (27)	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331,0655	-6,0	Monogaloil glucose	Liu et al (2012) Wyrepkowski et al (2014)
3	1,73	171,0276	169,0132	125,0231 (100)	C ₇ H ₆ O ₅	169,0137	-3,0	Ácido gálico	Wyrepkowski et al (2014) Flamini (2013)
4	1,89	345,0135	343,0676	191,0554 (20), 169,0117 (100), 125,0248 (50)	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	343,0665	3,2	Ácido 3- <i>O</i> -galoil-quínico	Wyrepkowski et al (2014)
5	2,04	-	331,0569	169,0114 (100)	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331,0665	1,8	Galoil hexosídeo	Abu-Reidah et al (2015)
6	2,24	-	279,1076	119,0339 (15)	C ₁₁ H ₂₀ O ₈	279,1080	1,4	Não identificado	-
7	2,70	485,0990	483,0753	271,0432 (22), 193,0087 (8), 169,0127 (25), 125,9119 (2)	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483,0775	4,6	Digaloil hexosídeo	Abu-Reidah et al (2015)
8	2,78	405,0176	403,1163	169,0148 (68), 125,0205 (45)	C ₂₄ H ₂₀ O ₆	403,1182	4,7	Derivado de ácido gálico	-
9	2,89	405,1569	403,1170	169,0120 (55), 125,0209 (29)	C ₂₄ H ₂₀ O ₆	403,1182	3,0	Derivado de ácido gálico I	-
10	3,14	-	289,0710	271,0370 (12)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0712	0,9	Catequina	-
11	3,59	731,1642	729,1424	577,1125 (25),	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729,1456	-4,4	Galato de procianidina	Russo et al

				407,0752 (32), 289,0695 (15), 169,0142 (8)				tipo B (P2G1)	(2013)
12	3,90	883,1836	881,1537	729,1426 (22), 559,0952 (8), 407,0562 (3), 169,0089 (2)	$C_{44}H_{34}O_{20}$	881,1565	-3,2	Digalato de procianidina tipo B (P2G2)	Russo et al (2013)
13	4,11	443,0888	441,0838	289,0659 (20), 169,0115 (58), 125,0206 (65)	$C_{22}H_{18}O_{10}$	441,0822	3,6	Epicatequina-3- <i>O</i> -galato	Russo et al (2013)
14	4,31	731,1883	729,1469	577,1281 (10), 289,0262 (10), 169,0063 (8)	$C_{37}H_{30}O_{16}$	729,1456	1,8	Galato de procianidina tipo B (P2G1) I	Russo et al (2013)

Tr: tempo de retenção; m/z: relação massa/carga; I, II: indicação para isômero;

^a Padrão de fragmentação no modo de ionização negativo; entre parênteses (intensidade relativa %).

Figura 16 – Estruturas químicas de compostos fenólicos identificados porUPLC-QTOF no extrato etanólico das sementes de *Triplaris gardneriana*



Fonte: Elaborado pelo autor

O perfil UPLC-QTOF de compostos fenólicos após digestão *in vitro* (Figura 15B e 15C) mostrou ser consistente com os índices de bioaccessibilidade (Tabela 7) observados para EETg. Como mencionado anteriormente, o pH alcalino do lúmen intestinal favorece a degradação de ácidos fenólicos e derivados (Helal et al., 2014). Como consequência disso, é observado o desaparecimento de grande parte dos picos referentes aos compostos fenólicos em EETg após a digestão (Figura 15B e 15 C). Esse fenômeno se refletiu nos baixos valores de BCF e, por conseguinte, na redução dos IAAB mensurados pelos ensaios DPPH e FRAP. O galato de metila, éster do ácido gálico gerado no decorrer do processo, juntamente com um derivado desse mesmo ácido, foram, aparentemente, os únicos representantes de ácidos fenólicos resistentes à digestão *in vitro* (Tabela 9).

Na presença ou ausência de enzimas digestivas, flavonoides, representados por procianidinas, mostraram-se bioacessíveis mesmo em menor intensidade, após adição do fluido intestinal (Figura 15B e 15C e Tabela 9). Resultado semelhante tem sido descrito após digestão gastrointestinal simulada de extrato de sementes de uva comercial, onde catequinas e derivados, dentre os quais se destacavam procianidinas, também foram resistentes ao tratamento enzimático (LAURENT; BESAÇON; CAPORICCIO, 2007).

No geral, esses resultados sugerem que, mesmo com reduções no conteúdo de compostos fenólicos, evidenciado via LC-MS e nos valores de atividades antioxidantes em EETg após a digestão gastrointestinal, esses compostos ainda se mantiveram bioacessíveis.

Tabela 9 - Compostos fitoquímicos detectados via UPLC-QTOF em modos de ionização positivo e negativo no extrato das sementes de *Triplaris gardneriana* (EETg) após digestão *in vitro*

Tratamento	Pico no.	Tr min	[M+H] ⁺ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	Produtos Iônicos (MS/MS) ^a	Fórmula Molecular	Razão m/z Calculada	Erro (ppm)	Composto Proposto	Referência
Pós-intestinal	15	3,19	185,0359	183,0283	168,0056 (8), 124,0145 (100)	C ₈ H ₈ O ₅	183,0293	-5,5	Galato de metila	Abu-Reidah et al (2015)
	16	4,13	883,1960	881,1532	729,1483 (5), 559,1055 (10), 407,0661 (40), 169,0116 (5)	C ₄₄ H ₃₄ O ₂₀	881,1565	-3,7	Digalato de procianidina tipo B (P2G2) I	Russo et al (2013)
	17	3,03	341,1182	339,0341	169,0090 (100), 125,0214 (58)	C ₁₄ H ₁₂ O ₁₀	339,0352	-3,2	Derivado de ácido gálico II	Moreno-Murillo et al (2008)
Pós-intestinal sem enzimas	18	3,99	185,1017	183,0286	168,0063 (12), 124,0154 (100)	C ₈ H ₈ O ₅	183,0293	-3,8	Galato de metila I	Abu-Reidah et al (2015)
	19	4,72	883,1689	881,1536	729,1403 (5), 559,1125 (20), 407,0830 (1), 169,0092 (2)	C ₄₄ H ₃₄ O ₂₀	881,1565	-3,3	Digalato de procianidina tipo B (P2G2) II	Russo et al (2013)

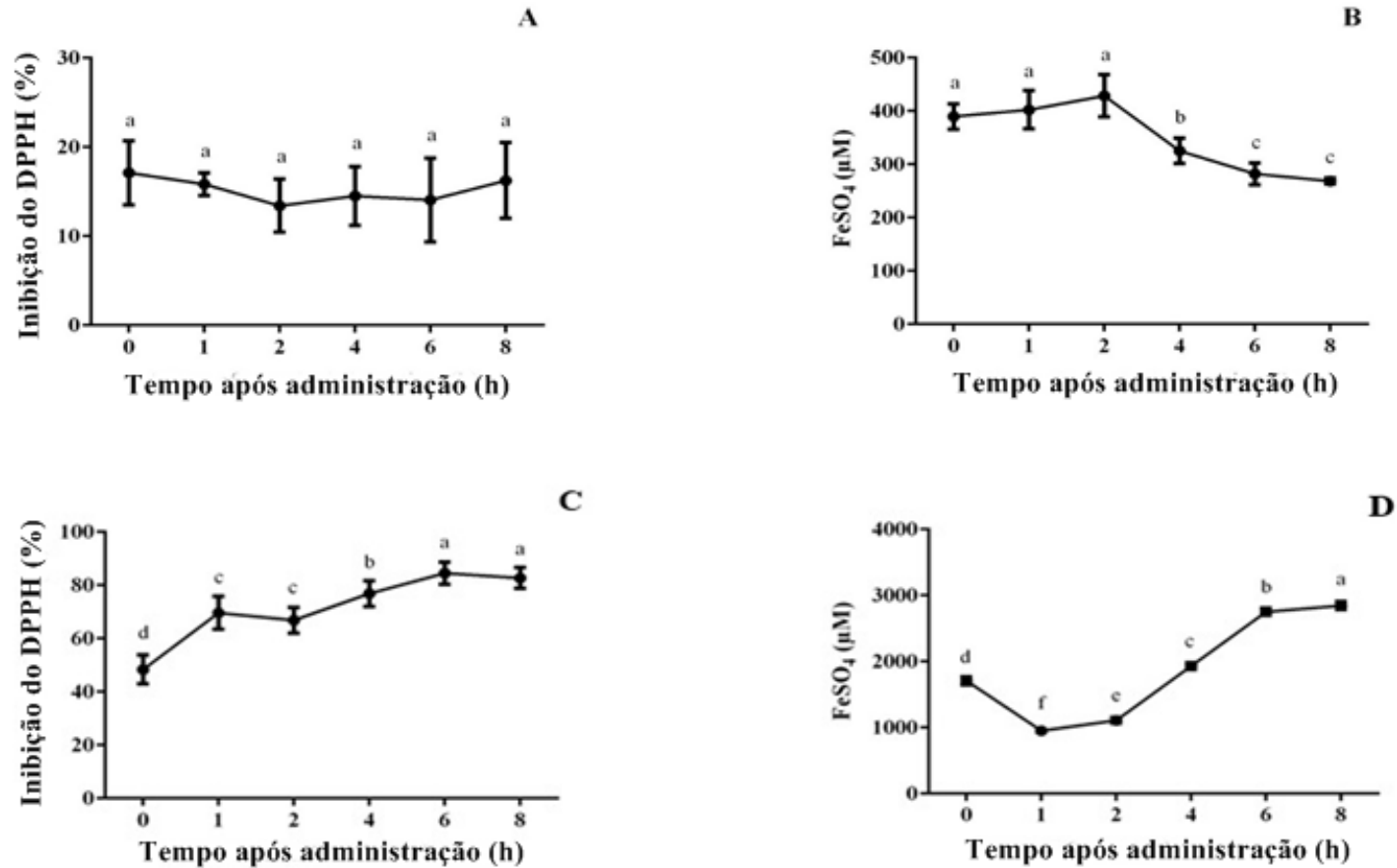
Tr: tempo de retenção; m/z: relação massa/carga; I, II: indicação para isômero;

^a Padrão de fragmentação no modo de ionização negativo; entre parênteses (intensidade relativa %).

5.4 Biodisponibilidade de compostos fenólicos em ratos

A capacidade antioxidante total (CAT) do plasma e urina de ratos Wistar em diferentes tempos foi determinada após a administração de dose oral única de EETg. Essa abordagem se propôs em estimar a biodisponibilidade indireta dos compostos fenólicos de *T. gardneriana* através da avaliação da CAT desses fluidos biológicos. Por meio dessa análise, evidências farmacocinéticas da absorção e eliminação dos compostos fenólicos presentes naquele material seriam comprovadas. Primeiramente, para as amostras de plasma, a capacidade de inibição do radical DPPH permaneceu constante em todos os tempos após a administração de EETg (Figura 17A). Enquanto que, para o ensaio FRAP (Figura 17B), uma queda no poder de redução do ferro foi visualizada a partir das primeiras 4 horas após a administração da preparação. Tendências na CAT como essas condizem com pobre biodisponibilidade oral de compostos fenólicos (SCALBERT et al., 2002).

Figura 17 – Capacidade antioxidante total (CAT) do plasma e urina de ratos Wistar após administração oral de extrato de sementes de *Triplaris gardneriana* (EETg) avaliada pelos ensaios DPPH e FRAP. A dose administrada foi de 25 mg por 200 g de peso corporal. Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão (n = 4 ratos/grupo). Valores com letras diferentes representam diferenças significativas (teste de Tukey, $p < 0,05$). DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. FRAP: poder antioxidante de redução do ferro. FeSO₄: sulfato ferroso. A = CAT do plasma por DPPH, B = CAT do plasma por FRAP, C = CAT de urina por DPPH, D = CAT de urina por FRAP



A maioria dos compostos fenólicos adquiridos através da dieta ou por suplementação, é rapidamente absorvida e biotransformada (PALAFOX-CARLOS; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011). A concentração plasmática de seus metabólitos é transitória, apresentando picos entre 1,5 e 3 h, no caso de matrizes complexas; enquanto que, para compostos isolados e/ou purificados, concentrações máximas ocorrem em menos de 1 h após administração por via oral (SERRA et al., 2010; PANDAREESH; MYTHRI; SRINIVAS BHARATH, 2015). Por exemplo, a administração oral aguda de suco de framboesa (*Rubus idaeus* var. Glen Ample) em ratos Sprague Dawley resultou em baixíssimas concentrações plasmáticas de antocianinas após 2 h da ingestão (BORGES et al., 2007). Outro trabalho verificou que o extrato de sementes de uva rico em compostos fenólicos, somente quando ofertado em dias consecutivos a ratos Sprague Dawley, mostrou níveis elevados desses fitoquímicos no plasma (FERRUZZI et al., 2009). Portanto, a redução na CAT observada no ensaio FRAP pode ser atribuída à decrescente concentração plasmática de compostos fenólicos percebida após 4 h da administração de EETg (Figura 17B).

Análises de ordem termodinâmica predizem que a neutralização de radicais por parte de moléculas antioxidantes constitui um processo energeticamente favorável. Contudo, baixas concentrações plasmáticas e teciduais de compostos fenólicos, mesmo após o consumo de alimentos ou preparações ricas nessas substâncias, são incompatíveis com os requerimentos cinéticos necessários para se atingir taxas de neutralização de relevância fisiológica (GALLEANO et al., 2010). Baseado nessa declaração, a constância nos valores observados no ensaio com o radical DPPH para as amostras de plasma pode ser explicada. Baixas concentrações de compostos fenólicos no meio reacional dificultariam a ocorrência da reação de neutralização no sentido de estabilização desse radical.

Em relação às amostras de urina analisadas, aumento na CAT foi verificado a partir de 1 e 4 h após a administração de EETg, para os ensaios DPPH e FRAP, respectivamente (Figura 17C e 17D). Esse último tempo correspondeu ao momento onde a redução na CAT do plasma foi observada; demonstrando assim, que os processos de absorção e eliminação dos compostos fenólicos em *T. gardneriana* estão estritamente relacionados. Por via de regra, os compostos fenólicos, quando absorvidos, são reconhecidos pelo organismo como xenobióticos, estimulando os mecanismos de detoxificação e conseqüentemente, são rapidamente removidos da corrente sanguínea (CROZIER; DEL RIO; CLIFFORD, 2010). Os seres vivos não apresentam artifícios para acúmulo ou retenção de compostos fenólicos, por isso, os metabolizam de forma a serem excretados tanto na urina como na bile após a ingestão (PORINI; RISO, 2008; OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

O metabolismo de compostos fenólicos inicia-se no lúmen do intestino delgado, sendo que modificações pós-absortivas também são passíveis de ocorrer no fígado e em outros órgãos. Além disso, a atuação da microbiota intestinal por fermentação é capaz de biotransformá-los em substâncias de baixa massa molecular, que são posteriormente absorvidas (MANACH et al., 2005; DEL RIO et al., 2010; PALAFOX-CARLOS; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011). Em razão disso, a avaliação da biodisponibilidade desses fitoquímicos deve incluir a análise não só dos compostos originais, mas também de seus produtos metabólicos (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014). Nesse contexto, o diagnóstico estrutural dos metabólitos gerados após a ingestão de compostos fenólicos presentes em EETg foi realizado a partir da utilização de metodologia baseada em espectrometria de massa.

Em geral, a recuperação de compostos fenólicos e seus metabólitos na urina, plasma e tecidos é baixa; onde concentrações em escalas micromolar, nanomolar e ainda menores, respectivamente, são encontradas (KUIJSTEN et al., 2006; ALMINGER et al., 2014; MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016). Assim sendo, no presente estudo, a análise por UPLC-QTOF não foi capaz de detectar metabólitos provenientes de EETg no plasma dos animais estudados. Casos equivalentes onde ácidos clorogênicos revelaram-se indetectáveis no plasma após o consumo de compostos fenólicos isolados ou alimentos ricos nesses fitoquímicos foram reportados na literatura (OLIVEIRA; BASTOS, 2011). Ainda com base nos resultados de caracterização fitoquímica, onde galato de metila, um derivado de ácido gálico e procianidinas demonstraram-se bioacessíveis, vários trabalhos apontam que derivados de ácido gálico e catequina possuem ótima taxa de absorção pelo organismo e, em virtude disso, aparentam ser biodisponíveis (APPELDOORN et al., 2009; CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; JAKOBEK, 2015).

A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada de forma íntegra na urina. A ação de enzimas de fase II da biotransformação de xenobióticos na mucosa intestinal e, posteriormente, no fígado e nos tecidos periféricos garante modificações nas estruturas dos compostos fenólicos. Os metabólitos circulantes estão sob a forma de conjugados, detentores de grupos aniônicos capazes de manter suas propriedades antioxidantes (RECHNER et al., 2002; SCALBERT et al., 2002; DEL RIO et al., 2010; CARBONELL-CAPELLA et al., 2014). A ocorrência desses metabólitos também explicaria a elevação na CAT das amostras urinárias pós-administração de EETg (Figura 17C e 17D).

Os metabólitos de compostos fenólicos detectados na urina compreendem uma variedade de ácidos aromáticos de baixa massa molecular (ácidos benzoico, fenilacético,

fenilpropionico e fenilvalérico, por exemplo). Esses provêm da fissão dos anéis aromáticos de compostos fenólicos mais complexos por bactérias do cólon, assim como da biotransformação por reações hepáticas e tissulares dos compostos originais (RECHNER et al., 2002; PANDAREESH; MYTHRI; SRINIVAS BHARATH, 2015). Apresentam-se como pequenos conjugados, um indício que tiveram excreção facilitada pelo aumento de sua hidrofilicidade (SOUZA; CASANOVA; COSTA, 2015). Derivados sulfatados, glicuronados e/ou metilados são os mais encontrados, porém conjugações com o aminoácido glicina são comuns de acontecerem (OLIVEIRA; BASTOS, 2011; BARROS et al., 2016). Baseado nessas informações, através de UPLC-QTOF, foram detectados dois metabólitos urinários que foram originados a partir da biotransformação dos compostos fenólicos em EETg, a saber: ácido hipúrico e fenilacetil glicina (Tabela 10).

Tabela10 - Metabólitos excretados pela urina 0-8 h após a administração do extrato das sementes de *Triplaris gardneriana* (EETg) em 24 ratos Wistar machos

Tr min	[M+H] ⁺ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	Produtos Iônicos (MS/MS) ^a	Fórmula Molecular	Razão m/z Calculada	Erro (ppm)	Composto Proposto	Tratamento						Referência
								G0	G1	G2	G4	G6	G8	
3,47	180,0626	178,0504	165,0538 (50), 134,0606 (30), 121,0652 (100), 79,9592 (45)	C ₉ H ₉ NO ₃	178,0505	0,0	Ácido hipúrico	+	+	+	+	+	+	Jia et al (2016)
3,89	194,0795	192,0660	74,0241 (100)	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	192,0661	-0,5	Fenilacetil glicina	-	+	-	+	+	+	Sauer et al (1997)

Tr: tempo de retenção; m/z: relação massa/carga;;

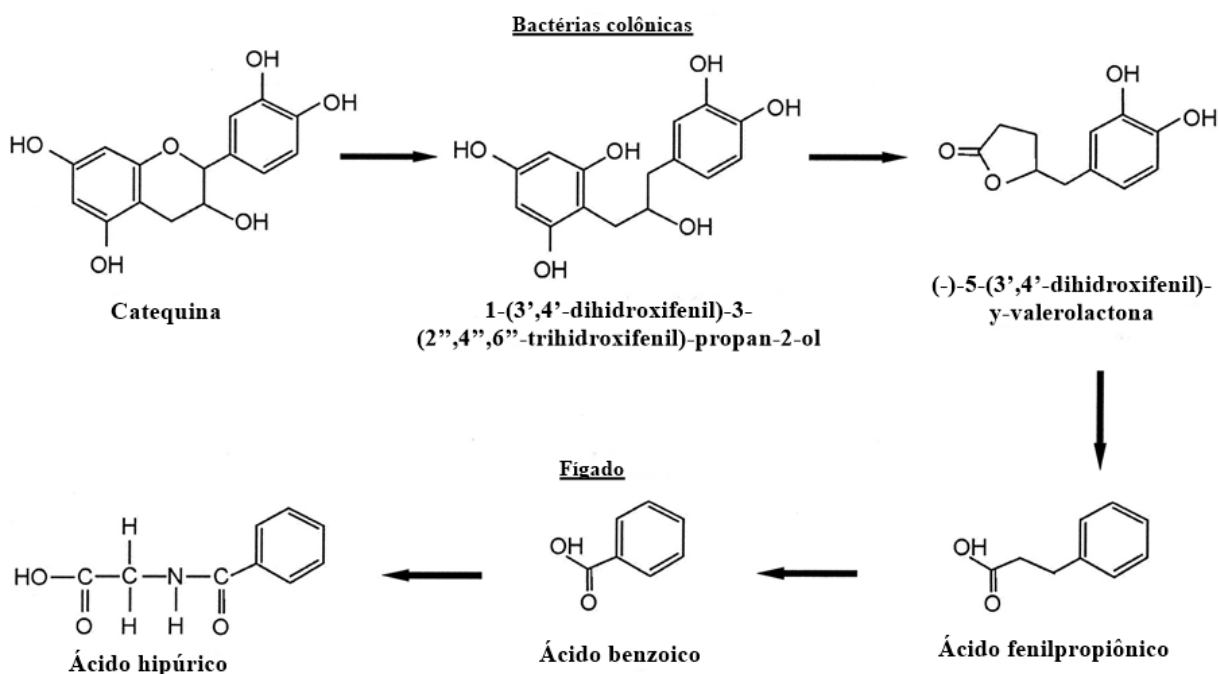
^a Padrão de fragmentação no modo de ionização negativo; entre parênteses (intensidade relativa %).

+, -: indica presença e ausência, respectivamente;

G0, G1, G2, G4, G6, G8: grupos de animais após 0, 1, 2, 4, 6 e 8 horas da administração, respectivamente.

O ácido hipúrico origina-se da conjugação da glicina com metabólitos benzoicos provenientes do catabolismo dos ácidos gálico e quínico, catequinas e seus derivados (GONTHIER et al., 2003; DEL RIO et al., 2010) (Figura 18). Assim como no presente estudo, pesquisas contendo métodos bioanalíticos para estudo de compostos fenólicos apontaram o ácido hipúrico como um dos principais produtos da biotransformação de preparações vegetais contendo ácidos clorogênicos e catequinas (OLTHOF et al., 2003; SANTOS et al., 2014). Contudo, esse biomarcador também é gerado por outras rotas metabólicas que não incluem a supracitada, como é o caso do catabolismo dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina (CROZIER; DEL RIO; CLIFFORD, 2010). No entanto, no presente estudo, os animais estiveram em jejum por 8 h, o que sugere que a maior parte do ácido hipúrico excretado veio dos compostos fenólicos de EETg (Tabela 10). A constância e até mesmo elevação na excreção de ácido hipúrico observadas após o consumo de chá verde por voluntários humanos serviu como suporte para essa hipótese (MULDER; RIETVELD; VAN AMELSVOORT, 2005).

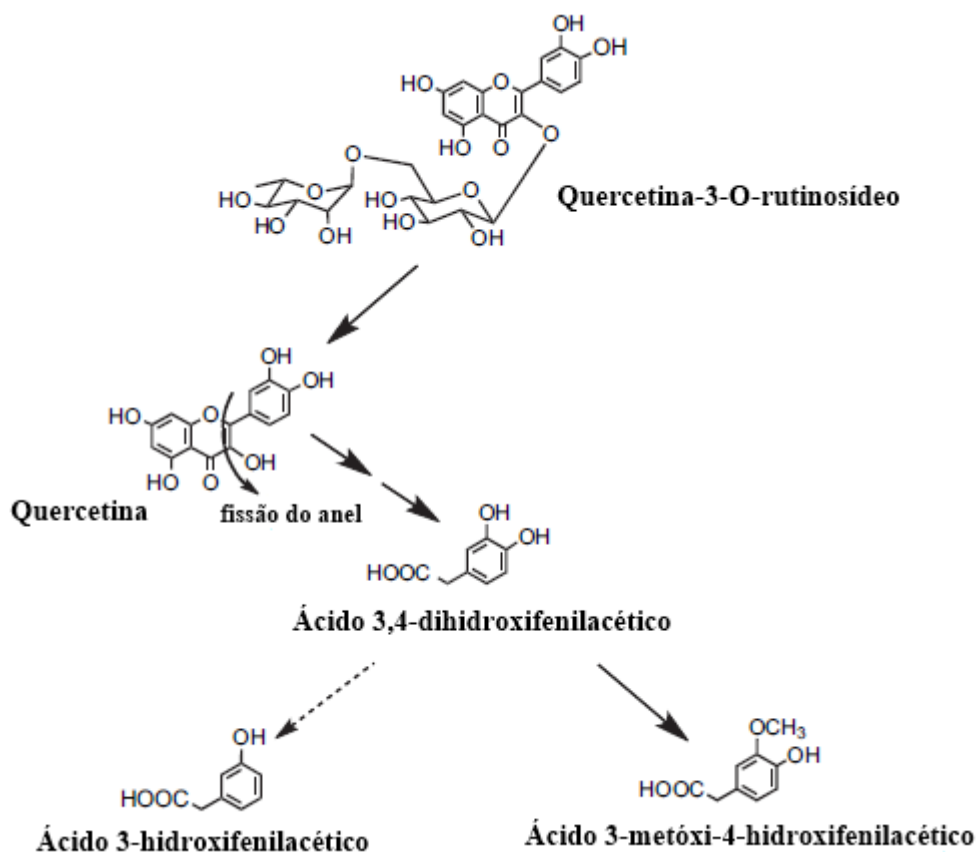
Figura 18 – Representação esquemática envolvendo o catabolismo de catequina por bactérias colônicas e enzimas hepáticas e sua subsequente excreção urinária sob a forma de ácido hipúrico



Fonte: Mulder, Rietveld, e Van Amelsvoort (2005).

A fenilacetil glicina, produto da conjugação entre glicina e ácido fenilacético, correspondeu ao segundo metabólito identificado na urina dos roedores nos tempos de 1, 4, 6 e 8 h após administração de EETg (Tabela 10). O ácido fenilacético, além de derivar da fenilalanina, provem do intenso catabolismo de flavonoides (Figura 19), com especial atenção aos de esqueletos carbonados do tipo flavan-3-ol, como é o caso das catequinas e seus derivados (CROZIER; DEL RIO; CLIFFORD, 2010). A partir disso, a ocorrência de catequinas em EETg parece estar estritamente relacionada ao aparecimento desse metabólito nas amostras urinárias estudadas. À luz dos conhecimentos atuais, a presença de fenilacetil glicina na urina foi confirmada para ratos, camundongos e cães, porém sua detecção em seres humanos é controversa (MATSUMOTO et al., 1995; SERRANO-CONTRERAS et al., 2016).

Figura 19 – Rota proposta para o catabolismo de flavonoides exemplificado pela quercetina-3-O-rutinosídeo resultando na produção de diferentes formas do ácido fenilacético antes de sua conjugação com a glicina e posterior excreção urinária



Fonte: Del Rio et al (2010).

Em linhas gerais, a análise do plasma e de urina de roedores é de grande auxílio no delineamento do perfil farmacocinético de compostos fenólicos após suplementação aguda, como é o caso do presente trabalho. Apesar de não prover uma avaliação quantitativa da biodisponibilidade, essas interpretações refletem a capacidade do organismo em assimilar e biotransformar essas moléculas (CROZIER; DEL RIO; CLIFFORD, 2010; SANTOS et al., 2014).

Vários estudos sobre biodisponibilidade apontam que as quantidades de compostos fenólicos efetivamente absorvidos são baixas (DUEIK; BOUCHON, 2016). Em roedores, a biodisponibilidade costuma apresentar valores entre 2 e 20% (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014). Todavia, o valor de 0,17% para o flavonoide taxifolina em ratos, muito abaixo do intervalo anteriormente mencionado, já foi descrita na literatura (WANG et al., 2009). Com base nos resultados de CAT e de análise por UPLC-QTOF encontrados para o plasma e urina de ratos, o comportamento farmacocinético e conseqüentemente, a biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes em EETg, mostraram-se limitados. Isso pode ser atribuído, principalmente, a sua deficiente absorção por via oral, concentrações fisiológicas restritas e metabolismo e eliminação acelerados. Juntando todas essas considerações, é possível deduzir que, para manutenção de concentrações plasmáticas desejáveis de compostos fenólicos, provenientes de *T. gardneriana* ou de qualquer outro produto vegetal, repetidas doses são requeridas.

6 CONCLUSÃO

O extrato etanólico das sementes de *Triplaris gardneriana* apresentou um perfil promissor de compostos fenólicos biologicamente ativos, podendo atuar *in vitro* como sequestrante de radicais livres, redutor de metais de transição e inibidor da peroxidação lipídica, enfatizando assim o seu potencial antioxidante.

Parte de compostos fenólicos identificados em *T. gardneriana* foram instáveis em condições gastrointestinais simuladas, tendo conseqüentemente suas propriedades antioxidantes comprometidas pelo processo digestivo. Entretanto, essa espécie vegetal provou ser uma fonte significativa de flavonoides bioacessíveis. Apesar da biodisponibilidade limitada de seus compostos fenólicos, indicada pela baixa influência na CAT plasmática, rápida biotransformação e eliminação urinária, o presente estudo permitiu esclarecer um pouco sobre o metabolismo dessa classe de fitoquímicos, com a detecção de ácido hipúrico e fenilacetil glicina, produtos derivados da sua degradação em roedores.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foi determinado o perfil fitoquímico do extrato etanólico elaborado a partir das sementes de *Triplaris gardneriana* (EETg) através da detecção das principais classes de metabólitos secundários, quantificações dos conteúdos de fenóis e flavonoides totais, além de sua caracterização fenólica por meio de técnicas cromatográficas. Uma vez que não há um método universal para a determinação da atividade antioxidante de extratos vegetais, esta foi avaliada por diferentes metodologias *in vitro*, resultando em dados coerentes com a literatura e passíveis de comparação com outras espécies da mesma família botânica.

Em seguida, a influência da bioacessibilidade sobre a integridade dos compostos fenólicos em EETg, e conseqüentemente em sua atividade antioxidante, foi estudada a partir de um modelo de digestão gastro-pancreática *in vitro* que melhor simulasse as condições fisiológicas humanas. Para o teor de fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante mensurada pelos métodos FRAP e DPPH ao final da digestão *in vitro*, observou-se que os compostos fenólicos mostraram sensíveis à condição alcalina da etapa intestinal e que a provável formação de complexos com as enzimas digestivas, além de modificações em sua estrutura química, resultaram na redução da atividade antioxidante de EETg. Porém, mesmo quando submetido a condições simulatórias de digestão, o extrato apresentou capacidade antioxidante satisfatória (superior a 50%), uma vez que apesar das perdas, os flavonoides se apresentaram bioacessíveis.

A biodisponibilidade dos compostos fenólicos em EETg foi investigada indiretamente em roedores após administração oral em ratos Wistar. Verificou-se que a capacidade antioxidante plasmática decresceu e a urinária aumentou pouco tempo após a ingestão da preparação contendo compostos fenólicos. Isso decorre do fato de que os compostos absorvidos e metabolizados são tratados como xenobióticos e, em virtude disso, são removidos rapidamente da corrente sanguínea. A análise química do plasma e da urina dos roedores, apesar de não prover dados quantitativos precisos da captação pelo trato gastrointestinal, forneceu informações valiosas sobre a identidade e o perfil farmacocinético dos metabólitos gerados após suplementação aguda.

Os resultados de bioacessibilidade e biodisponibilidade reforçam a ideia de que os compostos fenólicos não apresentam o mesmo perfil de atividade antioxidante nos ensaios *in vivo*. Parte disso pode ser explicado pela baixa biodisponibilidade dessas substâncias. As

principais razões encontradas são a fraca estabilidade gastrointestinal e a rápida e extensa metabolização.

É importante salientar que muita pesquisa ainda é necessária para desvendar os fatores que influenciam a bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos provenientes de fontes vegetais. Portanto, torna-se de extrema importância a execução de estudos quantitativos com o propósito de fornecer informações biologicamente relevantes sobre a absorção e metabolismo desta classe de metabólitos secundários, principalmente no que diz respeito ao papel da microbiota intestinal neste último processo. A partir desses resultados, uma compreensão holística dos efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos em sistemas humanos poderá ser estabelecida.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 414-420, 2010.
- ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH, M. S.; JAMOUS, R. M.; ARRAEZ-ROMAN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p. 179-191, 2015.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. **Nutrition**, v. 18, p. 75-81, 2002.
- ALMINGER, M.; AURA, A. M.; BOHN, T.; DUFOUR, C.; EL, S. N.; GOMES, A.; KARAKAYA, S.; MARTÍNEZ-CUESTA, M. C.; McDOUGALL, G. J.; REQUENA, T.; SANTOS, C. N. *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 413-436, 2014.
- AMAROWICZ, R.; TROSZYŃSKA, A.; BARYŁKO-PIKIELNA, N.; SHAHIDI, F. Polyphenolics extracts from legume seeds: correlations between total antioxidant activity, total phenolics content, tannins content and astringency. **Journal of Food Lipids**, v. 11, p. 278–286, 2004.
- ANTOLOVIC, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183–198, 2002.
- APPELDOORN, M. M.; VINCKEN, J. P.; GRUPPEN, H.; HOLLMAN, P. C. H. Procyanidin dimers A1, A2, and B2 are absorbed without conjugation of methylation from the small intestine of rats. **The Journal of Nutrition**, v. 139, p. 1469-1473, 2009.
- ARAUJO, M. M. Estudo etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais no assentamento Santo Antônio, Cajazeiras, PB, Brasil. 130 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2009.
- ARULSELVAN, P.; FARD, T. M.; TAN, W. S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M. E.; KUMAR, S. S. Role of antioxidants and natural products in inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p.1-15, 2016.
- BANNOUR, M.; AOUADHI, C.; KHALFAOUI, H.; KHADHRI, A.; ASCHI-SMITI, S. Barks essential oil, secondary metabolites and biological activities of four organs of Tunisian *Calligonum azel* Maire. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, p. 1-10, 2016.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARROS, G. S. G.; MATOS, F. J. A.; VIEIRA, J. E. V.; SOUSA, M. P.; MEDEIROS, M. C. Pharmacological screening of some Brazilian plants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 22, p. 116-122, 1970.

BARROS, H. R. M.; GARCIA-VILLALBA, R.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; GENOVESE, M. I. Evaluation of the distribution and metabolism of polyphenols derived from cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) in mice gastrointestinal tract by UPLC-ESI-QTOF. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 477-489, 2016.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 15-27, 1999.

BIRCH-MACHIN, M. A.; BOWMAN, A. Oxidative stress and ageing. **British Journal of Dermatology**, v. 175, p. 26-29, 2016.

BLANCAS-BENITEZ, F. J.; MERCADO, G. M.; QUIRÓS-SAUCEDA, A. E.; GONZÁLEZ, E. M.; AGUILAR, G. A. G.; AYERDI, S. G. S. Bioaccessibility of polyphenols associated with dietary fiber and *in vitro* kinetics release of polyphenols in Mexican 'Ataulfo' mango (*Mangifera indica* L.) by-products. **Food & Function**, v. 6, p. 859-868, 2015.

BOLTON, J.L.; TRUSH, M.A.; PENNING, T. M.; DRYHURST, G.; MONKS, T. J. Role of quinones in toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 3, p. 135-160, 2000.

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. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 5, p. 714-725, 2007.

BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2722-2735, 2007.

BRAZ FILHO, R.; RODRIGUES, A. S. Constituintes químicos de *Triplarisgardneriana*. In: XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1974, Recife, Pernambuco. **Ciência e Cultura**, v. 26. p. 184, 1974.

CAITO, S. W.; ASCHNER, M. Mitochondrial redox dysfunction and environmental exposures. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 6, p. 1-48, 2015.

CAMPOS, M. R. S.; RUIZ, J. R.; CHEL-GUERRERO, L.; ANCONA, D. B. *Coccoloba uvifera* (L.) (Polygonaceae) fruit: phytochemical screening and potential antioxidant activity. **Journal of Chemistry**, p. 1-9, 2015.

CARBONELL-CAPELLA, J. M.; BUNIEWSKA, M.; BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 155-171, 2014.

- CARDOSO, C.; AFONSO, C.; LOURENÇO, H.; COSTA, S.; NUNES, M. L. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, p. 5-23, 2015.
- CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTEN, S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1–20, 2013.
- CHIANG, C-J.; KADOUH, H.; ZHOU, K. Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by *in vitro* digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, p. 417-422, 2013.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3ed. Barueri: Manole, 2009, 878 p.
- CRAFT, B.D.; KERRIHARD, A.L.; AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B. Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods used for their assessment. **Comprehensive Review in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 148–173, 2012.
- CROZIER, A.; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 446-467, 2010.
- D'ANTUONO, I.; GARBETTA, A.; LINSALATA, V.; MINERVINI, F.; CARDINALI, A. Polyphenols from artichoke heads (*Cynaracardunculus* (L.) subsp. *scolymus* Hayek): *in vitro* bioaccessibility, intestinal uptake and bioavailability. **Food & Function**, v. 6, p. 1268-1277, 2015.
- DAIBER, A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 897–906, 2010.
- DARVIN, M. E.; PATZELT, A.; KNORR, F.; BLUME-PEYTAVI, U.; STERRY, W.; LADEMANN, J. One-year study on the variation of carotenoid antioxidant substances in living human skin: influence of dietary supplementation and stress factors. **Journal of Biomedical Optics**, v. 13, n. 4, 044028, 2008.
- DE PAULA, J. E. Madeiras úteis para produção de energia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 53-65, 1993.
- DEL RIO, D.; COSTA, L. G.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Polyphenols and health: What compounds are involved? **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 20, p. 1-6, 2010.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.
- DUEIK, V.; BOUCHON, P. Development of polyphenol-enriched vacuum and atmospheric fried matrices: Evaluation of quality parameters and *in vitro* bioavailability of polyphenols. **Food Research International**, v. 88, p. 166-172, 2016.

DURACKOVA, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v. 59, n. 4, p. 459–469, 2010.

ENGERS, V. K.; BEHLING, C. S.; FRIZZO, M. N. A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. **Revista Contexto & Saúde**, v. 10, n. 20, p. 93-102, 2011.

FARIAS, D. F.; SOUZA, T. M.; VIANA, M. P.; SOARES, B. M.; CUNHA, A. P.; VASCONCELOS, I. M.; RICARDO, N. M. P. S; FERREIRA, P. M. P.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Research International**, p.1-9, 2013.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, p. 751-760, 2009.

FERRARI, C. K. B. Capacidade antioxidante total (CAT) em estudos clínicos, experimentais e nutricionais. **Journal of Health Sciences Institute**, v. 28, n. 4, p. 307-310, 2010.

FERRUZZI, M. G.; LOBO, J. K.; JANLE, E. M.; WHITTAKER, N.; COOPER, B.; SIMON, J. E.; WU, Q. L.; WELCH, C.; HO, L.; WEAVER, C.; PASINETTI, G. M. Bioavailability of gallic acid and catechins from grape seed polyphenol extract is improved by repeated dosing in rats: Implications for treatment in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 18, n. 1, p. 113-124, 2009.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. **Sports Medicine**, v. 36, n.4, p. 327-358, 2006.

FLAMINI, R. Recent applications of mass spectrometry in the study of grape and wine polyphenols. **ISRN Spectroscopy**, ID 813563, 2013.

FRAGA, C. G.; GALLEANO, M.; VERSTRAETEN, S. V.; OTEIZA, P. I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 435–44, 2010.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3597–3604, 2000.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. Análise de Própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 171-178, 2006.

GALLEANO, M.; VERSTRAETEN, S. V.; OTEIZA, P. I.; FRAGA, C. G. Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, p. 23-30, 2010.

GARBETTA, A.; CAPOTORTO, I.; CARDINALI, A.; D'ANTUONO, I.; LINSALATA, V.; PIZZI, F.; MINERVINI, F. Antioxidant activity induced by main polyphenols present in

edible artichoke heads: influence of *in vitro* gastro-intestinal digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 456-464, 2014.

GLEICHENHAGEN, M.; SCHIEBER, A. Current challenges in polyphenol analytical chemistry. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 43-49, 2016.

GONTHIER, M. P.; VERNY, M. A.; BESSON, C.; REMESY, C.; SCALBERT, A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1853-1859, 2003.

GOTHAI, S.; ARUSELVAN, P.; TAN, W. S.; FAKURAZI, S. Woundhealing properties of ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* in normal human dermal fibroblasts. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2016.

GUO, C.J.; YANG, J.J.; WEI, J.Y.; LI, Y.F.; XU, J.; JIANG, Y.G. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, v. 23, p. 1719-1726, 2003.

HALLIWELL; GUTTERIDGE. Free Radicals in Biology and Medicine. 4ed. Estados Unidos: Oxford University Press, 2007, 851 p.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESSE, 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. **Nutrition Research**, v. 28, p. 198-207, 2008.

HELAL, A.; TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; CONTE, A. Bioaccessibility of polyphenols and cinnamaldehyde in cinnamon beverages subjected to *in vitro* gastro-pancreatic digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 506-516, 2014.

HOST, B.; WILLIAMSON, G. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. **Natural Product Reports**. v. 21, p. 425-47, 2004.

HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1-12, 2011.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades - Tamboril (2016). Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/v3/cidades/municipio/2313203>. Acesso em 22 de novembro de 2016.

INDO, H. P.; YEN, H. C.; NAKANISHI, I.; MATSUMOTO, K.; TAMURA, M.; NAGANO, Y.; MATSUI, H.; GUSEV, O.; CORNETTE, R.; OKUDA, T.; MINAMIYAMA, Y.; ICHIKAWA, H.; SUENAGA, S.; OKI, M.; SATO, T.; OZAWA, T.; CLAIR, D. K.; MAJIMA, H. J. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. **Journal of Clinical Biochemical Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 1-7, 2015.

JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, v. 175, p. 556-567, 2015.

JIA, F.; XU, F.; QI, Y.; LIU, S.; PI, Z.; SONG, F.; LIU, Z. A study on the holistic efficacy of different *Radix aconite preparata* for treating rheumatic arthritis in rats based on the urinary metabonomic method using UPLC-Q-TOF-HDMS. **Analytical Methods**, v. 8, p. 3088-3095, 2016.

JING, R.; LI, H. Q.; HU, C. L.; JIANG, Y. P.; QIN, L. P.; ZHENG, C. J. Phytochemical and pharmacological profiles of three *Fagopyrum* buckwheats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 1-20, 2016.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41-60, 2009.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 453–464, 2004.

KROLL, J.; RAWEL, H. M.; ROHN, S. Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds. **Food Science and Technology Research**, v. 9, p. 205–218, 2003.

KUIJSTEN, A.; ARTS, I. C.; HOLLMAN, P. C.; VAN'T VEER, P.; KAMPMAN, E. Plasma enterolignans are associated with lower colorectal adenoma risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.15, p.1132–1136, 2006.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–16, 2013.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; GARCIA-PARILLA, M. C.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 691-693, 2004.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M.T.R; GODINHO, R.O.; NOGUEIRA, T.C.M.L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAM, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 1104 p., 2007.

LAURENT, C.; BESAÇON, P.; CAPORICCIO, B. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1704-1712, 2007.

LI, X. C.; ELSOHLY, H. N.; NIMROD, A. C.; CLARK, A. M. Antifungal activity of (-)-epigallocatechin gallate from *Coccoloba dugandiana*. **Planta Medica**, v. 65, p. 780, 1999.

LIU, Y.; GAO, L.; LIU, L.; YANG, Q.; LU, Z.; NIE, Z.; WANG, Y.; XIA, T. Purification and characterization of a novel galloyltransferase involved in catechin galloylation in the tea plant (*Camellia sinensis*). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 44406-44417, 2012.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 791 p., 2002.

LUCENA, R. F. P.; ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; ALMEIDA, C. F. C. B. R.; FLORENTINO, A. T. N.; FERRAZ, J. S. F. Useful plants of the semi-arid northeastern region of Brazil – a look at their conservation and sustainable use. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 125, p. 281-290, 2007.

MACÊDO, S. K. S. Estudo químico e avaliação da atividade biológica *in vitro* de *Triplaris gardneriana* Wedd (POLYGONACEAE). 213 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2015.

MACÊDO, S. K. S.; ALMEIDA, T. S.; FERRAZ, C. A. A.; OLIVEIRA, A. P.; ANJOS, V. H. A.; SIQUEIRA, J. A. F.; ARAUJO, E. C. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, N. D. S.; NUNES, X. P. Identification of flavonol glycosides and *in vitro* photoprotective and antioxidant activities of *Triplaris gardneriana* Wedd. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, p. 207-215, 2015.

MACÊDO, S. K. S.; LAVOR, A. L.; SILVA, N. D. S.; ALMEIDA, T. S.; PAULO, I. M. M.; BEZERRA, G. S.; MACEDO, F. K. S.; ANJOS, V. H. A.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; ALMEIDA, R. G. S.; NUNES, X. P. GC-MS analysis of esterified fatty acids obtained from leaves and seeds of *Triplaris gardneriana* Wedd. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, p. 623-630, 2016.

MAKSIMOVIĆ, Z.; KOVAČEVIĆ, N.; LAKUŠIĆ, B.; ČEBOVIĆ, T. Antioxidant activity of yellow dock (*Rumex crispus* L., Polygonaceae) fruit extract. **Phytotherapy Research**, v.25, p.101-105, 2011.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; REMESY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, p.230S-242S, 2005.

MARTINS, N.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. *In vivo* antioxidant activity of phenolic compounds: facts and gaps. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 1-12, 2016.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3ed. Fortaleza: Edição UFC, 1997, 45p.

MATSUMOTO, M.; ZHANG, C. H.; KOSUGI, C.; MATSUMOTO, I. Gas chromatography-mass spectrometric studies of canine urinary metabolism. **Journal of Veterinary Medicinal Science**, v.57, n.2, p.205-211, 1995.

- MELO, E. Polygonaceae da Cadeia do Espinhaço, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, n. 3, p. 273-300, 2000.
- MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 315-320, 2009.
- MORENO-MURILLO, B.; SANCHEZ, A.; QUEVEDO, R.; PABON, M. L.; CARULLA, J. E. F. 3-O- α -L-Rhamnopyranosilflavonoides y otros derivados fenólicos de hojas de *Calliandra calothyrsus* Meissner (Mimosaceae). **Revista Colombiana de Química**, v. 37, p. 287-295, 2008.
- MOSTAFA, H. A. M.; ELBAKRY, A. A.; EMAN, A. A. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of different plant parts of *Rumex vesicarius* (Polygonaceae). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p.109-118, 2011.
- MULDER, T. P.; RIETVELD, A. G.; VAN AMELSVOORT, J. M. Consumption of both black tea and green tea results in an increase in the excretion of hippuric acid into urine. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 256S–260S, 2005.
- NAGY, K.; COURTET-COMPONDU, M. C.; WILLIAMSON, G.; REZZI, S.; KUSSMANN, M.; RYTZ, A. Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1333–1339, 2012.
- NUGROHO, A.; KIM, E. J.; CHOI, J. S.; PARK, H. J. Simultaneous quantification and peroxynitrite-scavenging activities of flavonoids in *Polygonum aviculare* L. herb. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 89, p. 93-98, 2014.
- OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
- OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.
- OLIVEIRA, P. E. S.; CONSERVA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Chemical constituents from *Triplaris americana* L. (Polygonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.36, p.134-137, 2008.
- OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C.; BUIJSMAN, M. N.; VAN AMELSVOORT, J. M.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1806-1814, 2003.
- PALAFIX-CARLOS, H.; AYALA-ZAVALA, F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 6-15, 2011

- PANDAREESH, M. D.; MYTHRI, R. B.; SRINIVAS BHARATH, M. M. Bioavailability of dietary polyphenols: Factors contributing to their clinical application in CNS diseases. **Neurochemistry International**, v. 89, p. 198-208, 2015.
- PAUSTENBACH, D. J. The practice of exposure assessment: a state-of-the-art review. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B**, v. 3, p. 179-291, 2000.
- PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; SALVATORE, S.; DEL RIO, D.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, p. 1030–1038, 2006.
- PEREIRA, A. S. G. Avaliação da bioacessibilidade de compostos antioxidantes em variedades de maçã produzidas em Portugal. Dissertação (Mestrado) – Programa de Tecnologia e Segurança Alimentar, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2014.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.
- PEREIRA JÚNIOR, L. R.; ANDRADE, A. P.; ARAUJO, K. D.; BARBOSA, A. S.; BARBOSA, F. M. Espécies da caatinga como alternativa para o desenvolvimento de novos fitofármacos. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p. 509-520, 2014.
- PESSOA, I. P. Caracterização química, atividade antioxidante e segurança de uso de sementes de *Licania rigida* Benth. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- PIMPÃO, R. C.; VENTURA, M. R.; FERREIRA, R. B.; WILLIAMSON, G.; SANTOS, C. N. Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit purée. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. 454–463, 2015.
- PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G.P. Methods for total antioxidant activity determination: a review. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 1 p.1-10, 2011.
- PORRINI, M.; RISO, P. Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 18, p. 647-650, 2008.
- PROJETO VERDE –Conheça e plantas árvores. Pajeú – *Triplaris gardneriana*. Disponível em: <https://appverde.wordpress.com/2015/09/29/pajeu-triplaris-gardneriana/>. Acesso em 22 de novembro de 2016.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3396-3402, 2000.
- RAMADAN, M. F.; KROH, L. W.; MOERSEL, J. T. Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia*

abyssinica Cass.) crude seed oils and oil fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 6961–6969, 2003.

RAMÍREZ-MORENO, E.; HERVERT-HERNÁNDEZ, D.; SÁNCHEZ-MATA, M. C.; DÍEZ-MARQUÉS, C.; GOÑI, I. Intestinal bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of pulp and seeds of cactus pear. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, p. 839-843, 2011.

RAO, P. S.; KALVA, S.; YERRAMILI, A.; MAMIDI, S. Free radicals and tissue damage: role of antioxidants. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 2-7, 2011.

RECHNER, A. R.; KUHNLE, G.; BREMNER, P.; HUBBARD, G. P.; MOORE, K. P.; RICE-EVANS, C. A. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. **Free Radical Biology & Medicine**, v.33, n.2, p.220–235, 2002.

REIS, N. S.; SERRANO, S. H. P.; MENEGHATTI, R.; GIL, E. S. Métodos eletroquímicos usados para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 949-53, 2009.

ROLEIRA, F. M. F.; SILVA, E. J. T.; VARELA, C. L.; COSTA, S. C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235–258, 2015.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n.1, p.31-42, 2010.

ROUQUAYROL, M. Z. Atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro. **Revista do Centro de Ciências da Saúde**, p. 24-32, 1984.

RUSSO, D.; KENNY, O.; SMYTH, T. J.; MILELLA, L.; HOSSAIN, M. B.; DIOP, M. S.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. P. Profiling of phytochemicals in tissues from *Sclerocaryabirrea* by HPLC-MS and their link with antioxidant activity. **ISRN Chromatography**, ID 283462, 2013.

SABIR, S. M.; ROCHA, J. B. T. Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct *in vitro* antioxidant and *in vivo* hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. **Food Chemistry**, v. 111, p. 845–851, 2008.

SAUER, J. M.; SMITH, R. L.; BAO, J.; KATTNIG, M. J.; KUESTER, R. K.; McCLURE, T. M.; MAYERSOHN, M.; SIPES, I. G. Oral and topical absorption, disposition kinetics, and the metabolic fate of trans-methyl styryl ketone in the male fischer 344 rat. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 25, p. 732-739, 1997.

SANTOS, A. C.; COSTA, G.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; BATISTA, M. T.; RIBEIRO, A. J. Advance in methods studying the pharmacokinetics of polyphenols. **Current Drug Metabolism**, v. 15, p. 1-20, 2014.

SAURA-CALIXTO, F. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 43-49, 2011.

SAVIĆ, I. M.; NIKOLIĆ, V. D.; SAVIĆ, I. M.; NIKOLIĆ, L. B.; JOVIĆ, M. D.; JOVIĆ, M. D. The qualitative analysis of the green tea extract using ESI-MS method. **Advanced technologies**, v. 3, p. 30-37, 2014.

SCALBERT, A.; WILLIAMS, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S-85S, 2000.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; RÉMÉSY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.56, p.276-282, 2002.

SCHULZ, M. Influência da maturação sobre o conteúdo e bioacessibilidade de minerais e perfil de compostos fenólicos dos frutos da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius). 171 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SERRA, A.; MACIÀ, A.; ROMERO, M. P.; VALLS, J.; BLADÉ, C.; AROLA, L.; MOTILVA, M. J. Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in *in vitro* and *in vivo* models. **British Journal of Nutrition**, v.103, p.944-952, 2010.

SERRANO-CONTRERAS, J. I.; GARCIA-PEREZ, I. MELENDEZ-CAMARGO, M. E.; ZEPEDA, L. G. NMR-Based metabolomic analysis of physiological responses to starvation and refeeding in the rat. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 9, p. 3241–3254, 2016.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757–781, 2015.

SILVA, M. A. B.; MELO, L. V. L.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, J. P. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SILVA, R. M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 549-562, 2010.

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

SOUZA, J. E.; CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Bioavailability of phenolic compounds: a major challenge for drug development? **Revista Fitos**, v. 9, p. 55-67, 2015.

STANISAVLJEVIC, N.; SAMARDZIC, J.; JANKOVIC, T.; SAVIKIN, K.; MOJSIN, M.; TOPALOVIC, V.; STEVANOVIC, M. Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro* simulated digestion in the presence of food matrix. **Food Chemistry**, v. 175, p. 516–522, 2015.

SWIECA, M.; GAWLIK-DZIKI, U.; DZIKI, D.; BARANIAK, B.; CZYŻ, J. The influence of protein–flavonoid interactions on protein digestibility *in vitro* and the antioxidant quality of breads enriched with onion skin. **Food Chemistry**, v. 141, p. 451-458, 2013.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, p. 599–606, 2010.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; CONTE, A. The first tract of alimentary canal as an extractor. Release of phytochemicals from solid food matrices during simulated digestion. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, p. 555–568, 2012.

TEIXEIRA, C. B. Screening de plantas presentes no Pantanal Sul-Mato-Grossense fundamentado na atividade antimicrobiana. 70 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.

TENORE, G. C.; CAMPIGLIA, P.; RITIENI, A.; NOVELLINO, E. *In vitro* bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca). **Food Chemistry**, v. 141, p. 3519-3524, 2013.

TRABELSI, N.; WAFFO-TEGUO, P.; SNOUSSI, M.; KSOURI, R.; MERILLON, J. M.; SMAOUI, A.; ABDELLY, C. Variability of phenolic composition and biological activities of two Tunisian halophyte species from contrasted regions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 3, p. 749–761, 2013.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSE, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VENDITTI, P.; DI STEFANO, L.; DI MEO, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Mitochondrion**, v. 13, n. 2, p. 71–82, 2013.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

WALLACE, D. C.; FAN, W.; PROCACCIO, V. Mitochondrial energetics and therapeutics. **Annual Review of Pathology**, v. 5, p. 297-348, 2010.

WANG, X.; XIA, H.; XING, F.; DENG, G.; SHEN, Q.; ZENG, S. A highly sensitive and robust UPLC–MS with electrospray ionization method for quantitation of taxifolin in rat plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 1778-1786, 2009.

WYREPKOWSKI, C. C.; COSTA, D. L.; SINHORIN, A. P.; VILEGAS, W.; DE GRANDIS, R. A.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; DOS SANTOS, L. C. Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpiniaferreastem* bark and evaluation of their mutagenic activity. **Molecules**, v. 19, p. 16039-16057, 2014.