



RENATA APARECIDA SORIANO SANCHO

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES E ANTIDIABÉTICAS DOS
COMPOSTOS BIOATIVOS DE CASCA DE FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris*)**

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RENATA APARECIDA SORIANO SANCHO

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E
ANTIDIABÉTICAS DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE CASCA
DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*)**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Doutora em Ciência de Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Glaucia Maria Pastore

Este exemplar corresponde à versão final da
tese defendida pela aluna Renata Aparecida
Soriano Sancho, e orientada pela Prof^a Dr^a
Glaucia Maria Pastore.

Assinatura do Orientador

Campinas, 2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

Sa55a Sancho, Renata Aparecida Soriano, 1962-
Avaliação das propriedades antioxidantes e antidiabéticas dos compostos bioativos de casca de feijão (*Phaseolus vulgaris*) / Renata Aparecida Soriano Sancho. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Gláucia Maria Pastore.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Feijão. 2. Antocianinas. 3. Diabetes. 4. Antioxidantes. 5. Digestão in vitro. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the antioxidant and antidiabetic properties of bioactive compounds present in the bean seed coat (*Phaseolus vulgaris*)

Palavras-chave em inglês:

Bean

Anthocyanins

Antioxidants

Diabetes

In vitro digestion

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gláucia Maria Pastore [Orientador]

Gustavo Molina

Marlene Maria Amaral Scheid

Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

João Ernesto de Carvalho

Data de defesa: 29-01-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Glaucia Maria Pastore (Orientadora)
Universidade Estadual de Campinas (FEA)

Prof. Dr. Gustavo Molina (titular)
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Prof^ª. Dr^ª. Marlene Maria Amaral Scheid (titular)
Universidade do Vale do Paraíba

Prof^ª Dr^ª Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz (titular)
Universidade Estadual de Campinas (CPQBA)

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (titular)
Universidade Estadual de Campinas (FEA)

Prof^ª. Dr^ª. Luciana Gomes Malta (suplente)
Centro Universitário de Várzea Grande

Prof. Dr Hervé Louis Ghislain Rogez (suplente)
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior (suplente)
Universidade Estadual de Campinas (FEA)

RESUMO

A ingestão de alimentos ricos em compostos bioativos está associada ao menor risco de doenças crônicas. Diferentes mecanismos estão envolvidos, principalmente através de seu potencial antioxidante. O objetivo deste estudo foi determinar a atividade antioxidante e os teores de diferentes compostos bioativos presentes nos extratos das cascas de feijão preto e roxinho e avaliar as propriedades antioxidantes e antidiabéticas do extrato rico em antocianinas de casca de feijão preto (ERA). Extratos de feijão preto e roxinho foram submetidos à digestão *in vitro* e avaliados através das determinações de fenóis totais, flavonoides totais, taninos condensados, antocianinas monoméricas e atividade antioxidante por meio de dois diferentes métodos. No ERA, as antocianinas foram identificadas e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetria de massas. Antocianinas monoméricas, fenóis totais e atividade antioxidante através dos ensaios TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) e ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) também foram avaliados antes e após a digestão *in vitro*. No ensaio *in vivo*, o efeito da administração do ERA foi investigado em ratos com Diabetes induzido por estreptozotocina. Ratos Wistar foram distribuídos em 5 grupos (controle normal, normal tratado com ERA, controle diabético, diabético pré-tratado com ERA e diabético pós-tratado com ERA) e tratados durante 3 semanas. Glicemia, peso corpóreo, perfis enzimáticos hepático e renal, histologia dos tecidos pancreático e hepático foram avaliados, além do potencial antioxidante, através da análise das enzimas catalase, glutathione redutase e do ensaio ORAC plasmático. O feijão preto apresentou uma concentração dez vezes maior de antocianinas que o feijão roxinho ($0,83 \pm 0,04$ e $0,08 \pm 0,01$ mg equivalentes cianidina 3-glicosídeo/g). Após a digestão *in vitro*, as antocianinas não foram detectadas, os fenóis totais dos extratos de feijão preto e roxinho tiveram reduções respectivas de 75% e 52%. Os taninos condensados apresentaram redução de 90% em ambos os extratos. Na análise dos flavonoides, a concentração do feijão roxinho permaneceu inalterada e o feijão preto

apresentou redução de 21%. O feijão roxinho apresentou maior capacidade de neutralização do radical ABTS que o feijão preto, com respectivos $21,9 \pm 0,5$ e $17,4 \pm 0,1$ μM equivalentes Trolox/g. A digestão *in vitro* não afetou a capacidade antioxidante dos extratos analisados por este método. No ensaio ORAC, os feijões apresentaram aumento da capacidade antioxidante com 43,2% e 32,6% para os feijões preto e roxinho, respectivamente. Delfinidina 3-glicosídeo, petunidina 3-glicosídeo e malvidina 3-glicosídeo foram identificadas no ERA. A digestão provocou decréscimo de 90% na concentração das antocianinas e de 45% nos fenóis totais. A atividade antioxidante no ensaio TEAC foi reduzida em 28% e no ensaio ORAC em 35%. O ensaio *in vivo* mostrou os efeitos protetores do ERA apenas no grupo pré-tratado, com melhora dos níveis da glicemia e ganho de peso. Neste mesmo grupo, alterações pancreáticas, hepáticas e renais foram menos acentuadas do que nos outros grupos diabéticos. O tratamento com ERA, subsequente à indução do Diabetes não reduziu os danos teciduais, as alterações biológicas ou melhorou o estado geral dos animais. Neste modelo experimental, o pré-tratamento com ERA reduziu os danos causados pelo Diabetes induzido por estreptozotocina.

Palavras-chave: Feijão, antocianinas, diabetes, antioxidantes, digestão *in vitro*

ABSTRACT

The food intake rich in bioactive compounds is associated with a reduced risk of chronic diseases. Different mechanisms are involved, especially through their antioxidant potential. The goal of this study was to determine the antioxidant activity and the concentrations of different bioactive compounds present in extracts of black and small red beans seed coats and to evaluate the antioxidant and antidiabetic properties of anthocyanin-rich extracts from black bean seed coats (ERA). Black and small red beans extracts were subjected to *in vitro* digestion and evaluated through analyzes of total phenolics, total flavonoids, condensed tannins, monomeric anthocyanins and antioxidant activity by two different methods. In ERA, anthocyanins have been identified and quantified by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Monomeric anthocyanins, total phenolics and antioxidant activity through TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) and ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) assays were also assessed, before and after *in vitro* digestion. At the *in vivo* assay, the effect of ERA administration was investigated in rats with streptozotocin-induced diabetes. Wistar rats were distributed into 5 groups (normal control, normal treated with ERA, diabetic control, diabetic pre-treated with ERA and diabetic post-treated with ERA) and treated for 3 weeks. Blood glucose, body weight, liver and kidney enzyme profiles, pancreas and liver tissue histology were evaluated, as well as the antioxidant potential through analysis of catalase, glutathione reductase, and ORAC plasmatic assay. Black beans showed tenfold higher concentrations of anthocyanins than small red beans (0.83 ± 0.04 e 0.08 ± 0.01 mg cyanidin 3-glucoside equivalent/g). After *in vitro* digestion, anthocyanins could not be detected, and total phenols of black and small red beans have respective reductions of 75% and 52%. Condensed tannins decreased by 90% in both extracts. On the flavonoids analysis, while the concentration in small red beans remained unchanged, black beans showed a reduction of 21% in their concentration. Small red beans showed higher ABTS radical scavenging capacity

than black beans, with respective 21.9 ± 0.5 and 17.4 ± 0.1 μM Trolox equivalents/g of bean. *In vitro* digestion did not affect the antioxidant activity of the analyzed extracts by this method. In the ORAC assay, both beans showed an increase in the antioxidant capacity, with 43.2% and 32.6% for black and small red beans, respectively. Delphinidin 3-glucoside, petunidin 3-glucoside and malvidin-3-glucoside were identified in ERA. Digestion triggered a decrease of 90% in monomeric anthocyanins concentration and of 45% in total phenolic contents. The TEAC assay antioxidant activity was reduced by 28% and the ORAC one by 35%. The *in vivo* assay showed protective effects of ERA only in the pre-treated group, with improvement of the glycemia levels and the weight gain. Also for the same group, pancreatic, hepatic and renal changes were less marked than in the others diabetes groups. ERA treatment subsequent to the induction of diabetes did not reduce the tissue damages, the biological alterations or improve the animals' general state. In this experimental model, pre-treatment with ERA reduced the damages caused by streptozotocin induced diabetes.

Keywords: Bean, anthocyanins, antioxidants, diabetes, *in vitro* digestion

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
SUMÁRIO.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xix
ÍNDICE DE FIGURAS	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxv
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	9
CAPÍTULO I	11
Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes	11
ABSTRACT	13
1. Introduction.....	14
2. Chemical structure and antioxidant action of anthocyanins.....	15
2.1. Absorption, metabolism and bioavailability of anthocyanins.....	17
2.2. Properties of anthocyanin-related type 2 diabetes	19
2.2.1. Oxidative stress	25
2.2.2. β cells.....	27
2.2.3. Insulin secretion	28
2.2.4. Insulin resistance	30
2.2.5. α -glucosidase inhibitory action.....	33
3. Conclusion.....	35
References.....	36
CAPÍTULO II	53
Effect of in vitro digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats	53
ABSTRACT	55
1. Introduction.....	56
2. Materials and methods	57
2.1. Materials.....	57

2.2. Extraction method	58
2.3. In vitro gastrointestinal digestion	59
2.4. Quantification of phenolic compounds	59
2.5. Antioxidant capacity	61
2.6. Statistical analysis.....	62
3. Results and Discussion	63
3.1. Phenolic profiles in crude and digested extracts	63
3.2. Antioxidant activity	67
4. Conclusions.....	70
References.....	71
CAPÍTULO III	77
Efeito da digestão in vitro na atividade antioxidante de extrato rico em antocianinas de casca de feijão preto	77
RESUMO.....	79
1. Introdução	80
2. Material e métodos.....	82
2.1. Material	82
2.2. Extração e purificação das antocianinas.....	83
2.3. Análises das antocianinas por cromatografia líquida e espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)	84
2.4. Digestão gastrointestinal in vitro	86
2.5. Determinação dos fenóis totais.....	87
2.6. Determinação das antocianinas monoméricas.....	88
2.7. Determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	89
2.8. Determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	89
2.9. Análises estatísticas.....	90
3. Resultados e discussão.....	90
3.1. Identificação e análise quantitativa das antocianinas.....	90
3.2. Perfil dos compostos fenólicos nos extratos purificado e digerido	94
3.3. Atividade antioxidante	96
4. Conclusão	101
Referências	102

CAPÍTULO IV	109
Estudo dos efeitos protetores do extrato rico em antocianinas de casca de feijão preto em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina	109
RESUMO.....	111
1. Introdução	112
2. Material e Métodos.....	114
2.1. Material	114
2.2. Extração e purificação das antocianinas.....	114
2.3. Análise das antocianinas.....	115
2.4. Experimento animal e procedimentos	116
2.4.1. Animais e modelo experimental.....	116
2.4.2. Controle de peso e glicemia	117
2.4.3. Coleta de sangue e órgãos.....	117
2.4.4. Procedimentos histopatológicos	118
2.4.5. Análises bioquímicas	118
2.4.6. Análise da atividade das enzimas antioxidantes no tecido hepático...	118
2.4.7. Capacidade antioxidante plasmática	119
2.5. Análises estatísticas.....	120
3. Resultados	121
4. Discussão.....	132
5. Conclusão	137
Referências	138
CONCLUSÃO GERAL.....	145
PERSPECTIVAS FUTURAS	147

*Dedico este trabalho à minha
querida família, Eduardo, Isabela,
Apparecida, Ari e Daniella.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Eduardo, meu grande incentivador. Obrigada por estar ao meu lado o tempo todo, me apoiando nas horas mais difíceis e me ajudando do início ao fim deste trabalho. À minha filha Isabela, por compreender as ausências geradas pela dedicação necessária ao presente trabalho.

Aos meus pais Ari e Aparecida, que sempre me ensinaram, sem nunca precisar dizer uma palavra, que o que realmente importa na vida é a bondade, a justiça e principalmente, a ética. À minha irmã Daniella, por permitir que tudo fique sempre melhor ao seu lado.

À Prof^a Glaucia, minha orientadora, pela confiança e oportunidades oferecidas ao longo do doutorado.

À banca examinadora, pelas importantes contribuições e sugestões apresentadas.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de Doutorado.

Ao pessoal do laboratório, Ana Simiqueli, Jane, Ana Stela, Ju Bueno, Érica, Ana Paula, Gustavo Molina, Gustavo Araújo, Henrique, Bruno e Léo, pelo companheirismo e ótimo ambiente de trabalho. Um agradecimento especial aos queridos Nadir e Angélica, pela disponibilidade, ajuda constante e especialmente pela amizade.

À Luciana Malta, tanto por tornar-se um caso típico de amizade à primeira vista, quanto pela colaboração fundamental na estruturação de meu trabalho.

À Verônica, por essa amizade tão grande e especial, além das nossas infinitas discussões sobre digestão *in vitro*.

À Maysa, pela amizade e também pelas discussões científicas e eternas supervisões de cálculos. Não imagino como teria conseguido realizar o ensaio *in vivo* sem a sua ajuda.

Às queridas Fabíola e Marcella, amigas de todas as horas desde o meu início na UNICAMP.

Ao Dr Julio Alejandro Rojas Moscoso, uma das pessoas mais bondosas que já conheci, pela imensa ajuda dada no final do ensaio *in vivo*.

Ao pessoal do CPQBA, Prof Dr^a Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, Ana Possente, Sirlene, Michelle, Adriana e Rafael, pela acolhida simpática e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Às técnicas Bia (Laboratório de Bioquímica) e Suzana (LEB), por sempre colaborarem com o meu trabalho.

Aos Professores Dr^a Neuci Nelci Fenalti Höehr, Dr. Antonio de Pádua Franceschi e Dr. Gilberto de Nucci, pela viabilização de inúmeras análises.

À Prof^a Dr^a Denise Vaz e a sua aluna Juliana Pascuotte Candido, pela valiosa contribuição nas análises das enzimas antioxidantes.

Aos Doutores José Antonio de Fátima Esteves e Alisson Fernando Chiorato, pela identificação das variedades de feijão.

Aos funcionários da FEA e especialmente ao Cosme Perota, sempre solícito.

Finalmente, a todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

EVALUATION OF THE EFFECTS OF ANTHOCYANINS IN TYPE 2 DIABETES

Table 1. Summary of anthocyanin effects on glucose metabolism and oxidative stress.....	20
---	----

CAPÍTULO II

EFFECT OF *IN VITRO* DIGESTION ON BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COMMON BEAN SEED COATS

Table 1. Antioxidant activities of bioactive compounds in black and small red beans.....	68
--	----

CAPÍTULO III

EFEITO DA DIGESTÃO *IN VITRO* NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO RICO EM ANTOCIANINAS DE CASCA DE FEIJÃO PRETO

Tabela 1. Parâmetros de espectrometria de massas para as transições MRM	85
Tabela 2. Identificação e quantificação das antocianinas do extrato da casca do feijão preto.....	93
Tabela 3. Teores de fenóis totais e antocianinas em ERA e ERAD	94
Tabela 4. Dados da digestão <i>in vitro</i> na atividade antioxidante reportados na literatura recente.....	100

CAPÍTULO IV

ESTUDO DOS EFEITOS PROTETORES DO EXTRATO RICO EM ANTOCIANINAS DE CASCA DE FEIJÃO PRETO EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Tabela 1. Teores das antocianinas presentes no extrato de casca de feijão	115
Tabela 2. Grupos dos animais utilizados no experimento	117
Tabela 3. Consumo de ração e ganho de peso de ratos normais e diabéticos tratados com ERA	121
Tabela 4. Efeito de ERA na glicemia de ratos normais e diabéticos	122

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

EVALUATION OF THE EFFECTS OF ANTHOCYANINS IN TYPE 2 DIABETES

Figure 1. Structures of anthocyanins.....	16
---	----

CAPÍTULO II

EFFECT OF *IN VITRO* DIGESTION ON BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COMMON BEAN SEED COATS

Figure 1. Total phenols (A), total flavonoids (B) and condensed tannins (C) in bean seed coats.	65
---	----

CAPÍTULO III

EFEITO DA DIGESTÃO *IN VITRO* NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO RICO EM ANTOCIANINAS DE CASCA DE FEIJÃO PRETO

Figura 1. Diagrama de fluxo da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	87
Figura 2. Cromatograma do extrato rico em ANT's da casca de feijão preto.....	91
Figura 3. Estruturas das antocianinas encontradas no extrato rico em ANT's da casca de feijão preto.....	92
Figura 4. Efeito da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> na atividade antioxidante dos extratos avaliada pelo método TEAC	97

Figura 5. Efeito da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> na atividade antioxidante dos extratos avaliada pelo método ORAC.....	98
---	----

CAPÍTULO IV

ESTUDO DOS EFEITOS PROTETORES DO EXTRATO RICO EM ANTOCIANINAS DE CASCA DE FEIJÃO PRETO EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Figura 1. Efeito do ERA nos peso relativos de fígado (A) e rim (B) de ratos normais e diabéticos. G1: controle normal, G2: normal/tratamento ERA, G3: controle diabético, G4: diabético/pré-tratamento ERA, G5: diabético/tratamento ERA.....	123
Figura 2. Efeito do ERA no perfil hepático de ratos normais e diabéticos. G1: controle normal, G2: normal/tratamento ERA, G3: controle diabético, G4: diabético/pré-tratamento ERA, G5: diabético/tratamento ERA.	124
Figura 3. Efeito do ERA no perfil renal de ratos normais e diabéticos. G1: controle normal, G2: normal/tratamento ERA, G3: controle diabético, G4: diabético/pré-tratamento ERA, G5: diabético/tratamento ERA	125
Figura 4. Efeito do ERA nas enzimas antioxidantes hepáticas catalase (A) e glutathione redutase (B) de ratos normais e diabéticos. G1: controle normal, G2: normal/tratamento ERA, G3: controle diabético, G4: diabético/pré-tratamento ERA, G5: diabético/tratamento ERA	126
Figura 5. Efeito do ERA no potencial antioxidante plasmático de ratos normais e diabéticos. G1: controle normal, G2: normal/tratamento ERA, G3: controle diabético, G4: diabético/pré-tratamento ERA, G5: diabético/tratamento ERA.....	127

Figura 6. Histopatologia do pâncreas.....	129
Figura 7. Histopatologia do fígado.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	antioxidant activity
AAPH	2,2'-azobis (amidinopropano) dihidrocloreto
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ALP	fosfatase alcalina
ALT	alanina aminotransferase
ANT	antocianinas ou anthocyanins
AST	aspartato aminotransferase
BB	black bean
BHT	hidróxido de tolueno butilato
CAT	catalase
CDDs	chronic degenerative diseases
CE	catechin equivalent
CEB	crude extract of black beans
CESR	crude extract of small red beans
CGE	cyanidin 3-glucoside equivalents
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
Cnd 3-glc	cianidina 3-glicosídeo
CT	condensed tannins
DEB	digested extract of black beans
DESR	digested extract of small red beans
Dfn 3-glc	delfinidina 3-glicosídeo
DT1	diabetes tipo 1
DT2	diabetes tipo 2
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis 2-nitrobenzóico
EAG	equivalente de ácido gálico
ERA	extrato rico em antocianinas
ERAD	extrato rico em antocianinas digerido
EROs	espécies reativas de oxigênio

GAE	gallic acid equivalent
GI	gastrointestinal digestion
GLUT4	glucose transporter type 4
GSSG	(-)-glutathione oxidized
IR	insulin resistance
MA	monomeric anthocyanins
MDA	malondialdehyde
Mvd 3-glc	malvidin 3-glucoside
NaBH ₄	sodium borohydride (NaBH ₄)
ORAC	capacidade de absorção do radical oxigênio ou <i>oxygen radical absorbance capacity</i>
Ptn 3-glc	petunidin 3-glucoside
RBP4	retinol binding protein
SOD	superóxido dismutase ou superoxide dismutase
SRB	small red bean
STZ	estreptozotocina ou streptozotocin
T2D	type 2 diabetes
TAS	total antioxidant status
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TE	Trolox equivalent
TEAC	capacidade antioxidante equivalente a Trolox ou <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>
TF	total flavonoid
TP	total phenol
TROLOX	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

INTRODUÇÃO GERAL

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é um dos mais antigos alimentos cultivados nas Américas e um componente indispensável na dieta brasileira. O Brasil é o maior produtor mundial deste grão (MAPA, 2014), que representa uma fonte importante de carboidratos e proteínas (Lin et al., 2008). Além destes nutrientes, o feijão é rico em compostos bioativos como ácidos fenólicos e flavonoides, concentrados principalmente em suas cascas, sendo que as variedades de coloração vermelha e preta podem conter antocianinas (Oomah et al., 2010; Xu & Chang, 2009; Lin et al., 2008; Jordheim et al., 2006). Em razão desse perfil químico, são inúmeros os trabalhos que avaliaram a atividade antioxidante tanto nos grãos como nas cascas do feijão (Akond et al., 2011; Akillioglu & Karakaya, 2010; Oomah et al., 2010; Xu & Chang, 2009).

Os organismos aeróbicos estão constantemente expostos aos compostos oxidantes gerados tanto nas condições fisiológicas, como provenientes do meio externo. Estes compostos são potencialmente deletérios, pois podem causar danos aos constituintes celulares e, em determinadas condições, contribuir para o desenvolvimento de uma série de doenças crônicas, incluindo o Diabetes. Ainda que os organismos possuam um sistema de defesa próprio formado, entre outros, pelas enzimas antioxidantes, alimentos que sejam fonte de compostos com atividade antioxidante podem apresentar potencial benéfico aos seres humanos (Finkel & Holbrook, 2000).

O Diabetes Mellitus é uma doença reconhecida por inúmeras alterações metabólicas, cuja principal característica é a hiperglicemia crônica, resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Embora possa se apresentar sob diferentes formas, as principais são o Diabetes tipo 1 (DT1) e o tipo 2 (DT2). Enquanto que o DT1 é responsável por 5 a 10% dos casos e é caracterizado pela destruição das células β do pâncreas, o DT2 representa aproximadamente 90%

dos casos e resulta da resistência à insulina associada à deficiência relativa deste hormônio (ADA, 2013).

A maior preocupação com os pacientes diabéticos advém das complicações que ocorrem em longo prazo, tais como a retinopatia que pode levar à cegueira, a nefropatia com risco de insuficiência renal crônica e a arteriopatia periférica, que pode provocar úlceras nos membros inferiores e amputações. As pessoas com diabetes também apresentam aumento na incidência de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. Além disso, alterações no metabolismo dos lipídeos e a elevação da pressão arterial também são frequentes nos diabéticos (ADA, 2013).

A associação entre as complicações diabéticas e o estresse oxidativo já é reconhecida. O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema antioxidante. De fato, a hiperglicemia crônica, através de diferentes mecanismos como, por exemplo, a auto-oxidação da glicose e a formação de produtos de finais de glicação avançada, leva a alterações bioquímicas que resultam em aumento das EROs (Bonnetfont-Rousselot, 2002).

As EROs são neutralizadas pelos antioxidantes e compreendem compostos radicalares como o anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), os radicais hidroxila ($OH^{\cdot}$), alcóxila ($RH^{\cdot}$) e peróxila ($ROO^{\cdot}$) e também espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2) (Sies e Stahl, 1995). O sistema antioxidante, por sua vez, pode ser endógeno ou exógeno. Enquanto que as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione redutase compõem o quadro dos antioxidantes endógenos, os exógenos são provenientes dos alimentos, destacando-se as vitaminas, os carotenoides e os compostos fenólicos (Young & Woodside, 2001).

O consumo dos compostos fenólicos está relacionado com a redução do risco de doenças crônicas como Diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, além de alguns tipos de câncer (Pandey & Risvi, 2009). A característica fundamental destes compostos é a presença de, no mínimo, um anel aromático hidroxilado em sua estrutura. O grupamento fenol é o principal responsável por suas propriedades antioxidantes, uma vez que pode transferir um elétron a um radical livre, convertendo-se em um radical fenil relativamente estável e interromper as reações de oxidação em cadeia, causadoras de danos aos componentes celulares. Os compostos fenólicos estão distribuídos em diferentes grupos, destacando-se entre eles os flavonoides e os ácidos fenólicos (Pandey & Risvi, 2009; Rice-Evans et al., 1997).

Os flavonoides compreendem o maior grupo dos compostos fenólicos, sendo que mais de 9000 diferentes estruturas já foram identificadas. Na maioria das vezes, os flavonoides se apresentam na forma glicosilada, o que lhes confere maior estabilidade. Em função de suas variações estruturais, os principais flavonoides são divididos em subgrupos: flavonóis (quercetina, miricetina e kaempferol), flavonas (luteolina e apigenina), flavanóis (catequina, epicatequina), flavanonas (naringenina), antocianidinas (cianidina, delphinidina), isoflavonas (genisteína) e chalconas (buteína) (Gnanavanthan, 2013; Bueno et al., 2012; Pandey & Risvi, 2009).

As antocianinas (ANTs) são pigmentos flavonoicos, encontrados principalmente na forma de heterosídeos (antocianidina + açúcar) e responsáveis pelas cores vermelha, roxa e azul de um grande número de frutas, vegetais, grãos e flores. Inúmeros trabalhos *in vitro* reportam as propriedades antioxidantes das ANTs, como recentemente revisado por Sancho e Pastore (2012). Entretanto, estes compostos apresentam baixa biodisponibilidade e são instáveis nas condições de pH intestinal (Correa-Betanzo et al., 2014; Sancho & Pastore, 2012). Desta forma, a atividade antioxidante reportada nestes estudos *in vitro*, pode ser inferior à real atividade no organismo.

Adicionalmente, as ANT's apresentam propriedades antidiabéticas. De fato, inúmeros trabalhos, utilizando diferentes modelos experimentais de Diabetes, sugerem que as ANT's podem reduzir a glicemia através de mecanismos distintos, como a proteção de células β , a melhora da resistência à insulina e o aumento da secreção deste hormônio (Roy et al., 2008; Jayaprakasam et al., 2006). Os mecanismos de ação se relacionam provavelmente com as propriedades antioxidantes destes pigmentos (Sancho & Pastore, 2012).

O presente estudo apresenta a avaliação da atividade biológica *in vitro* e *in vivo* de compostos bioativos de extratos produzidos com casca de feijão, enfatizando suas propriedades antioxidantes e antidiabéticas, e a ação potencialmente benéfica das ANT's no Diabetes.

Referências

- Akillioglu, H.G., & Karakaya, S. (2010). Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and *in vitro* digestion process. *Food Science and Biotechnology*, 19, 633-639.
- Akond, A.S.M.G.M., Khandaker, L., Berthold, J., Gates, L., Peters, K., Delong, H., & Hossain, K. (2011). Anthocyanin, total polyphenols and antioxidant activity of common bean. *American Journal of Food Technology*, 6, 385-394.
- American Diabetes Association (ADA). Standards of medical care in diabetes. (2013). *Diabetes Care*; 36, 11S-66S.
- Bonnefont-Rousselot, D. (2002). Glucose and reactive oxygen species. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 5, 561-568.

- Bueno, J. M., Ramos-Escudero, F., Sáez-Plaza, P., Muñoz, A. M., Jose Navas, M., & Asuero, A. G. (2012). Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part I: general considerations concerning polyphenols and flavonoids. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42, 102-125.
- Correa-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M., & Paliyath, G. (2014). Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 165, 522-531.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247.
- Gnanavinthan, A. (2013). Introduction to the major classes of bioactives present in fruit. In M. Skinner, & D. Hunter (Eds), *Bioactive in fruit: health benefits and functional foods* (pp.1-18). Oxford: John Wiley & Sons.
- Jayaprakasam, B., Olson, L. K., Schutzki, R. E., Tai, M. H., & Nair, M. G. (2006). Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 243-248.
- Jordheim, M., Fossen, T., & Andersen, Ø. M. (2006). Preparative isolation and NMR characterization of carboxypyrananthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3572-3577.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134, 3479S-3485S.
- Lin, L. Z., Harnly, J. M., Pastor-Corrales, M. S., & Luthria, D. L. (2008). The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 107, 399-410.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)
<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>, acesso em 18/07/2014.

Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., & Loarca-Piña, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). Journal of the Science of Food and Agriculture, 85, 935-942.

Oomah, B. D., Corbé, A., & Balasubramanian, P. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 8225-8230.

Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2, 270-278.

Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science, 2, 152-159.

Roy, M., Sen, S., & Chakraborti, A. S. (2008). Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: implication for glycation-induced hemoglobin modification. Life Sciences, 82, 1102-1110.

Sancho, R. A. S., & Pastore, G. M. (2012). Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. Food Research International, 46, 378-386.

Sies, H., & Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. The American Journal of Clinical Nutrition, 62, 1315S-1321S.

- Xu, B., & Chang, S. K. (2009). Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4754-4764.
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Avaliação das atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de compostos bioativos de extratos produzidos com casca de feijão, enfatizando as suas propriedades antioxidantes e antidiabéticas.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1. Determinar os teores de fenóis totais, flavonoides totais, antocianinas (ANTs) monoméricas, taninos condensados e atividade antioxidante através dos métodos ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e da capacidade de neutralização do radical ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) dos extratos das cascas de feijão preto e roxinho antes e após a digestão *in vitro*.

2.2. Identificar e quantificar as ANTs de um extrato rico em ANTs de feijão preto (ERA) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetria de massas (CLAE-EM/EM).

2.3. Determinar os fenóis totais, as ANTs monoméricas e a atividade antioxidante por meio dos métodos TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) e ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) do ERA submetidos ou não à digestão *in vitro*.

2.4. Avaliar a ingestão de ração, a evolução de peso e a glicemia de ratos Wistar com diabetes experimental induzido por estreptozotocina e tratados com ERA.

2.5. Analisar o perfil bioquímico hepático e renal, bem como a atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione redutase dos animais.

2.6. Investigar as possíveis alterações nos tecidos hepático e pancreático dos animais.

2.7. Determinar a atividade antioxidante plasmática através do método ORAC.

CAPÍTULO I

EVALUATION OF THE EFFECTS OF ANTHOCYANINS IN TYPE 2 DIABETES

Reproduced from Renata A. Soriano Sancho & Glaucia Maria Pastore (2012) Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. *Food Research International*. 46, 378-386. Copyright © (2011), with permission from Elsevier (License number: 3517250133809).

ABSTRACT

The number of cases of type 2 diabetes (T2D) is increasing worldwide. This disease can be characterized by insulin resistance and pancreatic β cell dysfunction, which lead to macro- and microvascular complications. Anthocyanins are flavonoids that occur naturally in plants and are responsible for their color. Studies with cell lines and animal models and clinical trials in humans suggest that anthocyanins exhibit antidiabetic properties. However, variation in the structure of anthocyanins makes it difficult to determine their effects on T2D. Understanding the absorption and metabolism of anthocyanins is important for understanding their role in the improvement of this disease. Published data suggest that anthocyanins may lower blood glucose by improving insulin resistance, protecting β cells, increasing secretion of insulin and reducing digestion of sugars in the small intestine. The mechanisms of action are primarily related to their antioxidant properties, but enzymatic inhibition and other pathways may also be relevant.

Keywords: anthocyanin, type 2 diabetes, oxidative stress, insulin, β cells

1. Introduction

The improvement of living conditions has contributed to the increased longevity of people worldwide. As a result, population aging is no longer a phenomenon restricted to developed countries. Medical advances have decreased the impact of infectious diseases, and chronic degenerative diseases (CDDs), such as diabetes mellitus, cardiovascular disease, Alzheimer's and Parkinson's, have become more important in the context of health.

Unlike infectious diseases, CDDs are multifactorial and often develop through exposure to different risk factors and unhealthy lifestyles.

The incidence of diabetes is increasing worldwide. The number of people with diabetes will increase from 171 million in 2000 to a projected 366 million in 2030. Brazil is among the 10 countries with the greatest number of people with diabetes and is expected to rank sixth in the year 2030, with a projected total of 11.3 million people with the disease (Wild, Roglic, Green, Sicree, & King, 2004).

An inadequate diet is a risk factor for the development of CDD. However, a proper diet can prevent or delay the manifestation of disease or improve the condition of individuals with an established disease. The benefits associated with a healthy diet are due, at least in part, to higher concentrations of antioxidants found in fruits and vegetables, such as carotenoids, tocopherols, ascorbate and polyphenols (Ames, Shigena, & Hagen, 1993; Nöthlings et al., 2008).

Anthocyanins (ANTs) are pigments widely found in fruits and vegetables and, therefore, often consumed in a normal diet. Interest in this important class of flavonoids has been growing in the scientific community due to recent evidence of their beneficial effects on health. Numerous publications have reported the antioxidant effects of ANTs (Kähkönen & Heinonen, 2003), such as vasoprotective (Xu, Ikeda, & Yamori, 2004), anti-inflammatory, anticarcinogenic (Seeram, 2008),

antiobesity (Tsuda, Horio, Uchida, Aoki, & Osawa, 2003) and antidiabetic effects (Takikawa, Inoue, Horio, & Tsuda, 2010).

This paper aims to review and discuss the current knowledge of the effects of ANT on CDD, specifically in type 2 diabetes mellitus.

2. Chemical structure and antioxidant action of anthocyanins

ANTs, which belong to the flavonoid class, are secondary metabolites of higher plants and are responsible for the blue, red and purple colors of fruits, vegetables and flowers. They are water-soluble poly-hydroxy and methoxy polyglycosides derived from 2-phenylbenzopyrylium (flavylium cation).

Individual differences in ANTs are related to the number of hydroxyl groups; the nature, number and position of sugars linked to the molecule; and the presence of aliphatic or aromatic acids attached to the sugar molecule. Most ANTs is derived from six anthocyanidins (aglycones): cyanidin, delphinidin, petunidin, peonidin, malvidin and pelargonidin (Fig. 1). Glycosylation and acylation alter the physical and chemical properties of ANT and increase its stability (Brouillard, Iacobucci, & Sweeny, 1982; Cevallos-Casals & Cisneros-Zevallos, 2004; He & Giusti, 2010; Kong, Chia, Goh, Chia, & Brouillard, 2003). The structure and color of ANT are dependent on pH and copigmentation. In solution, ANTs consist of four molecular forms in equilibrium: flavylium cation (red), quinoidal base (violet), hemiacetal base and chalcone (both colorless). The quantity of these forms depends on pH; they are in the cation flavylium form only below pH 2 (Clifford, 2000; Lapidot, Harel, Akiri, Granit, & Kanner, 1999; Mazza & Brouillard, 1987; Prior & Wu, 2006).

The most important function of ANTs is to give color to vegetables. However, they can also act as antioxidants (Kong et al., 2003), which has been demonstrated under different experimental conditions.

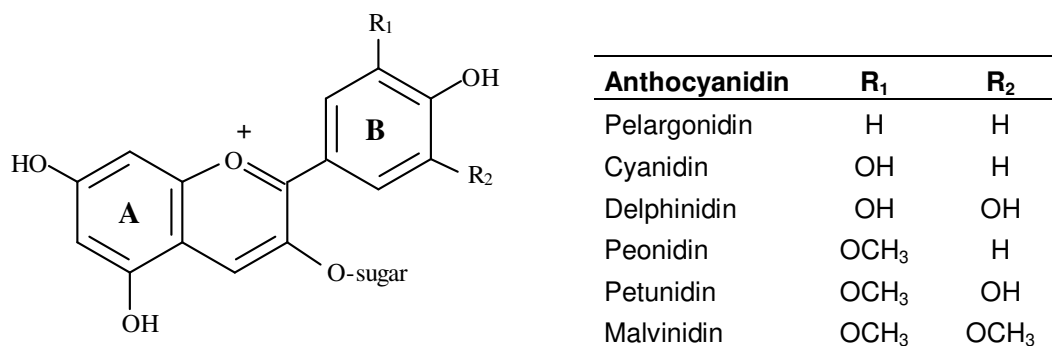


Fig. 1 - Structures of anthocyanins.

ANTs have the ability to capture radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, $\text{DPPH}^{\bullet}$, peroxy radicals and oxygen peroxide (Awika, Rooney, & Waniska, 2005; Ehlenfeldt & Prior, 2001; Kähkönen & Heinonen, 2003; Moyer, Hummer, Finn, Frei, & Wrolstad, 2002; Philpott, Gould, Lim, & Ferguson, 2004; Prior et al., 1998; Stintzing & Carle, 2004; Tsuda, Shiga, Ohshima, Kawakishi, & Osawa, 1996) and to inhibit the oxidation of liposomes and human LDL *in vitro* (Heinonen, Meyer, & Frankel, 1998; Kähkönen & Heinonen, 2003; Satué-Gracia, Heinonen, & Frankel 1997).

In vivo, ANT has been shown to have antioxidant activity under conditions of acute stress (Tsuda, Horio, Kito, & Osawa, 1999b); to restore the serum levels of malondialdehyde (MDA), antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) and catalase (Roy, Sen, & Chakraborti, 2008; Nizamutdinova et al., 2009); and to increase plasma antioxidant capacity (Leite, Malta, Riccio, Eberlin, Pastore, & Maróstica, 2011). Humans studies have confirmed that ANT may increase postprandial serum antioxidant status in healthy men after consumption of a high fat diet (Kay & Holub, 2002), improve the capacity of resistance to oxidative damage after acute stress and reduce oxidative damage to DNA in elderly women and men (Traustadóttir et al., 2009). However, in one study of healthy men, ANT did not decrease plasma levels of MDA, but increased the level of the reduced glutathione and lowered the amount of oxidative damage to DNA (Weissel et al., 2006).

2.1. Absorption, metabolism and bioavailability of anthocyanins

Human and animal models studies have shown that ANTs are rapidly absorbed as glycosides in the stomach and small intestine, mainly in the jejunal portion. This behavior differs from most other flavonoid glycosides, which have their sugar moiety removed by glycosidases before being absorbed. However, the percentage of absorption appears to be low and the absorption mechanisms can be saturated with high doses of ANT (Bitsch, Netzel, Frank, Strass, & Bitsch, 2004; Bub, Watzl, Heeb, Rechkemmer, & Briviba, 2001; Cao, Muccitelli, Sánchez-Moreno, & Prior, 2001; Ichiyanagi et al., 2004; Kalt et al., 2008; Matuschek, Hendriks, McGhie, & Reynolds, 2006; Mazza, Kay, Cottrell, & Holub, 2002; Passamonti, Vrhovsek, Vanzo, & Mattivi, 2003; Scalbert & Williamson, 2000; Talavéra et al., 2003; Talavéra et al., 2004; Wu, Cao, & Prior, 2002). Additionally, the food matrix significantly affects the absorption of ANT (Yang, Koo, Song, & Chun, 2011). *In vitro* (Yi, Akoh, Foscher, & Krewer, 2006), *in vivo* (Tavalera et al., 2004; Wu, Pittman, McKay, & Prior, 2005) and human studies (Charron et al., 2009) have shown that the properties of the aglycon and sugar and the presence of acylation influence the absorption and metabolism of ANT.

Similarly to other flavonoids, part of ANT is metabolized primarily through conjugation with glucuronic acid and also by methylation reactions (Walle, 2004). Several studies have confirmed these pathways *in vitro* (Woodward, Needs, & Kay, 2010), in animal models (Ichiyanagi et al., 2004; Tavalera et al., 2004; Wu et al., 2005) and in humans (Bitsch et al., 2004; Ohnishi et al., 2006; Tian, Giusti, Stoner, & Schwartz, 2006; Wu et al., 2002). Conjugation with sulfate, usually found in other flavonoids, was also evident for ANT in humans. However, the studies were few, and very low concentrations were found (Felgines et al., 2003; Felgines, Talavera, Texier, Gil-Izquierdo, Lamaison, & Rémésy, 2005). The colonic microflora plays a major role in metabolism. ANT reaches the colon in two ways: by not being absorbed in the stomach and small intestine or by being excreted in bile after absorption (Kay, 2006; Prior & Wu, 2006). After reaching the colon, ANTs are

subject to hydrolysis to release the sugar moiety and the aglycon, which can be degraded to form phenolic acids that are susceptible to resorption (Forester & Waterhouse, 2010; Keppler & Humpf, 2005; Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004; McGhie & Walton, 2007; Nurmi et al., 2009; Tsuda, Horio, & Osawa 1999). Similar metabolic events have also been observed in other classes of flavonoids (Rechner, et al., 2002; Walle, 2004).

The elimination route for ANT depends on how and where they are metabolized (Kay, 2006). Although the percentage of ANT excreted in the urine is low (Bitsch et al., 2004; Bub et al., 2001; Cao et al., 2001; McGhie, Ainge, Barnett, Cooney, & Jensen, 2003; Tian et al., 2006; Wu et al., 2002; Wu et al., 2005), the excretion of metabolites produced in the colon can be important (Kay, 2006). While ANT is eliminated in feces (Del Bò et al., 2010; He, Magnuson, & Giusti, 2005), the significance of this route remains unknown (Manach et al., 2004).

Several studies have reported the low bioavailability of ANT (Bitsch et al., 2004; Felgines et al., 2003; Felgines et al., 2005; Wu et al., 2002), which may be due to its chemical structure (Yi et al., 2006); excretion in feces; instability at neutral pH (Prior et al., 2006); or metabolism by colonic microflora (Aura et al., 2005), intestinal mucosa and liver, which result in degradation of the molecule (Bub et al., 2001). Conversely, a high bioavailability of ANT was suggested in a recent study, in which pigs that received moderate doses of ANT for four weeks showed the same accumulation of ANT in different tissues but none in plasma and urine (Kalt et al., 2008).

While reports of the low bioavailability of ANT are common, new research shows that some of the beneficial effects of ANT may be related to the products formed during metabolism, such as protocatechuic acid, the main metabolite of ANT in humans. The phenolic acids, due to their larger chemical and microbiological stability, may also be responsible for the antioxidant and other physiological effects observed after the consumption of ANT (Forester &

Waterhouse, 2009; 2010; Keppler & Humpf, 2005; Vitaglione et al., 2007; Wang, Wei, Yan, Jin, & Ling., 2010).

2.2. Properties of anthocyanin-related type 2 diabetes

Type 2 diabetes (T2D) is associated with impaired insulin secretion and insulin resistance, which lead to chronic hyperglycemia, increased oxidative stress and glycated hemoglobin (Hb A1c), caused by the glycation of proteins (Bonina et al., 2002; Jain, McVie, Duett, & Herbst, 1989; Tourrel, et al, 2002). Combined, these metabolic changes contribute to a greater morbidity and mortality, mainly due to long-term complications. The main complications of this disease are macrovascular changes that can lead to myocardial infarction, stroke and peripheral vascular disease and microvascular changes that are responsible for retinopathy, nephropathy and neuropathy (Donnelly, Emslie-Smith, Gardner, & Morris, 2000).

Several experiments have demonstrated the antidiabetic properties of ANTs, which are attributed to multiple and simultaneous effects of these bioactive compounds, including reducing blood glucose, glucosuria and Hb A1c; preventing free radical production; increasing insulin secretion; and improving insulin resistance (Ataie-Jafari, Hosseini, Karimi, & Pajouhi, 2008; Grace et al., 2009; Guo, et al. 2007; Iwai, Onodera, & Matsue, 2004; Jayaprakasam, Vareed, Olson, & Nair, 2005; Roy et al., 2008; Sugimoto, Igarachi, Kubo, Molineux, & Kubomura, 2003; Takikawa et al., 2010; Tsuda, Horio, Kitoh, & Osawa, 1999).

However, some studies with healthy, non-diabetic humans revealed that ANT did not alter blood glucose or plasma insulin concentrations (Basu et al., 2009; Chambers, & Camire, 2003; Kelley, et al., 2006;), perhaps because it requires the presence of pre-existing metabolic disorders for which these compounds have an effective action. The properties of anthocyanin-related glucose metabolism and oxidative stress are presented in Table 1.

Table 1. Summary of anthocyanin effects on glucose metabolism and oxidative stress.

Anthocyanin source	Model	Effect	Reference
CY-3-glucoside	Male Wistar rats/ liver ischemia-reperfusion injury	protective effect against oxidative stress	Tsuda et al., 1999b
Plants crude ANT extracts	<i>In vitro</i>	↓ α -glucosidase activity	Matsui et al., 2001a
Red flowers and roots of purple sweet potato	<i>In vitro</i>	↓ α -glucosidase activity	Matsui et al., 2001b
Freeze-dried wild blueberrie powder	Healthy adults/ high-fat meal	↑ serum antioxidant status	Kay & Holub, 2002
Purple sweet potato	Male Sprague-Dawley rats	↓ α -glucosidase activity ↓ plasma insulin	Matsui et al., 2002
Cranberry juice concentrate powder	Diabetics adults	no effect on fasting plasma glucose, Hb A1c	Chambers & Camire, 2003
CY-3-glucoside-rich purple corn color	Male C57BL/6J mice/ high fat diet	↓ plasma insulin ↓ plasma glucose ↓ insulin resistance (↑ adipose tissue TNF- α expression)	Tsuda et al., 2003
Boysenberry juice concentrate (CY-3-glucosylrutinoside, CY-3-diglucoside, CY-3-glucoside)	Male Wistar rats/STZ- T2D	↓ oxidative stress markers (TBARS)	Sugimoto et al., 2003

Table 1. Summary of anthocyanin effects on glucose metabolism and oxidative stress (continued).

Anthocyanin source	Model	Effect	Reference
Gamazumi (<i>Viburnum dilatatum</i> Thunb.) crude extract	Male Sprague-Dawley rats/STZ-T2D	↓ oxidative stress markers (TBARS) ↓ plasma glucose ↓ Hb A1c	Iwai et al., 2004
CY-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside, CY-3-galactoside, pelargonidin-3-galactoside and CY, delphinidin, pelargonidin, malvidin, petunidin	INS-1 832/13 cells	↑ insulin secretion	Jayaprakasan et al., 2005
<i>Vaccinium angustifolium</i> fruit ethanolic extracts	β TC-tet cells	proliferation of replicating β cells	Martineau et al., 2006
Cornelian cherry ANT (delphinidin-3-galactoside, CY-3-galactoside, pelargonidin 3-galactoside)	Male C57BL/6 mice/high fat diet	↑ glucose tolerance ↑ glucose-stimulated insulin secretion protect β-cells	Jayaprakasam et al., 2006
ANT-rich black rice extract	Male Sprague-Dawley rats/ high fructose diet	↓ insulin resistance ↓ oxidative stress markers (TBARS and GSSG)	Guo et al., 2007
CY-3-glucoside	Male KK-A ^y mice	↓ plasma glucose ↓ insulin resistance (adipose tissue upregulated GLUT4 and downregulated RBP4)	Sasaki et al., 2007

Table 1. Summary of anthocyanin effects on glucose metabolism and oxidative stress (continued).

Anthocyanin source	Model	Effect	Reference
Tart cherries	Male Dahl-SS rats	↓ fasting plasma glucose ↓ plasma insulin ↑ antioxidant capacity	Seymor et al., 2008
Sour cherry juice	Diabetics women	↓Hb A1c	Ataie-Jafari et al., 2008
Black chokeberry fruit extract (CY-3-galactoside, CY-3-arabinoside, CY-3-xyloside, CY-3-glucoside and others polyphenols)	Male Wistar rats/low dose of STZ + diet fructose and saturated fat	↓ plasma glucose ↓ plasma oxidative stress markers (TBARS) ↑ antioxidant enzymes activities (SOD)	Jurgoński et al., 2008
Pelargonidin	Male Wistar rats/ STZ- T2D	↓ insulin resistance ↑ insulin secretion ↓ plasma glucose ↓ plasma oxidative stress markers (MDA and fructosamine) and ↑ antioxidant enzymes activities (SOD and CAT) - ↓ Hb A1c	Roy et al., 2008
Strawberry freeze-dried powder	Women with metabolic syndrome	↓ serum oxidative stress markers (MDA, ox-LDL, 4-hydroxynonenal) no significant differences in fasting glucose level	Basu et al., 2009

Table 1. Summary of anthocyanin effects on glucose metabolism and oxidative stress (continued).

Anthocyanin source	Model	Effect	Reference
ANT-rich lowbush blueberry formulation (delphinidin-3-glucoside, malvidin-3-glucoside)	Male C57BL/6J mice/very high fat diet	↓ plasma glucose (malvidin-3-glucoside was the active hypoglycemic agent)	Grace et al., 2009
Whole blueberry freeze-dried powder	Male C57BL/6 mice/high fat diet	↓ insulin resistance (↓ adipose tissue TNF- α , MCP-1 and IL-6 expression) ↑ adipose tissue antioxidants enzymes gene expression (GPX) no effect on modest hyperinsulinemia	DeFuria et al., 2009
Tart cherry powder	Male Zucker fatty rats	↓ fasting plasma glucose ↓ plasma insulin ↓ insulin resistance (↓ IL-6 and TNF- α mRNA retroperitoneal fat expression and ↓ plasma IL-6 and TNF- α)	Seymor et al., 2009
Whole blueberries, strawberries, Concord grape or black raspberry freeze-dried powders or strawberries or blueberries purified ANT	Male C57BL/6 mice/high fat diet	no changes in glucose levels ↓ MCP-1	Prior et al., 2009
Black soybean ANT (CY-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside and petunidin-3-glucoside)	Male Sprague-Dawley rats/ STZ-T2D	↓ plasma glucose ↑ plasma insulin ↓ insulin resistance (↑expression of GLUT4 in muscle tissue) ↓ oxidative stress markers (MDA) and ↑antioxidant enzymes activities in pancreas (SOD and CAT) protection of β cells against ROS	Nizamutdinova et al., 2009

Table 1. Summary of anthocyanin effects on glucose metabolism and oxidative stress (continued).

Anthocyanin source	Model	Effect	Reference
Blueberry extract, blueberry juice, whole blueberry freeze-dried powder	Male C57BL/6 mice/high fat diet	↓ fasting plasma glucose	Prior et al., 2010
ANT-rich bilberry extract	Male KK-A ^y mice	↑ function of β cells ↓ plasma glucose ↓ insulin resistance (activation of AMPK → ↑ adipose tissue and skeletal muscle GLUT4 expression, ↓ liver glucose production; ↓ mesenteric adipose tissue RBP4 expression)	Takikawa et al., 2010
<i>Vaccinium arctostaphylos</i> fruit extract	Male Wistar rats/aloxan-T2D	↓ plasma glucose ↑ insulin and GLUT4 expression ↓ α-glucosidase activity ↑ red blood cells antioxidant enzymes activities (SOD, CAT and GPX)	Feshani et al., 2011
Chinese bayberry extract	INS-1 cells and primary islets from ICR mice	inhibition of the H ₂ O ₂ -induced apoptosis of β cells protection of β cells against ROS	Zhang et al., 2011

2.2.1. Oxidative stress

Diabetes is associated with oxidative stress resulting from an imbalance between the production of free radicals and/or reactive oxygen species and the antioxidant systems of the body. The increase in free radicals can occur in hyperlipidemic and hyperglycemic states (Baynes & Thorpe, 1999; Bonina et al., 2002). Therefore, the inhibition or reduction of oxidative processes, as additional therapy, can prevent or delay the onset of complications associated with diabetes (Bonina et al., 2002). This prevention can be accomplished with the use of antioxidants and also through the increased expression of antioxidant enzymes; the administration of ANT can be effective in such circumstances (Feshani et al., 2011; Sugimoto et al., 2003).

A number of experiments in animal models indicate that the elevation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), of MDA and oxidized glutathione as well as decreased concentrations of SOD and catalase are indicators of lipid oxidation and antioxidant enzymes in the diabetic state (Guo et al., 2007; Roy et al., 2008; Sugimoto et al., 2003).

Oxidative stress induced by ischemia-reperfusion leads to increased concentrations of TBARS and lower levels of reduced glutathione. A diet containing 0.2% cyanidin-3-glucoside was shown to reduce the plasma levels of TBARS and increase hepatic concentrations of reduced glutathione in rats (Tsuda, Horio, Kitoh, & Osawa, 1999).

A study with streptozotocin (STZ)-induced diabetic Wistar rats showed that the administration of a diet containing 0.1% mulberry anthocyanins reduced liver concentrations of oxidized glutathione and tended to reduce TBARS levels (Sugimoto et al., 2003).

Sprague-Dawley rats fed a diet with 0.5% of black rice ANT-rich extract have reduced oxidative stress presenting lower blood concentrations of TBARS and reduced glutathione (Guo et al., 2007).

Dietary supplementation with 0.2% chokeberry fruit extract resulted in sufficient antioxidant activity to normalize the concentrations of TBARS in the liver, kidneys and lungs of pre-diabetic Wistar rats. However there were no significant changes in SOD activity (Jurgoński, et al., 2008).

The plasma antioxidant status of Dahl-SS rats, measured by a total antioxidant status (TAS) assay, was restored by a diet supplemented with 1% freeze-dried whole tart cherry powder for 90 days (Seymour et al., 2008).

STZ-induced diabetic Wistar rats treated with one i.p. injection of pelargonidin at a dose of 3 mg/kg body weight showed a restoration of depleted serum levels of the enzymes SOD and catalase and normalization of the serum level of MDA (Roy et al., 2008). Similar results were also observed in STZ-diabetic rats treated with anthocyanins from black soybean seed coats (Nizamutdinova et al., 2009).

Oral administration of an ethanolic extract of *Vaccinium arctostaphylos* fruit, which is rich in ANT (Nickavar & Amin, 2004), increased the concentration of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in red blood cells of alloxan-induced diabetic Wistar rats (Feshani et al., 2010).

After ingestion of fat diet and 100 g freeze-dried blueberry powder containing 1.2 g of ANT, diluted in 500 ml of water, healthy men had increased plasma antioxidant levels. Measurements were performed using oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and total antioxidant status (TAS) (Kay & Holub, 2002).

Women with metabolic syndrome had a reduction in lipid peroxidation, presenting lower plasma levels of MDA, oxidized LDL and 4-hydroxynoneal after consuming two glasses of juice made with freeze-dried strawberry powder for four weeks (Basu et al., 2009).

2.2.2. β cells

T2D development is associated with the dysfunction of pancreatic β cells and insulin resistance (IR). Although β cells can compensate for IR by secreting greater amounts of insulin, insufficient compensation leads to hyperglycemia, which can generate reactive oxygen species (ROSs) through glycation reactions, causing apoptosis of β cells (Ahrén, 2005; Hunt, Smith, & Wolff, 1990; Kaneto et al., 1996; 1999). The expression of antioxidant enzymes such as catalase, SOD and glutathione peroxidase is very low in pancreatic islets. Thus, β cells are highly vulnerable to oxidative stress (Evans, Goldfine, Maddux, & Grodsky, 2003; Tiedge, Lortz, Drinkgern, & Lenzen, 1997). Because ANTs are able to reduce oxidative stress through their antioxidant action, this group of compounds may protect β cells (Roy et al., 2008).

Different *in vitro* and *in vivo* studies have associated decreased hyperglycemia with the protection that ANTs exert on β cells through their antioxidant and modulator action (Jurgoński et al., 2008; Martineau et al., 2006; Nizamutdinova et al., 2009; Roy et al., 2008; Zhang et al., 2011). Thus, the use of ANTs may be relevant in T2D therapy.

An *in vitro* study with different parts of blueberry plants (*Vaccinium angustifolium*) revealed that fruit extract increased the proliferation of pancreatic β TC-tet cells (Martineau et al., 2006). Although the bioactive compounds have not been identified, one can suppose that ANTs present in this fruit are involved in the process (Prior et al., 1998). The same study found a decrease in apoptosis in PC12 cells exposed to high concentrations of glucose. Based on previous

evidence concerning the plasticity of β cells in the pancreas of adults (Bouwens & Rooman, 2005), the increase in β cell proliferation and decrease apoptosis resulting from this fruit extract may indicate a potential anti-diabetic effect that merits investigation.

Cornelian cherry anthocyanins were able to protect the pancreatic islets of C57BL/6 CB mice. This mice lineage is susceptible to obesity and diabetes induced by diet. When subjected to a high fat diet with ANT supplementation, the islet structure was preserved and insulin secretion was increased (Jayaprakasam et al., 2006).

Treatment with ANTs from black soybean seed coats prevented the apoptosis of β cells through modulation of proteins associated with apoptosis. There was a downregulation of caspase 3 and Bax, which are pro-apoptotic proteins, and an increased expression of Bcl2 that presents antiapoptotic activity (Nizamutdinova et al., 2009).

C57BL/6J mice showed increased β -cell function, which was assessed by HOMA-BCF score, after 75 days of consumption of water containing purified ANT (0.2 mg / mL) (Prior et al., 2010).

ANTs from Chinese bayberry extract protected pancreatic β INS-1 cells and primary islets from damage induced by H_2O_2 (Zhang et al., 2011). The protective effect was time- and dose-dependent and was obtained by increasing the expression of heme oxygenase 1 (HO-1), which has been previously shown to have a cytoprotective action in β cells (Pileggi et al., 2001).

2.2.3. Insulin secretion

Insulin maintains blood glucose within appropriate values by increasing glucose uptake in adipose tissue and muscle and inhibiting glucose production in the liver. In T2D, insulin secretion may be impaired due to the dysfunction of β cells

(Ahrén, 2005). Sulfonylurea derivatives increase insulin secretion and are related to the reduction of microvascular complications found in diabetic patients. However, this type of treatment can lead to hypoglycemia (Stumvoll, Goldstein, & van Haeften, 2005). Therefore, the search for natural compounds that increase insulin secretion is appealing, and some studies have revealed that ANT may be an insulin secretagogue (Jayaprakasam et al., 2005; Nizamutdinova et al., 2009; Roy et al., 2008).

A study comparing the effects of different ANTs and anthocyanidins on insulin secretion in INS-1 832/13 cells found that delphinidin-3-glucoside had greater action than cyanidin-3-glucoside, which in turn was more efficient than pelargonidin-3-galactoside. These results suggest that the number of hydroxyl groups in the B ring of the molecule can influence the ability of ANT to secrete insulin. Only pelargonidin showed secretagogue activity when anthocyanidins were tested (Jayaprakasam et al., 2005). Moreover, there were no significant differences in insulin concentration of β TC-tet cells incubated with *Vaccinium angustifolium* fruit extract, which is rich in ANT (Martineau et al., 2006).

Increased insulin secretion was also observed in STZ-induced diabetic Wistar rats that received one dose of pelargonidin-3-glucoside (Roy et al., 2008). Similar results were obtained in STZ-induced diabetic Sprague-Dawley rats that received ANT extracted from black soybean (Nizamutdinova et al., 2009).

Increased insulin expression was observed in pancreatic and cardiac cells of alloxan-induced diabetic Wistar rats that were treated with extract of *Vaccinium arctostaphylos*. Although the mechanism is unclear, the authors attribute the increased expression to stimulation of β -cells and/or an increased release of insulin from the remnant β -cells (Feshani et al., 2011).

2.2.4. Insulin resistance

The reduction in glucose uptake stimulated by insulin (insulin resistance) is one of the hallmarks of T2D. Hyperglycemia, increased plasma levels of free fatty acids, oxidative stress caused by ROSs, endoplasmic reticulum stress and adipocyte dysfunction all have important roles in the development of this metabolic disease (Araki, Oyadomari, & Mori, 2003; Donath & Sheolson, 2011; Dresner et al., 1999; Houstis, Rosen, & Lander, 2006; Tsuda, Ueno, Kojo, Yoshikawa, & Osawa, 2005).

When T2D is associated with obesity, fat cells undergo important changes in their metabolic activities (Sartipy & Loskutoff, 2003). The adipocytokines are biologically active molecules synthesized and secreted by adipocytes (Matsuzawa, 2005). Examples of adipocytokines include adiponectin, which decreases in concentration in insulin resistance, and inflammatory molecules, such as monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). The inflammatory molecules have increased expression levels in T2D and likely contribute to the development of insulin resistance (Sasaki et al., 2007).

Some studies have shown that anthocyanins have anti-inflammatory activity and can reduce the expression of TNF- α , MCP-1 and IL-6, contributing to the improvement of T2D (DeFuria, et al., 2009; Sasaki et al., 2007; Seymour et al., 2009; Tsuda et al., 2003).

C57BL/6J mice fed a high-fat diet supplemented with anthocyanin-rich food coloring (with a high cyanidin-3-glucoside content) had reduced blood glucose and TNF- α from adipose tissue. These results may be associated with improvement in insulin resistance (Tsuda et al., 2003). A reduction in glycemia and decreased expression levels of TNF- α and MCP-1 in adipose tissue were also observed in

KK-A^y mice fed a diet supplemented with cyanidin-3-glucoside (Sasaki et al., 2007).

ANT-rich black rice extract decreased insulin resistance in Sprague-Dawley rats fed a diet containing high fructose, which induces hyperlipidemia and hyperinsulinemia. The mechanism may be related to the inhibition of oxidative stress and improvement of the plasma lipid profile (Guo et al., 2007) because an increase in plasma free fatty acids can disrupt the insulin signaling (Dresner et al., 1999).

Zucker rats fed a high-fat diet supplemented with tart cherry powder had fasting reduced glycemia and insulinemia as well as improved insulin resistance due to a decrease in plasma levels of IL-6 and TNF- α (Seymour et al., 2009).

C57BL/6 mice fed a high-fat diet supplemented with freeze-dried whole blueberry powder showed reduced levels of fasting glucose and TNF- α expression in adipose tissue and improved insulin tolerance test (ITT) results. However, the plasma concentration of fasting insulin was not reduced, indicating that the blueberry extract was not effective in reducing hyperinsulinemia resulting from a high-fat diet (DeFuria et al., 2009). Moreover, a comparison of the effects of supplementation with freeze-dried powders from different ANT-rich whole berries in hypo- and hyperlipidemic diets administered to C57BL/6J mice showed no changes in plasma levels of TNF- α , IL-6 and PAI-1 (Prior et al., 2009). However, in the same publication, another experiment with the same animal model demonstrated a reduction in plasma levels of MCP-1 in mice that received a high-fat diet and drinking water supplemented with ANTs purified from blueberries.

Administration of ANT extracted from black soybean to Sprague-Dawley rats raised the autophosphorylation level of insulin receptors, stimulating their activity. Therefore, the hypoglycemic activity attributed to ANTs can be explained, in part,

by the activation of insulin receptors generated by this group of flavonoids (Nizamutdinova et al., 2009).

Some recent studies in animal models showed a reduction in glycemia and an increased expression of the glucose transporter type 4 (GLUT4), which has been associated with decreased insulin resistance after treatment with anthocyanins from different plants species (Nizamutdinova et al., 2009; Sasaki et al., 2007; Takikawa et al., 2010).

GLUT4 is a protein from the glucose transporter family that is sensitive to insulin and is expressed mainly in muscle and adipose tissue. In the absence of stimulation, GLUT4 is located in the intracellular compartment. When insulin binds to the insulin receptor, it triggers a series of reactions that result in the translocation of GLUT4 to the plasma membrane, increasing glucose uptake (Bryant, Govers, & James, 2002) and therefore playing a key role in glucose homeostasis.

Increased GLUT4 mRNA expression was observed in heart cells of alloxan-induced diabetic Wistar rats treated with an extract of *Vaccinium arctostaphylos* (Feshani et al., 2011). Although the study did not identify the compounds present in the extract, the presence of anthocyanins has been observed in fruits of the genus *Vaccinium* (Prior et al., 1998).

In the diabetic state, GLUT4 expression in adipocytes is reduced, with a concomitant increase in the expression and excretion of retinol binding protein (RBP4) in the blood. There is a link between RBP4 and insulin resistance: when the blood level of this protein increases, insulin signaling is impaired in skeletal muscle, and hepatic glucose production is stimulated, increasing blood glucose (Yang et al., 2005). Therefore, the reduced expression of RBP4 with increased expression of GLUT4 may be important in the prevention and treatment of diabetes (Sasaki et al., 2007). An improvement in insulin resistance through the increased

expression of GLUT4 had previously been observed in diabetic rats during treatment with troglitazone (Furuta et al., 2002).

The decreased expression of RBP4 was also observed in mesenteric adipose tissue of diabetic KK-A^y mice. However, there were no changes in the concentrations of RBP4 in plasma or white adipose tissue, indicating that the antidiabetic effect may be associated with modulation of the expression of this adipocytokine (Takikawa et al., 2010).

The activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in adipose tissue and skeletal muscle induces increased expression of GLUT4, which provides greater uptake and utilization of glucose by these tissues through mechanisms independent of insulin. In the liver, the activation of AMPK reduced gluconeogenesis, which is increased in T2D, resulting in lower glucose production (Takikawa et al., 2010). Billberry extract added to the diet decreased plasma glucose and increased insulin sensitivity in diabetic KK-A^y mice through activation of AMPK in white adipose, skeletal muscle and liver tissues (Takikawa et al., 2010).

Therefore, anthocyanins may modulate the expression of adipocytokines, increase the expression of GLUT4, decrease the expression of RBP4, activate AMPK and reduce oxidative stress to improve insulin sensitivity, favorably influencing glycemic control.

2.2.5. α -glucosidase inhibitory action

The prevention of postprandial hyperglycemia in diabetic patients represents one way to control the disease. The α -glucosidases are enzymes found in the epithelium of the small intestine that are responsible for the hydrolysis of carbohydrates (Gray, Lally, & Conklin, 1979). Thus, the use of α -glucosidase inhibitors, which delay digestion of carbohydrates, may be a therapeutic approach

for T2D. Synthetic inhibitory agents, such as acarbose, have been employed to control glycemia increases after meals (Baron, 1998; Chiasson, et al., 2002). Nevertheless, there is a great deal of interest in natural agents that exert the same effect, and ANT has been effective in these conditions (Matsui et al., 2001a; 2001b; Matsui et al., 2002).

The mechanism by which ANT inhibits α -glucosidase is not completely clear. However, the inhibition is probably competitive, as in the case of acarbose - a result of the structural similarity between the normal substrate of the enzyme and the glucosyl groups linked to ANT, which would bind to the active site but would not be hydrolyzed (McDougall & Stewart, 2005). Another possibility is that polar groups present in the active site of the enzyme interact with hydroxyl groups on ANT, changing the molecular configuration of the enzyme and its hydrophilic and hydrophobic properties, leading to a change in enzyme activity (Adisakwattana, Charoenlertkul, & Yibchok-Anun, 2009).

Studies performed *in vitro* with extracts of different plant parts, such as roots, stems, leaves, flowers and bark, or with standards of anthocyanins, have shown inhibitory activity of α -glucosidase against maltase and sucrase (Adisakwattana et al., 2009; Feshani et al., 2011) or only against maltase (Matsui et al. 2001a; 2001b). Meanwhile, the presence or absence of inhibition, as well as the efficiency of inhibition, depends on both the type of enzyme and the chemical structure of ANT (Adisakwattana et al., 2009; Matsui et al., 2001a; 2001b). As an example, the highest inhibitory activity is seen for ANT acylate, as compared to non-acylated ANT (Matsui, 2001b), which might be due to its greater stability of ANT acylate in the gut (Charron et al., 2009).

The reductions in blood glucose resulting from a single dose of ANT extract from purple sweet potato that were observed in healthy Sprague-Dawley rats after carbohydrate loading (sucrose, maltose and glucose) occurred through inhibition of maltase activity (Matsui et al., 2002). Moreover, when a Wistar rat model of

prediabetes obtained through a high-fructose diet and simultaneous single injection of streptozotocin (20 mg/kg) was fed a diet supplemented with extract of chokeberry, hypoglycemic effects were also obtained. In this case, the lowest blood glucose concentrations were attributed, in part, to inhibition of the enzymes maltase and sucrase (Jurgoński et al., 2008).

A synergistic effect between acarbose and cyanidin-3-galactoside was shown by Adisakwattana (2009). This result is important because it indicates that this combination may lead to a reduction of the dose of acarbose in the treatment of T2D, consequently reducing side effects that, though weak, may occur by the consumption of acarbose (Chiasson et al., 2002).

3. Conclusion

Anthocyanins may have favorable effects on T2D. Several papers suggest that ANTs are able to both stimulate insulin secretion and protect β cells by reducing oxidative stress, thereby improving insulin resistance and decreasing levels of postprandial glucose. Further studies are needed to clarify what type of anthocyanin is most appropriate for a particular purpose, the optimal dose to be consumed and efficiency of the extracts in relation to consumption of foods that are rich in these flavonoids.

Acknowledgments

The authors thank the National Brazilian Research Foundation (CNPq) for financial support.

References

- Adisakwattana, S., Charoenlertkul, P., & Yibchok-Anun, S. (2009). α -Glucosidase inhibitory activity of cyanidin-3-galactoside and synergistic effect with acarbose. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24, 65-69.
- Ahrén, B. (2005). Type 2 diabetes, insulin secretion and β -cell mass. *Current Molecular Medicine*, 5, 275-286.
- Ames, B. M., Shigena, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 90, 7915-7922.
- Araki, E., Oyadomari, S., & Mori, M. (2003). Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Internal Medicine*, 42, 7-14.
- Ataie-Jafari, A., Hosseini, S., Karimi, F., & Pajouhi, M. (2008). Effects of sour cherry juice on blood glucose and some cardiovascular risk factors improvements in diabetic women. A pilot study. *Nutrition & Food Science*, 38, 355-360.
- Aura, A. M., Martin-Lopez, P., O'Leary, K. A., Williamson, G., Oksman-Caldentey, K. M., Poutanen, K., & Santos-Buelga, C. (2005). In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European Journal of Nutrition*, 44, 133-142.
- Awika, J. M., Rooney, L. W., & Waniska, R. D. (2005). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 90, 293-301.
- Baron, A. D. (1998). Postprandial hyperglycaemia and α -glucosidase inhibitors. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 40, S51-S55.

- Basu, A., Wilkinson, M., Penugonda, K., Simmons, B., Betts, N. B., Timothy, J., & Lyons, T. J. (2009). Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutrition Journal*, 8, 43-49.
- Baynes, J. W., & Thorpe, S. R. (1999). Perspectives in diabetes. Role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48, 1-9.
- Bitsch, R., Netzel, N., Frank, T., Strass, G., & Bitsch, I. (2004). Bioavailability and biokinetics of anthocyanins from red grape juice and red wine. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 293-298.
- Bonina, F. P., Leorra, C., Scalia, G., Puglia, C., Trombetta, D., Tringali, G., Roccuzzello, A. M., Rapisarda, P., & Saija, A. (2002). Evaluation of oxidative stress in diabetic patients after supplementation with a standardised red orange extract. *Diabetes, Nutrition & Metabolism*. 15, 14-19.
- Bouwens, L., & Rooman, I. (2005). Regulation of pancreatic betacell mass. *Physiological Reviews*, 85, 1255-1270.
- Brouillard, R., Iacobucci, G., A., & Sweeny, J, G. (1982). Chemistry of anthocyanin pigments. 9. UV-visible spectrophotometric determination of the acidity constants of apigeninidin and three related 3-deoxyflavylium salts. *Journal of the American Chemical Society*, 104, 7585-7590.
- Bryant, N. J., Govers, R., & James, D. E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 267-277.
- Bub, A., Watzl, B., Heeb, D., Rechkemmer, G., & Briviba, K. (2001). Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *European Journal of Nutrition*, 40, 113-120.

- Cao, G., U Muccitelli, H. U., Sánchez-Moreno, C., & Prior, R. L. (2001). Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 920-6.
- Cevallos-Casals, B. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2004). Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry*, 86, 69-77.
- Chambers, B. K., & Camire, M. H. (2003). Can cranberry supplementation benefit adults with type 2 diabetes? *Diabetes Care*, 26, 2695-2696.
- Charron, C. S., Kurilich, A. C., Beverly A., Clevidence, B. A., Simon, P. W., Harrison, D. J., Britz, S. J., David, J., Baer, D. J., & Novotny, J. A. (2009). Bioavailability of anthocyanins from purple carrot juice: effects of acylation and plant matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1226-1230.
- Chiasson, J. L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., & Laakso, M. (2002). Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *The Lancet*, 359, 2072-2077.
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1063-1072.
- DeFuria, J., Bennett, G., Strissel, K. J., Perfield II, J. W., Milbury, P. E., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2009). Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae. *The Journal of Nutrition*, 139, 1-7.

- Del Bò, C., Ciappellano, S., Klimis-Zacas, D., Martini, D., Gardana, C., Riso, P., & Porrini, M. (2010). Anthocyanin absorption, metabolism, and distribution from a wild blueberry-enriched diet (*Vaccinium angustifolium*) is affected by diet duration in the Sprague-Dawley rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2491-2497.
- Donath, M. Y., & Sheolson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 11, 98-107.
- Donnelly, R., Emslie-Smith, A. M., Gardner, I. D., & Morris, A. D. (2000). ABC of arterial and venous disease. Vascular complications of diabetes. *British Medical Journal*, 320, 1062-1066.
- Dresner, A., Laurent D., Marcucci, M., Griffin, M. E., Dufour, S., Cline, G. W., Slezak, L.A., Andersen, D. K., Hundal, R. S., & Rothman, D. L. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *The Journal of Clinical Investigation*, 103, 253-259.
- Ehlenfeldt, M. K., & Prior, R. L. (2001). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2222-2227.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes*, 52, 1-8.
- Felgines. C., Talavera, S., Gonthier, M. P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J. L., & Rémésy, C. (2003). Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *The Journal of Nutrition*, 133, 1296-301.

- Felgines, C., Talavera, S., Texier, O., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J. L., & Rémésy, C. (2005). Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7721-7727.
- Feshani, A. M., Kouhsar, S. M., & Mohammadi, S. (2011). *Vaccinium arctostaphylos*, a common herbal medicine in Iran: molecular and biochemical study of its antidiabetic effects on alloxan-diabetic Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 67-74.
- Forester, S. C., & Waterhouse, A. L. (2009). Metabolites are key to understanding health effects of wine polyphenolics. *The Journal of Nutrition*, 138, 1824S-1831S.
- Forester, S. C., & Waterhouse, A. L. (2010). Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5320-5327.
- Furuta, M., Yano, Y., Gabazza, E. C., Araki-Sasaki, R., Tanaka, T., Katsuki, A., Hori, Y., Nakatani, K., Sumida, Y., & Adachi, Y. (2002). Troglitazone improves GLUT4 expression in adipose tissue in an animal model of obese type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 56, 159-171.
- Grace, M. H., David, M., Ribnicky, D. M., Kuhn, P., Poulev, A., Logendra, S., Yousef, G. G., Raskin, I., & Lila, M. A. (2009). Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*, 16, 406-415.
- Gray, G. M., Lally, B. C., & Conklin, K. A. (1979). Action of intestinal sucrase-isomaltase and its free monomers on an α -limit dextrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 6038-6043.

- Guo, H., Ling, W., Liu, C., Hu, Y., Xia, M., Feng, X., & Xia, X. (2007). Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. indica) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62, 1-6.
- He, J., Magnuson, B. A., & Giusti, M. M. (2005). Analysis of anthocyanins in rat intestinal contents-impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2859-2866.
- He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 163-187.
- Heinonen, I. M., Meyer, A. S., & Frankel, E. N. (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4107-4112.
- Houstis, N., Rosen, E. D., & Lander, E. S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*, 440, 944-948.
- Hunt, J. V., Smith, C. C., & Wolff, S. P. (1990). Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes*, 39, 1420-1424.
- Ichianagi, T., Rahman, M. M., Kashiwada, Y., Ikeshiro, Y., Shida, Y., Hatano, Y., Matsumoto, H., Hirayama, M., Tsuda, T., & Konishi, T. (2004). Absorption and metabolism of delphinidin 3-O- β -D-glucopyranoside in rats. *Free Radical Biology & Medicine*, 36, 930-937.
- Iwai, K., Onodera, A., & Matsue, H. (2004). Inhibitory effects of *Viburnum dilatatum* Thunb. (Gamazumi) on oxidation and hyperglycemia in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1002-1007.

- Jain, S. K., McVie, R., Duett, J., & Herbst, J. J. (1989). Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes*, 38, 1539-1543.
- Jayaprakasam, B., Vareed, S. K., Olson, L. K., & Nair, M. G. (2005). Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 28-31.
- Jayaprakasam, B., Olson, L. K., Schutzki, R. E., Tai M. H., & Nair, M. G. (2006). Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 243-248.
- Jurgoński, A., Juśkiewicz, J., & Zduńczyk, Z. (2008). Ingestion of black chokeberry fruit extract leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 176-182.
- Kähkönen, M. P., & Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 628-633.
- Kalt, W., Blumberg, J. B., McDonald, J. E., Vinqvist-Tymchuk, M. R., Fillmore, S. A. E., Graf, B. A, O'Leary, J. M., & Milbury, P. E. (2008). Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 705-712.
- Kaneto, H., Fujii, J., Myint, T., Miyazawa, N., Islam, K. N., Kawasaki, K., Suzuki, K., Nakamura, M., Tatsumi, H., Yamasaki, Y., & Taniguchi, N. (1996). Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic β -cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochemical Journal*, 320, 855-863.

- Kaneto, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J., Matsuoka, T., Fujitani, Y., Umayahara, Y., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Yamasaki, Y., & Hori, M. (1999). Beneficial effects of antioxidants in diabetes. Possible protection of pancreatic β -cells against glucose toxicity. *Diabetes*, 48, 2398-2406.
- Kay, C. D., & Holub, B. J. (2002). The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 88, 389-397.
- Kay, C. D. (2006). Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutrition Research Reviews*, 19, 137-146.
- Kelley, D. S., Rasooly, R., Jacob, R. A., Kader, A. A., Bruce E., & Mackey, B. E. (2006). Consumption of Bing sweet cherries lowers circulating concentrations of inflammation markers in healthy men and women. *The Journal of Nutrition*, 136, 981-986.
- Keppler, K., & Humpf, H. U. (2005) Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 5195-5205.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923-933.
- Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, R., & Kanner, J. (1999). pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 67-70.
- Leite, A. V., Malta, L. G., Riccio, M. F., Eberlin, M. N., Pastore, G. M., & Maróstica Júnior, M. R (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2277-2283.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Martineau, L. C., Couture, A., Spoor, S., Benhaddou-Andaloussi, A., Harris, C., Meddah, B., Leduc, C., Burt, A., Vuong, T., Le, P. M., Prentki, M., Bennett, S. A., Arnason, J. T., & Haddad, P. S. (2006). Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Phytomedicine*, 13, 612-623.
- Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., & Matsumoto, K. (2001a). α -glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1948-1951.
- Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., & Matsumoto, K. (2001b). α -glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. α -glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1952-1956.
- Matsui, T., Ebichi, S., Kobayashi, M., Fukui, K., Sugita, K., Terahara, N., & Matsumoto, K. (2002). Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from ipomoea batatas cultivar ayamurasaki can be achieved through the α -glucosidase inhibitory action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7244-7248.
- Matsuzawa Y. (2005). Adipocytokines and metabolic syndrome. *Seminars in Vascular Medicine*, 5, 34-39.
- Matuschek M. C., Hendriks, W. H., McGhie, T. K., & Reynolds, G. W. (2006). The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 31-36.

- Mazza, G., & Brouillard, R. (1987). Recent developments in stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*, 25, 207-225.
- Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T., & Holub B. J. (2002). Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7731-7737.
- McDougall, G. J., & Stewart, D. (2005). The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *BioFactors*, 23, 189-195.
- McGhie, T. K., Ainge, G. D., Barnett, L. E., Cooney, J. M., & Jensen, D. J. (2003). Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolised by both humans and rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4539-4548.
- McGhie, T. K., & Walton M. C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 702-713.
- Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B., & Wrolstad, R.E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519-525.
- Nickavar, B., & Amin, G. (2004). Anthocyanins from *Vaccinium arctostaphylos* berries. *Pharmaceutical Biology*, 42, 289-291.
- Nizamutdinova, I. T., Jin, Y. C., Chung, J., Shin, S. C., Lee, S. J., Seo, H. G., Lee, J. H., Chang, K. C., & Kim, H. J. (2009). The anti-diabetic effect of anthocyanins in streptozotocin-induced diabetic rats through glucose transporter 4 regulation and prevention of insulin resistance and pancreatic apoptosis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 1419-1429.

- Nöthlings, U., Schulze, M. B., Weikert, C., Boeing, H., Schouw, Y. T., Bamia, C., Benetou, V., Lagiou, P., Krogh, V., Beulens, J. W. J., Peeters, P. H. M., Halkjær, J., Tjønneland, A., Tumino, R., Panico, S., Masala, G., Clavel-Chapelon, F., Lauzon, B., Boutron-Ruault, M. C., Vercambre, M. N., Kaaks, R., Linseisen, J., Overvad, K., Arriola, L., Ardanaz, E., Gonzalez, C. A., Tormo, M. J., Bingham, S., Khaw, K. T., Key, T. J. A., Vineis, P., Riboli, E., Ferrari, P., Boffetta, P., Bueno-de-Mesquita, H. B., van der A, D. L., Berglund, G., Wirfält, E., Hallmans, G., Johansson, I., Lund, E., & Trichopoulou, A. (2008). Intake of vegetables, legumes, and fruit, and risk for all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in a European diabetic population. *The Journal of Nutrition*, 138, 775-781.
- Nurmi, T., Mursu, J., Heinonen, M., Nurmi, A., Hiltunen, R., & Voutilainen, S. (2009). Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2274-2281.
- Ohnishi, R., Ito, H., Kasajima, N., Kaneda, M., Kariyama, R., Kumon, H., Hatano, T., & Yoshida, T. (2006). Urinary excretion of anthocyanins in humans after cranberry juice ingestion. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 1681-1687.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*, 544, 210-213.
- Philpott, M., Gould, K. S., Lim, C., & Ferguson, L. R. (2004). *In situ* and *in vitro* antioxidant activity of sweet potato anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 1511-1513.
- Pileggi, A., Molano, R. D., Berney, T., Cattani, P., Vizzardelli, C., Oliver, R., Fraker, C., Ricordi, C., Pastori, R. L., Bach, F. H., & Inverardi, L. (2001). Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes*, 50, 1983-1991.

- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., & Mainland, C. M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 2686-2693.
- Prior, R. L., & Wu, X. (2006). Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, *40*, 1014-1028.
- Prior, R. L., Wu, X., Gu, L., Hager, T., Hager, A., Wilkes, S., & Howard, L. (2009). Purified berry anthocyanins but not whole berries normalize lipid parameters in mice fed an obesogenic high fat diet. *Molecular Nutrition & Food Research*, *53*, 1406-1418.
- Prior, R. L., Wilkes, S. E., Rogers, T. R., Khanal, R. C., Wu, X., & Howard, L. R. (2010). Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 3970-3976.
- Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner P., Hubbard, G. P., Moore, K. P., & Rice-Evans, C. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, *33*, 220-235.
- Roy, M., Sen, S., & Chakraborti, A. S. (2008). Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: Implication for glycation-induced hemoglobin modification. *Life Sciences*, *82*, 1102-1110.
- Sartipy, P., & Loskutoff, D. J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, *100*, 7265-7270.

- Sasaki, R., Nishimura, N., Hoshino, H., Isa, Y., Kadowaki, M., Ichi, T., Tanaka, A., Nishiumi, S., Fukuda, I., Ashida, H., Horio, F., & Tsuda, T. (2007). Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochemical pharmacology*, 74, 1619-1627.
- Satué-Gracia, M. T., Heinonen, M., & Frankel, E. (1997). Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3362-3367.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130, 2073S-2085S.
- Seeram, N. (2008). Berry Fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 627-629.
- Seymour, E. M., Singer, A. M. A., Kirakosyan, A., Urcuyo-Llanes, D. E., Kaufman, P.B., & Bolling, S. F. (2008). Altered hyperlipidemia, hepatic steatosis, and hepatic peroxisome proliferator-activated receptors in rats with intake of tart cherry. *Journal of Medicinal Food*, 11, 252-259.
- Seymour, E. M., Lewis, S. K., Urcuyo-Llanes, D. E., Tanone, I. I., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., & Bolling, S. F. (2009). Regular tart cherry intake alters abdominal adiposity, adipose gene transcription, and inflammation in obesity-prone rats fed a high fat diet. *Journal of Medicinal Food*, 12, 935-942.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 19-38.

- Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, *365*, 1333-1346.
- Sugimoto, E., Igarachi, K., Kubo, K., Molineux, J., & Kubomura, K. (2003). Protective effects of boysenberry anthocyanins on oxidative stress in diabetic rats. *Food Science and Technology Research*, *9*, 345-349.
- Takikawa, M., Inoue, S., Horio, F., & Tsuda, T. (2010). Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *The Journal of Nutrition*, *140*, 527-533.
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, J. L., & Rémésy, C. (2003). Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *The Journal of Nutrition*, *133*, 4178-4182.
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Manach, C., Lamaison, J. L., & Rémésy, C. (2004). Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *The Journal of Nutrition*, *134*, 2275-2279.
- Tian, Q., Giusti, M. M., Stoner, G. D., & Schwartz, S. J. (2006). Urinary excretion of black raspberry (*Rubus occidentalis*) anthocyanins and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 1467-1472.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., & Lenzen, S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, *46*, 1733-1742.
- Tourrel, C., Bailbe, D., Lacorne, M., Meile, M. J., Kergoart, M., & Portha, B. (2002). Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the β -cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes*, *51*, 1443-1452.

- Traustadóttir, T., Davies, S. S., Stock, A. A., Su, Y., Heward, C. B., Roberts, L. J., & Harman, S. M. (2009). Tart cherry juice decreases oxidative stress in healthy older men and women. *The Journal of Nutrition*, 139, 1896-1900.
- Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., & Osawa, T. (1996). Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochemical Pharmacology*, 52, 1033-1039.
- Tsuda, T., Horio, F., & Osawa, T. (1999). Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-L-D-glucoside in rats. *FEBS Letters*, 449, 179-182.
- Tsuda, T., Horio, F., Kitoh, J., & Osawa, T. (1999). Protective effects of dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 368, 361-366.
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., & Osawa, T., (2003). Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *The Journal of Nutrition*, 133, 2125 -2130.
- Tsuda, T., Ueno, Y., Kojo, H., Yoshikawa, T., & Osawa, T. (2005). Gene expression profile of isolated rat adipocytes treated with anthocyanins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1733, 137-147.
- Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A. Scalfi, L., & Fogliano, V. (2007). Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *The Journal of Nutrition*, 137, 2043-2048.
- Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 36, 829-837.

- Wang, D., Wei, X., Yan, X., Jin, T., & Ling, A. (2010). Protocatechuic acid, a metabolite of anthocyanins, inhibits monocyte adhesion and reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12722-12728.
- Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J. P., Kulling, S., Rüfer, K., Johannes, C. and Christine Janzowski, C. (2006). An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in ealthy probands. *Biotechnology Journal*, 1, 388-397.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H. (2004). Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27, 1047-1053.
- Woodward, G. M., Needs, P. W., & Kay, C. D. (2010). Anthocyanin-derived phenolic acids form glucuronides following simulated gastrointestinal digestion and microsomal glucuronidation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 1-9.
- Wu, X., Cao, G., & Prior, R. L. (2002). Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *The Journal of Nutrition*, 132, 1865-1871.
- Wu, X., Pittman, H. E., Mckay, S., & Prior, R. L. (2005). Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism after berry consumption in weanling pigs. *The Journal of Nutrition*, 135, 2417-2424.
- Xu, J. W., Ikeda, K., & Yamori, Y. (2004). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by cyanidin-3-glucoside, a typical anthocyanin pigment. *Hypertension*, 44, 217-222.

- Yang, Q., Graham, T. E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O. D., Zabolotny, J. M., Kotani, K., Quadro, L., & Kahn, B. B. (2005). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, 436, 356-362.
- Yang, M., I. Koo, S., O. Song, W. K., & Chun, O. (2011). Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: Review. *Current Medicinal Chemistry*, 18, 291-300.
- Yi, W., Akoh, C. C., Foscher, J., & Krewer, G. (2006). Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by Caco-2 human intestinal cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5651-5658.
- Zhang, B., Kang, M., Xie, Q., Xu, B., Sun, C., Chen, K., & Wu, Y. (2011). Anthocyanins from Chinese bayberry extract protect β cells from oxidative stress-mediated injury via HO-1 upregulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 537-545.

CAPÍTULO II

EFFECT OF *IN VITRO* DIGESTION ON BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COMMON BEAN SEED COATS

Reproduced from Renata A. Soriano Sancho, Verônica Pavan, & Glaucia Maria Pastore. (2014). Effect of *in vitro* digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2014.11.042. Copyright © (2014), with permission from Elsevier (License number: 3539301262453).

ABSTRACT

The effects of gastrointestinal digestion on black bean (BB) and small red bean (SRB) seed coats were evaluated in treated and untreated extracts with an *in vitro* digestion process. The total phenols (TPs), total flavonoids (TFs), condensed tannins (CTs), monomeric anthocyanins (MAs), ABTS radical-scavenging capacity and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) were evaluated in both groups. Anthocyanins, which appeared at 10-fold higher levels in BB than SRB (0.83 mg and 0.08 mg cyanidin 3-glucoside equivalents/g of bean, respectively) were undetectable in either extract after digestion. The results indicate that the *in vitro* digestion process was responsible for a reduction of the TPs, CTs and MAs in both the BB and SRB seed coats, and of TFs in the BB seed coats. However, the antioxidant activity was maintained for both groups, and even significantly increased in the BB group when measured with an ORAC assay.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, *In vitro* digestion, Anthocyanins, Phenolic compounds.

1. Introduction

Beans (*Phaseolus vulgaris*) are one of the oldest foods cultivated in America and an indispensable component of the Brazilian diet. Brazil, besides being the world's largest producer of this food, also ranks as the largest consumer (MAPA, 2014).

In addition to representing an important source of protein, carbohydrates, fiber and minerals, beans are recognized for being rich in phytochemicals with potential health benefits (Lin, Harnly, Pastor-Corrales, & Luthria, 2008). These bioactive compounds may counteract reactive oxygen species, inhibiting oxidative mechanisms that lead to degenerative diseases.

Several studies have demonstrated associations between the consumption of this food and reduced risk of chronic degenerative diseases such as diabetes (Helmstädter, 2010), obesity (Wu, Xu, Shen, Perricone, & Preuss, 2010), cardiovascular and renal diseases (Anderson, Smith, & Washnock, 1999).

This potential protective action has aroused the interest of the scientific community, which identified in this legume not only the presence of bioactive compounds such as phenolic acids, flavonols, flavan-3-ols, condensed tannins (CTs) and anthocyanins (ANTs), but also anti-inflammatory and antioxidant activities (AA), specifically against DPPH, ABTS and peroxy radicals (Akillioglu & Karakaya, 2010; Akond et al., 2011; Lin et al., 2008; Oomah, Corbé, & Balasubramanian., 2010; Marles, Balasubramanian, & Bett, 2010; Tsuda, Osawa, Ohshima, & Kawakishi, 1994; Xu & Chang, 2008; 2009).

Although they represent a relatively small portion of the bean, the seed coats concentrate most of the polyphenols found in the beans and this characteristic has generated several studies conducted with this part of the legume

(Choung, Choi, An, Chu, & Cho, 2003; Lin et al, 2008; Oomah et al., 2010; Tsuda, et al., 1994).

Organic extracts have frequently been used for the quantification of polyphenols and for the assessment of AA in beans seed coats (Choung et al., 2003). Although several studies have shown that digestion induces important changes in polyphenols of different foods and extracts leading to changes in antioxidant activity (Fernández & Labra, 2013; Noguer et al., 2008; Pérez-Vicente, Gil-Izquierdo, & García-Viguera, 2002), little is known about the changes brought by gastrointestinal digestion (GI) on beans' polyphenols. Even though the interest in this subject has recently increased, studies concerning this approach are scarce

The *in vitro* digestion has been used often to simulate gastrointestinal conditions since they can be considered relatively simple when compared to the *in vivo* model, besides being safe and do not present ethical restrictions (You, Zhao, Regenstein, & Ren, 2010).

The primary objectives of the present study were to quantify the total phenols (TPs), total flavonoids (TFs), CTs and monomeric ANTs (MAs); and investigate the *in vitro* AA by both oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ABTS radical-scavenging capacity assays in extracts of the seed bean coats that were treated (or not) by simulated digestion.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Small red beans (SRB) and black beans (BB), grown in the State of Minas Gerais, Brazil, were purchased from local markets (Campinas, São Paulo, Brazil), in September 2012 and stored at -18°C until analysis.

Standards of catechin, gallic acid and the reagents 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), 2,20-azobis(2-methylamidinopropane)-dihydrochloride (AAPH), sodium fluorescein, aluminum chloride ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), butylated hydroxytoluene (BHT), sodium borohydride (NaBH_4), chloranil, vanillin, bile extract from porcine (B-8631), pepsin from porcine gastric mucosa (EC 3.4.23.1, P-7000), pancreatin from porcine pancreas (4 x USP-US Pharmacopeia specifications, P-1750) were obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). All other chemicals and solvents in this study were of analytical grade. The water was purified by the Milli-Q system (Millipore, Bedford, USA).

2.2. Extraction method

It is evident that peeling beans, in addition to being an extremely laborious process, can effectively remove the compounds present in the seed coats.

With this initial concept, a preliminary extraction was performed with the aim of comparing the use of ground bean coats versus whole beans in the preparation of the extract. This comparison was chosen as a parameter to assess the content of ANTs (data not shown). Since the results were not significantly different, whole beans were chosen for further experiments, with a significant reduction in the work and time required for sample preparation.

The extraction was performed as described by Jordheim, Fossen, and Andersen (2006), with slight modifications. Approximately 40 g of BB and SRB were soaked in 45 mL of water (0.5% HCl) at 4°C for 3 h. SRB and BB were then extracted one and two times, respectively with 100 mL of methanol (0.5% HCl) at 4°C for 24 h. After centrifugation and evaporation under reduced pressure ($T < 38^\circ\text{C}$), concentrates were recombined, diluted with Milli-Q water to a volume of 25 mL and stored at -80°C for further experiments. These extracts were designated crude extracts of black (CEB) and small red beans (CESR).

2.3. *In vitro* gastrointestinal digestion

In vitro GI digestion was performed as described by Faller, Fialho, and Liu (2012), with slight modifications. Briefly, 1 mL of each extract was mixed with saline (140 mM NaCl, 5 mM KCl, and 150 μ M BHT) to create a final volume of 4.5 mL. The mixture was vortexed and acidified with 0.1 M/1 M HCl until it reached pH 2. Then, gastric digestion was performed with the addition of 125 μ L of pepsin solution (200 mg of pepsin in 5 mL of 0.1 M HCl) and the mixture was placed in a shaker at 37°C for 1 hour. Thereafter, the pH of the solution was adjusted to 6.9 with the addition of 0.1 M/1 M NaHCO₃. Further intestinal digestion was performed with the addition of 625 μ L of pancreatin-bile solution (225 mg of bile extract and 37 mg of pancreatin in 18.7 mL of 0.1 M NaHCO₃) and incubation in a shaker at 37°C for 2 h. Before the gastric and intestinal steps, the extracts were capped with nitrogen to prevent degradation of the phenolic compounds due to oxidation. The digestate volume was adjusted to 9 mL with saline and stored at -80 °C for further experiments. These extracts were called digested extracts of black (DEB) and small red beans (DESR).

2.4. Quantification of phenolic compounds

2.4.1. Total phenolics

The TPs were determined by the reaction with Folin-Ciocalteu reagent (Roesler, Catharino, Malta, Eberlin, & Pastore, 2007). Extracts were dissolved in methanol to obtain the appropriate concentration. Then, 0.5 mL of each diluted extract was mixed with 2.5 mL of 10% Folin-Ciocalteu reagent and 2.0 mL of 7.5% Na₂CO₃ solution. After 5 min at 50°C, the absorbance was measured at 760 nm in a spectrophotometer (DU-640™, Beckman-Coulter - Brea, CA, USA). The quantification was carried out with a calibration curve of gallic acid (1.0-60.0 μ g/mL), and the results were expressed in mg gallic acid equivalent (GAE)/g of bean.

2.4.2. Total flavonoids

The determination of TFs was carried out according to Faller et al. (2012), using the sodium borohydride/chloranil-based (SBC) assay. Briefly, in test tubes, 1 ml of appropriately diluted samples solution (with tetrahydrofuran/ethanol, 1:1, v/v), were mixed with 1 mL of NaBH₄ solution (50 mM) and 0.5 mL of AlCl₃ solution (74.6 mM). The test tubes were shaken in an orbital shaker at room temperature for 30 min and an additional 0.5 mL of NaBH₄ solution was added into each test tube. After 30 minutes of shaking in the same conditions, 2.0 mL of cold acetic acid solution (0.8 M) was added into test tubes which were kept in the dark for 15 min. 1 ml of chloranil solution (20.0 mM) was added and the tubes were heated at 95°C with shaking for 60 min. The solutions were cooled with water, the final volume was adjusted to 4 ml with methanol and 1 mL of vanillin (1.052 mM) was added. Then 2 mL of HCl (12 M) was added and the solutions were kept in the dark for 15 min. The absorbance was measured at 490 nm in a microplate reader (NOVOstar®, BMG Labtech - Offenburg, Germany). The quantification was performed with a calibration curve of catechin (0.15-1.8 mg/mL), and TF content was expressed in milligrams of catechin equivalent (CE)/g of bean.

2.4.3. Condensed tannins

The CTs, were analyzed according to the method of Price, Van Scoyoc, and Butler (1978), with slight modifications. Briefly, 250 µL of vanillin reagent (1% vanillin, 4% HCl in methanol) was added to 50 µL of the suitably diluted sample. The absorbance was measured at 510 nm using a microplate reader against methanol as a blank. The quantification was performed with a calibration curve of catechin (0.02-1.2 mg/mL) and the CT content was expressed in as mg CE/g of bean.

2.4.4. Monomeric anthocyanins

The quantification of MAs was determined by the pH differential method (Giusti & Wrolstad, 2001). Extracts properly diluted in potassium chloride buffer (pH 1, 0.025 mol/L) and sodium acetate buffer (pH 4.5, 0.4 mol/L) were incubated for 30 min and then measured at both 520 and 700 nm in a spectrophotometer. MAs were expressed as milligrams of cyanidin 3-glucoside equivalents (CGE)/g of bean, considering the molecular weight of 449.2 g/mol and molar absorption coefficient (ϵ) of 26,900 L/mol cm. Although the literature reports that the major anthocyanin in BB is delphinidin-3-glucoside (Takeoka et al., 1997), the MA content is calculated as cyanidin-3-glucoside because of its historical use in similar assays and its wide commercial availability (Xu & Chang, 2009)

2.5. Antioxidant capacity

2.5.1. ABTS^{•+} scavenging capacity assay

The ABTS^{•+} scavenging capacity assay was determined as described by Leite et al. (2011). The ABTS^{•+} solution was produced by reacting aqueous ABTS solution (7 mM) with potassium persulfate (2.45 mM). Diluted ABTS^{•+} solution with an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm was employed in the analysis. The reactions were performed in microplates by adding 250 μ L of ABTS^{•+} solution to 50 μ L of each extract solution. After 6 min of incubation at room temperature, absorbance values were measured on a microplate reader. The results were calculated based on a calibration curve of Trolox (1-180 μ M/mL), and results were expressed as μ M Trolox equivalent (TE)/g of bean.

2.5.2. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay

The ORAC assay, based on the method described by Dávalos, Gómez-Cordovés, and Bartolomé (2004), was performed in a microplate reader. Samples and Trolox standards were prepared with 75 mM phosphate buffer (pH 7.4). The outside wells of a black-walled 96 well microplate were not used because of wide variation in results compared to those from the inner wells. In each well containing 20 μ L of extract or Trolox standard and 120 μ L of fluorescein (70 mM), 60 μ L of AAPH solution (12 mM) was added to start the reaction, resulting in a final total volume of 200 μ L. The decay of fluorescence was measured every minute for 80 min at 37°C, with excitation and emission wavelengths of 485 and 528 nm. A blank experiment (fluorescein + AAPH) with buffer instead of the sample or Trolox was also performed. The results were calculated using the relative area under the curve for samples compared to a Trolox standard curve (25-800 μ M) prepared under the same experimental conditions. ORAC values were expressed as μ M TE/g of bean.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using StatSoft, Inc. (2013). STATISTICA software, version 12.0. The results were subjected to ANOVA and differences between means were located using Tukey's multiple comparison test. Significance was determined at $p < 0.05$. All results are presented as means $\pm$ standard deviation for triplicates.

3. Results and Discussion

3.1. Phenolic profiles in crude and digested extracts

The evaluation of the *in vitro* digestion in TPs, TFs, and CTs are presented in Fig. 1.

CESR showed 1.23 ± 0.04 mg GAE/g of beans, levels significantly higher than those of TPs ($p < 0.05$) and the 0.85 ± 0.06 mg GAE/g found in CEB, confirming the trend toward increased phenols in bean varieties with light colors (Espinosa-Alonso, Lygin, Widholm, Valverde, & Paredes-Lopez, 2006). Compared with studies performed on whole ground beans, the results are close to those obtained by Espinosa-Alonso et al. (2006) and slightly lower than those found by Mujica, Granito, and Soto (2009) who carried out the extraction with methanol. Xu and Chang. (2008) found higher values using acetone for extraction. Therefore, the discrepancy in results may be attributed, at least in part, to the solvent used for extraction. Phenolic compounds present in BB were more affected by *in vitro* GI digestion, with a 75% reduction compared to the 52% in SRB. The decrease in TPs, which was significant for both extracts ($p < 0.05$), may be a consequence of the instability of these compounds when exposed to high pH (Friedman & Jürgens, 2000), as may occur in intestinal alkaline medium.

Unlike methods based only on the reaction with aluminum chloride, which may underestimate the flavonoid content of a sample, the quantification performed with the SBC assay permits the measurement of all subgroups of flavonoids, including flavones, flavonols, flavonones, flavononols, isoflavonoids, flavanols, and anthocyanins (Faller et al., 2012). The samples showed TFs of 1.59 ± 0.6 and 2.05 ± 0.01 mg CE/g in crude extracts and 1.25 ± 0.07 and 1.96 ± 0.1 mg CE/g in digested extracts of BB and SRB, respectively. These data show that SRB had a higher concentration of TFs than BB and also reveal that only in BB seed coats, simulated GI digestion caused a significant loss ($p < 0.05$) of these compounds. Xu

and Chang (2007), in a study with whole beans, found 0.85 and 0.98 mg CE/g for RB and BB, respectively. The lower levels of TFs obtained could be explained by differences in methodology used in the analyses.

The determination of CTs revealed that CEB had concentrations significantly higher than those of CESR ($p < 0.05$) with 76.3 ± 6.9 and 54.4 ± 4.1 mg CE/g for CEB and CESR, respectively. These levels were higher than those determined by Espinosa-Alonso et al. (2006) and Valdés, Coelho, Michelluti, and Tramonte (2011). However, in both studies, CTs were evaluated in bean flour and the levels of these polyphenols are greater when determined in tegument than in whole seed (Guzmán-Maldonado, Castellanos, & De Mejía, 1996).

Fernández and Labra, (2013), after evaluating the effect of simulated digestion in red grape skin and seed extracts, reported the degradation of tannins, which was attributed to the interaction between these compounds and pancreatic enzymes and to the intestinal pH. After digestion, the contents of CTs in both extracts showed a significant decrease ($p < 0.05$) with 6.4 ± 0.3 mg CE/g for BB and 5.3 ± 0.2 mg CE/g for SRB. Meanwhile, it was found that these values were not significantly different among themselves ($p > 0.05$).

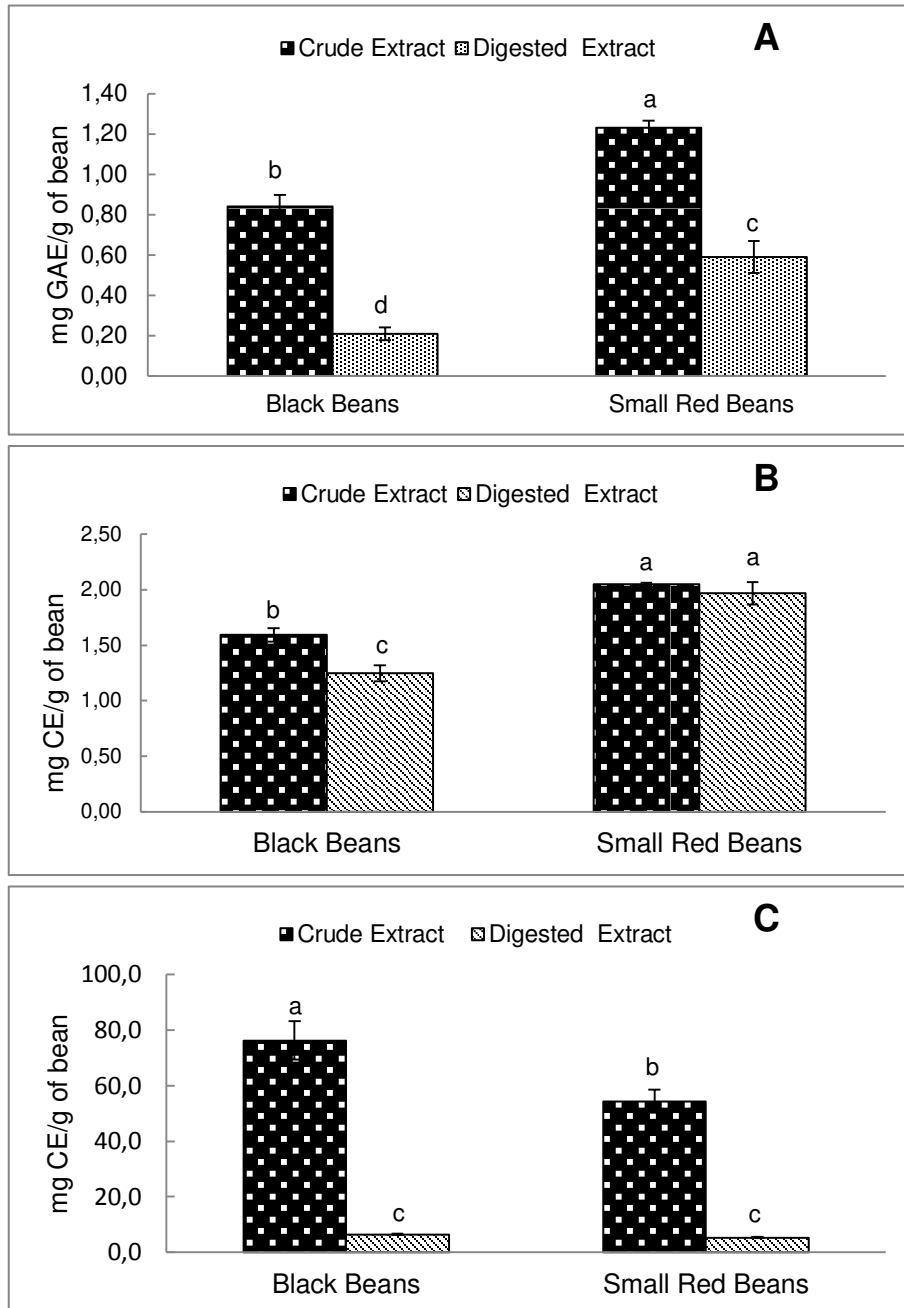


Fig. 1. Total phenols (A), total flavonoids (B) and condensed tannins (C) in bean seed coats. Values are means $\pm$ standard deviation of triplicate analysis. GAE - gallic acid equivalent. CE - catechin equivalent. Different letters indicate significantly different values ($p < 0.05$).

The levels of MAs were 0.83 ± 0.04 in CEB and 0.08 ± 0.01 mg CGE/g in CESR. ANTs could not be detected in digested extracts.

The results indicate significant differences in concentrations of ANTs between the two varieties of beans ($p < 0.05$), and BB showed ANT levels 10 times higher than SRB. Literature data show several results for the quantification of ANTs, including 0.25 to 0.45 mg/g (Akond et al., 2011), 0.01 to 1.85 mg CGE/g (Espinosa-Alonso et al., 2006), and 0.44 mg/g (Wu et al., 2006) for BB, with 0.32 to 0.42 mg/g (Akond et al., 2011) and 0.06 mg/g (Wu et al., 2006) for RB. Although some of these published results are similar to those found in the present study, others are quite different. However, in addition to methods employed for the extraction and quantification and geographic and agronomic factors, the varieties and genetic profiles may directly influence the ANT levels (Macz-Pop, Rivas-Gonzalo, Pérez-Alonso, & González-Paramás, 2006).

Compared to other phenolic compounds, ANTs showed higher losses during simulated digestion, because they are broadly sensitive to the alkaline conditions of the intestinal digestion, as well as the impact caused by digestive enzymes and bile salts (Bermúdez-Soto, Tomás-Barberán, & Garcia-Conesa, 2007; Bouayed, Hoffmann, & Bohn, 2011; McDougall, Fyffe, Dobson, & Stewart, 2005a). Significant decreases in concentrations of ANTs following *in vitro* GI digestion were reported in research with pomegranate juice (Pérez-Vicente, et al., 2002), chokeberry (Bermúdez-Soto et al., 2007) and grapes (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010). In research conducted with apples, Bouayed et al. (2011) did not detect ANTs after intestinal digestion.

According to Pérez-Vicente et al. (2002), it is important to consider that, after intestinal digestion in humans, the ANT flavylum form would not be the predominant one due to the slightly alkaline pH. Also, the possibility that part of the ANTs is metabolized to some other noncolored, oxidized forms or degraded into other chemicals should be considered.

In our simulated intestinal medium (pH 7.5-8.0), ANTs (consisting of four molecular forms in equilibrium: the colored flavylum cation and the secondary structures: quinoidal base, hemiacetal and chalcone pseudobases) would be predominantly present in the colorless chalcone molecular form. This would not allow their quantification by the method we employed (McDougall, Dobson, Smith, Blake, & Stewart, 2005b).

Therefore, despite the evidence of significant reductions in MAs after digestion, the fact that ANTs were not detected in digested extracts does not imply the complete loss of these compounds.

3.2. Antioxidant activity

Because the antioxidant activity of a compound can present distinct results with different radicals, it must be examined through more than one test. Our study determined the antioxidant activity by ABTS^{•+} scavenging capacity and ORAC assays on raw and digested BB and SRB seed coat extracts. These results are shown in Table 1.

CESR and DESR showed greater ability to reduce ABTS^{•+} than did CEB and DEB, but no significant differences ($p > 0.05$) were observed between the crude and digested extracts for each variety of bean.

It is interesting to note that, although the digestion produced a significant reduction ($p < 0.05$) in TPs, CTs and MAs of SRB and BB and in TFs of BB, the ABTS antiradical activity was maintained at the same levels in the crude and digested extracts. Akillioglu and Karakaya (2010), in a study of beans, cooked under different conditions, found increased ABTS radical-scavenging capacity after *in vitro* digestion. The divergence of the results could possibly be explained by differences in the varieties of beans employed in the studies, in addition to the fact that the authors conducted digestion on whole beans after cooking.

Table 1. Antioxidant activities of bioactive compounds in black and small red beans.

Extracts	ABTS radical scavenging activity (μM Trolox equivalents/g)	ORAC (μM Trolox equivalents/g)
CEB	17.4 ± 0.1^b	1241 ± 122^b
DEB	14.2 ± 1.4^b	1778 ± 59^a
CESR	21.9 ± 0.5^a	1079 ± 10^b
DESR	23.5 ± 1.1^a	1431 ± 122^{ab}

CEB - crude extract of black beans; DEB - digested extract of black beans; CESR - crude extract of small red beans; DESR - digested extract of small red beans.

Values are means $\pm$ standard deviation of triplicate analysis. Different letters in the same column indicate significantly different values ($p < 0.05$).

The main ANT degradation products are phenolic acids (Fleschhut, Kratzer, Rechkemmer, & Kulling, 2006), whose AAs were previously reported (Villaño, Fernández-Pachón, Troncoso, & García-Parrilla, 2005). During intestinal digestion, through oxidative reactions, ANTs can undergo polymerization and/or complexation with proteins and polysaccharides present in the intestinal medium. (Stevenson, Cooney, Jensen, Zhang, & Wibisono, 2007). Therefore, it can be hypothesized that the different products formed during the *in vitro* process were at least partly responsible for maintaining the sequestration capacity of the ABTS^{++} in BB, since the initial concentration of ANTs was important in this variety. Moreover, the products originated from the degradation of tannins may have contributed to the maintenance of the antioxidant activity.

With respect to the SRB, the higher antiradical activity ABTS compared with BB could be attributed to a higher concentration of non-anthocyanic phenolic compounds. Tagliazucchi et al. (2010) in a study of the AA of grape polyphenols,

found that non-anthocyanic polyphenols showed greater stability in the intestinal pH. The authors also suggested that the antiradical activity may be pH-dependent.

ORAC assay is more relevant from a biological standpoint for being performed in physiologic temperature and pH, reflecting more closely the antioxidant activity in biological systems (Prior, Wu, & Schaich, 2005). Crude extracts of both varieties of beans showed no significant differences ($p > 0.05$) in the AA through the ORAC assay. The values found with this method, 1241 ± 122 and 1079 ± 58 $\mu\text{mol TE/g}$ for CEB and CESR respectively, are higher than those reported by Xu and Chang (2008) for whole beans. However they are consistent with the results obtained for BB in a study of several varieties (Oomah et al., 2010), with seed coats' AA 6 to 8 times greater than that of the whole bean. These data confirm that seed coats, although a small portion of the bean (7.6% for BB and 9.2% for SRB), concentrate the bioactive compounds of beans.

Working with red wine, Noguer et al. (2008) reported a reduction in the polyphenol concentration and an increased AA by ORAC method after *in vitro* GI digestion. These results were associated with the increased concentrations of simple phenolic compounds such as phenolic acids.

The present data on bean seed coats showed that the digested extracts had higher AA, with increases of 43.2% for BB and 32.7% for the SRB. However, the increase in AA was significant only for BB ($p < 0.05$).

One possible explanation for our results would be the conversion of phenolic compounds (induced by GI digestion) into products with different chemical properties with, consequently, different biological activities (Bermúdez-Soto et al., 2007).

It is important to stress that although the digested extracts have demonstrated relevant scavenger capacity against ABTS and peroxy radicals, the

presence of other non-phenolic compounds, such as amino acids derived from the hydrolysis of proteins, may interfere with the AA (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006).

Because the GI tract is constantly exposed to reactive oxygen species, both from the diet and from the activation of phagocytes in the gut (Halliwell, Rafter, & Jenner. 2005), the bioactive compounds from beans' seed coats may exert direct protective effects by scavenging reactive oxygen species.

4. Conclusions

Our results indicate that the *in vitro* digestion process was responsible for a reduction of the TPs, CTs and ANTs in both the BB and SRB seed coats, and of TFs in the BB seed coats. However, the AA was maintained for both groups, and even significantly increased in the BB group when measured with an ORAC assay.

The *in vitro* digestion model employed in our study has several limitations when compared with the real biological conditions. However, the results are a step forward from the simple chemical extraction that has been used until now. Further work is required to determine which polyphenols remain and which are the degradation products formed after digestion, as well as to evaluate the AA of these compounds.

Acknowledgments

The authors thank the National Brazilian Research Foundation (CNPq) (140978/2010-0) for financial support.

References

- Akillioglu, H. G., & Karakaya, S. (2010). Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and in vitro digestion process. *Food Science and Biotechnology*, 19, 633-639.
- Akond, A. S. M. G. M., Khandaker, L., Berthold, J., Gates, L., Peters, K., Delong, H., et al. (2011). Anthocyanin, total polyphenols and antioxidant activity of common bean. *American Journal of Food Technology*, 6, 385-394.
- Anderson, J. W., Smith, B. M., & Washnock, C. S. (1999). Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 464s-474s.
- Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., & Garcia-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102, 865-874.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128, 14-21.
- Choung, M. G., Choi, B. R., An, Y. N., Chu, Y. H., & Cho, Y. S. (2003). Anthocyanin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7040-7043.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48-54.

- Espinosa-Alonso, L. G., Lygin, A., Widholm, J. M., Valverde, M. E., & Paredes-Lopez, O. (2006). Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4436-4444.
- Faller, A. L. K., Fialho, E., & Liu, R. H. (2012). Cellular antioxidant activity of Feijoad whole meal coupled with an *in vitro* digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4826-4832.
- Fernández, K., & Labra, J. (2013). Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chemistry*, 139, 196-202.
- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., & Kulling, S. E. (2006). Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. *European Journal of Nutrition*, 45, 7-18.
- Friedman, M., & Jürgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2101-2110.
- Giusti, M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (pp. F1.2.1 - F1.2.13).
- Guzmán-Maldonado, H., Castellanos, J., & De Mejía, E. G. (1996). Relationship between theoretical and experimentally detected tannin content of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 55, 333-335.
- Halliwell, B., Rafter, J., & Jenner, A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 268-276.

- Helmstädter, A. (2010). Beans and diabetes: *Phaseolus vulgaris* preparations as antihyperglycemic agents. *Journal of Medicinal Food*, 13, 251-254.
- Jordheim, M., Fossen, T., & Andersen, Ø. M. (2006). Preparative isolation and NMR characterization of carboxypyrananthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3572-3577.
- Leite, A. V., Malta, L. G., Riccio, M. F., Eberlin, M. N., Pastore, G. M., & Maróstica Júnior, M. R. (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2277-2283.
- Lin, L. Z., Harnly, J. M., Pastor-Corrales, M. S., & Luthria, D. L. (2008). The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 107, 399-410.
- Macz-Pop, G. A., Rivas-Gonzalo, J. C., Pérez-Alonso, J. J., & González-Paramás, A. M. (2006). Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 94, 448-456.
- Marles, M. S., Balasubramanian, P., & Bett, K. E. (2010). Differential accumulation of polyphenolics in black bean genotypes grown in four environments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7001-7006.
- McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005b). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5896-5904.
- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2005). Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66, 2540-2548.

- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2014). <http://www.agricultura.gov.br> (accessed in July).
- Mujica, M. V., Granito, M., & Soto, N. (2009). Importance of the extraction method in the quantification of total phenolic compounds in *Phaseolus vulgaris* L. *Interciencia*, 34, 650-654.
- Noguer, M., Cerezo, A. B., Rentzsch, M., Winterhalter, P., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2008). Simulated digestion and antioxidant activity of red wine fractions separated by high speed countercurrent chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8879-8884.
- Oomah, B. D., Corbé, A., & Balasubramanian, P. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8225-8230.
- Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39, 791-800.
- Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., & García-Viguera, C. (2002). *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2308-2312.
- Price, M. L., Van Scoyoc, S., & Butler, L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 1214-1218.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.

- Roesler, R., Catharino, R. R., Malta, L. G., Eberlin, M. N., & Pastore, G. (2007). Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 104, 1048-1054.
- Stevenson, D. E., Cooney, J. M., Jensen, D. J., Zhang, J., & Wibisono, R. (2007). Comparison of the relative recovery of polyphenolics in two fruit extracts from a model of degradation during digestion and metabolism. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 939-945
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120, 599-606.
- Takeoka, G. R., Dao, L. T., Full, G. H., Wong, R. Y., Harden, L. A., Edwards, R. H., et al. (1997). Characterization of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3395-3400.
- Tsuda, T., Osawa, T., Ohshima, K., & Kawakishi, S. (1994). Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 248-251.
- Valdés, S. T., Coelho, C. M. M., Michelluti, D. J., & Tramonte, V. L. C. G. (2011). Association of genotype and preparation methods on the antioxidant activity, and antinutrients in common beans (*Phaseolus vulgaris*). *LWT - Food Science and Technology*, 44, 2104-2111.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2005). Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites *in vitro*. *Analytica Chimica Acta*, 538, 391-398.

- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4069-4075.
- Wu, X., Xu, X., Shen, J., Perricone, N. V., & Preuss, H. G. (2010). Enhanced weight loss from a dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract in overweight men and women. *The Journal of Applied Research*, 10, 73-79.
- Xu, B. J., & Chang, S. K. C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72, 159-166.
- Xu, B. J., & Chang, S. K. C. (2008). Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. *Journal of Food Science*, 73, 19-27.
- Xu, B., & Chang, S. K. (2009). Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 4754-4764.
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M., & Ren, J. (2010). Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 120, 810-816.

CAPÍTULO III

EFEITO DA DIGESTÃO *IN VITRO* NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO RICO EM ANTOCIANINAS DE CASCA DE FEIJÃO PRETO

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista
Journal of Food Science

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo caracterizar as antocianinas (ANTs) de um extrato semipurificado de feijão preto e avaliar o efeito produzido pela digestão *in vitro* na atividade antioxidante, nos fenóis totais e nas ANTs monoméricas deste extrato. A identificação e quantificação das ANTs foram realizadas por CLAE-EM/EM, o que possibilitou a identificação de: delphinidina 3-glicosídeo, petunidina 3-glicosídeo e malvidina 3-glicosídeo. A digestão simulada provocou redução de 45% na concentração de fenóis totais e 90% das ANTs. A atividade antioxidante, analisada pelos ensaios TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) e ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), também foi reduzida após a digestão, com 28 e 35% de redução, respectivamente. As reduções observadas na capacidade antioxidante foram provavelmente decorrentes da degradação das ANTs durante o processo de digestão intestinal.

Palavras chave: *Phaseolus vulgaris*, Digestão *in vitro*, Antocianinas, ORAC, TEAC, CLAE-EM/EM.

1. Introdução

Os feijões comuns (*Phaseolus vulgaris*) são amplamente consumidos e cultivados em diferentes regiões do planeta. O Brasil é o maior produtor mundial deste grão com uma produção anual em torno de 3,5 milhões de toneladas (MAPA 2014).

Representando uma fonte importante de compostos bioativos, concentrados principalmente em sua casca, os feijões de diferentes variedades apresentam composições características de polifenóis. Em meio a estes compostos, foram identificados ácidos hidroxi-cinâmicos e flavonoides como flavonóis e antocianinas (Lin et al. 2008; Oomah et al. 2010). Dentre os compostos presentes no feijão preto, destacam-se as antocianinas (ANTs) (Jordheim et al. 2006; Xu e Chang 2009).

Constituindo um importante grupo de flavonoides, as ANTs estão presentes principalmente em angiospermas. Estes pigmentos hidrossolúveis são responsáveis pelas cores que variam do rosa ao vermelho e do violeta ao azul escuro da maioria das frutas, vegetais, grãos e flores (Andersen e Jordheim 2013).

Uma característica importante das ANTs é que são formadas por uma aglicona (antocianidina) unida a uma ou mais moléculas de açúcar e eventualmente a um ácido. A unidade estrutural da aglicona é o cátion flavilium, ao qual se encontram ligados os grupamentos hidroxila e/ou metoxila. Nos alimentos as principais antocianidinas encontradas são: cianidina, peonidina, delphinidina, pelargonidina, malvidina e petunidina (Andersen e Jordheim 2013). Embora a cianidina seja a aglicona predominante na maioria dos alimentos, a delphinidina é reportada como a principal aglicona do feijão preto (Takeoka et al. 1997; Jordheim et al. 2006). Adicionalmente, apenas ANTs simples, ou seja, sem ácidos conjugados na molécula, já foram identificadas nos feijões (Takeoka et al. 1997; Wu e Prior 2005; Andersen e Jordheim 2013).

O consumo de ANT, provenientes dos mais diversos alimentos, tem sido associado à redução do risco de uma série de doenças, tais como: alguns tipos de câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica e outros tipos de doenças crônico-degenerativas. Muitos desses efeitos positivos estão relacionados com a atividade antioxidante atribuída às ANT (He e Giusti 2010).

Estes compostos apresentam atividade antioxidante elevada, devido ao poder de neutralização que possuem em relação aos radicais livres, com a consequente interrupção das reações em cadeia que determinam o dano oxidativo (He e Giusti 2010). Estudos realizados com ANT extraídas de diferentes alimentos demonstraram a sua capacidade de inativar os radicais DPPH, ABTS e peroxila (Awika et al. 2005; Duymuş et al. 2014). Entretanto, as análises *in vitro* parecem demonstrar maior bioatividade das ANT do que as análises *in vivo* (Liu et al. 2013). Este fato pode ser decorrente da degradação das ANT durante a digestão. A instabilidade destes compostos nas condições de pH do intestino delgado e na presença de enzimas digestivas e sais biliares foi demonstrada previamente (Bouayed et al. 2011).

A digestão *in vitro* tem se mostrado como uma alternativa para a avaliação das transformações sofridas por diferentes compostos durante a digestão gastrointestinal. Entretanto, este método apresenta algumas limitações, como a ausência da microbiota intestinal e dos controles hormonal e neural, responsáveis pela regulação dos principais processos digestivos como, o esvaziamento gástrico, o trânsito intestinal e a secreção dos fluidos digestivos (Guerra et al. 2012). Ainda assim, por ser um método simples, rápido e não apresentar as restrições éticas encontradas nos ensaios *in vivo*, tem sido utilizado em inúmeros trabalhos de determinação de polifenóis, ANT e atividade antioxidante (McDougal et al. 2005; Liang et al., 2012; Correa-Betanzo et al. 2014).

Estudos recentes avaliaram a atividade antioxidante de extratos obtidos a partir de grãos inteiros e da casca de feijões (Xu e Chang 2009; Oomah et al.

2010; Akond et al. 2011). Porém, trabalhos que avaliem o efeito da digestão nas ANT's e na atividade antioxidante de feijão são escassos.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da digestão *in vitro* nas ANT's monoméricas e os fenóis totais, bem como na atividade antioxidante de um extrato rico em ANT's obtido da casca de feijão preto, por meio da simulação das condições químicas e enzimáticas da digestão gastrointestinal. Além disso, as ANT's do feijão preto foram identificadas e quantificadas, através de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM).

2. Material e métodos

2.1. Material

Os feijões pretos, provenientes do estado de Minas Gerais, Brasil, foram adquiridos no comércio local de Campinas, em setembro de 2012 e estocados a -18°C até o preparo do extrato.

Os padrões de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) e ácido gálico foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Os padrões de delphinidina 3-glicosídeo (dfn 3-glc) e cianidina 3-glicosídeo (cnd 3-glc) foram adquiridos da Extrasynthèse (Genay, França).

Os reagentes [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] (ABTS), 2,2'-azobis (amidinopropano) dihidroclorato (AAPH), fluoresceína sódica, hidróxido de tolueno butilato (BHT), extrato de bile porcina, pepsina mucosa gástrica porcina e pancreatina de pâncreas porcino foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA).

O metanol grau cromatográfico (CLAE) foi obtido de J. T. Baker (Mexico City, D.F., Mexico). A água foi purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). Os solventes, ácidos e demais reagentes utilizados nas diferentes análises foram de grau analítico da Labsynth (Diadema, Brasil).

2.2. Extração e purificação das antocianinas

A extração das ANTs foi realizada segundo o método descrito por Jordheim et al. (2006), com ligeiras modificações. Inicialmente, 4 kg de grãos de feijão foram embebidos em 4,8 L de água destilada (0,5% HCl), durante 16 h a 4°C. Esta etapa foi realizada com o objetivo de melhorar o rendimento, visto que a extração realizada diretamente com metanol produz uma concentração de ANTs muito baixa. Em seguida, os feijões foram extraídos duas vezes com 4,8 L de metanol (0,5% HCl) por 24 h a 4°C. Após centrifugação, filtração a vácuo e concentração sob pressão reduzida ($T < 38^{\circ}\text{C}$), os extratos foram recombinaados e tiveram o volume ajustado com água para 600 mL. Posteriormente, o extrato sofreu partição líquido-líquido com acetato de etila (3 x 600 mL) para remoção de flavonoides menos polares e outros compostos não polares. A camada aquosa foi concentrada para 300 mL e submetida a coluna Amberlit XAD 7 (Sigma), que foi lavada com água para remoção de açúcares livres e ácidos alifáticos. As ANTs foram então eluídas com metanol (0,5% HCl) e o eluato foi concentrado à vácuo para eliminação do solvente, liofilizado e armazenado a -80°C até o momento das análises. Este extrato foi denominado extrato rico em ANTs (ERA).

2.3. Análises das antocianinas por cromatografia líquida e espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)

Condições da CLAE-EM/EM

As análises das ANTs presentes no ERA foram executadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu 8040 (Kyoto, Japão) do tipo triplo quadrupolo equipado, com fonte de ionização electrospray (ESI).

A separação cromatográfica foi realizada em coluna Nova-Pak® C₁₈ (4 µm, 3.9 mm i.d., 150 mm) (Waters, Milford, MA, EUA) usando fase móvel binária. O solvente A foi água e o solvente B foi metanol, ambos com 5% de ácido fórmico. O gradiente de eluição a 35 °C foi o seguinte: 0 min, 10% B; 0-15 min, 10-40% (v:v) B; 15-16 min, 40-100% (v:v) B; 16-17 min, 100% (v:v) B; 17-18 min, 100-10% B; 18-20 min, 10% (v:v) B, a um fluxo de 0,9 mL/min. A temperatura do amostrador automático foi mantida a 15°C e o volume de injeção foi de 10 µL. Os parâmetros da fonte de ionização foram voltagem capilar de 4,5 kV; temperatura de 300 °C; temperatura da linha de dessolvatação de 230 °C; fluxo do gás de secagem (N₂) a 15 L/min; fluxo do gás nebulizador (N₂) a 3 L/min; pressão de gás (Ar) para dissociação induzida por colisão de 228 kPa.

A seleção das ANTs foi realizada previamente, de acordo com análise de varredura completa do extrato de casca de feijão. Os experimentos de EM/EM foram feitos no modo positivo e então, um método de CLAE-EM/EM utilizando monitoramento de múltiplas reações (MRM) para garantir maior sensibilidade e especificidade foi desenvolvido e aplicado à amostra real. Cnd 3-glc foi empregada como padrão interno (PI) por não estar presente na amostra (Wu e Prior 2005) e dfn 3-glc foi usada para a construção da curva analítica para determinação de todas as ANTs. A Tabela 1 apresenta os parâmetros de DP (Potencial de Orifício), CE (Energia de Colisão) e CXP (Potencial de Saída da Cella de Colisão),

otimizados para a análise de transição MRM de cada analito e do PI. Os dados foram adquiridos pelo software Labsolution (versão 5.53 SP2, Shimadzu).

Tabela 1. Parâmetros de espectrometria de massas para as transições MRM.

Composto	Transições (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE(V)	CXP (V)
Delfinidina 3-glucosídeo	465>303	-16	-21	-23
Petunidina 3-glucosídeo	479>317	-17	-23	-23
Malvidina 3-glucosídeo	493>331	-17	-22	-24
Cianidina 3-glucosídeo	449>287	-21	-28	-15

DP: potencial de orifício, CE: energia de colisão, CXP: potencial de saída da cela de colisão.

Preparo dos padrões e curva de calibração

Soluções estoque dos padrões de ANTs (1mg/mL) foram preparadas em metanol:água (1:1, v:v) e estocadas a 4°C. Posteriormente, uma solução intermediária de cada padrão (10 µg/mL) foi preparada em metanol:água (1:1, v:v). Diluições desta solução foram feitas a 7 diferentes níveis para as curvas analíticas de dfn 3-glc, que foram produzidas com as concentrações de 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 e 1500 ng/mL. Para prevenir a degradação dos compostos, todas as soluções foram mantidas ao abrigo da luz.

Os resultados foram expressos como µg de equivalentes de dfn 3-glc/mg de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4. Digestão gastrointestinal *in vitro*

O diagrama de fluxo do processo de digestão está apresentado na Figura 1. A digestão gastrointestinal *in vitro* foi realizada de acordo com o método descrito por Faller et al. (2012), com ligeiras modificações. Brevemente, 200 mg de extrato liofilizado foi misturado com 4,5 mL solução salina (NaCl 140 mM, KCl 5 mM e BHT 150 μ M) e agitada por 10 min a 21 °C. A mistura foi acidificada com HCl 0,1 M/1 M até atingir o pH 2. Foram adicionados 125 μ L de solução de pepsina (200 mg de pepsina em 5 mL de HCl 0,1 M) e a mistura foi colocada em um agitador a 37°C por 1 h para realização da digestão gástrica. Após esta etapa, o pH da solução foi ajustado para 6,9 pela adição de NaHCO₃ 0,1 M/1 M e foram adicionados 625 μ L de solução de bile-pancreatina (225 mg de extrato de bile e 37 mg de pancreatina em 19 mL de NaHCO₃ 0,1 M). A digestão intestinal foi conduzida em agitador a 37°C por 2 h. Antes de cada etapa de digestão gástrica e intestinal, os extratos foram submetidos à atmosfera saturada por nitrogênio para prevenir a degradação das ANT's pela oxidação. O volume final foi ajustado para 11 mL com solução salina, aliqotado e estocado a -80 °C para posteriores experimentos. Este extrato foi chamado de extrato rico em ANT's digerido (ERAD).

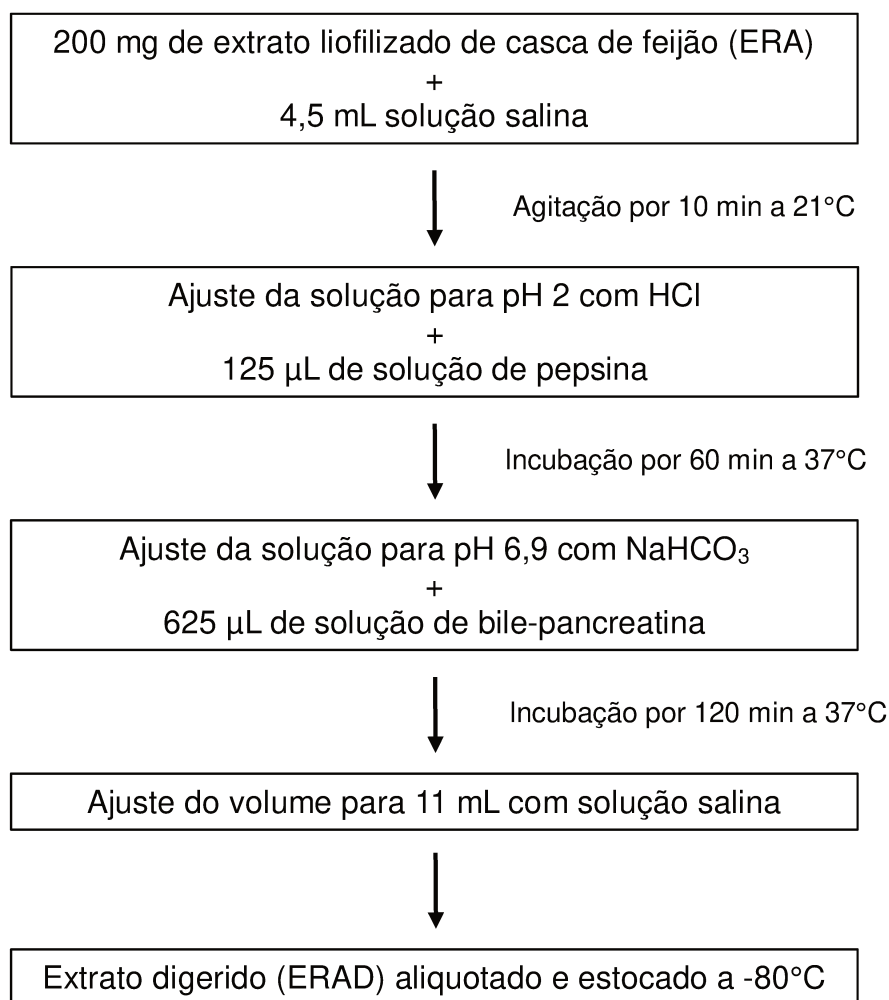


Figura 1. Diagrama de fluxo da digestão gastrointestinal *in vitro*.

2.5. Determinação dos fenois totais

O método Folin-Ciocalteu foi utilizado para a análise dos fenóis totais em ERA e ERAD (Roesler et al. 2007). Os extratos foram diluídos em metanol para obtenção de concentrações de 0,5 mg/mL. Em seguida, 0,5 mL de extrato ou padrão de ácido gálico foram misturados com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 10% e 2,0 mL de solução de Na₂CO₃ 7,5%. Após permanecer 5 min

em banho a 50°C, as absorbâncias foram lidas a 760 nm em espectrofotômetro (DU-640™, Beckman-Coulter - Brea, CA, USA). A quantificação foi realizada por meio de curva de calibração do ácido gálico (1,0 – 60,0 µg/mL) e os resultados foram expresso em µg de equivalente de ácido gálico (EAG)/mg de extrato.

2.6. Determinação das antocianinas monoméricas

A determinação das ANTs monoméricas foi realizada em ambos os extratos pelo método do pH diferencial, de acordo com a metodologia proposta por Giusti e Wrolstad (2001). Inicialmente, foi determinado o fator de diluição adequado, através da diluição da amostra em tampão cloreto de potássio (pH 1,0; 0,025 M) de forma a se obter absorbância próxima de 0,8, a 520 nm. Em seguida, foram preparadas duas diluições de cada extrato, uma em tampão cloreto de potássio e outra em tampão acetato de sódio (pH 4,5; 0,4 M). Após incubação de 30 min ao abrigo da luz, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 520 e 700 nm. As ANTs monoméricas foram expressas em µg de equivalente cnd 3-glc/mg de extrato, considerando o peso molecular de 449,2 g/mol e coeficiente de absorção molar (ϵ) de 26,900 L/mol.cm (Jurd e Asen, 1966) empregando a Equação 1:

$$AM (mg/L) = \frac{[(A_{520} - A_{700})_{pH1} - (A_{520} - A_{700})_{pH4,5}] \times PM \times FD \times 10^3}{\epsilon \times 1} \quad (\text{eq. 1})$$

onde A_{520} e A_{700} correspondem às absorbâncias a 520 e 700 nm, respectivamente; FD ao fator de diluição e 1 ao caminho ótico em cm.

Embora a principal ANT do feijão preto seja a dfn 3-glc, o teor das ANTs monoméricas foi calculado em equivalentes de cnd 3-glc, devido à ausência de informações na literatura sobre o coeficiente de absorção molar da dfn 3-glc em tampão.

2.7. Determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

O ensaio TEAC, que avalia a capacidade de um composto neutralizar o radical estável ABTS em comparação com a atividade antioxidante do Trolox, foi realizado de acordo com o método descrito por Leite et al. (2012). A produção de $ABTS^{•+}$ ocorreu pela mistura de 5 mL de solução aquosa de ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] 7 mM com 88 μ L de persulfato de potássio 140 mM. O radical foi diluído em água de modo a se obter absorvância de $0,7000 \pm 0,02$ a 734nm. Os extratos, também diluídos em água, foram analisados na concentração de 0,02 mg/mL. A reação ocorreu pela adição de 250 μ L de solução de $ABTS^{•+}$ a 50 μ L de extrato ou padrão, por 6 minutos, seguida de leitura de absorvância a 734 nm em leitor de microplacas (NOVOstar®, BMG Labtech - Offenburg, Alemanha). Os resultados foram calculados com base em curva de calibração de Trolox (10 – 170 μ M) (% de inibição x concentração de Trolox) e expressos em μ M de equivalentes Trolox/mg de extrato.

2.8. Determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

O ensaio ORAC foi baseado na metodologia descrita por Leite et al. (2011). Foram empregadas microplacas pretas com 96 poços. Devido à grande variação de resultados decorrente do uso dos poços externos da microplaca, os mesmos não foram utilizados durante o experimento. As soluções envolvidas na reação foram preparadas com tampão fosfato 75 mM (pH 7,4). Os extratos, diluídos em água, foram analisados na concentração de 0,075 mg/mL. Nos poços contendo 20 μ L dos extratos ou diferentes concentrações de padrão de Trolox foram adicionados 120 μ L de solução de fluoresceína (70 μ M) e em seguida 60 μ L de solução de AAPH (12 mM) para dar início à reação. O decaimento da fluorescência foi registrado em leitor de microplacas, a cada 1 min durante 80 min, a 37°C com emissão à 520 nm e excitação à 485 nm. Um branco da reação

(fluoresceína + AAPH) com tampão no lugar do antioxidante foi realizado. Os resultados, expressos em μmol de equivalentes de Trolox/mg de extrato, foram calculados usando a área relativa sob a curva das amostras comparada com a curva do padrão de Trolox (25 - 700 μM). A área sob a curva foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$\text{AUC} = 1 + f_1/f_0 + \dots f_i/f_0 + \dots f_{80}/f_0 \quad (\text{eq. 2})$$

onde f_0 e f_i são representados pelas fluorescências obtidas nos tempos 0 e intermediários entre 0 e 80 minutos, respectivamente.

2.9. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados através teste t para amostras pareadas, pelo software STATISTICA (StatSoft Inc., 2013, versão 12.0). A significância foi determinada a $p < 0,05$. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão das triplicatas analisadas.

3. Resultados e discussão

3.1. Identificação e análise quantitativa das antocianinas

As análises qualitativas e quantitativas das ANT's do ERA foram realizadas, através de CLAE-EM/EM. O modo positivo foi escolhido para a condução dos experimentos uma vez que as ANT's são carregadas positivamente. Inicialmente foi realizada a seleção das ANT's do extrato através de análise de varredura completa. Em seguida, análises de EM/EM foram realizadas no extrato e também no padrão dfn 3-glc para conhecimento das características dos íons produto e perdas neutras. Foram detectados os íons de massa m/z 303, m/z 317 e m/z 331, correspondentes à perda da molécula de açúcar. Portanto, as transições

465→303, 479→317 e 493→331 foram escolhidas para as análises quantitativas por MRM. Por fim, as ANTs foram separadas por CLAE-EM/EM.

Como pode ser observado na Figura 2 e na Tabela 2, foram detectadas 3 diferentes ANTs no ERA. Nas diferentes análises realizadas por EM/EM, foram enfatizadas as avaliações dos íons produto provenientes da fragmentação de um íon precursor selecionado. Além disso, os tempos de retenção, a massa do açúcar ligado à aglicona e os dados descritos na literatura foram empregadas para a identificação das ANTs.

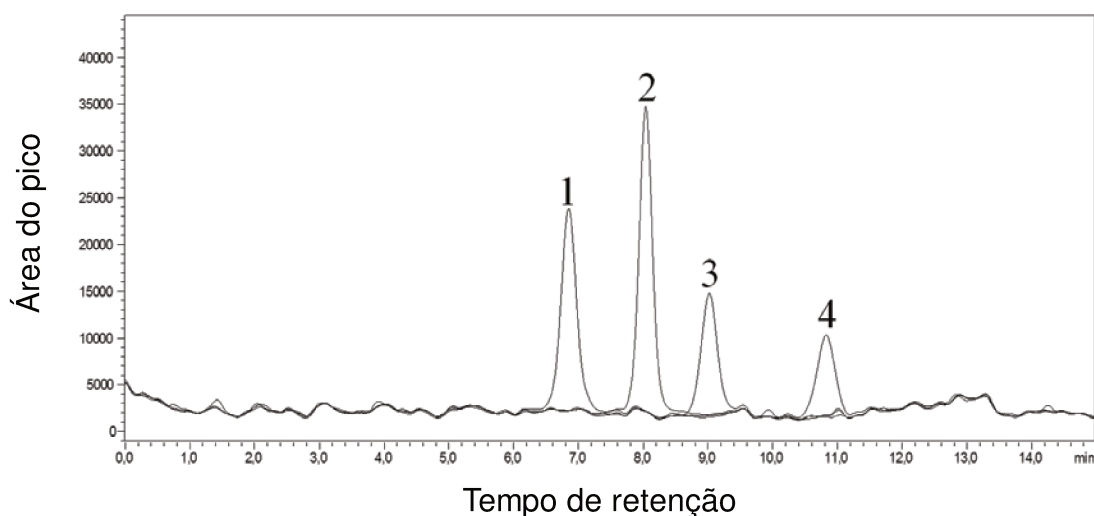


Figura 2. Cromatograma do extrato rico em ANTs da casca de feijão preto. (1) Delfinidina 3-glucosídeo, (2) cianidina 3-glucosídeo (padrão interno), (3) petunidina 3-glucosídeo, (4) malvidina 3-glucosídeo.

O pico cromatográfico 1, observado na Figura 2, apresentou o íon molecular $[M]^+$ em m/z 465. A perda de uma hexose $[M-162]^+$ levou à formação do fragmento referente à aglicona m/z 303, correspondente à delfinidina. Consequentemente, a

ANT foi identificada como dfn 3-glc (Figura 3). Comparações dos dados do espectro de massa deste pico com o padrão dfn 3-glc confirmaram esta identificação.

O perfil do espectro de massas do pico 3 (Figura 2) revelou o íon molecular $[M]^+$ em m/z 479 e o fragmento EM/EM em m/z 317, correspondente à aglicona petunidina e resultante da perda de uma hexose $[M-162]^+$. Desta maneira, pode-se sugerir que o composto seja a petunidina 3-glicosídeo (ptn 3-glc) (Figura 3), visto que outros autores demonstraram a presença desta ANT em feijão preto (Yoshida et al. 1996; Takeoka et al. 1997; Wu e Prior 2005).

Finalmente, a análise do pico 4 (Figura 2) mostrou o íon molecular $[M]^+$ em m/z 493 e o fragmento MS/MS, proveniente da perda de uma hexose $[M-162]^+$, em m/z 331, indicativo da aglicona malvidina. Com base nestas evidências e em dados da literatura, sugere-se que seja a malvidina 3-glicosídeo (mvd 3-glc) (Yoshida et al. 1996; Takeoka et al. 1997; Wu e Prior 2005).

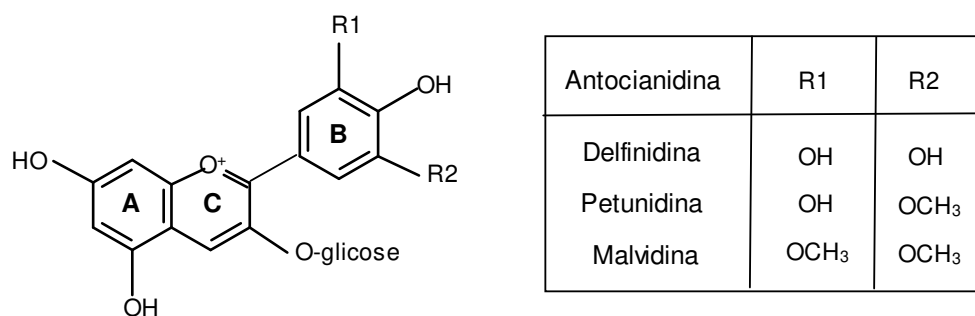


Figura 3. Estruturas das antocianinas encontradas no extrato rico em ANT's da casca de feijão preto.

Embora monoglicosídeos de delphinidina, petunidina e malvidina tenham sido identificados em feijões pretos (Takeoka et al. 1997; Aparício-Fernandez et al. 2005; Wu e Prior 2005; Jordheim et al. 2006), alguns autores descrevem a presença das mesmas agliconas na forma livre ou ainda diglicosiladas em feijões com esta mesma cor de casca (Yoshida 1997; Romani et al. 2004; Aparício-Fernandez et al. 2005; Wu e Prior 2005). Diferenças na origem, no cultivar e no grau de maturação, além do método empregado na extração, poderiam explicar estas discrepâncias (Macz-Pop et al. 2006).

A quantificação das ANT's foi baseada na curva padrão de dfn 3-glc obtida pela análise CLAE-EM/EM (MRM) utilizando a cnd 3-glc como padrão interno. A curva teve a seguinte equação para a dfn 3-glc: $y = 1,6181x - 0,0404$; $R^2 = 0,9955$. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Identificação e quantificação das antocianinas do extrato da casca do feijão preto.

Pico*	[M] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)	Composto	µg de equivalente de dfn 3-glc/mg de extrato
1	465	303 [M-162] ⁺	delfinidina 3-glicosídeo	48,1±4,9
3	479	317 [M-162] ⁺	petunidina 3-glicosídeo	35,0±3,3
4	493	331 [M-162] ⁺	malvidina 3-glicosídeo	26,6±1,3

*Numerado de acordo com o cromatograma.

Dfn 3-glc: delfinidina 3-glicosídeo.

As análises quantitativas revelaram que a dfn 3-glc foi a ANT majoritária do extrato, representando 44% do total das ANT's, seguida de ptn 3-glc e mvd 3-glc com 32% e 24%, respectivamente. Wu et al. (2006) indicaram relações percentuais de ANT's muito próximas às encontradas em nosso trabalho, com

41,5% (dfn 3-glc), 34,5% (ptn 3-glc), 24% (mvd 3-glc). Por outro lado, Takeoka et al. (1997) reportaram 56%, 26% e 18% para dfn 3-glc, ptn 3-glc e mvd 3-glc, respectivamente. É interessante observar que, mesmo com proporções variadas, foi mantido o mesmo perfil quantitativo das ANT's. De acordo com Choung et al. (2003), grãos da mesma espécie, mesmo que sejam produzidos em diferentes regiões ou países contém as mesmas ANT's, variando apenas os seus teores.

3.2. Perfil dos compostos fenólicos nos extratos purificado e digerido

O impacto da digestão gastrointestinal *in vitro* nos fenóis totais e nas antocianinas monoméricas pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Teores de fenóis totais e antocianinas monoméricas em ERA e ERAD.

Extrato	Fenóis totais ^a	Antocianinas Monoméricas ^b
ERA	77,4±2,2	132,6±3,5
ERAD	42,3±0,8	13,2±0,3

ERA - extrato rico em antocianinas; ERAD - extrato rico em antocianinas digerido. Valores expressos como média ± desvio padrão de análises em triplicatas.

^aµg equivalente ác.gálico/mg extrato; ^bµg equivalente cianidina 3-glicosídeo/mg extrato.

Os fenóis totais presentes no ERA apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) após o processo de digestão, com 45% de redução em seus teores. Trabalhos prévios realizados com grãos, sucos de frutas e *berries* demonstram que a digestão *in vitro* pode afetar os compostos fenólicos, reduzindo suas concentrações. Este decréscimo seria decorrente de alterações estruturais, degradação ou interação com outros compostos, como por exemplo, enzimas (Bermúdez-Soto et al. 2007; Tarko et al. 2009; Nderitu et al. 2013; Correa-Betanzo

et al. 2014; Huang et al. 2014). Por outro lado, a digestão *in vitro* não provocou alterações nos teores de fenóis totais em trabalho realizado com feijoada (Faller et al. 2012). Resultados semelhantes foram reportados por Akillioglu e Karakaya (2010) ao avaliar as alterações provocadas pela digestão na composição dos fenólicos em feijões.

Por sua vez, as ANT_s monoméricas tiveram as suas concentrações diminuídas em 90% após a digestão, o que seria um indicativo da instabilidade das ANT_s frente à digestão intestinal. Resultados semelhantes foram reportados em trabalhos realizados com ANT_s provenientes de diferentes alimentos como uvas, romãs e *berries*, (Pérez-Vicente et al 2002; McDougall et al. 2005; Bermúdez-Soto et al. 2007; Tagliazucchi et al. 2010; Liang et al. 2012).

As ANT_s, que ocorrem sob quatro estruturas moleculares em equilíbrio dependente de pH, têm a sua estabilidade reduzida rapidamente em pH > 4,5, quando o cátion flavilium (vermelho, pH 1-2) é convertido nas formas menos estáveis: pseudobase (incolor, pH 4-5), base quinoidal (roxa, pH 6-7) e chalcona (incolor a amarela, pH 7-8) (Nielsen et al. 2003). Nesta última forma, pode ocorrer fissão entre os anéis B e C (Fig. 2) resultando em destruição do sistema cromóforo (McDougall et al. 2005). De acordo com Bouayed et al. (2011), o meio levemente alcalino encontrado nas condições de digestão intestinal e a ação dos sais biliares e da pancreatina podem provocar a degradação das ANT_s. Isto poderia ser uma das principais razões para o importante decréscimo observado nas ANT_s do presente estudo.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é o fato da estabilidade das ANT_s estar diretamente relacionada com a sua estrutura química. As ANT_s aciladas são mais estáveis que as não aciladas, as formas antocianicas diglicosiladas apresentam maior estabilidade que as monoglicosiladas e agliconas com maior número de metoxilas são mais estáveis que aquelas com maior número de hidroxilas (Mc Dougall et al. 2005; Correa-

Betanzo et al. 2014). Estudos prévios reportaram redução nas concentrações de ANTs após digestão *in vitro*, com perdas mais pronunciadas de dfn 3-glc (Pérez-Vicente e al. 2002; Liu et al. 2013; Correa-Betanzo et al. 2014). Portanto, as perdas verificadas em nosso estudo poderiam estar associadas à estrutura das ANTs, visto que no ERA foram detectadas ANTs monoglicosiladas e não aciladas, além da ANT majoritária ser dfn 3-glc, cuja aglicona não apresenta metoxilas em sua estrutura.

Além disso, uma parte das ANTs pode ter sido convertida em outros compostos, tais como ácidos fenólicos, como descrito por Keppler e Humpf (2005). Esses compostos seriam formados provavelmente pela cisão do anel B de agliconas.

3.3. Atividade antioxidante

As alterações provocadas pela digestão *in vitro* na atividade antioxidante do ERA foram avaliadas através dos métodos TEAC e ORAC, apresentados nas Figuras 4 e 5, respectivamente. As tendências em ambas análises antioxidantes foram similares às observadas nos ensaios de fenóis totais e antocianinas monoméricas, com decréscimo significativo ($p < 0,05$) da atividade após a digestão simulada.

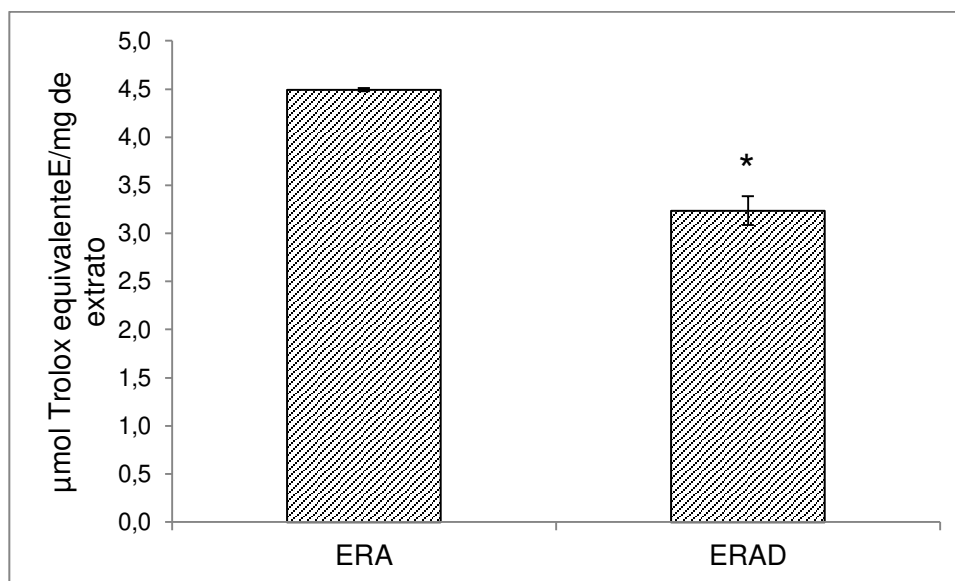


Figura 4. Efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* na atividade antioxidante dos extratos avaliada pelo método TEAC.

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão de análises em triplicatas.

* indica valor significativamente diferente ($p > 0,05$) do extrato não digerido.

ERA: extrato rico em antocianinas; ERAD extrato rico em antocianinas digerido.

A capacidade de neutralização do ABTS^{++} foi reduzida em 28% após a digestão intestinal, com $4,50 \pm 0,02$ e $3,24 \pm 0,15$ $\mu\text{mol TE/mg}$ para o ERA e ERAD, respectivamente. Estes dados diferem dos reportados por Akillioglu e Karakaya (2010), que observaram aumento da inibição do ABTS^{++} após a digestão. Entretanto, este estudo foi realizado com feijões inteiros e a presença de ANTs não é descrita nas variedades estudadas.

Ao final do processo de digestão intestinal, a atividade antioxidante do ERA, avaliada pelo ensaio ORAC, apresentou diminuição de 35%. Os valores encontrados foram de $4,61 \pm 0,37$ $\mu\text{mol TE/mg}$ de extrato para ERA e $2,99 \pm 0,06$ $\mu\text{mol TE/mg}$ de extrato para ERAD. É interessante ressaltar que valores muito próximos foram encontrados por Liu et al. (2013), ao avaliar o efeito da digestão

nas ANTs de mirtilo. Os autores reportaram 4,1 e 2,9 $\mu\text{mol TE/mg}$ de extrato não digerido e digerido, respectivamente e indicaram que malvidina, delphinidina e petunidina foram as principais ANTs encontradas na fruta.

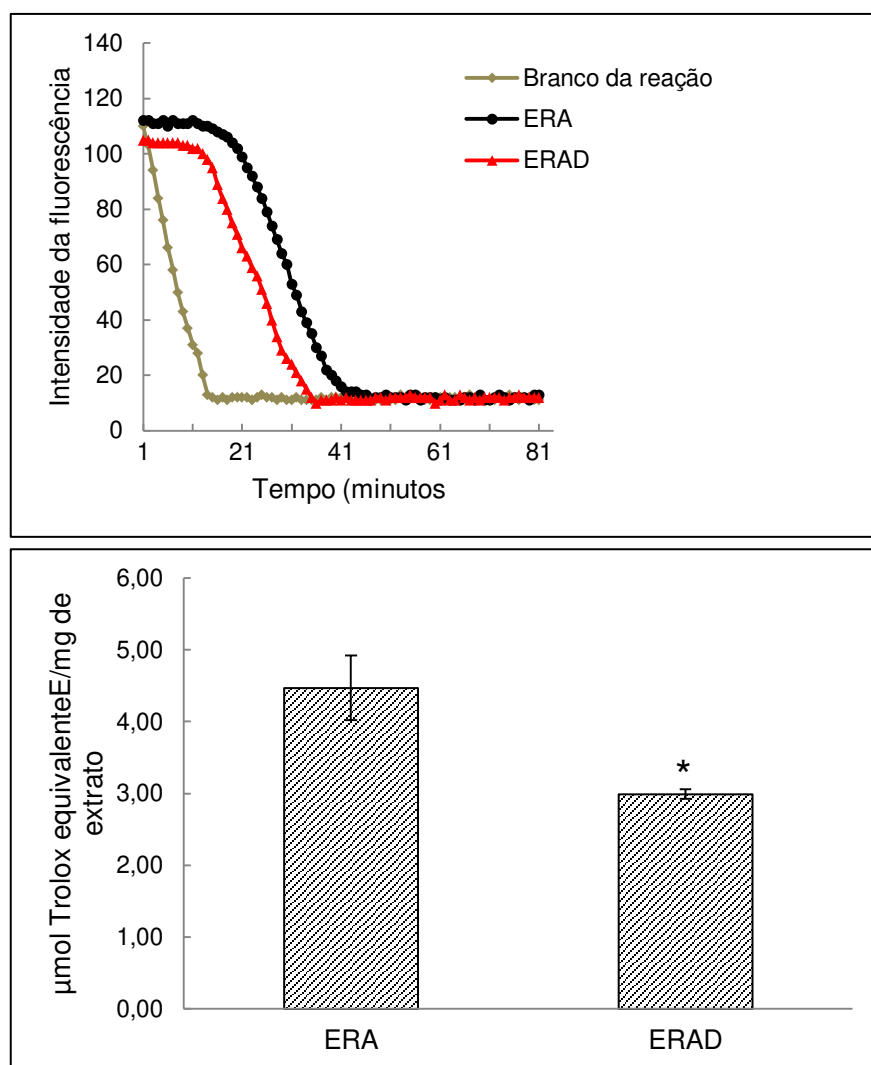


Figura 5. Efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* na atividade antioxidante dos extratos avaliada pelo método ORAC.

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão de análises em triplicatas.

* indica valor significativamente diferente ($p > 0,05$) do extrato não digerido.

ERA: extrato rico em antocianinas; ERAD extrato rico em antocianinas digerido.

Os resultados reportados na literatura sobre modelos de digestão *in vitro* são controversos, apontando tanto para aumento, como redução da capacidade antioxidante ao final da digestão, como apresentado na Tabela 4. O alimento avaliado seria a principal razão para estas diferenças, uma vez que a composição de polifenóis varia muito nos diversos alimentos. De acordo com Tarko et al. (2009), o tipo de alteração provocadas pela digestão na atividade antioxidante ocorre em função da natureza e estrutura do polifenol. Além disso, as divergências observadas nestes trabalhos também podem ser decorrentes de variações nos princípios dos ensaios, nos radicais utilizados, no potencial redox dos reagentes em questão e no tempo de reação empregado (Toydemir et al. 2013).

Estudos prévios sugerem que diferentes fatores podem ser responsáveis pelo aumento da capacidade antioxidante após a digestão. Foram reportadas a liberação de compostos simples, como ácidos fenólicos, a partir da quebra de compostos poliméricos presentes em vinho tinto (Noguer et al., 2008) e também de monômeros e agliconas provenientes da decomposição de procianidinas presentes em maçãs (Tarko et al., 2009). Além disso, a digestão de amido e proteínas liberou polifenóis presentes em feijão (Akillioglu & Karakaya, 2010) e as condições ácida do estômago e alcalina do intestino promoveram a liberação de compostos fenólicos fortemente ligados à parede celular de casca de uva (Tagliazucchi et al., 2010). Adicionalmente, alterações de pH e a ação de enzimas digestivas também podem levar à alterações de estrutura dos compostos fenólicos com formação de compostos com elevado potencial antioxidante (Bermúdez-Soto et al. 2007; Noguer et al. 2008; Liang et al. 2012).

Por outro lado, a redução da atividade antioxidante como consequência da degradação das ANT's durante a digestão intestinal foi previamente reportada (Liu et al. 2013). Adicionalmente, diversos trabalhos conduzidos com diferentes tipos de alimentos, cujos compostos bioativos majoritários eram ANT's, evidenciaram a redução da atividade antioxidante (Liang et al. 2012; Liu et al. 2013; Correa-Betanzo et al. 2014; Huang et al. 2014).

Tabela 4. Dados da digestão *in vitro* na atividade antioxidante reportados na literatura recente.

Alimento	Análise	Atividade antioxidante	Referência
Vinho tinto	ORAC FRAP	↑ ↓	Noguer et al., 2008
Ameixa, banana, chokeberry, maçã, melão e pera	ABTS	↑ ou ↓	Tarko et al., 2009
Feijões	DPPH ABTS	↑ ou ↓ ↑	Akillioglu & Karakaya, 2010
Uva	FRAP ABTS	↑ ↑	Tagliazucchi et al., 2010
Maçã	FRAP ABTS	↓ ↑	Bouayed et al., 2011
<i>Morus atropurpurea</i> Roxb. (Mulberry)	Captura OH [•] DPPH ABTS	↓ ↓ ↓	Liang et al., 2012
<i>Vaccinium</i> spp. (mirtilo)	ORAC	↓	Liu et al., 2013
Chá + suco de frutas	DPPH ABTS FRAP	↓ ↓ ↓	Chen et al., 2013
<i>Ribes uva-crispa</i> (gooseberry)	DPPH ORAC	↑ ↑	Chiang et al., 2013
<i>Prunus cerasus</i> L. (cereja)	ABTS CUPRAC DPPH	↓ ↓ ↑	Toydemir et al., 2013
<i>Vaccinium angustifolium</i> (mirtilo)	DPPH Captura O ₂ ^{•-}	↓ ↓	Correa-Betanzo et al., 2014
<i>Myrica rubra</i> (bayberry)	FRAP ABTS DPPH ORAC	↓ ↓ ↓ sem diferença	Huang et al., 2014

ORAC: Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio; FRAP: potencial antioxidante de redução do ferro; DPPH: capacidade de redução do radical DPPH; ABTS: capacidade de redução do radical ABTS.

Nossos dados diferem de estudos realizados com frutas, sucos e grãos, nos quais ocorreu aumento da atividade antioxidante em consequência da possível liberação de compostos fenólicos durante o processo digestivo. Visto que o presente estudo foi realizado com um extrato purificado rico em ANT's, inferimos que as reduções observadas na capacidade antioxidante foram decorrentes da degradação das ANT's durante o processo de digestão intestinal.

4. Conclusão

Os efeitos da digestão *in vitro* no ERA, obtido a partir da casca de feijão preto, foram avaliados no presente estudo. Além disso, foram identificadas as ANT's dfn 3-glc, ptn 3-glc e mlv 3-glc no extrato purificado da casca de feijão preto, sendo dfn 3-glc a ANT majoritária. Os nossos resultados mostram que a digestão foi responsável pelo decréscimo nas concentrações dos fenóis totais, das ANT's monoméricas e na atividade antioxidante avaliada através dos ensaios TEAC e ORAC. A redução da atividade antioxidante foi atribuída à degradação das ANT's durante o processo digestivo. Através de uma abordagem relativamente simples, quando comparada com estudos *in vivo*, observamos que a digestão pode alterar os efeitos biológicos das ANT's presentes no feijão preto, influenciando a sua capacidade antioxidante.

Referências

- Akillioglu HG, Karakaya S. 2010. Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and in vitro digestion process. *Food Sci Biotechnol* 19(3): 633-9.
- Akond ASMGM., Khandaker L, Berthold J, Gates L, Peters K, Delong H, Hossain K. 2011. Anthocyanin, total polyphenols and antioxidant activity of common bean. *Am J Food Technol* 6(5), 385-394.
- Andersen ØM, Jordheim M. 2013. Basic anthocyanin chemistry and dietary sources. In: Wallace TC, Giusti MM, editor. *Anthocyanins in health and disease*. Boca Raton: CRC Press. p 13-89.
- Aparicio-Fernandez X, Yousef GG, Loarca-Pina G, de Mejia E, Lila MA. 2005. Characterization of polyphenolics in the seed coat of Black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* 53(11): 4615-22.
- Awika JM, Rooney LW, Waniska RD. 2005. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chem* 90(1): 293-01.
- Bermúdez-Soto MJ, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT. 2007. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chem* 102(3): 865-74.
- Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T. 2011. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: bioaccessibility and potential uptake. *Food Chem* 128(1): 14-21.

- Choung MG, Choi BR, An YN, Chu YH, Cho YS. 2003. Anthocyanin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J Agric Food Chem 51 (24): 7040-3.
- Correa-Betanzo J, Allen-Vercoe E, McDonald J, Schroeter K, Corredig M, Paliyath G. 2014. Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion Food Chem 165:522-31.
- Duymuş HG, Göger F, Başer KH. 2014. *In vitro* antioxidant properties and anthocyanin compositions of elderberry extracts. Food Chem 155:112-9.
- Faller ALK, Fialho E, Liu RH. 2012. Cellular antioxidant activity of Feijoadá whole meal coupled with an *in vitro* digestion. J Agric Food Chem, 60:4826-32.
- Giusti M, Wrolstad RE. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV–visible spectroscopy. Curr Protoc Food Analyt Chem, F1.2.1-F1.2.13.
- Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M 2012. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. Trends Biotechnol, 30(11), 591-600.
- He J, Giusti MM. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. Annu Rev Food Sci Technol 1:163–87.
- Huang H, Sun Y, Lou S, Li H, Ye X. 2014. *In vitro* digestion combined with cellular assay to determine the antioxidant activity in Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) fruits: A comparison with traditional methods. Food Chem 146:363-70.

- Jordheim M, Fossen T, Andersen, ØM. 2006. Preparative isolation and NMR characterization of carboxypyrananthocyanins. *J Agric Food Chem* 54:3572-77.
- Jurd L, Asen S. 1966. The formation of metal and "co-pigment" complexes of cyaniding 3-glucoside. *Phytochemistry* 5(6):1263-71.
- Keppler K, Humpf HU. 2005. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg Med Chem* 13(17):5195-205.
- Leite AV, Malta LG, Riccio MF, Eberlin MN, Pastore, GM, Marostica Junior MR. 2011. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *J Agric Food Chem* 59(6): 2277-83.
- Liang L, Wu X, Zhao T, Zhao J, Li F, Zou Y., Mao G, Yang L. 2012. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from rapy (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Res Int* 46(1):76-82.
- Lin LZ, Harnly JM, Pastor-Corrales MS, Luthria DL. 2008. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem* 107(1):399-410.
- Liu Y, Zhang D, Wu Y, Wang D, Wei Y, Wu J, Ji B. 2014. Stability and absorption of anthocyanins from blueberries subjected to a simulated digestion process. *Int J Food Sci Nutr* 65(4):440-8.
- Macz-Pop GA, Rivas-Gonzalo JC, Pérez-Alonso JJ, González-Paramás, AM. 2006. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem* 94(3): 448-56.

- McDougall GJ, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. 2005. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. J Agric Food Chem 53(15): 5896-904.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>, acesso em 18/07/2014.
- Nderitu AM, Dykes L, Awika JM., Minnaar A, Duodu KG. 2013. Phenolic composition and inhibitory effect against oxidative DNA damage of cooked cowpeas as affected by simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. Food Chem 141(3): 1763-71.
- Nielsen ILF, Haren GR, MagnussenEL, DragstedLO, Rasmussen SE. 2003. Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and antioxidative potency. J Agric Food Chem 51(20): 5861-6.
- Noguer M, Cerezo AB, Rentzsch M, Winterhalter P, Troncoso AM., García-Parrilla MC. 2008. Simulated digestion and antioxidant activity of red wine fractions separated by high speed countercurrent chromatography. J Agric Food Chem 56(19): 8879-84.
- Oomah BD, Corbé A, Balasubramanian P. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. J Agric Food Chem 58(14): 8225-30.
- Pérez-Vicente A, Gil-Izquierdo A, García-Viguera, C. 2002. *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. J Agric Food Chem 50(8): 2308-12.

- Roesler R, Catharino RR, Malta LG, Eberlin MN, Pastore G. 2007. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem* 104(3): 1048-54.
- Romani A, Vignolini P, Galardi C, Mulinacci N, Benedettelli S, Heimler D. 2004. Germplasm characterization of Zolfino landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. *J Agric Food Chem*, 52(12): 3838-42.
- Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. 2010. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem* 120(2): 599-606.
- Takeoka GR, Dao LT, Full GH, Wong RY, Harden LA., Edwards RH, Berrios JDJ. 1997. Characterization of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthocyanins. *J Agric Food Chem* 45(9): 3395-3400.
- Tarko T, Duda-Chodak A, Sroka P, Satora P, Michalik J. 2009. Transformations of phenolic compounds in an *in vitro* model simulating the human alimentary tract. *Food Technol Biotech* 31(4): 456-63.
- Toydemir G, Capanoglu E, Kamiloglu S, Boyacioglu D, De Vos RC, Hall RD, Beekwilder J. 2013. Changes in sour cherry (*Prunus cerasus* L.) antioxidants during nectar processing and *in vitro* gastrointestinal digestion. *J Funct Foods* 5(3); 1402-13.
- Xu B, Chang SK. 2009. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *J Agric Food Chem* 57(11): 4754-64.

- Wu X, Prior RL. 2005. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. *J Agric Food Chem* 53(8): 3101-13.
- Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem* 54(11): 4069-75.
- Yoshida K, Sato Y, Okuno R, Kameda K, Isobi M, Kondo T. 1996. Structural analysis and measurement of anthocyanins from colored seed coats of vigna, phaseolus, and glycine legumes. *Biosci Biotech Biochem* 60 (4): 589-93
- .

CAPÍTULO IV

ESTUDO DOS EFEITOS PROTETORES DO EXTRATO RICO EM ANTOCIANINAS DE CASCA DE FEIJÃO PRETO EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista
Nutrition Research

RESUMO

As antocianinas são compostos bioativos com propriedades antioxidantes e antidiabéticas. A hiperglicemia associada ao aumento do estresse oxidativo e alterações pancreática, hepática e renal são características do diabetes induzido por estreptozotocina (STZ). Neste estudo, foram avaliados os possíveis efeitos da administração de um extrato rico em antocianinas de casca de feijão preto (ERA) em ratos com diabetes induzido por STZ. Ratos machos Wistar foram divididos em 5 grupos (controle normal, controle diabético, normal tratado com ERA, diabético pré-tratado com ERA e diabético pós-tratado com ERA) e tratados com veículo ou dose de 50 mg de extrato/kg de peso corpóreo. Foram avaliados o consumo de ração, glicemia, peso corpóreo, perfis enzimáticos hepático e renal, histologia dos tecidos pancreático e hepático, bem como o potencial antioxidante através da análise das enzimas catalase, glutathione redutase e ensaio ORAC plasmático. Os resultados mostraram que a administração de ERA não afetou de forma negativa os animais saudáveis. Os efeitos protetores do ERA frente ao diabetes foram observados apenas nos animais do grupo pré-tratado que apresentaram melhora nos níveis da glicemia e no ganho de peso, além de exibir alterações pancreáticas, hepáticas e renais menos pronunciadas do que nos demais grupos diabéticos. O tratamento realizado com ERA, após a indução do diabetes, não reduziu as lesões e não melhorou o estado geral dos animais. O pré-tratamento com ERA não impediu o aparecimento do diabetes, porém foi capaz de atenuar os danos provocados pela doença, como hiperglicemia e perda de peso. Estes resultados demonstram que o consumo preventivo de ANTs da casca de feijão pode retardar ou reduzir os danos provocados pelo diabetes.

Palavras chave: Antocianinas, diabetes, *Phaseolus vulgaris*, glicemia, ORAC.

1. Introdução

O *diabetes mellitus* pode ser definido como um grupo de desordens metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Suas principais formas são o diabetes tipo 1 (DT1) e o tipo 2 (DT2). Enquanto o DT1 é caracterizado pela destruição das células β do pâncreas, o DT2 resulta da resistência à insulina associada à deficiência relativa deste hormônio, sendo esta a forma mais prevalente da doença com mais de 90% dos casos [1].

O estresse oxidativo, associado à hiperglicemia e à hiperlipidemia características do diabetes, são responsáveis pelas alterações macrovasculares, que podem ocasionar infarto, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica e pelas alterações microvasculares que levam à retinopatia, nefropatia e neuropatia [2, 3]. Estas complicações a longo prazo contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade, com projeções alarmantes de aumento de casos. A previsão é que o número de diabéticos aumente de 285 milhões em 2010 para 439 milhões em 2030 [4].

Inúmeros medicamentos são empregados no tratamento do diabetes, para prevenção de suas complicações. Entretanto, estas drogas podem apresentar efeitos colaterais como hipoglicemia, aumento de peso e distúrbios gastrointestinais [5]. Por esta razão, nos dias atuais, existe uma busca por fontes alternativas e seguras que colaborem de maneira coadjuvante no tratamento da doença, reduzindo a quantidade de medicamento necessária para o seu controle [6; 7].

Estudos prévios demonstraram o efeito positivo observado após a administração de compostos provenientes de alimentos no abrandamento dos sintomas do diabetes [8; 9;10].

As antocianinas (ANTs), responsáveis pelas cores que variam do salmão ao vermelho e do lilás ao azul escuro em um grande número de frutas, vegetais e grãos, estão amplamente presentes na dieta humana. Estes pigmentos hidrossolúveis, pertencentes ao grupo dos flavonoides são glicosídeos e acilglicosídeos de seis principais antocianidinas - cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina. Além de conferir cor às plantas, também são responsáveis pela proteção contra a luz UV e o estresse oxidativo, por esta razão estes compostos bioativos são considerados antioxidantes [11; 12]. Uma recente revisão publicada por Sancho e Pastore [13] aborda em maiores detalhes o efeito das ANTs em diabetes tipo 2.

Diversos autores reportaram a melhora no quadro diabético decorrente do consumo de ANTs provenientes de diferentes alimentos como amoras [14], milho roxo [15, 16], *bilberry* [9], mirtilo [17], soja negra [8] e arroz negro [18]. Nestes trabalhos foi demonstrado que o modo de ação das ANTs envolve diferentes mecanismos como a redução do estresse oxidativo [14; 19], a melhora na resistência à insulina [9, 15, 18; 20], o aumento na secreção de insulina [8; 21; 22] e a proteção de células β [23; 24].

Os feijões (*Phaseolus vulgaris*) se destacam dentre as leguminosas por serem os mais importantes para o consumo humano direto e as variedades que apresentam coloração vermelha ou preta podem conter quantidades expressivas de ANTs em sua casca [25, 26, 27].

Estes grãos representam uma fonte importante de carboidratos e proteínas, sendo o Brasil o principal produtor mundial [28]. Trabalhos indicam que o seu consumo está associado à redução de pressão arterial, circunferência abdominal, glicemia, triglicérides e colesterol LDL, além de manutenção de peso corporal adequado [29; 30]. Adicionalmente, estudos *in vitro* realizados com a casca de feijão demonstraram que as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa podem ser relacionadas com a presença de polifenóis, dentre eles

as ANTs [31; 32]. Ainda que inúmeros estudos tenham sido realizados com ANTs originárias de diversas fontes para avaliação de seu efeito no diabetes, não foram relatados ensaios conduzidos com estes compostos provenientes de casca de feijão.

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do extrato de casca feijão preto, rico em ANTs, na glicemia, no peso, nas funções hepática e renal e no estatus antioxidante de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ).

2. Material e Métodos

2.1. Material

Os feijões pretos, provenientes do estado de Minas Gerais, Brasil, foram adquiridos no comércio local de Campinas, em setembro de 2012 e estocados a -18°C até o momento das análises.

O padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) e os reagentes ácido metafosfórico, 2,2'-azobis (amidinopropano) dihidroclorato (AAPH), fluoresceína sódica, beta-NADPH, (-)-glutathione oxidada (GSSG), ácido 5,5'-ditio-bis 2-nitrobenzóico (DTNB), foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). A STZ foi da marca Merck (Darmstadt, Alemanha). Os demais solventes ácidos e reagentes utilizados nas diferentes análises foram de grau analítico da Labsynth (Diadama, Brasil). A água foi purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

2.2. Extração e purificação das antocianinas

A extração das ANTs foi realizada de acordo com o método descrito por Jordheim et al [27], com ligeiras modificações. Inicialmente, 4 kg de grãos de feijão foram embebidos em 4,8 L de água destilada (0,5% HCl), durante 16 h a 4°C. Na sequência, os feijões foram extraídos duas vezes com 4,8 L de metanol (0,5%

HCl) por 24 h a 4°C. Após centrifugação, filtração a vácuo e concentração sob pressão reduzida ($T < 38^{\circ}\text{C}$), os extratos foram recombinaados e tiveram o volume ajustado com água para 600 mL. Posteriormente, o extrato sofreu partição líquido-líquido com acetato de etila (3 x 600 mL) para remoção dos compostos de baixa polaridade. A camada aquosa foi concentrada para 300 mL e submetida a coluna Amberlit XAD 7 (Sigma), para remoção de açúcares livres e ácidos com água. As ANTs foram então eluídas com metanol (0,5% HCl). O eluato foi concentrado à vácuo para eliminação do solvente, liofilizado e armazenado a -80°C . O rendimento final do extrato rico em ANTs (ERA) foi de 18,7 g.

2.3. Análise das antocianinas

A metodologia empregada para a análise do ERA, empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM), encontra-se descrita no capítulo anterior. A identificação e quantificação das ANTs estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Teores das antocianinas presentes no extrato de casca de feijão.

Antocianinas	μg equivalente de delphinidina 3-glicosídeo/mg de extrato
delphinidina 3-glicosídeo	$48,1 \pm 4,9$
petunidina 3-glicosídeo	$35,0 \pm 3,3$
malvidina 3-glicosídeo	$26,6 \pm 1,3$

2.4. Experimento animal e procedimentos

2.4.1. Animais e modelo experimental

Ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Unicamp (CEMIB), foram empregados neste estudo. O modelo experimental foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEEA/Unicamp/Brasil, sob o protocolo número 2975-1. Os animais foram mantidos em condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 h), temperatura (22 - 24°C) e umidade (45 - 60%), com água e alimentação (ração comercial) *ad libitum*.

Os ratos, pesando entre 200 e 270 g, foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos com 7 animais cada. O diabetes foi induzido, após jejum de 6 horas, em três grupos (G3, G4 e G5) através de injeção intraperitoneal de STZ (60 mg/kg de peso corpóreo) em tampão citrato 0,1M, pH 4,5 (10 mL/kg de peso corpóreo). Os dois grupos restantes (G1 e G2) receberam apenas tampão citrato. Cinco dias após a administração da droga, animais que apresentaram glicemia superior a 250 mg/dL, acompanhada de manifestações de polifagia, poliúria e polidipsia, foram considerados diabéticos. Após a confirmação da doença, os animais foram tratados com solução salina (NaCl 0,9%) ou ERA (50 mg/kg de peso corpóreo), através de gavagem orogástrica (10 mL/kg de peso corpóreo) por um período de 21 dias. Os animais utilizados no protocolo experimental foram divididos nos grupos apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Grupos dos animais utilizados no experimento.

Grupos	Animais	Tratamento
G1	Controle normal (tampão citrato)	NaCl
G2	Normal tratado (tampão citrato)	ERA
G3	Controle diabético (STZ)	NaCl
G4	Diabético pré-tratado (STZ)	pré-tratamento ERA
G5	Diabético pós tratado(STZ)	ERA

ERA: extrato rico em antocianinas na dose de 50 mg/kg de peso corpóreo.

O grupo diabético (G4) foi pré-tratado por 7 dias com ERA (50 mg/kg de peso corpóreo). Após a indução do diabetes, o tratamento foi realizado como nos demais animais que receberam extrato.

2.4.2. Controle de peso e glicemia

O peso e a glicemia de jejum dos animais foram medidos nos dias -5 (injeção de STZ/tampão citrato), 0 (início do tratamento), 7, 14 e 21. As amostras de sangue foram coletadas na veia caudal e medidas com glicosímetro digital (Accu-Chek Performa, Roche, Mannheim, Germany).

2.4.3. Coleta de sangue e órgãos

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com xilazina 2% (10 mg/kg) e ketamina (80 mg/kg) e eutanasiados através de punção da aorta abdominal. O sangue foi coletado em tubos apropriados (Vacutainer®) para cada análise específica. Para o ensaio ORAC plasmático, foram utilizados tubos revestidos com EDTA. O plasma foi obtido por centrifugação e as amostras armazenadas a -80°C até o momento das análises. Imediatamente após a coleta do sangue, o fígado e os rins foram removidos e pesados. As variações dos pesos dos órgãos foram expressas em termos relativos [(peso do órgão/peso corpóreo)

X 100]. Frações de fígado foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para as análises posteriores.

2.4.4. Procedimentos histopatológicos

Amostras de tecidos pancreático e hepático foram coletadas e fixadas em solução de formalina 10%. Posteriormente foram embebidas em parafina, seccionadas e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Os cortes foram analisados em microscópio ZEISS AX10 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), com objetivas de 10x, 20x e 40x.

2.4.5. Análises bioquímicas

As determinações plasmáticas de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), uréia e creatinina foram realizadas através de um analisador automático (Modular® - Roche).

2.4.6. Análise da atividade das enzimas antioxidantes no tecido hepático

Preparo do homogenato

Os homogenatos do tecido hepático foram preparados na razão de 20 mg de tecido/mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) utilizando Ultra Turrax® (IKA T 18 basic, Works Inc, Wilmington, USA). Em seguida foram armazenados a -80 °C até o momento das análises.

Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi avaliada em espectrofotômetro (DU-640™, Beckman-Coulter - Brea, CA, USA) de acordo com o método proposto por Aebi [33]. Inicialmente, o homogenato foi diluído na razão de 1:100 em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0). O meio de reação foi composto por 26 µL de homogenato e 374 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0). A reação foi iniciada com a adição de 200

μL de H_2O_2 10 mM (tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 7,0). A decomposição de H_2O_2 em H_2O foi monitorada por meio da leitura de absorbância a 240 nm durante 2 min. Os resultados foram expressos em U/g de tecido.

Glutathione redutase (GR)

A determinação espectrofotométrica da atividade da GR no homogenato foi realizada segundo Smith et al [34]. O homogenato foi diluído na razão de 1:20 em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0). O meio de reação foi composto por 1 mL de tampão fosfato (0,2 M, pH 7,5) contendo EDTA 1mM, 500 μL de DTNB 3mM em tampão fosfato (0,01M, pH 7,5), 250 μL de H_2O , 100 μL de NAPH 2 mM (0,02M, pH 7,5) e 50 μL de homogenato. A reação foi iniciada pela adição de 100 μL de GSSG 20 mM em H_2O . A formação de TNB (ácido 5-tio 2-nitro benzóico) a partir de DTNB em presença de GR, NADPH e GSSG foi monitorada a 412 nm durante 5 min. Os resultados foram expressos em U/g de tecido.

2.4.7. Capacidade antioxidante plasmática

Preparo do plasma

O preparo das amostras foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Leite et al [35]. Após descongelamento lento das amostras estocadas a -80°C e agitação em vórtex, 50 μL de plasma foi transferido para um microtubo ao qual foram adicionados 100 μL de etanol e 50 μL de água destilada. A solução foi agitada por 30s e posteriormente 200 μL de ácido metafosfórico (0,75 M) foram acrescentados. A mistura foi novamente agitada por 30 s e então centrifugada a 1400 rpm por 5 min a 10°C . O sobrenadante foi removido e estocado a -80°C para posterior análise.

Avaliação da capacidade antioxidante plasmática

A avaliação, realizada através do método ORAC proposto por Leite et al [35], ocorreu em leitor de fluorescência (NOVOstar, BMG Labtech, Offenburg, Germany). As amostras de plasma (concentração final de 0,031 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ de solução) e padrão de Trolox foram preparadas com tampão fostato de potássio 75mM (pH 7,4). Os poços externos de microplacas pretas não foram utilizados por causar grande variação de resultados em comparação aos poços internos. Em cada poço contendo 20 μL de solução de plasma ou padrão de Trolox e 120 μL de fluoresceína (70 mM) foram adicionados 60 μL de solução de AAPH (122 mM) para iniciar a reação, resultando em um volume final de 200 μL . O decaimento da fluorescência foi medido a cada 1 minuto durante 80 minutos a 37°C, com emissão e excitação a 520 nm e 528 nm, respectivamente. Um branco do experimento, sem amostra ou padrão, também foi realizado (20 μL de tampão fostato, 120 μL de fluoresceína, 60 μL de solução de AAPH). Os resultados, expressos como μM de Trolox equivalentes por μL de plasma, foram calculados usando a área relativa sob a curva das amostras comparada com a curva do padrão de Trolox (1, 10, 25, 50, 75, 100, 125 μM). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software STATISTICA (StatSoft Inc., 2013, versão 12.0). Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) de triplicatas.

3. Resultados

Os efeitos da administração de ERA foram avaliados em ratos portadores de diabetes induzido por STZ. As médias semanais do consumo de ração, apresentadas na Tabela 3, mostram que o consumo foi significativamente maior ($p<0,05$) nos grupos diabéticos G3 e G5 quando comparados com os grupos normais G1, G2 e o grupo diabético pré-tratado G4.

Tabela 3. Consumo de ração e ganho de peso de ratos normais e diabéticos tratados com ERA.

Consumo semanal de ração (g)		Peso corporal (g)				
		Dia -5*	Dia 0**	Dia +7	Dia +14	Dia +21
G1	217±5 ^b	238±8 ^a	289±11 ^a	315±15 ^a	331±17 ^a	328±20 ^a
G2	222±14 ^b	235±15 ^a	283±17 ^a	314±19 ^a	336±22 ^a	340±19 ^a
G3	321±28 ^a	247±16 ^a	243±16 ^b	243±14 ^c	258±15 ^c	240±17 ^c
G4	250±14 ^b	236±13 ^a	247±9 ^b	270±11 ^b	288±20 ^b	279±31 ^b
G5	298±15 ^a	252±13 ^a	249±10 ^b	251±15 ^{b,c}	252±20 ^c	226±23 ^c

Consumo de ração e peso corporal expressos em g. G1: controle normal, G2: controle diabético, G3: normal/tratamento ERA, G4: diabético/pré-tratamento ERA, G5: diabético/tratamento ERA. Resultados expressos como média ± DP (n=7). Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam resultados estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

*Injeção de STZ/citrato. **Início do tratamento.

A evolução do peso dos animais durante o estudo pode ser observada na Tabela 3. O início do diabetes resultou em pesos significativamente menores ($p<0,05$) nos grupos G3, G4 e G5 quando comparados com os grupos G1 e G2. A partir do sétimo dia de tratamento, verificou-se uma tendência à maior peso no G4 quando comparado aos demais grupos diabéticos. As pesagens dos 14^o e 21^o dias

revelaram que os grupos diabéticos G3 e G5 mantiveram pesos significativamente menores ($p<0,05$) que os outros grupos. Ao final do experimento observou-se que, enquanto os grupos diabéticos G3 e G5 apresentaram pesos inferiores aos pesos iniciais, o grupo pré-tratado G4 mostrou ganho de peso, ficando numa faixa intermediária entre os grupos saudáveis e os demais animais diabéticos.

Os efeitos da administração de ERA na glicemia de jejum estão expostos na Tabela 4. Os grupos G1 e G2 não apresentaram alterações nos níveis de glicose durante todo o período experimental e os valores foram significativamente menores ($p<0,05$) do que os dos ratos diabéticos dos 3 outros grupos. Após 14 dias de tratamento, o grupo G4 apresentou glicemia significativamente menor ($p<0,05$) que o grupo G5. Ao final de 21 dias, os teores de glicose do grupo G4 foram de modo significativo ($p<0,05$) inferiores aos grupos G3 e G5.

Tabela 4. Efeito de ERA na glicemia de ratos normais e diabéticos.

	Glicemia				
	Dia -5*	Dia 0**	Dia +7	Dia +14	Dia +21
G1	111±8 ^a	121±5 ^b	106±6 ^b	112±7 ^c	121±19 ^c
G2	115±5 ^a	116±6 ^b	117±12 ^b	113±7 ^c	121±19 ^c
G3	119±5 ^a	541±45 ^a	459±79 ^a	452±48 ^{a,b}	399±102 ^a
G4	120±7 ^a	446±115 ^a	375±100 ^a	354±153 ^b	269±67 ^b
G5	113±5 ^a	530±65 ^a	491±67 ^a	519±47 ^a	483±103 ^a

Glicemia expressa em mg/dL. G1: controle normal, G2: normal/tratamento ERA, G3: controle diabético, G4: diabético/pré-tratamento ERA, G5: diabético/tratamento ERA. Resultados expressos como média ± DP (n=7). Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam resultados estatisticamente diferentes ($p<0,05$). *Injeção de STZ/citrato.

**Início do tratamento.

As variações de peso relativo do fígado e rins estão apresentadas na Figura 1. O peso dos fígados apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) nos grupos G3 e G5 quando comparados com os grupos G1 e G2 e estes parâmetros no grupo G4 foram significativamente menores ($p<0,05$) quando comparados com o grupo G5. Com relação ao peso relativo dos rins, os animais pertencentes aos três grupos diabéticos (G3, G4 e G5) tiveram peso significativamente mais alto ($p<0,05$) que os grupos G1 e G2 e o grupo G4 apresentou peso significativamente menor ($p<0,05$) que o grupo G5.

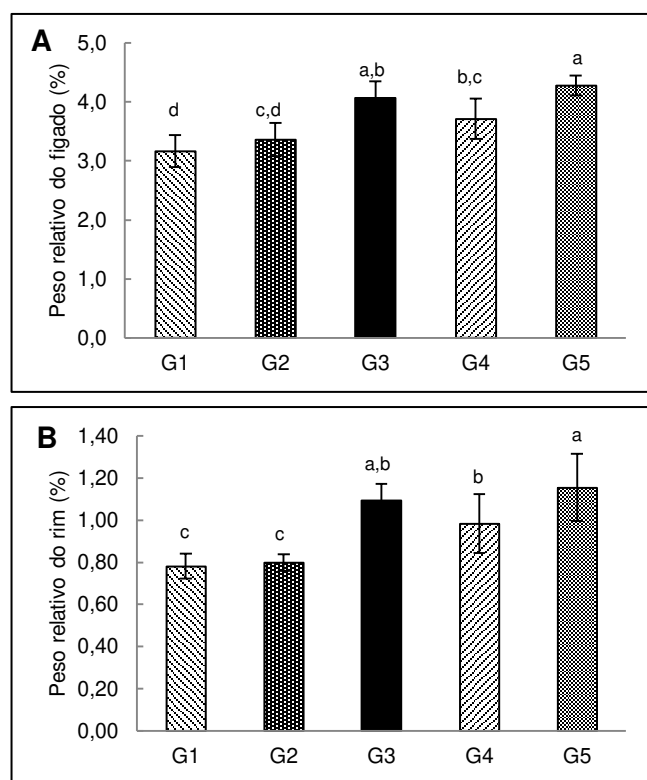


Figura 1. Efeito do ERA nos peso relativos de fígado (A) e rim (B) de ratos normais e diabéticos. G1: controle normal, G2: normal/tratamento ERA, G3: controle diabético, G4: diabético/pré-tratamento ERA, G5: diabético/tratamento ERA. Resultados expressos como média $\pm$ DP ($n=7$). Letras diferentes no mesmo gráfico indicam resultados estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

A Figura 2 mostra os efeitos do ERA nos níveis séricos dos marcadores de lesão hepática nos diferentes grupos. Os níveis de ALT foram significativamente mais baixos ($p<0,05$) nos grupos G1 e G2 quando comparados com G3 e G5 e no grupo G4 estes valores foram significativamente menores ($p<0,05$) que o G5. As dosagens de AST foram significativamente mais altas no G5 quando comparadas com os grupos G1 e G2 ($p<0,05$) e significativamente mais baixas no G2 quando comparadas com os grupos G3 e G4. Os níveis de ALP foram significativamente mais baixos ($p<0,05$) nos grupos G1 e G2 quando comparados com os demais grupos.

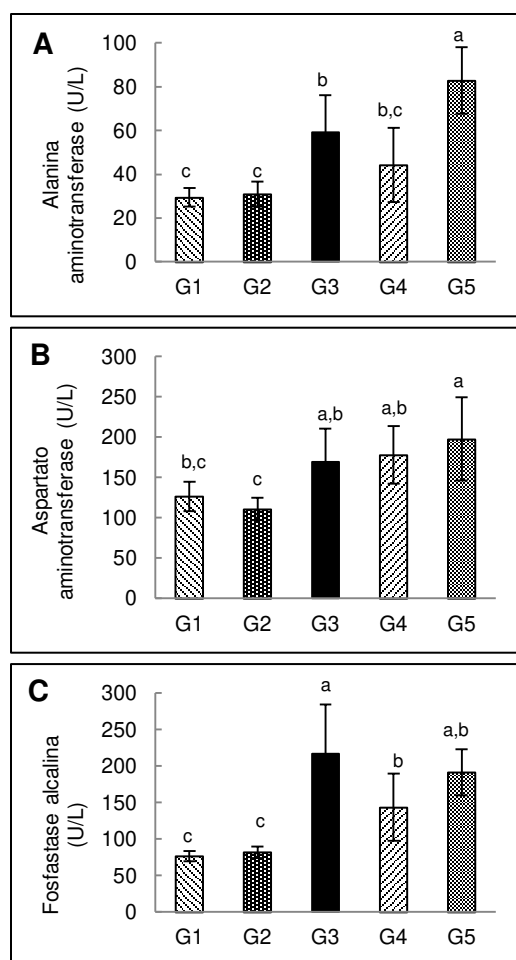


Figura 2. Efeito do ERA no perfil hepático de ratos normais e diabéticos. G1: controle normal, G2: normal/tratamento ERA, G3: controle diabético, G4: diabético/pré-tratamento ERA, G5: diabético/tratamento ERA. Resultados expressos como média $\pm$ DP ($n=7$). Letras diferentes no mesmo gráfico indicam resultados estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

Os efeitos do ERA na função renal, apresentados na Figura 3, indicam que os animais não diabéticos tiveram um nível de uremia significativamente menor ($p<0,05$) do que os diabéticos dos grupos G3 e G5. Os valores séricos da creatinina foram significativamente maiores no grupo G4 quando comparados com o grupo G1.

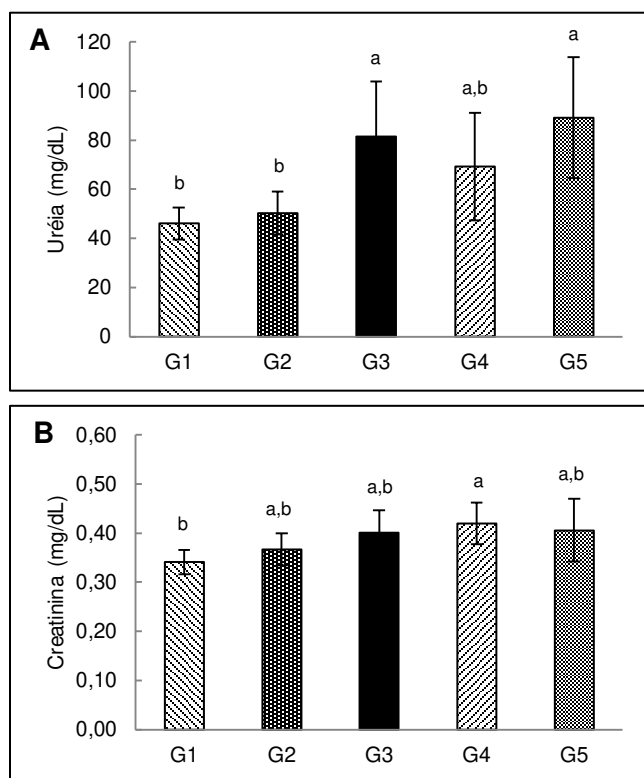


Figura 3. Efeito do ERA no perfil renal de ratos normais e diabéticos. G1: controle normal, G2: normal/tratamento ERA, G3: controle diabético, G4: diabético/pré-tratamento ERA, G5: diabético/tratamento ERA. Resultados expressos como média $\pm$ DP ($n=7$). Letras diferentes no mesmo gráfico indicam resultados estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

Na Figura 4 estão apresentados os resultados referentes às medidas da atividade das enzimas antioxidantes hepáticas. Em todos os grupos portadores de diabetes (G3, G4 e G5) a CAT apresentou atividade significativamente inferior ($p < 0,05$) aos grupos G1 e G2. A atividade da GR não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre os cinco grupos.

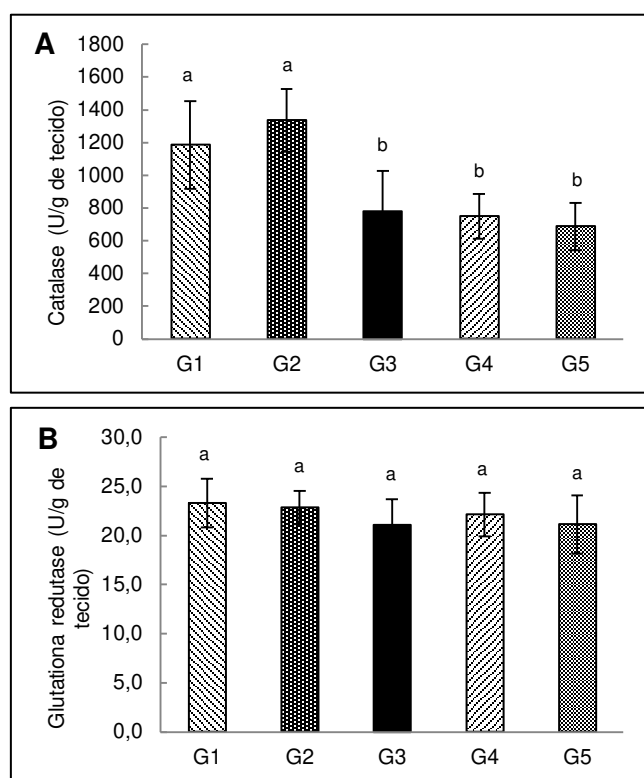


Figura 4. Efeito do ERA nas enzimas antioxidantes hepáticas catalase (A) e glutathione reductase (B) de ratos normais e diabéticos. G1: controle normal, G2: normal/tratamento ERA, G3: controle diabético, G4: diabético/pré-tratamento ERA, G5: diabético/tratamento ERA. Resultados expressos como média $\pm$ DP ($n=7$). Letras diferentes no mesmo gráfico indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados referentes ao potencial antioxidante plasmático, avaliado pelo método ORAC, estão apresentados na Figura 5. Observa-se ligeiro aumento na atividade antioxidante plasmática em todos os grupos tratados com ERA (G2, G4 e G5). Entretanto a diferença foi significativa ($p < 0,05$) apenas entre os grupos G1 e G5.

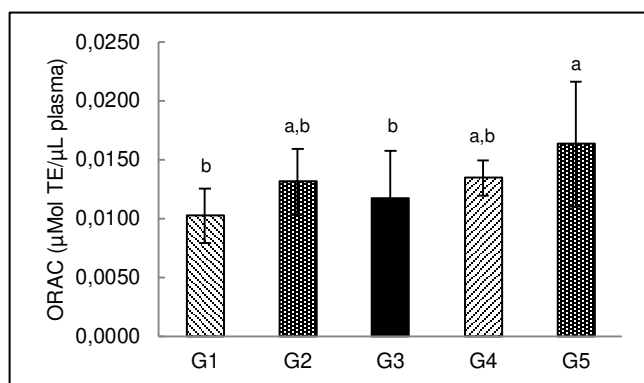


Figura 5. Efeito do ERA no potencial antioxidante plasmático de ratos normais e diabéticos. G1: controle normal, G2: normal/tratamento ERA, G3: controle diabético, G4: diabético/pré-tratamento ERA, G5: diabético/tratamento ERA. Resultados expressos como média $\pm$ DP ($n=7$). Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A histologia do pâncreas dos animais normais (grupos G1 e G2) mostrou estrutura típica, com ilhotas de Langerhans e acinos normais. As ilhotas apresentaram conformação oval arredondada, superfície homogênea, capilares bem distribuídos, com células apresentando núcleo evidente e citoplasma homogêneo (Figura 6A, 6B).

Por outro lado, nos animais diabéticos dos grupos G3 e G5 os achados histológicos foram bastante semelhantes. Observou-se desorganização da estrutura das células endócrinas e exócrinas, evidenciada por menor quantidade de ilhotas de Langerhans e ácinos edemaciados. As ilhotas se apresentam retraídas, houve redução importante do número de células, presença de células necróticas, células vacuolizadas e tipos celulares de começo de infiltração linfocítica (Figura 6C e 6E). Nos animais diabéticos do grupo G4 foi possível observar danos em alguns ácinos e nas ilhotas, porém de maneira menos pronunciada que nos outros grupos diabéticos. As ilhotas se mostraram menos encolhidas, a vacuolização celular foi discreta, a redução do número de células foi menor e a infiltração linfocitária foi reduzida ou ausente (Figura 6D).

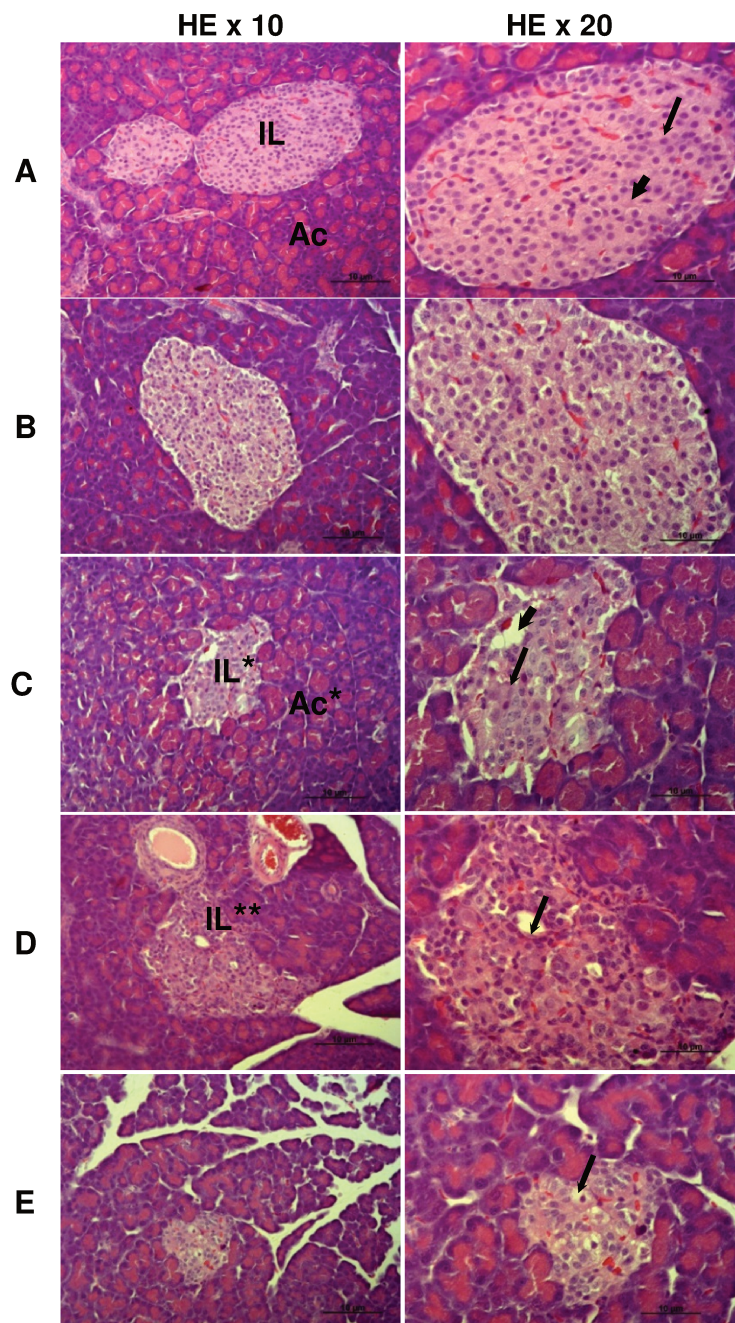


Figura 6. Histopatologia do pâncreas. **A**: controle normal (G1), IL (ilhotas de Langerhans), Ac (ácinos), núcleo celular (seta estreita), citoplasma (seta estreita); **B**: normal/tratamento ERA (G2), achados histológicos semelhantes ao G1; **C**: controle diabético (G3), IL* (ilhotas com forma alterada e número de células reduzido), Ac* (ácinos edemaciados), necrose (seta larga), vacuolização do citoplasma (seta estreita); **D**: diabético/pré-tratamento com ERA (G4) IL** (ilhotas maiores que no G3 e com maior número de células remanescentes), necrose (seta estreita); **E**: diabético/pós-tratamento com ERA (G5), achados semelhantes ao G3, necrose (seta estreita).

Os fígados dos animais do grupo G1 apresentaram estrutura histológica característica, com lóbulos formados por cordões de hepatócitos dispostos de forma radiada, em direção à veia centro lobular e agrupados em torno das tríades, compostas por ramos da veia porta, artéria hepática e canais biliares. Os sinusoides, formados por células epiteliais e células de Kupffer, separavam os cordões de hepatócitos. As células hepáticas apresentaram núcleo central e arredondado, algumas com estruturas binucleadas, como pode ser observado na Figura 7A. Nos animais do grupo G2, o fígado também mostrou estrutura histológica típica, exceto por algumas leves dilatações da veia central (Figura 7B). As alterações histológicas evidenciadas nos animais diabéticos do grupo G3 foram: veias centrais dilatadas e com estase, dilatação sinusoidal, infiltrado inflamatório linfocítico em parte dos tratos portais, bem como áreas focais de hemorragia (Figura 7C). Os animais diabéticos dos grupos G4 e G5 apresentaram dilatação da veia central, estase venosa e infiltrados inflamatórios linfocíticos periportais (Figura 7D e 7E).

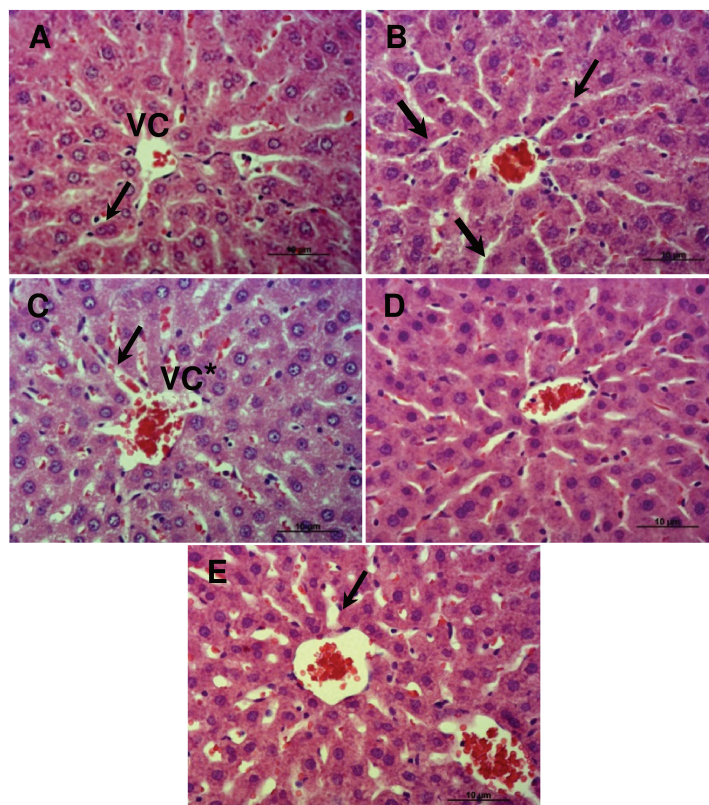


Figura 7. Histopatologia do fígado (HE x 20): **A**: controle normal (G1), estrutura hepática normal, VC (veia central), célula binucleada (seta estreita); **B**: normal/tratamento ERA (G2), achados histológicos semelhantes ao G1 com sinusoides separando os cordões de hepatócitos (setas), célula de Kupffer (seta); **C**: controle diabético (G3), VC* (veia central dilatada) e dilatação sinusoidal (seta estreita); **D**: diabético/pré-tratamento com ERA (G4), veia central dilatada; **E**: diabético/pós-tratamento com ERA (G5), achado histológicos semelhantes ao G3.

4. Discussão

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das ANT's em um modelo experimental de diabetes. As ANT's do ERA foram extraídas de casca de feijão preto e o diabetes foi induzido com STZ. A redução da glicemia e o ganho de peso nos animais diabéticos pré-tratados (G4) mostrou que as ANT's podem prevenir, ao menos em parte, a destruição das células β pancreáticas. Por outro lado, a análise dos resultados obtidos com os animais que receberam o extrato apenas após a indução da doença (G5) sugere que as ANT's não apresentaram efeito na melhora do diabetes.

A STZ é uma droga frequentemente empregada para indução de diabetes experimental, por causar necrose das células β das ilhotas pancreáticas, através de alquilação do DNA, da depleção de NAD^+ e da produção de espécies reativas de oxigênio, com a consequente inibição da secreção de insulina [36].

As propriedades antidiabéticas das ANT's foram demonstradas em inúmeros trabalhos realizados em diferentes condições experimentais. A literatura reporta estudos conduzidos com diferentes linhagens de células pancreáticas [37; 38; 39; 40]. Experimentos *in vivo* foram realizados com animais que desenvolvem a doença espontaneamente [39], além da indução do diabetes em ratos e camundongos por meio de drogas como STZ e aloxana [8; 22] e também através da administração de dieta rica em gorduras e em frutose [18; 41]. Adicionalmente, trabalhos foram realizados com humanos diabéticos [42; 43]. Dentre os efeitos protetores encontrados destacam-se a redução da glicemia e da perda de peso [8; 41], a proteção das células β pancreáticas devido à ação antioxidante das ANT's ou restauração do sistema antioxidante endógeno [8; 39], o aumento a secreção de insulina [21; 39; 44] e a melhora da resistência à insulina [9].

O grupo saudável empregado como controle no presente estudo (G1) apresentou resultados normais para os diferentes parâmetros avaliados,

reproduzindo os resultados de inúmeros trabalhos disponíveis na literatura [8; 14; 21; 29].

O tratamento de ratos normais com ERA (G2) não provocou alterações significativas ($p > 0,05$) nos parâmetros avaliados, quando comparado ao grupo G1. Estes achados demonstram que, dentro dos testes efetuados, não foram identificados efeitos deletérios dessa administração nos animais saudáveis.

Em conformidade com outros estudos realizados que empregaram o mesmo modelo experimental, os animais do grupo G3, injetados com STZ, apresentaram alterações nas inúmeras análises realizadas [14; 21]. A perda de peso e o aumento da glicemia refletiram os danos às ilhotas pancreáticas observados nas análises histopatológicas. A elevação no peso relativo do fígado e dos marcadores de dano hepático (elevação dos níveis de ALT, AST e ALP), somadas às alterações histológicas, confirmam as lesões hepáticas. O dano renal foi confirmado tanto pelo aumento do peso relativo dos órgãos quanto dos níveis da uréia sérica. A redução da atividade da CAT também foi observada nesse grupo.

A análise dos resultados do grupo G5 mostrou que a administração de ERA após a indução do diabetes não resultou em melhora dos parâmetros avaliados, com resultados muito próximos dos obtidos nos animais do grupo G3, exceto pela ausência de hemorragia focal hepática.

Por outro lado, o pré-tratamento com ERA no grupo G4, induziu nos animais tanto ganho de peso quanto aumento de glicemia, porém os níveis glicêmicos foram significativamente menores do que nos demais grupos diabéticos, sugerindo um possível efeito protetor para as ilhotas pancreáticas. Embora alterações nas análises tenham sido observadas, tais como o aumento do peso relativo do fígado e rins e dos níveis de ALT, ALP e uréia, essas foram menos pronunciadas do que nos demais grupos diabéticos.

A hiperglicemia, a perda de peso ou ganho reduzido, concomitante com a polifagia em animais com diabetes induzido por STZ, têm sido documentados na literatura [14; 45]. No presente trabalho, ficou evidente que o pré-tratamento com ERA (Grupo 4) reduziu a hiperglicemia e permitiu um ganho de peso, apesar do consumo de ração desse grupo ter sido menor que nos demais grupos diabéticos.

As ANTs, devido à sua ação antioxidante, podem levar à redução do estresse oxidativo e proteger as células β contra a morte celular, preservando em parte a secreção de insulina [8; 21; 38; 39]. Nizamutdinova et al [8], em ensaio *in vivo*, avaliaram marcadores da apoptose em células pancreáticas e observaram que a administração de ANTs de soja negra provocou inibição na regulação de proteínas próapoptóticas como caspase-3 clivada e Bax, além de aumento na regulação da proteína anti-apoptótica Bcl-2. A proteção contra a morte celular induzida por H_2O_2 e a redução dos níveis caspase-3 clivada foram verificadas em células HIT-T15 tratadas com ANTs de milho roxo [39]. Neste mesmo estudo, os autores observaram aumento das células β no pâncreas de camundongos C57BL/KsJ db/db que receberam o mesmo extrato.

Por outro lado, as ANTs podem ter um efeito positivo no diabetes, através do aumento da secreção de insulina [8; 21; 39; 44; 46]. Sun et al. [44] verificaram o aumento na expressão do fator de transcrição de insulina PDX-1, na expressão do gene *Ins2* e da proteína insulina ao tratar células INS-1 com ANTs de *bayberry*. Os autores consideraram que estes efeitos, de maneira combinada, podem ter contribuído para a elevação da secreção de insulina. O aumento na expressão da insulina também foi verificado em células β remanescentes de ratos com diabetes induzido por aloxana e tratados com ANTs de *Vaccinium arctostaphylos* L. [22]. Em estudo com células HIT-T15 tratadas com ANTs, o aumento da secreção de insulina foi atribuído à ativação de receptores de peptídeo tipo glucagon (GLP) [39]. Pertencente à família das incretinas, o GLP é um hormônio produzido no intestino e estimula a produção de insulina [47]. Adicionalmente, Jayaprakasam et al. [23], demonstraram que as ANTs podem estimular a secreção de insulina em

células INS-1 832/13, sendo a delfinidina 3-glicosídeo uma das ANT's que apresentaram maior atividade secretagoga. Portanto, os resultados positivos obtidos no grupo pré-tratado podem ser possivelmente explicados pelo efeito protetor do ERA frente às espécies reativas. Esse efeito potencial pode ter preservado parte das células β no momento da administração da STZ, conservando a capacidade secretória das células β remanescentes e a produção de insulina.

A disfunção renal gerada pelo diabetes determina alterações importantes como o aumento dos níveis de uréia e creatinina, provocadas pela diurese osmótica. A longo prazo, estabelece-se um quadro de nefropatia diabética com a perda total da função renal [3; 48]. A identificação, no grupo pré-tratado, de aumento no peso renal em menor grau, bem como níveis de uréia ligeiramente inferiores, sugerem a preservação da função renal dos animais diabéticos através da redução da glicemia mediante a administração de ANT's.

Além do dano pancreático, a STZ também pode apresentar toxicidade hepática [Lenzen]. Níveis aumentados das transaminases ALT e AST, assim como da ALP são indicativos de lesão no fígado [49]. Os resultados obtidos com a administração de ERA, antes da indução do diabetes, mostraram menores elevações, tanto dos níveis de ALT e ALP quanto do peso do fígado, o que permite considerar um possível efeito protetor dessa substância sobre o tecido hepático. Estes resultados são consistentes com os achados reportados por Kumar et al [50] que administraram extrato de folhas de *Dillenia indica* (L.) à ratos com diabetes induzido por aloxana.

Quando o diabetes está estabelecido, a hiperglicemia promove o aumento da produção de radicais livres que, associada a uma resposta inadequada do sistema de defesa antioxidante enzimático, leva ao estresse oxidativo [13]. Investigações prévias demonstraram a redução de enzimas antioxidantes em soro, fígado e rins no diabetes experimental [8; 21; 51].

No presente estudo, foram avaliadas as enzimas antioxidantes CAT e GR do fígado, órgão chave nos processos de desintoxicação e de reações envolvendo radicais livres [52]. Para a atividade antioxidante, não observamos alterações na atividade da GR. Por outro lado, a atividade da CAT se apresentou reduzida em todos os grupos diabéticos, levando-nos a inferir que o ERA não foi capaz de restaurar os níveis depletados dessa enzima. Estes resultados divergem dos obtidos por Ramachandraiahgari et al.[51], que mostraram o aumento dos níveis da CAT e GR hepáticas após o tratamento de ratos diabéticos com extrato de *Aloe vera* e de Roy et al [21], que observaram a restauração dos níveis séricos da CAT em ratos diabéticos tratados com pelargonidina. A restauração do estado depleto das enzimas foi atribuída às propriedades antioxidantes dos compostos avaliados.

Outro método frequentemente utilizado para avaliação do potencial antioxidante plasmático é o ensaio ORAC, considerado um índice adequado para avaliação do estresse oxidativo em casos de diabetes [53]. Por empregar temperatura e pH semelhantes aos do sangue e radicais peróxila que são análogos aos encontrados em sistemas biológicos, além de combinar tempo e grau de inibição na avaliação da capacidade antioxidante, esta análise é mais próxima das condições fisiológicas [35; 54].

Maiores valores de ORAC foram verificados em sujeitos saudáveis quando comparados com diabéticos [53]. A redução destes valores ocorreu de forma concomitante com o aumento dos níveis de hemoglobina glicada e de hidroperóxidos, demonstrando que a hiperglicemia está fortemente relacionada com o aumento do estresse oxidativo.

Os alimentos ricos em flavonoides contribuem de maneira importante para o aumento do potencial antioxidante plasmático [35; 55; 56]. Sujeitos saudáveis que tiveram a dieta suplementada com mirtilo liofilizado apresentaram aumento da capacidade antioxidante plasmática [57]. As propriedades antioxidantes desta fruta

são provavelmente decorrentes da alta concentração de ANTs que apresentam [56]. É interessante observar que as ANTs majoritárias do mirtilo, delfinidina, petunidina e malvidina, são as mesmas encontradas no feijão preto.

No presente trabalho, todos os animais que receberam o ERA, independentemente de seu estado diabético, apresentaram valores de ORAC ligeiramente superiores aos animais que não receberam o extrato. Todavia, a diferença alcançou significância estatística apenas na comparação entre os grupos G1 e G5. Este resultado pode apontar para um potencial efeito protetor, em relação ao estresse oxidativo, devido às propriedades antioxidantes das ANTs presentes neste extrato, embora estudos adicionais sejam necessários para a confirmação dessa ação, bem como para a compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo.

5. Conclusão

Este estudo evidenciou que apenas a utilização preventiva das ANTs da casca de feijão preto pode retardar ou reduzir os danos provocados pelo diabetes.

Os nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com ERA não impediu o aparecimento do diabetes, mas apresentou um efeito positivo ao reduzir a hiperglicemia e compensar a perda de peso, bem como atenuar os danos pancreáticos, renais e hepáticos nos animais. Além disso, constatamos que o tratamento realizado com ERA, após a indução do diabetes, não foi capaz de reduzir as lesões, nem melhorar o estado geral dos animais.

Referências

- [1] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2013. Diabetes care 2013; 36(Suppl 1):S11-66.
- [2] Bonina FP, Leorra C, Scalia G, Puglia C, Trombetta D, Tringali G Roccazzello AM, Rapisarda P, Saija A. Evaluation of oxidative stress in diabetic patients after supplementation with a standardised red orange extract. Diabetes Nutr Metab 2002; 15:14-9.
- [3] Donnelly R, Emslie-Smith AM, Gardner ID, Morris AD. ABC of arterial and venous disease. Vascular complications of diabetes. BMJ 2000; 320:1062-66.
- [4] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Res Clin Pract 2010; 87: 4-14.
- [5] Goldstein BJ. Clinical translation of “a diabetes outcome progression trial”: ADOPT appropriate combination oral therapies in type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92:1226-8.
- [6] Kappel VD, Pereira DF, Cazarolli LH, Guesser SM, da Silva CHB, Schenkel EP, Reginatto FH, da Silva FR. Short and long-term effects of *Baccharis articulata* on glucose homeostasis. Molecules 2012; 17:6754-68.
- [7] Kumar K, Issac A, Ninan E, Kuttan R, Maliakel B. Enhanced anti-diabetic activity of polyphenol-rich de-coumarinated extracts of *Cinnamomum cassia*. Journal of Functional Foods 2014, 10:54-64.
- [8] Nizamutdinova IT, Jin YC, Chung, J, Shin, SC, Lee, SJ, Seo HG, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. The anti-diabetic effect of anthocyanins in streptozotocin-induced diabetic rats through glucose transporter 4 regulation and prevention of insulin resistance and pancreatic apoptosis. Mol Nutr Food Res 2009; 53:1419-29.
- [9] Takikawa M, Inoue S, Horio F, Tsuda T. (2010). Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. J Nutr 2010; 140:527-33.

- [10] Babu PVA, Liu D, Gilbert ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem* 2013; 24:1777-89.
- [11] Andersen ØM, Jhordeim M. Basic anthocyanin chemistry and dietary sources. In: Wallace TC, Giusti MM. *Anthocyanins in health and disease*. Boca Raton: CRC PressTaylor & Francis Group; 2013, p. 13-89.
- [12] He J, Giusti, MM. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu Rev Food Sci Technol* 2010; 1:163-87.
- [13] Sancho RAS, Pastore GM. Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. *Food Res Int* 2012; 46:378-86.
- [14] Sugimoto E, Igarachi K, Kubo K, Molineux J, Kubomura K. Protective effects of boysenberry anthocyanins on oxidative stress in diabetic rats. *Food Sci Technol Res* 2003; 9:345-9.
- [15] Sasaki R, Nishimura N, Hoshino H, Isa Y, Kadowaki M, Ichi T, Tanaka A, Nishiumi S, Fukuda I, Ashida H, Horio F, Tsuda T. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochem Pharmacol* 2007; 74:1619-27.
- [16] Hong SH, Heo JI, Kim JH, Kwon SO, Yeo KM, Bakowska-Barczak AM, et al. Antidiabetic and beta cell-protection activities of purple corn anthocyanins. *Biomol Ther* 2013; 21:284-9
- [17] Prior RL, Wilkes SE, Rogers TR, Khanal RC, Wu X, Howard LR. Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *J Agric Food Chem* 2010; 58:3970-6.
- [18] Guo H, Ling W, Liu C, Hu Y, Xia M, Feng, X. et al. Effect of anthocyanin rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2007; 62:1-6.
- [19] Seymour EM, Singer AMA, Kirakosyan A, Urcuyo-Llanes DE, Kaufman P B, Bolling SF. Altered hyperlipidemia, hepatic steatosis, and hepatic peroxisome proliferator-activated receptors in rats with intake of tart cherry. *J Med Food* 2008; 11:252-9.

- [20] Liu Y, Li D, Zhang Y, Sun R, Xia M. Anthocyanin increases adiponectin secretion and protects against diabetes-related endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; 306:E975-88.
- [21] Roy M, Sen S, Chakraborti AS. Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: Implication for glycation-induced hemoglobin modification. *Life Sci* 2008; 82:1102-10.
- [22] Feshani AM, Kouhsar SM, Mohammadi S. *Vaccinium arctostaphylos*, a common herbal medicine in Iran: molecular and biochemical study of its antidiabetic effects on alloxan-diabetic Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 2011; 133:67-74.
- [23] Jayaprakasam B, Vareed SK, Olson LK, Nair MG. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *J Agric Food Chem* 2005; 53:28-31.
- [24] Prior, RL, Wilkes SE, Rogers TR, Khanal RC, Wu X, Howard, LR. Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *J Agric Food Chem* 2010; 58:3970-6.
- [25] Broughton WG, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J, 2003: Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant Soil* 2003; 252:55-128.
- [26] Wu X, Prior RL. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. *J Agric Food Chem* 2005; 53:3101-13.
- [27] Jordheim M, Fossen T, Andersen ØM. Preparative isolation and NMR characterization of carboxypyrananthocyanins. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 3572-7.
- [28] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>; 2014.

- [29] Hernández-Saavedra D, Mendoza-Sánchez M, Hernández-Montiel HL, Guzmán-Maldonado HS, Loarca-Piña GF, Salgado LM, Reynoso-Camacho R. Cooked common beans (*Phaseolus vulgaris*) protect against β -cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2013; 68:207-12.
- [30] Papanikolaou Y, Fulgoni III VL. Bean consumption is associated with greater nutrient intake, reduced systolic blood pressure, lower body weight, and a smaller waist circumference in adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *J Am Coll Nutr* 2008; 27:569-76.
- [31] Oomah, BD, Corbé A, Balasubramanian P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. *J Agric Food Chem* 2010; 58:8225-30.
- [32] Aparicio-Fernández X, Reynoso-Camacho R, Castaño-Tostado E, García-Gasca T, de Mejía EG, Guzmán-Maldonado SH, Elizondo G, Yousef GG, Lila MA, Loarca-Pina G. Antiradical capacity and induction of apoptosis on HeLa cells by a *Phaseolus vulgaris* extract. *Plant Foods Hum Nutr* 2008; 63:35-40
- [33] Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-6.
- [34] Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* 1988; 175:408-13.
- [35] Leite AV, Malta LG, Riccio MF, Eberlin MN, Pastore GM, Marostica Junior MR. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *J Agric Food Chem* 2011; 59:2277-83.
- [36] Lenzen S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; 51:216-26.
- [37] Martineau LC, Couture, A, Spoor D, Benhaddou-Andaloussi A, Harris C, Meddah B, Leduc C, Burt A, Vuong T, Le PM, Prentkie M, Bennett SA, Arnason JT, Haddad PS. Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Phytomedicine* 2006; 13:612-23.

- [38] Sun CD, Zhang B, Zhang JK, Xu CJ, Wu YL, Li X, Chen KS. Cyanidin-3-glucoside-rich extract from Chinese bayberry fruit protects pancreatic β cells and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Med Food* 2012; 15:288-98.
- [39] Hong SH, Heo JI, Kim JH, Kwon SO, Yeo KM, Bakowska-Barczak AM, Kolodziejczyk P, Ryu OK, Choi MK, Kang YH, Lim SS, Suh HW, Sung Oh H, Lee JY. Antidiabetic and beta cell-protection activities of purple corn anthocyanins. *Biomol Ther* 2013; 21:284-9.
- [40] Lee JS, Kim,YR, Song IG, Ha SJ, Kim YE, Baek NI, Hong EK. Cyanidin-3-glucoside isolated from mulberry fruit protects pancreatic β -cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Int J Mol Med* 2015; 35:405-12.
- [41] Grace MH, Ribnicky DM, Kuhn P, Poulev A, Logendra S, Yousef GG, Raskin I, Lila MA. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine* 2009; 16:406-15.
- [42] Ataie-Jafari A, Hosseini S, Karimi F, Pajouhi M. Effects of sour cherry juice on blood glucose and some cardiovascular risk factors improvements in diabetic women: A pilot study. *Nutr Food Sci* 2008; 38:355-60.
- [43] Basu A, Wilkinson M, Penugonda K, Simmons B, Betts NM, Lyons TJ. Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutr J* 2009; 8:1-7.
- [44] Sun CD, Zhang B, Zhang JK, Xu CJ, Wu YL, Li X, Chen KS. Cyanidin-3-glucoside-rich extract from Chinese bayberry fruit protects pancreatic β cells and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Med Food* 2012; 15:288-98.
- [45] Hamadi N, Mansour A, Hassan MH, Khalifi-Touhami F, Badary O. Ameliorative effects of resveratrol on liver injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2012; 26:384-92.

- [46] Jayaprakasam B, Olson LK, Schutzki RE, Tai MH, Nair MG. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*). J Agric Food Chem 2006; 54: 243-48.
- [47] Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. Lancet 2006; 368:1696-705.
- [48] Mogenson CE, Christensen CK. Blood pressure changes and renal functions in incipient and over diabetic nephropathy. Hypertension 1985; 7:1164-8.
- [49] Giboney, P. T. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. Am Fam Physician 2005; 71:1105-10.
- [50] Kumar S, Kumar V, Prakash O. Antidiabetic, hypolipidemic and histopathological analysis of *Dillenia indica* (L.) leaves extract on alloxan induced diabetic rats. Asian Pac J Trop Med 2011; 4:347-52.
- [51] Ramachandraiahgari RMY, Somesula SR, Adi PJ, Mannur IS, Enamala M, Matcha B. Protective role of ethanolic extract of *Aloe vera* antioxidant properties on liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. Dig J Nanomater Bios 2012; 7:175-84.
- [52] Stadler K, Jenei V, von Bölcsházy G, Somogyi A, Jakus J. Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes. Free Radic Biol Med 2003; 35:1240-51.
- [53] Merzouk S, Hichami A, Sari A, Madani S, Merzouk H, Yahia Berrouiguet A, Lenoir-Rousseaux JJ, Chabane-Sari N, Khan NA. Impaired oxidant/antioxidant status and LDL-fatty acid composition are associated with increased susceptibility to peroxidation of LDL in diabetic patients. Gen Physiol Biophys 2004; 23:387-99.
- [54] Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL}) of plasma and other biological and food samples. J Agric Food Chem 2003; 51:3273-9.

- [55] Cao G, Russell RM, Lischner N, Prior RL. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J Nutr* 1998; 128:2383-90.
- [56] Harasym J, Oledzki R. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. *Nutrition* 2014; 30:511-17.
- [57] Mazza G, Kay CD, Cottrell T, Holub BJ. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J Agric Food Chem* 2002; 50:7731-37.

CONCLUSÃO GERAL

Os alimentos ricos em compostos bioativos têm merecido um interesse continuado e crescente no âmbito da Ciência dos Alimentos. Grande parte dos estudos tem sido realizada com frutas, temperos e especiarias. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as cascas de feijão também apresentam essa atividade, através de compostos com importantes propriedades antioxidantes e antidiabéticas.

O estudo com dois diferentes tipos de feijão demonstrou que a variedade exerce forte influência na composição de polifenóis. Enquanto o extrato de casca de feijão preto apresentou maiores concentrações de antocianinas e taninos condensados, o de feijão roxinho exibiu maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides. De um modo geral, a digestão *in vitro* provocou redução nas concentrações das diversas classes de compostos de ambas as variedades. No entanto, a atividade antioxidante foi mantida ou aumentada após esse processo. Esses resultados sugerem que a liberação e/ou transformação de compostos durante a digestão preservaram a capacidade antioxidante dos extratos.

A purificação parcial do extrato de casca de feijão preto produziu um extrato rico em antocianinas, no qual foram identificadas: delphinidina 3-glicosídeo, petunidina 3-glicosídeo e malvidina 3-glicosídeo. Quando submetido à digestão *in vitro*, esse extrato teve os teores de antocianinas e a atividade antioxidante reduzidos, evidenciando a instabilidade das antocianinas em condições fisiológicas e sugerindo que a degradação destes compostos foi responsável pelo decréscimo da atividade antioxidante.

O extrato rico em antocianinas apresentou efeitos biológicos positivos apenas em determinadas circunstâncias, porém não revelou, através das análises empregadas, efeitos adversos. No ensaio *in vivo*, a utilização do extrato de forma preventiva, embora não tenha evitado o surgimento do diabetes, reduziu a

hiperglicemia, permitiu o ganho de peso e diminuiu a intensidade das lesões pancreáticas, renais e hepáticas. Por outro lado, quando administrado após a indução da doença, ele não propiciou a melhora do estado geral dos animais, nem dos demais parâmetros avaliados.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento de novas pesquisas que aprimorem a compreensão dos mecanismos envolvidos nas atividades biológicas dos compostos de casca de feijão se faz necessário, de forma a dar continuidade ao presente estudo.

Os resultados obtidos permitem considerar o potencial de investigações complementares sobre o tema, a saber:

- Identificação dos compostos presentes nos extratos brutos de casca de feijão antes e após a digestão *in vitro* e após a fermentação colônica, bem como a avaliação da atividade antioxidante dos compostos identificados.
- Identificação dos produtos de degradação formados após a digestão *in vitro* e após a fermentação colônica do extrato rico em antocianinas.
- Investigação da ação do extrato rico em antocianinas em modelos experimentais de resistência à insulina e diabetes tipo 2.
- Avaliação da ação de diferentes dosagens de extrato, em períodos de tratamento mais prolongados, para determinar os eventuais efeitos a médio e longo prazo.

ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação das propriedades antioxidantes e antidiabéticas de extrato de casca de feijão administrado em ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*)" (protocolo nº 2975-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore / Renata Aparecida Soriano Sancho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 04 de fevereiro de 2013.

Campinas, 04 de fevereiro de 2013.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Afonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>