TMUP
79
2005

U.PORTO

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E BIOLÓGICAS DE PROCIANIDINAS OLIGOMÉRICAS. CARACTERIZAÇÃO ANTIOXIDANTE DE PIGMENTOS ANTOCIÂNICOS.

ANA ISABEL GONÇALVES FARIA

OUTUBRO 2005

QD255.4
FARa P
2005


Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
D000065017

13/1/06

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E BIOLÓGICAS DE PROCIANIDINAS OLIGOMÉRICAS. CARACTERIZAÇÃO ANTIOXIDANTE DE PIGMENTOS ANTOCIÂNICOS.

Tese Submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para obtenção do grau de Mestre em Química

UNIVERSIDADE DO PORTO
BIBLIOTECA
Sala
Coloc. ITHUP-79
N.º 9112
Depart. Química

ANA ISABEL GONÇALVES FARIA

OUTUBRO 2005

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível devido à ajuda imprescindível de muitas pessoas que quero aqui lembrar:

Queria agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Nuno Mateus, pelo apoio, iniciativa e alegria que demonstrou durante estes dois anos. Um muito obrigada especial pois sem o seu impulso e motivação provavelmente não teria realizado este trabalho.

Queria agradecer ao Professor Doutor Victor Freitas pela partilha das suas opiniões e conhecimentos, fazendo com que o caminho a percorrer fosse menos difícil.

Gostaria de deixar uma palavra de apreço muito especial para o Boss, a Cátia e a Joana. Foram eles que estiveram sempre ao meu lado quando as coisas corriam bem e quando as coisas não corriam tão bem. Eles enriqueceram-me como pessoa e como cientista.

Não posso deixar de mencionar e agradecer a todas as pessoas com quem tive o prazer de conviver no Departamento de Química. A todos eles, obrigada pelos bons momentos que proporcionaram.

Uma referência especial à Dra. Adelina que, da sua forma muito característica, foi sempre disponível e prestável aos nossos pedidos.

Um agradecimento muito especial à Professora Doutora Conceição Calhau pela motivação, entusiasmo, disponibilidade e energia contagiante com que abraçou esta cooperação. Muito obrigada por todos os ensinamentos que me transmitiu.

Não posso deixar de agradecer também à Professora Doutora Isabel Azevedo pela forma como me recebeu, pela simpatia e disponibilidade demonstrada e pela sua abertura a esta cooperação.

Queria agradecer de forma especial à Rosário, à Susana à Brigite, à Joana e ao João por terem tornado a minha integração tão fácil e por se terem mostrado sempre disponíveis para me ajudarem. Um obrigada muito carinhoso também para a Luísa por toda a atenção e ajuda que me prestou.

A todas as pessoas que trabalham no Serviço de Bioquímica da Faculdade de Medicina por me terem recebido de braços abertos e terem tornado a minha estadia tão agradável.

Não podia deixar passar sem agradecer ao Professor Doutor Vítor Costa e à Dr. Amélia por todo o incentivo e conhecimento que deram para este trabalho. Obrigada por me terem ajudado a ultrapassar as primeiras barreiras encontradas.

Um reconhecido agradecimento à Patrícia e à Professora Doutora Paula Gameiro, por toda a disponibilidade e interesse demonstrado por este trabalho.

Gostaria também de agradecer ao iBeSa pelo apoio financeiro cedido a este projecto e em especial ao Eng. Machado Cruz por toda a confiança depositada neste projecto.

Não posso deixar de agradecer à minha família, especialmente à Sara e ao Ricardo por todo o entusiasmo que sempre me transmitiram. Foram muitas vezes fontes de ânimo.

Um agradecimento muito, muito especial aos meus pais. Só eles tornaram possível este trabalho. Obrigada pela compreensão, pela disponibilidade para me ouvirem e ajudarem e por todo o interesse, que mesmo sem perceberem, mostraram pelo meu trabalho.

Por fim, e porque os últimos são os primeiros, ao Zé por estar sempre ao meu lado, mesmo quando está longe. Sem ti não tinha conseguido.

Agora um pedido de desculpas, pois muitas vezes as palavras não são suficientes para nos transmitir o que nos vai na alma.

OBJECTIVO

Este trabalho teve como principal objectivo conhecer e caracterizar algumas propriedades biológicas de compostos polifenólicos, nomeadamente procianidinas e pigmentos antociânicos.

Os compostos polifenólicos são muito abundantes na natureza e a presença destes compostos nos alimentos e nas bebidas, nomeadamente no vinho tinto, tem sido associada a benefícios para a saúde especialmente pela actividade antioxidante que estes compostos têm apresentado. Neste trabalho pretendeu-se caracterizar a actividade antioxidante de alguns compostos que estão presentes no vinho tinto, nomeadamente as procianidinas. Numa outra perspectiva foi também estudado a influência das procianidinas sobre o crescimento de uma linha celular do cancro da mama. Adicionalmente foi avaliado o efeito de procianidinas na modulação da absorção de catiões orgânicos, de forma a conhecer qual o seu efeito na ingestão concomitante com outros alimentos ou fármacos. Também se pretendeu com estes dois últimos objectivos relacionar o possível efeito das procianidinas com a sua complexidade estrutural.

Numa outra parte deste trabalho pretendeu-se igualmente caracterizar a actividade antioxidante de alguns pigmentos antociânicos. Estes compostos polifenólicos são importantes pelas suas propriedades cromáticas, constituindo corantes naturais interessantes para aplicações na indústria alimentar.

RESUMO

Resumo

As procianidinas foram extraídas de grainha de uva e fraccionadas de acordo com o seu grau de complexidade, tendo-se obtido cinco fracções distintas. Recorrendo a métodos espectrofotométricos como o DPPH e o FRAP, e à monitorização do consumo de oxigénio e à monitorização da formação de dienos conjugados de vesículas de fosfatidilcolina utilizando o AAPH como iniciador, avaliou-se a capacidade antioxidante das fracções de procianidinas, relacionando-a com a sua complexidade estrutural. Avaliou-se também o efeito destas mesmas fracções na viabilidade e proliferação celular, recorrendo para isso a uma linha tumoral de carcinoma mamário. Por fim, estudou-se o efeito destas fracções de procianidinas na modulação da absorção de catiões orgânicos, utilizando o MPP^+ como modelo de catião e as células Caco-2 como modelo de linha celular de epitélio intestinal. Verificou-se que as fracções de procianidinas têm uma elevada capacidade antioxidante, e que esta capacidade diminui com o aumento da complexidade estrutural. Esta diminuição é provavelmente devido a um aumento do tamanho das moléculas que se traduz num aumento dos impedimentos estereoquímicos. As fracções que apresentaram maior capacidade antioxidante foram aquelas com capacidade de inibir a viabilidade e proliferação celular. Adicionalmente, verificou-se que estas moléculas são capazes de modular a captação de catiões orgânicos ao nível do epitélio intestinal. Através do uso destes compostos foi também possível perceber que existem fenómenos de oxidação-redução responsáveis pela regulação dos transportadores envolvidos no transporte de catiões orgânicos de células Caco-2. Deste modo, concluiu-se que a ingestão de procianidinas pode ter vantagens para a saúde humana uma vez que têm uma elevada capacidade antioxidante, além de poderem estar envolvidas na inibição da proliferação de células tumorais. Além disso podem exercer uma acção importante quando ingeridas concomitantemente com outras substâncias, sejam elas nutrientes, fármacos ou compostos tóxicos.

Numa segunda parte deste trabalho avaliou-se a actividade antioxidante de pigmentos antociânicos presentes no vinho. Estes pigmentos têm despertado muito interesse pois são pigmentos naturais com cores pouco vulgares na natureza. Através da utilização das mesmas técnicas, foram avaliados extractos de antocianinas (extracto A) e de pigmentos antociânicos derivados de mirtilo, e ainda antocianinas puras. Os dois extractos de pigmentos antociânicos continham essencialmente derivados pirúvicos de antocianinas (extracto B) e portisinas (extracto C) Os resultados revelaram extracto C possui uma

actividade antioxidante muito superior aos outros dois. Este facto está directamente relacionado com a estrutura química das moléculas, que é muito estabilizada no caso dos pigmentos do extracto C devido a extensas deslocalizações electrónicas. Verificou-se também que o padrão de glucosilação e metoxilação dos pigmentos está relacionado com a actividade antioxidante apresentada pelos compostos.

Abstract

Polyphenol compounds are widespread in nature and the presence of some of these compounds (*e.g.* flavanols, flavonols) in foodstuff and beverages such as red wine has been often associated to potential benefits to human health, especially for the antioxidant activity they have shown. In this work the antioxidant activity of some compounds present in wines was examined. Procyanidins were extracted from grape seed and fractionated according to their complexity degree. Antioxidant activity of procyanidin fractions was evaluated using DPPH and FRAP methods, and the ability of these compounds to inhibit lipid peroxidation induced by AAPH in a liposomal membrane system was evaluated using oxygen consumption and conjugated diene formation monitorization. The antioxidant activity was related with their structural complexity. In addition, MTT reduction and DNA synthesis were measured in MCF-7, a human breast cancer cell line, treated with procyanidin fractions and the monomer catechin, in order to evaluate the effect of these compounds on cell viability and proliferation. Moreover, the effect of these compounds in modulation of organic cations absorption was assessed. For this purpose, ^{3}H-MPP^{+} was used as an organic cation model and Caco-2 cells (an enterocyte-like cell line derived from a human colonic adenocarcinoma) as a cell model. Procyanidin fractions presented high antioxidant activity that increased with the structural complexity of the procyanidins (degree of polymerisation), but seemed to be reduced in the case of procyanidins with a degree of polymerisation beyond three flavanol units, probably due to stereochemical hindrance. Procyanidin fractions that exhibited higher antioxidant activity were the ones capable of inhibiting cell viability and proliferation. Additionally, it was found that these compounds modulate organic cations absorption in intestinal epithelium and that apical transport of MPP^{+} in Caco-2 cells may be modulated by oxidation-reduction phenomenon. Procyanidins intake can be advantageous for human health because of their high antioxidant activity, aside from their role in inhibition of cell proliferation. Moreover, concomitant ingestion of procyanidin and other substances such as nutrients, drugs or toxics should be taken into account.

In a second part of this work antioxidant activity of anthocyanin-derived pigments present in wine was evaluated. The major interest on these anthocyanin-derived pigments lies in their unusual colours in acidic conditions (more orange and bluish hues) even though arising from natural precursors. The antioxidant activity of

anthocyanin (extract A) and anthocyanin-derived pigment extracts was assessed using the same methods. The two anthocyanin-derived extracts were mainly comprised of anthocyanin-pyruvic acid adducts (extract B) and portisins (extract C). Extract C was found to have the highest antioxidant capacity that could be a result of the extended conjugation of π electrons in these pigments' structures. It was also found that the glicosilation and methoxilation pattern is directly related to the antioxidant activity displayed by these compounds.

Résumé

Les composés phénoliques sont commun dans la nature et la présence de certains de ces composés (comme par exemple les flavanols et flavonols) dans les aliments et boissons telles que le vin rouge, a été souvent associée aux avantages potentiels à la santé humaine, particulièrement dus à l'activité antioxydante que ces composés ont montrés. Dans ce travail, l'activité antioxydante de certains composés présents dans le vin a été examinée. Les procyanidines ont été extraites à partir de la graine de raisin et fractionnées selon leur degré de complexité structurale. L'activité antioxydante des fractions de procyanidines ainsi obtenues a été évaluée en utilisant les méthodes de DPPH, FRAP, consommation d'oxygène et formation de dièns conjugués, et associée avec leur complexité structurale. En outre, la réduction de MTT et la synthèse d'ADN ont été mesurées avec une ligne Mcf-7, une ligne humaine de cellules de cancer de sein, traitée avec les fractions de procyanidines et avec la catéchine, afin d'évaluer l'effet de ces composés sue la viabilité de cellules et leur prolifération. Finalement, l'effet de ces composés dans la modulation de l'absorption organique de cations a également été évalué. Pour cela, ^{3}H-MPP^{+} a été employé en tant que modèle organique de cation et les cellules Caco-2 (ligne enterocyte de cellules dérivée d'un adénocarcinome du côlon humain) comme modèle de cellules. Les fractions de procyanidines ont présenté une activité antioxydante élevée qui a augmenté avec la complexité structurale des procyanidines (degré de polymérisation) Cependant, cette activité semble être réduite dans le cas des procyanidines avec un degré de polymérisation au delà de trois unités de flavanol, probablement dû à des encombrements stéréochimiques. Les fractions de procyanidines qui ont montré une activité antioxydante plus élevée étaient celles capables de diminuer la viabilité cellules et la prolifération. En plus, on a constaté que ces composés modulent l'absorption organique de cations dans l'épithélium intestinal et que le transport apical de MPP^{+} en cellules Caco-2 peut être modulé par phénomène d'oxydation/réduction. Un régime alimentaire contenant des procyanidines peut être avantageux pour la santé humaine en raison de leur activité antioxydante élevée, hormis leur rôle dans l'inhibition de la prolifération de cellules. D'ailleurs, l'ingestion concomitante de procyanidines et d'autres substances telles que des aliments, des drogues ou des produits toxiques devrait être prise en considération.

Dans une deuxième partie de ce travail, l'activité antioxydante de pigments dérivés d'anthocyanes a été évaluée. L'intérêt principal de l'utilisation de ces colorants se tient

sur leurs couleurs peu communes en conditions acides (des tonalités plus oranges et plus bleuâtres) quoique résultant de précurseurs naturels. L'activité antioxydante d'extraits anthocyaniniques (extrait A) et d'extraits de dérivés anthocyaniniques (extrait B et C) a été évaluée en utilisant les mêmes méthodes. L'extrait B contenait essentiellement des dérivés pyruviques des anthocyanes, tandis que l'extrait C contenait essentiellement des vinylpiranoanthocyane-catéchines nommées Portisines. Ce dernier extrait s'est avéré pour avoir la capacité antioxydante la plus élevée. Ce résultat pourrait être du à la grande conjugaison des électrons π dans la structure de ces pigments. On a également constaté que le degré de glicosilation et de methoxilation est directement lié à l'activité antioxydante présentée par ces composés.

ÍNDICES

Índice Geral

Índice de Figuras 27
Índice de Tabelas 33

Introdução Geral

1 Características Gerais dos Polifenóis 41

1.1 Estrutura dos Principais Flavonóides 42
1.2 3- Flavanóis 43
1.2.1 Proantocianidinas 44
1.2.2 Ocorrência e biodisponibilidade dos 3-flavanóis 48
1.2.3 Importância biológica dos 3-flavanóis 50
1.3 Antocianinas 52
1.3.1 Ocorrência e biodisponibilidade das antocianinas 52
1.3.2 Importância biológica das antocianinas 53

2 Propriedades Antioxidantes dos Polifenóis 54

2.1 Caracterização de Antioxidantes 55
2.2 Espécies Reactivas de Oxigénio 55
2.3 Mecanismos de Acção Antioxidante dos Flavonóides 57

Parte I - Procianidinas: Caracterização da actividade antioxidante e de algumas propriedades biológicas

Capítulo 1 – Propriedades antioxidantes de compostos antioxidantes padrão

1 Introdução 67

1.1 Substrato 67
1.2 Iniciador 71
1.3 Técnicas de análise 71
1.3.1 DPPH 72
1.3.2 FRAP 73
1.3.3 Consumo de oxigénio 74
1.3.4 Formação de dienos conjugados 74

1.4 Antioxidantes 74

2 Material e Métodos 77

2.1 Reagentes 77
2.2 Avaliação da Capacidade Antiradicalar 77
2.3 Avaliação do Poder Redutor 77
2.4 Preparação de Lipossomas 78
2.4.1 Doseamento de Lipossomas 78
2.5 Procedimento de Peroxidação Lipídica 79
2.6 Monitorização do Consumo de Oxigénio 79
2.7 Monitorização da Formação de Dienos Conjugados 80
2.8 Análise Estatística 81

3 Resultados e Discussão 83

3.1 Compostos Antioxidantes Padrão 83
3.1.1 Avaliação da capacidade antiradicalar e do poder redutor 83
3.1.2 Avaliação da actividade antioxidante na peroxidação lipídica 85

4 Conclusão 88

Capítulo 2 – Propriedades antioxidantes de procianidinas extraídas de grainha de uva

1 Introdução 90

2 Material e Métodos 93

2.1 Preparação das procianidinas oligoméricas de grainhas de uva 93
2.1.1 Extracção das procianidinas das grainhas de uva 93
2.1.2 Fraccionamento das procianidinas por cromatografia em coluna .. 94
2.1.3 Análise das fracções de procianidinas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) 95
2.2 Caracterização da actividade antioxidante das fracções de procianidinas . 95
2.3 Análise Estatística 82

3 Resultados e Discussão 97

3.1 Caracterização das fracções de procianidinas 97

3.2 Caracterização da actividade antioxidante das fracções de procianidinas . 99
3.2.1 Avaliação da capacidade antiradicalar e do poder redutor 99
3.2.2 Avaliação da actividade antioxidante na peroxidação lipídica..... 100

4 Conclusão 102

Capítulo 3 – Efeito das procianidinas na proliferação tumoral

1 Introdução 104

2 Material e Métodos 107

2.1 Reagentes 107
2.2 Células e Condições de Cultura 107
2.3 Determinação da Viabilidade Celular 107
2.4 Síntese de ADN: Incorporação de Timidina-^{3}H 108
2.5 Análise Estatística 108

3 Resultados e Discussão 110

4 Conclusão 113

Capítulo 4 – Efeito das procianidinas no transporte intestinal de catiões orgânicos

1 Introdução 117

2 Material e Métodos 120

2.1 Reagentes 120
2.2 Células e Condições de Cultura 120
2.3 Estudos de Transporte 121
2.4 Determinação de Proteínas 121
2.5 Determinação da Viabilidade Celular 121
2.6 Análise Estatística 122

3 Resultados e Discussão 123

Determinação da viabilidade celular 131

4 Conclusão 132

Parte II – Pigmentos Antociânicos: Caracterização da actividade antioxidante

Capítulo 1 – Caracterização estrutural e propriedades antioxidantes de extractos de mirtilo preparados

1 Introdução 139

2 Material e Métodos 141

2.1 Reagentes 141

2.2 Extractos de pigmentos 141

2.2.1 Preparação dos extractos de mirtilo 121

2.2.2 Análise dos extractos de mirtilo por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) 141

2.2.3 Análise dos extractos de mirtilo por LC-MS 142

2.2.4 Análise dos extractos por UV-Vis 122

2.2.5 Fenóis totais 122

2.2.6 Flavonóides totais 123

2.2.7 Pigmentos Totais 123

2.3 Caracterização antioxidante dos extractos de pigmentos 143

2.4 Análise Estatística 123

3 Resultados e Discussão 145

3.1 Caracterização estrutural e polifenólica dos extractos 145

3.2 Caracterização da actividade antioxidante dos extractos 149

3.2.1 Avaliação da capacidade antiradicalar e do poder redutor 149

3.2.2 Avaliação da actividade antioxidante na peroxidação lipídica 150

4 Conclusão 153

Capítulo 2 – Caracterização de propriedades antioxidantes de pigmentos derivados de antocianinas

1 Introdução 157

2 Material e Métodos 159

2.1 Reagentes 159
2.2 Caracterização antioxidante de pigmentos 159
2.3 Análise Estatística 137

3 Resultados e Discussão 160

3.1 Pigmentos derivados de antocianinas 160
3.1.1 Avaliação da capacidade antiradicalar e do poder redutor 160
3.1.2 Avaliação da actividade antioxidante na peroxidação lipídica 161
3.1.3 Comparação entre as propriedades antioxidantes da cianidina e malvidina 163

4 Conclusão 166

Conclusão Geral 167

Lista de Referências Bibliográficas 171

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura e sistema de numeração do núcleo flavânico. **42**

Figura 2 – Estrutura dos compostos mais representativos..... **43**

Figura 3 – Estrutura química geral de uma procianidina oligomérica. **44**

Figura 4 – Decomposição das proantocianidinas por aquecimento em meio ácido. Reacção de Bate-Smith (1954)..... **45**

Figura 5 – Estrutura de procianidinas diméricas do tipo B. **46**

Figura 6 – Estrutura de procianidinas triméricas do tipo C..... **46**

Figura 7 – Estrutura de procianidinas diméricas do tipo A. **47**

Figura 8 – Estrutura de uma procianidina esterificada com o ácido gálico (B2-3''-O-galato). **48**

Figura 9 – Estrutura das principais antocianidinas e sistema de numeração do catião flavílio **52**

Figura 10 – Mecanismo antioxidante de actuação de um flavonóide (Jovanovic *et al.*, 1994)..... **58**

Figura 11 – Representação esquemática de fosfatidilcolina com caudas de ácido linoleico e ácido oleico. **68**

Figura 12 – Esquema 3D de lipossomas..... **68**

Figura 13 – Esquema de diferentes tipos de lipossomas. **69**

Figura 14 – Mecanismos de peroxidação lipídica do ácido linoleico (LH, ácido linoleico; $L^{\bullet}$, radical alquilo (estruturas de ressonância); $LOO^{\bullet}$, radical peroxilo; LOOH, hidroperóxido com ligações duplas conjugadas; $In^{\bullet}$, radical iniciador; InH, forma reduzida do radical iniciador)..... **70**

Figura 15 – Térmolise do AAPH..... **71**

Figura 16 – Estrutura química do 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. **72**

Figura 17 – Redução do complexo de tripiridiltriazina férrica a tripiridiltriazina ferrosa. **73**

Figura 18 – Estrutura química da quercetina..... **75**

Figura 19 – Estrutura química do ácido cafeico. **75**

Figura 20 – Estrutura química do Trolox e do Ácido Ascórbico. **76**

Figura 21 – Monitorização do consumo de oxigénio na presença e ausência de antioxidante. Ti – Tempo de indução **80**

Figura 22 – Formação dos dienos conjugados na presença e ausência de antioxidantes. Ti – Tempo de indução **81**

Figura 23 – Capacidade antiradicalar (a) e poder redutor (b) de 10 μM do ácido ascórbico, ácido cafeico, (+)-catequina, (-)-epicatequina e quercetina, avaliada pelos métodos do DPPH e FRAP respectivamente. Resultados expressos em μM de Trolox. * P <0,05 ..... **84**

Figura 24 – Oxidação do grupo *orto*-catecol presente em flavonóides (Fernandez *et al.*, 2002) **85**

Figura 25 – Inibição da oxidação de lipossomas de fosfatidilcolina de soja por 1,25 μM de ácido ascórbico, ácido cafeico, (+)-catequina, (-)-epicatequina e quercetina monitorizada pelo consumo de oxigénio (a) e formação de dienos conjugados (b). Os resultados são expressos como a razão do tempo de inibição pelo tempo de inibição obtido com o Trolox. * P <0,05 ..... **86**

Figura 26 – Cromatograma de HPLC (Abs 280 nm) da Fracção I extraída do extracto de grainhas de uva obtido por cromatografia em gel TSK Toyopearl HW – 40 (S).. ..... **97**

Figura 27 – Cromatograma HPLC (Abs 280 nm) da Fracção II extraída do extracto de grainhas de uva obtido por cromatografia em gel TSK Toyopearl HW-40 (S).. ..... **98**

Figura 28 – Cromatograma HPLC (Abs 280 nm) da Fracção III extraída do extracto de grainhas de uva obtido por cromatografia em gel TSK Toyopearl HW-40 (S).. ..... **98**

Figura 29 – Capacidade antiradicalar (a) e poder redutor (b) de 2,5 μg/mL de fracções de procianidinas, avaliada pelos métodos do DPPH e FRAP respectivamente. Resultados expressos em μM de Trolox. * P <0,05 .... **100**

Figura 30 – Inibição da oxidação de lipossomas de fosfatidilcolina de soja por 313 ng/mL de fracções de procianidinas de grainhas de uva, monitorizada pelo consumo de oxigénio (a) e formação de dienos conjugados (b). Os resultados são expressos como a razão do tempo de inibição pelo tempo de inibição obtido com Trolox. * P <0,05 ..... **101**

Figura 31 – Efeito da catequina e das fracções de procianidinas na viabilidade **(a)** e síntese de ADN **(b)** das células MCF-7, tratadas com estes compostos durante 48 h. As células MCF-7 foram tratadas na presença de catequina ou das fracções de procianidinas (FI-FV; 30 μg/mL ou 60 μg/mL) ou na ausência (controlo). Cada valor representa média ± SEM *P <0,05 (aumento ou decréscimo significativo *vs* respectivo controlo). **111**

Figura 32 – Estrutura química do MPP^+ (1-metil-4-fenilpiridínio). **119**

Figura 33 – Efeito de diferentes concentrações (6; 60; 600 µg/mL) de fracções de procianidinas (FI-FV; Fracção I – Fracção V) na captação apical de MPP^+-[^{3}H] nas células Caco-2. As monocamadas confluentes de Caco-2 foram pré-incubadas a 37 ºC durante 60 min e posteriormente incubadas com 200 nM MPP^+-[^{3}H] durante 5 min, na presença de EtOH (controlo) ou dos compostos testados. Cada valor representa média ± SEM (n=3-27). **123**

Figura 34 – Efeito de 600 µg/mL de fracções de procianidinas na captação apical de MPP^+-[^{3}H] nas células Caco-2. As monocamadas confluentes de Caco-2 foram pré-incubadas a 37 ºC durante 3, 20 e 60 min e posteriormente incubadas com 200 nM MPP^+-[^{3}H] durante 5 min, na presença de EtOH (controlo) ou dos compostos testados. Cada valor representa média ± SEM (n=3-27) $*P$ <0,05 (aumento ou decréscimo significativo *vs* respectivo controlo). **125**

Figura 35 – Efeito das fracções de procianidinas (I-V) na concentração de 600 µg/mL, na captação apical de MPP^+-[^{3}H] nas células Caco-2. As monocamadas confluentes de Caco-2 foram pré-incubadas a 37 ºC durante 60 min e durante 3 min com as procianidinas oxidadas. Seguidamente, as células foram incubadas com 200 nM MPP^+-[^{3}H] durante 5 min, na presença de EtOH (controlo) ou dos compostos testados. Cada valor representa média ± SEM (n=3-27). $*P$ <0,05 (aumento ou decréscimo significativo *vs* respectivo controlo). **126**

Figura 36 – Sequência de aminoácidos dos transportadores hOCT1 (a) e hEMT (b). Os domínios transmembranares encontram-se a sublinhado e os resíduos de cisteína destes domínios estão destacados a cinzento. Os resíduos de cisteína pertencentes aos domínios extracelulares encontram-se destacados a vermelho e os mesmos resíduos intracelulares a amarelo. **128**

Figura 37 – Esquema explicativo do mecanismo de antiporte do MPP^+ na membrana apical de enterócitos; a- incubação com MPP^+ não marcado; b- antiporte de MPP^+ e MPP^+-[^{3}H]. **129**

Figura 38 – Esquema explicativo do efeito de procianidinas (P-Procianidinas) sobre o transporte apical (antiporte) de MPP^+, no epitélio intestinal; a – incubação com MPP^+ não marcado; b – incubação com MPP^+-[^{3}H] e procianidinas **131**

Figura 39 – Estrutura geral das antocianinas, Derivados Pirúvicos de antocianinas e vinilpiranoantocianina-catequinas (portisinas) presentes nos extractos A, B e C respectivamente, preparados a partir de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*). R1 e R2 são H, OH ou OMe. R3 é uma glucose, galactose ou arabinose. **140**

Figura 40 – Espectro UV-Vis do extracto A de mirtilo (λmáx=538 nm), extracto B de derivados pirúvicos de antocianinas (λmáx=531 nm) e extracto C de vinilpiranoantocianina-catequina (λmáx=586 nm)..... **145**

Figura 41 – Cromatograma de HPLC do extracto A preparado a partir de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) com detecção a 528 nm: (1) Delfinidina-3-Galactose, (2) Delfinidina-3-Glucose, (3) Cianidina-3-Galactose, (4) Delfinidina-3-Arabinose, (5) Cianidina-3-Glucose, (6) Petunidina-3-Galactose, (7) Cianidina-3-Arabinose, (8) Petunidina-3-Glucose, (9) Peonidina-3-Galactose, (10) Petunidina-3-Arabinose, (11) Peonidina-3-Glucose, (12) Malvidina-3-Galactose, (13) Peonidina-3-Arabinose, (14) Malvidina-3-Glucose, (15) Malvidina-3-Arabinose..... **146**

Figura 42 – Cromatograma de HPLC do extracto B de mirtilo após 5 dias de reacção com ácido pirúvico com detecção a 511 nm: (1) derivado pirúvico de Delfinidina-3-Galactose (ou Glucose), (2) derivado pirúvico de Delfinidina-3-Arabinose, (3) derivado pirúvico de Cianidina-3-Galactose (ou Glucose), (4) derivado pirúvico de Cianidina-3-Arabinose, (5) derivado pirúvico de Petunidina-3-Galactose (ou Glucose), (6) derivado pirúvico de Petunidina-3-Arabinose, (7) derivado pirúvico de Peonidina-3-Galactose (ou Glucose), (8) derivado pirúvico de Peonidina-3-Arabinose, (9) derivado pirúvico de Malvidina-3-Galactose, (10) derivado pirúvico de Malvidina-3-Glucose (11) derivado pirúvico de Malvidina-3-Arabinose..... **146**

Figura 43 – Cromatograma de HPLC do extracto C derivado de mirtilo, detectado a 570 nm: (1) Vinilpirano-Delfinidin-3-Galactose (ou Glucose)-Catequina, (2) Vinilpirano-Delfinidin-3-Glucose (ou Galactose)-Catequina, (3) Vinilpirano-Cianidina-3-Galactose ou Glucose)-Catequina, (4) Vinilpirano-Cianidin-3-Arabinose-Catequina, (5) Vinilpirano-Petunidina-3-Glucose (ou Galactose)-Catequina, (6) Vinilpirano-Petunidina-3-Arabinose-Catequina, (7) Vinilpirano-Peonidina-3-Galactose (ou Glucose)-Catequina, (8) Vinilpirano-Malvidini-3-Arabinose-Catequina, (9) Vinilpirano-Malvidina-3-Glucose (ou Galactose)-Catequina..... **147**

Figura 44 – Capacidade antiradicalar (a) e poder redutor (b) de 2,5 μg/mL de extractos de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) avaliada pelos métodos do DPPH e FRAP respectivamente. Resultados expressos em μM de Trolox. * P <0,05..... **150**

Figura 45 – Consumo de oxigénio durante a oxidação de lipossomas de fosfatidilcolina de soja (340 μM) induzido por AAPH (10 mM) na ausência de antioxidantes e presença dos extractos preparados de mirtilo. Ti – Tempo de indução..... **151**

Figura 46 – Inibição da oxidação de lipossomas de fosfatidilcolina de soja por 667 ng/mL de extractos preparados de mirtilo, monitorizada pelo consumo de oxigénio (a) e de 300 ng/mL dos mesmos extractos na formação de dienos conjugados (b). Os resultados são expressos como a razão do

tempo de inibição pelo tempo de inibição obtido com Trolox. * *P* <0,05 ..... **152**

Figura 47 – Estrutura química dos derivados da cianidina testados..... **158**

Figura 48 – Estrutura química da cianidina e da malvidina. R_1= H ou açúcar..... **158**

Figura 49 – Capacidade antiradicalar (a) e poder redutor (b) de 10 μM de cianidina, cianidina-3-glucósido e seus derivados avaliada pelos métodos do DPPH e FRAP respectivamente. Resultados expressos em μM de Trolox. * *P* <0,05..... **160**

Figura 50 – Inibição da oxidação de lipossomas de fosfatidilcolina de soja por 1,25 μM de cianidina e seus derivados, monitorizada pelo consumo de oxigénio (a) e de 2,5 μM dos mesmos compostos na formação de dienos conjugados (b). Os resultados são expressos como a razão do tempo de inibição pelo tempo de inibição obtido com Trolox. * *P* <0,05 ..... **162**

Figura 51 – Capacidade antiradicalar (a) e poder redutor (b) de 10 μM de cianidina, malvidina e seus glucósidos avaliada pelos métodos do DPPH e FRAP respectivamente. Resultados expressos em μM de Trolox. Resultados expressos em μM equivalentes de Trolox. * *P* <0,05..... **164**

Figura 52 – Inibição da oxidação de lipossomas por 1,25 μM de cianidina, malvidina e seus glucósidos, monitorizada pelo consumo de oxigénio (a) e de 2,5 μM dos mesmos compostos na formação de dienos conjugados (b). Os resultados são expressos como a razão do tempo de inibição pelo tempo de inibição obtido com Trolox. * *P* <0,05. ..... **165**

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Teor em procianidinas de alguns alimentos comuns. Os valores representam médias ± desvio padrão e estão em mg/100 mg de peso fresco ou mg/L para as bebidas (Adaptado de Gu *et al.*, 2004). **49**

Tabela 2 – Espécies Reactivas de Oxigénio relevantes (Adaptado de Halliwell, 1995) **56**

Tabela 3 – Diferentes métodos *in vitro* que medem e/ou prevêem índices de actividade antioxidante (Adaptado de Aruoma *et al.*, 2003). **72**

Tabela 4 – Esquema de tempo de recolha das diferentes fracções (Freitas *et al.*, 1998). **94**

Tabela 5 – Gradiente de eluição usado no HPLC/DAD na análise das fracções de procianidinas. **95**

Tabela 6 – Composição fenólica esperada e peso molecular médio das fracções de procianidinas obtidas. **99**

Tabela 7 – Efeito da catequina (600 μg/mL) na captação apical de MPP^+-[^{3}H] nas células Caco-2. As monocamadas confluentes de Caco-2 foram incubadas com 200 nM MPP^+-[^{3}H] durante 5 min, na presença de EtOH (controlo) ou dos compostos testados. Cada valor representa média ± SEM (n=3-27). **P* <0,05 (aumento ou decréscimo significativo *vs* respectivo controlo). **129**

Tabela 8 – Efeito da catequina, fracção I e fracção II (600 μg/mL) na captação apical de MPP^+-[^{3}H] nas células Caco-2. As monocamadas confluentes de Caco-2 foram pré-incubadas com 100 μM de MPP^+ não marcado, e posteriormente incubadas com 200 nM MPP^+-[^{3}H]durante 5 min, na presença de EtOH (controlo) ou dos compostos testados. Cada valor representa média ± SEM (n=3-27). **P* <0,05 (aumento ou decréscimo significativo *vs* respectivo controlo). **130**

Tabela 9 – Análise das antocianinas presentes no extracto A, por LC/MS. **147**

Tabela 10 – Análise dos derivados pirúvicos (py) presentes no extracto B, por LC/MS. **148**

Tabela 11 – Análise dos pigmentos vinilpiranoantocianina-catequina (cat) (portisinas) presentes no extracto C. **148**

Tabela 12 – Conteúdo de fenóis totais, flavonóides totais e pigmentos totais, de um extracto de mirtilo (A) (*Vaccinium myrtillus*) e os seus respectivos extractos de aducto de ácido pirúvico (B) e vinilpiranoantocianina-catequina (C). Os valores das médias estão seguidos de símbolos que são diferentes quando os valores das colunas diferem entre si *P* <0,05. ..... **149**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

[^{3}H] – trício (radiação *beta*)

AAPH – *hidrocloreto de (2,2'-azobis(2-metilpropanimidamida)*, (2,2'-azobis(2-methylpropanimidamide) dihydrochloride)

Abs – absorvância

ADN – ácido 2-desoxirribonucleico

ASF – *amphiphilic solute facilitator*, (facilitador de solutos anfifílicos)

Caco-2 – células derivadas de carcinoma de cólon humano com diferenciação enterocítica

cy – cianidina

cy-3-gluc – cianidina-3-glucósido

cy-3-gluc-py – derivado pirúvico da cianidina-3-glucósido

DAD – *diode array detector*, (detector de barra de diodos)

DMSO – dimetilsulfóxido

DPPH – *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*, (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

DTNB – *5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)*, (ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico))

DTT – *dithiothreitol,* (ditiotreitol)

EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*, (ácido etilenodiaminotetracético)

EMT – *extraneuronal monoamine transporter*, (transportador extraneuronial de monoaminas)

EtOH – etanol

F – fracção de procianidina

FBS – *Foetal Bovine Serum,* (Soro Fetal de Bovino)

FRAP – *Ferric Reducing Ability Power*

GC – *gas chromatography*, (cromatografia de gás)

h – hora

HLPC – *High liquid performance chromatography*, (Cromatografia líquida de alta eficiência)

In – iniciador

LC-MS – *liquid chromatography – mass spectrometry*, (cromatografia líquida – espectrometria de massa)

LDL – *low density lipoprotein*, (lipoproteína de baixa densidade)

LUV – *large unilamellar vesicles*, (vesículas unilamelares grandes)

MCF-7 – linha celular derivada de um carcinoma mamário *in situ*

MEM – *minimum essential médium*, (meio essencial mínimo)

min – minutos

MLV – *multilamellar vesicles*, (vesículas multilamelares)

MPP^+ – *1-methyl-4-phenylpyridinium*, (1-metil-4-fenilpiridínio)

MPP^+-[^{3}H] - *1-[methyl-^{3}H]-4-phenylpyridinium*, (1-metil-4-fenilpiridínio triciado)

MTT – *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide*, (brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio)

mv – malvidina

mv-3-gluc – malvidina-3-glucósido

OCT – *organic cation transporter*, (transportador de catiões orgânicos)

P – nível de significância estatístico

PAO – *phenylarsine oxid*, (óxido de fenilarsénio)

PC – *L-α-phosphatidylcholine*, (L-α-fosfatidilcolina)

py – derivado pirúvico

ROS – *reactive oxygen species*, (Espécies Reactivas de Oxigénio)

SEM – *statistical error médium*, (erro médio estatístico)

TCA – ácido tricloroacético

Ti – tempo de indução

TPTZ – *2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine*, (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina)

U.A. – unidades de absorvância

UV – Ultra Violeta

Vinylcy-3-gluc-cat – vinilpiranocianidina-3-glucósido-catequina

Vis – Visível

vs – versus

INTRODUÇÃO GERAL

A procura de um aumento da longevidade tem sido desde sempre uma das maiores preocupações do Homem, a qual está inerente a um melhoramento da qualidade de vida. Para o efeito, desde a antiguidade que a utilização de plantas e seus derivados em termos nutricionais e terapêuticos se revelou de uma importância crucial. Recentemente, a comunidade científica tem procurado identificar, sintetizar e caracterizar os princípios activos responsáveis pelos efeitos benéficos associados a esta utilização.

Hoje em dia, é comum associar uma dieta rica em frutos e legumes à prevenção da ocorrência de patologias como o cancro e doenças cardiovasculares, as quais representam algumas das principais causas de mortalidade a nível global. Para além disso, certas dietas, como a mediterrânica, complementam o consumo destes alimentos com uma elevada utilização de azeite e uma ingestão moderada de vinho tinto, contribuindo também para a prevenção de tais doenças. Admite-se que na base deste efeito poderão estar as propriedades antioxidantes apresentadas pelos compostos fenólicos existentes nos alimentos em questão. Deste modo, torna-se essencial o estudo estrutural/funcional destes compostos com o objectivo de compreender a sua actividade biológica.

1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS POLIFENÓIS

Os compostos polifenólicos constituem um grupo de substâncias numeroso vastamente distribuído no Reino Vegetal, e são resultado do metabolismo secundário das plantas. Dentro dos polifenóis, os flavonóides são conhecidos há mais de um século e pertencem a um grupo vasto de compostos polifenólicos que estão largamente distribuídos por todos os alimentos de origem vegetal. A primeira observação fazendo referência à sua actividade biológica foi publicada por Rusznyak & Szent-Gyorgyi (1936).

Estes compostos desempenham um importante papel na natureza actuando a nível fisiológico na coloração e regulação da maturação dos frutos (Goldstein *et al.*, 1963) e na protecção destes face a agentes agressores tais como as bactérias e os insectos (Strong *et al.*, 1979). A nível nutricional exercem uma acção preponderante no desenvolvimento de características sensoriais como a cor e o sabor de certos alimentos (Haslam, 1980). No plano médico parecem contribuir para as defesas antioxidantes do organismo e prevenir a ocorrência de doenças cardiovasculares (Frankel *et al.*, 1993;

Hertog *et al.*, 1993, Carbonneau *et al.*, 1999) e certos tipos de cancro (Block, 1992; Pouget *et al.*, 2001).

Aparte as suas propriedades biológicas, os flavonóides são também de interesse industrial, nomeadamente na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica, devido à possibilidade de serem usados como substitutos de antioxidantes sintéticos (Moure *et al.*, 2001).

1.1 Estrutura dos Principais Flavonóides

Actualmente são conhecidas mais de 8000 estruturas de polifenóis, que têm como característica comum um anel aromático contendo pelo menos um grupo hidroxilo.

Os polifenóis podem ser divididos em pelo menos 10 classes com base na sua estrutura química (Ross *et al.*, 2002).

Os flavonóides são a maior classe de polifenóis, com uma estrutura comum C6-C3-C6, constituída por dois anéis aromáticos ligados por um anel heterocíclico, que caracteriza o núcleo flavânico (Figura 1). Frequentemente encontram-se ligados a açúcares (glicósidos), o que os torna solúveis em água. Ocasionalmente também aparecem nas plantas como agliconas (sem açúcar).

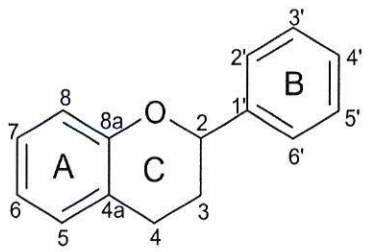
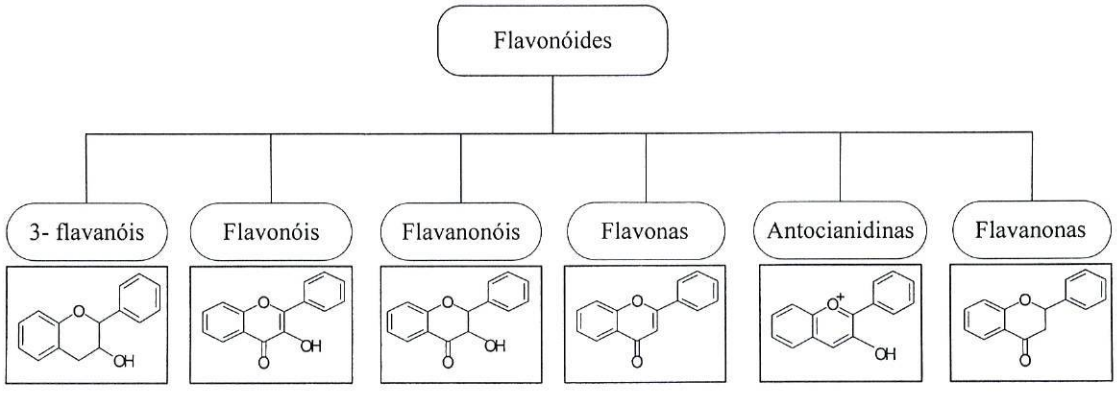


Figura 1 – Estrutura e sistema de numeração do núcleo flavânico.

Os flavonóides podem ser divididos em subclasses, com base nas variações do anel heterocíclico C. Aqui apresentam-se algumas das mais importantes.

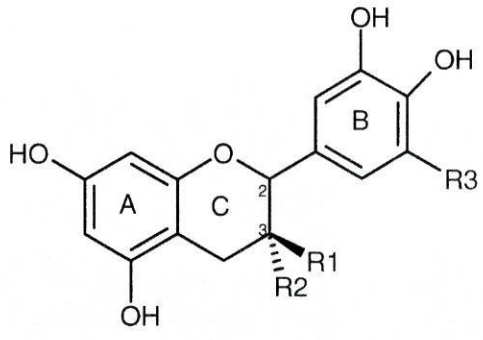


Dentro de cada classe, os diferentes compostos distinguem-se entre eles pelo padrão de hidroxilação e metilação dos anéis A e B e pela natureza e posição dos açúcares dos respectivos glicósidos. Os açúcares mais comuns são a glucose e a ramnose, mas também podem ser a galactose, a arabinose, a xilose entre outros. A glucosilação influencia as propriedades químicas, físicas e biológicas dos polifenóis.

Outra classe de polifenóis também muito estudada são os estilbenos, que não são muito comuns nos alimentos de origem vegetal. Há um em particular que tem recebido muita atenção, o resveratrol, que está presente no vinho e parece apresentar fortes propriedades anticarcinogénicas, antioxidantes, estrogénicas e actividades antiproliferativas. As propriedades anticarcinogénicas do resveratrol e dos seus derivados foram demonstradas em diferentes modelos, mas os mecanismos de acção exactos ainda não estão completamente desvendados (Farines *et al.*, 2004). No entanto, devido à reduzida quantidade deste composto no vinho (0,3-2,0 mg/L nos vinhos tintos), permanecem opiniões no sentido da não atribuição de qualquer efeito protector, a existir, ao resveratrol (Tapiero *et al.*, 2002).

1.2 3- Flavanóis

A família dos 3-flavanóis é o grupo mais abundante de flavonóides. Nos 3-flavanóis encontram-se as unidades monoméricas de catequina e galocatequina (Figura 2), que na natureza podem encontrar-se esterificadas ou glucosiladas.



	R1	R2	R3
(+)-catequina	OH	H	H
(-)-epicatequina	H	OH	H
(+)-galocatequina	OH	H	OH
(-)-epigalocatequina	H	OH	OH

Figura 2 – Estrutura dos compostos mais representativos desta classe.

Os carbonos C2 e C3 desta unidade são assimétricos constituindo centros quirais, dos quais resultam 4 isómeros: (+), (-)-catequina e (+), (-)-epicatequina. Nos isómeros (+)-catequina e (+)-epicatequina o grupo 3,4-diidrofenilo ligado ao carbono C2 e o grupo hidroxilo carbono C3 surgem em posição *trans* (2*R*, 3*S*) e nos restantes isómeros em

posição *cis* (2*R*, 3*R*). Na natureza os isómeros mais abundantes são a (+)-catequina e a (-)-epicatequina. Também é comum encontrar estes compostos esterificados com um grupo galoílo na posição C3 (ésteres de ácido gálico).

1.2.1 Proantocianidinas

As proantocianidinas também conhecidas por taninos condensados podem dividir-se em 2 grupos: Procianidinas, constituídas por subunidades de (+)-catequina e (-)-epicatequina, e Prodelfinidinas constituídas subunidades por galocatequina. Desde 1960, em que a estrutura básica das proantocianidinas foi elucidada (Figura 3), já foram identificados e completamente caracterizadas mais de 200 proantocianidinas oligoméricas, com um grau de polimerização até 5.

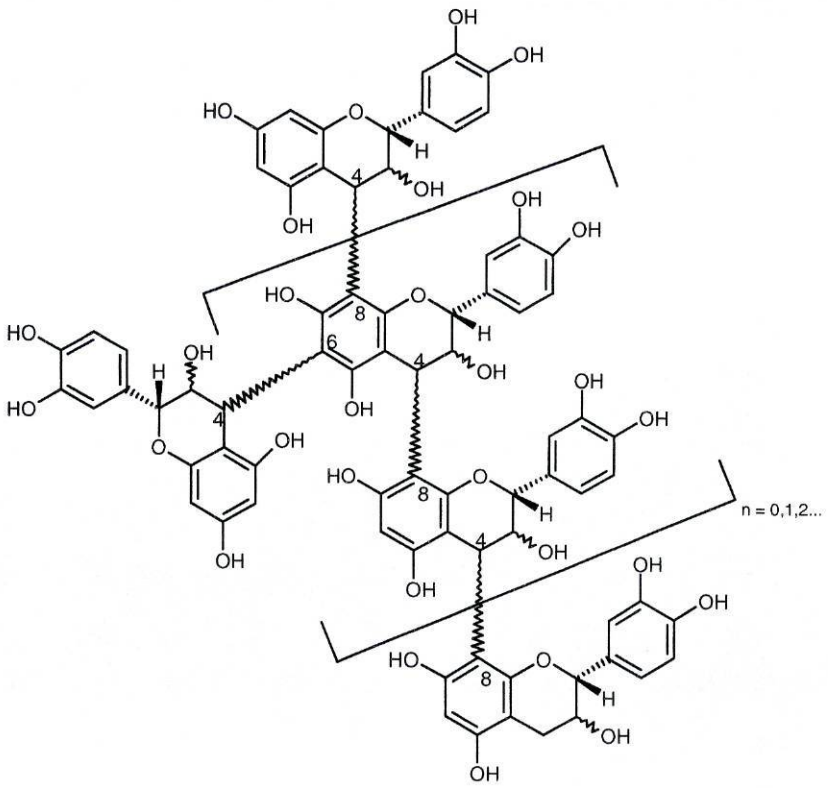


Figura 3 – Estrutura química geral de uma procianidina oligomérica.

As Proantocianidinas quando aquecidas em meio ácido decompõem-se em 3-flavanóis (catequina e galocatequina) e antocianidinas (Figura 4). No caso das procianidinas, estas dão origem a catequina e cianidina e as prodelfinidinas originam galocatequina e delfinidina.

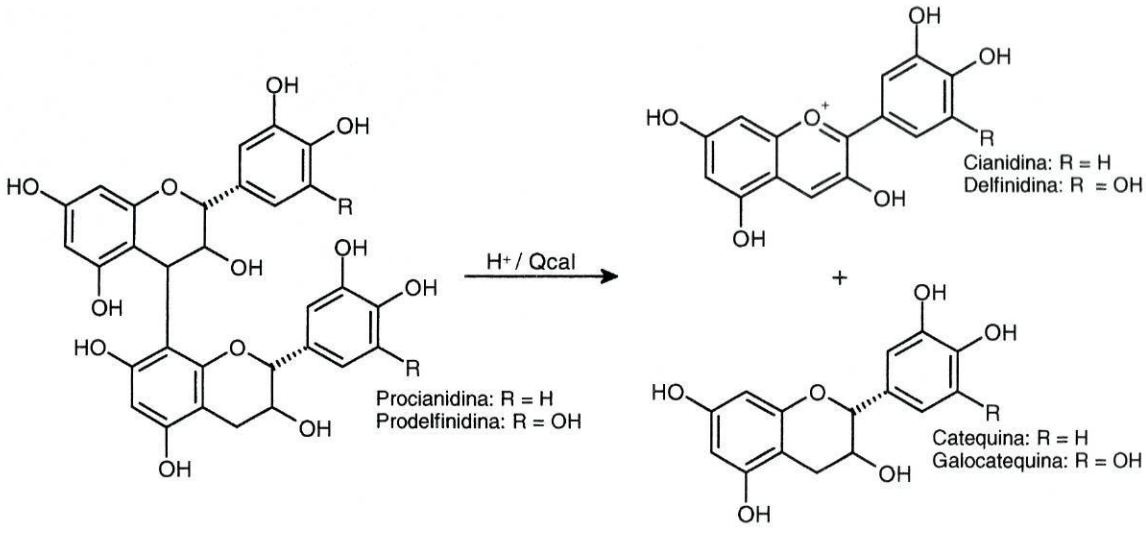
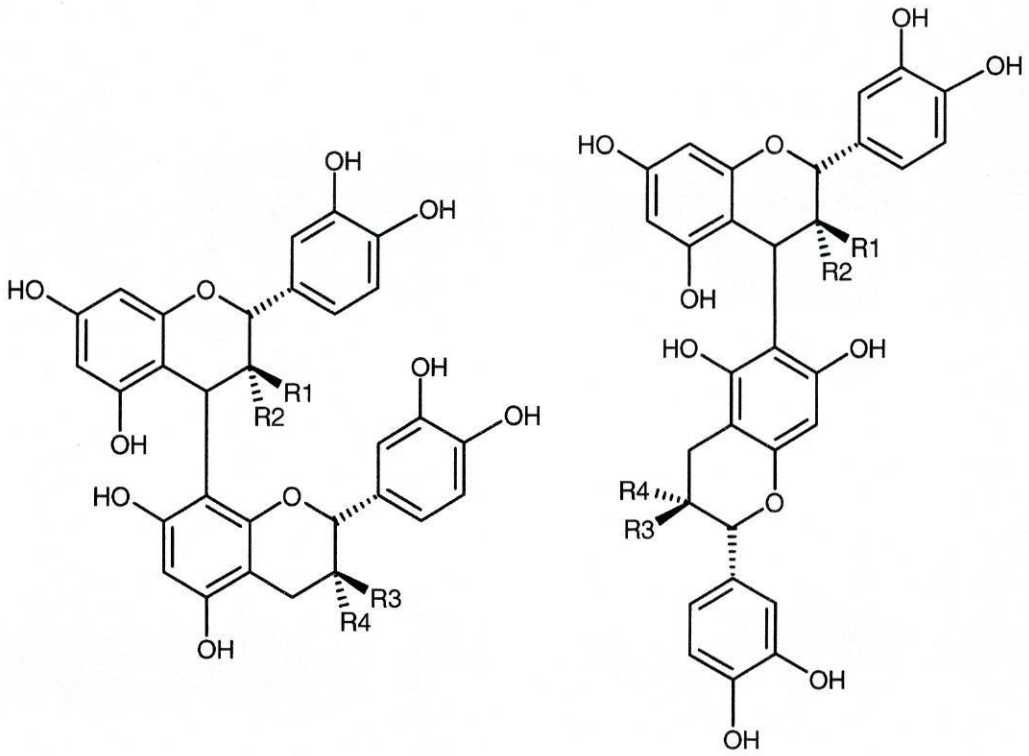


Figura 4 – Decomposição das proantocianidinas por aquecimento em meio ácido. Reacção de Bate-Smith (1954).

As proantocianidinas podem ser divididas em grupos com base no tipo de ligação das unidades monoméricas. As ligações interflavanol mais comuns são estabelecidas entre o C4 de uma unidade de flavanol e o C6 ou C8 da outra unidade. As proantocianidinas diméricas com esta ligação são ditas do tipo B (Figura 5), e as triméricas pertencem ao tipo C (Figura 6).



Dímeros C4-C8

B1 ((-)epi-(+)-cat): R_1=H; R_2=OH; R_3=OH; R_4=H

B2 ((-)epi-(-)-epi): R_1=H; R_2=OH; R_3=H; R_4=OH

B3 ((+)cat-(+)-cat): R_1=OH; R_2=H; R_3=OH; R_4=H

B4 ((+)cat-(-)-epi): R_1=OH; R_2=H; R_3=H; R_4=OH

Dímeros C4-C6

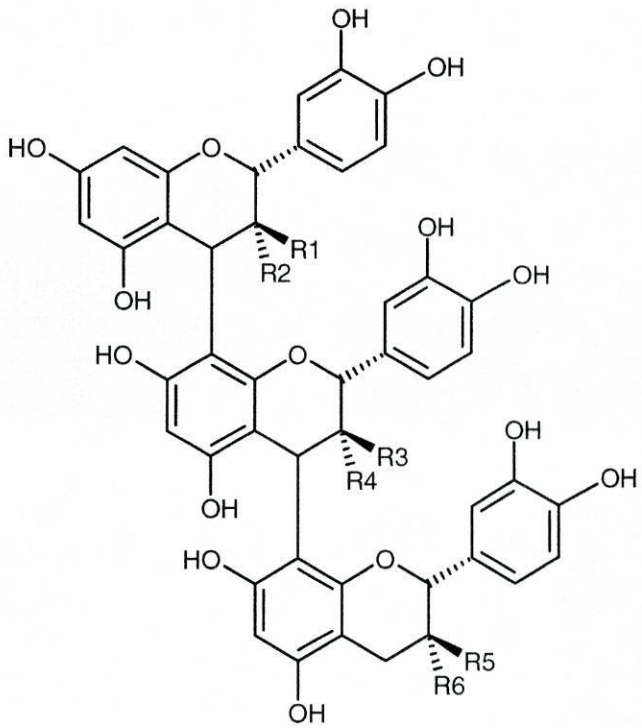
B5 ((-)epi-(-)-epi): R_1=H; R_2=OH; R_3=H; R_4=OH

B6 ((+)cat-(+)-cat): R_1=OH; R_2=H; R_3=OH; R_4=H

B7 ((-)epi-(+)-cat): R_1=H; R_2=OH; R_3=OH; R_4=H

B8 ((+)cat-(-)-epi): R_1=OH; R_2=H; R_3=H; R_4=OH

Figura 5 – Estrutura das procianidinas diméricas do tipo B.

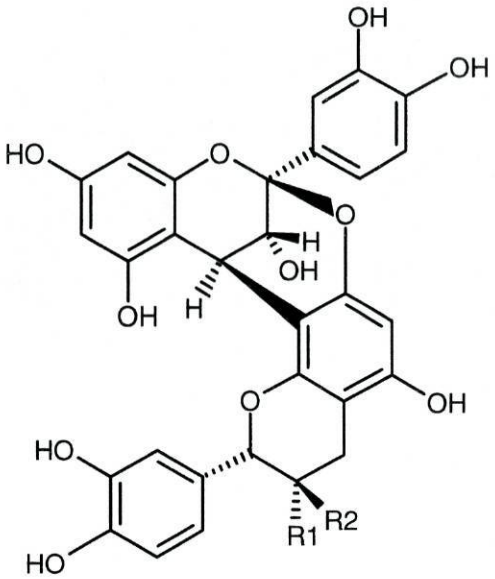


C1 ((-)epi-(-)-epi-(-)-epi): R_1, R_3, R_5=H; R_2, R_4, R_6=OH

T1 ((-)epi-(-)-epi-(+)-cat): R_1, R_3, R_6=H; R_2, R_4, R_5=OH

Figura 6 – Estrutura de procianidinas triméricas do tipo C.

Ao tipo A pertencem as proantocianidinas que possuem e ligação interflavanol C4-C6/C8, e uma ligação éter adicional entre o C2 da unidade superior e o oxigénio do C5 ou C7 da unidade inferior (Figura 7).



A1: R_1=OH; R_2=H

A2: R_1=OH; R_2=OH

Figura 7 – Estrutura de procianidinas diméricas do tipo A.

Fazem parte do tipo D as proantocianidinas triméricas que têm uma ligação do tipo B e outra do tipo A.

As unidades de flavanol podem ter substituintes acil ou glicosil. O substituinte acil mais comum é o ácido gálico, que forma uma ligação éter com o grupo hidroxilo na posição C3, mas também na posição C5 (Figura 8) (Santos-Buelga *et al.*, 2000).

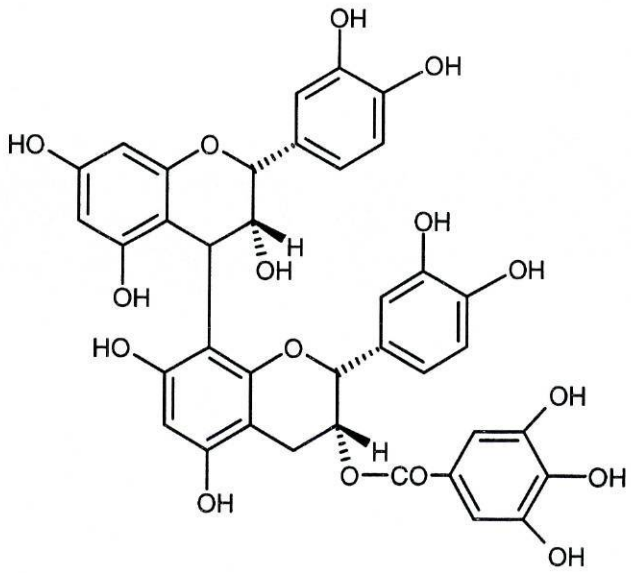


Figura 8 – Estrutura de uma procianidina esterificada com o ácido gálico (B2-3''-O-galato).

1.2.2 Ocorrência e biodisponibilidade dos 3-flavanóis

A ingestão de polifenóis depende grandemente dos hábitos e preferências alimentares. Os flavonóides correspondem a cerca de 2/3 dos polifenóis ingeridos, enquanto o restante 1/3 é derivado dos ácidos fenólicos. Como é de esperar, as suas propriedades biológicas dependem da sua biodisponibilidade (Ross *et al.*, 2002).

Há uma falha na informação quantitativa de muitos produtos alimentares. A composição dos alimentos é importante para perceber quais os alimentos que mais contribuem para o consumo diário de procianidinas. A Tabela 1 exemplifica os teores de procianidinas em alguns alimentos comuns.

Tabela 1 – Teor em procianidinas de alguns alimentos comuns. Os valores representam médias ± desvio padrão e estão em mg/100 mg de peso fresco ou mg/L para as bebidas (Adaptado de Gu *et al.*, 2004).

Produto	**Teor em Procianidinas**
Mirtilo	179,8 ± 50,8
Morangos	418,8 ± 75,3
Maçã (Golden Delicious)	125,8 ± 6,8
Sumo de maçã	9 ± 0,0
Pêra	31,9 ± 7,8
Pêssegos	67,3± 20,9
Pistacho	237,3 ± 52,0
Amêndoas	184,0 ± 48,2
Amendoins	15,6 ± 2,3
Chocolate preto	246,0± 0,3
Chocolate de leite	192,0 ± 28,8
Cerveja	23,0 ± 2,0
Vinho Rosé [a]	17,1
Vinho Branco [a]	15,1
Vinho Tinto [a]	557,7
Sumo de Uva	524,0 ± 2,0

[a] Valores obtidos de Auger *et al.*, 2004.

O consumo médio diário de catequinas, dímeros e trímeros de proantocianidinas foi estimado em 18-50 mg/dia, sendo as maiores fontes o chá, o chocolate, a maçã, as uvas e o vinho tinto (Manach *et al.*, 2005). Devido à falta de informação sobre o conteúdo em proantocianidinas mais polimerizadas nos alimentos, não é possível fazer uma boa estimativa da quantidade consumida, mas julga-se que sejam muitos miligramas por dia, o que os torna nos polifenóis mais abundantes na nossa dieta. Apesar de se encontrarem em muitos frutos e no vinho tinto, a biodisponibilidade de catequinas foi estudada principalmente após a ingestão de chocolate ou chá.

A estrutura química dos polifenóis determina a velocidade e a extensão da absorção intestinal e a natureza dos metabolitos circulantes no plasma, mas existem variações de indivíduo para indivíduo. A absorção destes compostos foi evidenciada através da avaliação da capacidade antioxidante do plasma após ingestão de alimentos ricos em polifenóis e medindo a concentração destes compostos no plasma e na urina.

Recentemente sugeriu-se também que a fonte de flavonóide pode interferir na biodisponibilidade do mesmo.

As proantocianidinas poliméricas não são absorvidas como tal. A detecção dos dímeros de procianidina B1 e B2 no plasma humano foi descrita em dois estudos (Holt *et al.*, 2002; Manach *et al.*, 2005). Estudo *in vitro* em animais confirmaram que o grau de polimerização prejudica a absorção intestinal. Todavia, os efeitos benéficos destes compostos não requerem uma absorção eficiente. De facto, estes compostos, podem exercer efeitos directos na mucosa intestinal e protegê-la do stress oxidativo ou da acção de carcinogénicos (Williamson *et al.*, 2005). Os efeitos biológicos podem ser atribuídos não à acção directa destes compostos, mas a acção de alguns dos seus metabolitos que podem ser absorvidos mais facilmente. Com base em experiências *in vitro*, Spencer *et al.*, 2000, sugeriu que os polímeros podem ser degradados em monómeros durante a digestão no estômago. No entanto, Rios *et al.*, 2002 demonstrou claramente com um estudo *in vivo*, que não é isto que acontece no Homem. Não foi verificado nenhuma despolimerização significativa durante a estadia dos compostos no estômago, provavelmente devido ao efeito de tampão exercido pelo bolo alimentar, tornando as condições acídicas menos agressivas e inviabilizando a decomposição das procianidinas.

1.2.3 Importância biológica dos 3-flavanóis

A natureza polifenólica e o elevado peso molecular são características estruturais que conferem a determinados polifenóis, nomeadamente aos 3-flavanóis propriedades físico-químicas como por exemplo a capacidade de formação de complexos insolúveis com proteínas, complexação com iões metálicos, elevado poder redutor e capacidade de neutralizar radicais livres de oxigénio. Estas propriedades são responsáveis por muitos dos efeitos biológicos que lhes são atribuídos na literatura.

As interacções com proteínas são fenómenos dinâmicos de superfície, normalmente reversíveis que se formam por interacções hidrofóbicas, especialmente pontes de hidrogénio entre os grupos fenólicos (dadores de H^+) e os grupos carbonilo de ligações peptídicas, (aceitadores de H^+) (Hagerman & Butler, 1980). A intensidade das interacções é influenciada pela natureza da proteína e pela estrutura do 3-flavanol. Estas

propriedades conferem um valor antinutricional a estes compostos, pois eles são capazes de interagir com as enzimas digestivas, inactivando-as, ou com substratos da dieta. São também responsáveis pelo aumento da secreção de proteínas endógenas (salivares), que contrariam o efeito antinutricional dos taninos, já que se ligam a estes promovendo a absorção de proteínas de maior valor alimentar.

Como estes compostos são bons complexadores de proteínas, são usados com efeitos terapêuticos no tratamento de diarreia, através da complexação não-específica de proteínas da mucosa intestinal, e na complexação de compostos como a toxina da cólera.

Em 1979 foi publicado um trabalho (St. Leger *et al.*, 1979) no qual se correlacionava o habitual consumo de vinho com uma baixa taxa de mortalidade devida a problemas cardiovasculares, e que esteve na origem do Paradoxo Francês. Foi sugerido que algum componente do vinho teria um efeito protector face ao desenvolvimento de arteriosclerose, principal causa de doenças cardiovasculares. Inúmeros estudos foram realizados desde então e concluiu-se que os compostos polifenólicos, presentes em grande concentração no vinho, especialmente no tinto, estão associados à diminuição de vários factores de risco de doenças cardiovasculares, como uma descida da pressão arterial e uma diminuição do nível de colesterol plasmático (Green *et al.*, 1986; Stensvold *et al.*, 1992; Tebib *et al.*, 1994).

Em face dos resultados obtidos *in vitro*, os polifenóis, e nomeadamente os 3-flavanóis, parecem ser capazes de actuar via três mecanismos na prevenção das doenças cardiovasculares:

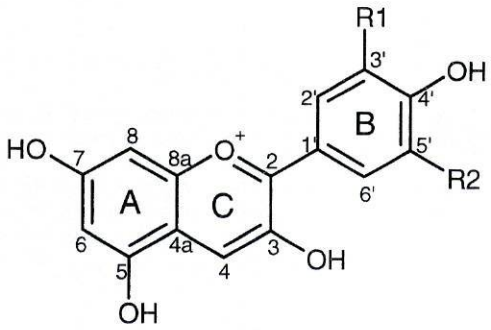
1) inibição da oxidação das LDL, através da quelatação de iões metálicos, neutralização de radicais livres e regeneração da vitamina E (Terão *et al.*, 1994; Porto *et al.*, 2003);
2) inibição da agregação de plaquetas: a agregação excessiva de plaquetas resultante da peroxidação lipídica torna-se perigosa porque pode criar um obstáculo ao fluxo sanguíneo (Fuster & Lewis, 1994);
3) protecção do aparelho vascular por interacção com cadeias peptídicas de colagénio e elastina que revestem os vasos sanguíneos.

Os polifenóis e em particular os 3-flavanóis parecem igualmente exibir uma acção protectora face ao desenvolvimento de tumores e mutações. Um estudo *in vivo* com

procianidinas revelou que estas são capazes de inibir um potente indutor de tumores da epiderme de ratos (Gali *et al.*, 1994). Um outro estudo com ratos demonstrou que os derivados galato de procianidinas apresentam uma actividade antitumoral ainda mais significativa (Kashiwada *et al.*, 1992).

1.3 Antocianinas

As antocianinas constituem o grupo de pigmentos provenientes das plantas mais importante. Estes pigmentos são glicosídeos do catião flavílio polihidroxilado e polimetoxilado. As antocianinas individuais diferem entre si no número e na posição dos grupos hidroxilo e grupos metoxilo (Figura 9). Até ao momento são conhecidas 18 antocianidinas naturais, mas apenas seis são comuns em plantas superiores (Stintzing & Carle, 2004): a pelargonidina, a malvidina, a cianidina, a delfinidina, a peonidina e a petunidina.



	R1	R2
Delfinidina	OH	OH
Cianidina	OH	H
Petunidina	OCH3	OH
Peonidina	HCH3	H
Malvidina	OCH3	OCH3
Pelargonidina	H	H

Figura 9 – Estrutura das principais antocianidinas e sistema de numeração do catião flavílio.

Na sua forma natural encontram-se geralmente glucosiladas designando-se antocianinas. Os glucósidos das antocianidinas (antocianinas) podem diferir entre si pela natureza, número e posição dos açúcares ligados à molécula, assim como também pela presença e natureza do ácido esterificado na molécula de açúcar (Kong *et al.*, 2003).

1.3.1 Ocorrência e biodisponibilidade das antocianinas

As antocianinas existem nos frutos vermelhos, estando presente em quantidades desde 0,15 mg/g nos morangos, a 4,5 mg/g nas cerejas e na ordem das dezenas de mg/L no vinho tinto (Tapiero *et al.*, 2002). A presença destes pigmentos em grandes quantidades

nalguns frutos foi associada à capacidade antioxidante que estes frutos mostraram, relativamente a outros mais pobres em antocianinas (Garcia-Alonso *et al.*, 2004).

Uma dose de 200 g de uvas fornece uma dose de cerca de 1500 mg de antocianinas, ao passo que 100 g de bagas de frutos silvestres proporcionam 500 mg, o que torna estes compostos muito abundantes na dieta. Deste modo, não é de estranhar que o consumo de antocianinas seja de algumas centenas de miligramas (Manach *et al.,* 2005). Existem alguns estudos de biodisponibilidade feitos em voluntários, que consumiram fontes ricas em antocianinas. A concentração destas no plasma era baixa, na ordem das nmol/L, e a concentração máxima foi atingida no plasma cerca de 1,5 h após a ingestão e na urina após 2,5 h. Estes tempos são consistentes com uma absorção ao nível do estômago. Apesar da biodisponibilidade de antocianinas parecer baixa, pode ser subestimada por duas razões principais: alguns metabolitos importantes podem ter sido ignorados ou os métodos usados podem necessitar de ser optimizados para a análise dos metabolitos das antocianinas. As antocianinas possuem, em solução, diferentes formas químicas em equilíbrio dependendo do pH. Na maior parte dos estudos as análises formam realizadas com detecção UV-Vis com base na conversão completa de todas as formas químicas em formas coloridas do catião flavílio com a acidificação. No entanto, é possível que algumas formas que existam em pH neutro não sejam convertidas na forma de catião flavílio, devido a reacções que possam acontecer com outras moléculas presentes no plasma ou na urina. As formas mais comuns de metabolito que se determinaram na urina foram derivados glucuronidados e/ou sulfonados de antocianinas (Manach *et al.*, 2005).

1.3.2 Importância biológica das antocianinas

A função mais significativa das antocianinas é a sua capacidade de dar cor às plantas ou produtos das plantas. Elas têm o papel importante na atracção dos insectos e na polinização ou dispersão de sementes.

As antocianinas possuem também propriedades farmacológicas e são usadas nos humanos para uso terapêutico. Estes pigmentos mostraram reduzir a permeabilidade e fragilidade capilar, sendo utilizados no tratamento de inflamações de tecidos. A actividade antioxidante de antocianinas também foi demonstrada através da captação de espécies reactivas de oxigénio e da inibição da oxidação de lipoproteínas e agregação de

plaquetas. Estes factos sugerem que podem ter um papel importante na protecção de doenças cardiovasculares (Lila, 2004).

Antocianinas isoladas e misturas ricas em antocianinas podem evitar a quebra de ADN (Acquaviva *et al.*, 2003), exercer actividade estrogénica, inibição enzimática, resposta antiinflamatória e inibição da peroxidação lipídica (Satué-Garcia *et al.*, 1997).

2 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DOS POLIFENÓIS

Os antioxidantes são do interesse da indústria alimentar pois têm um papel importante na conservação dos alimentos, mas também despertaram a atenção dos biólogos e dos clínicos na medida em que podem proteger o corpo humano contra espécies reactivas de oxigénio (ROS – Reactive Oxygen Species). O termo antioxidante é frequentemente utilizado, mas a sua definição é um tema mais complexo. Nos alimentos, um antioxidante deve ser uma substância que iniba a peroxidação lipídica. No entanto, *in vivo*, os alvos de espécies reactivas de oxigénio são muito variados, pois podem ser proteínas, lípidos, ácidos nucleicos ou outras pequenas moléculas.

Um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparada com o substrato oxidável, evita ou retarda significativamente a oxidação desse substrato (Halliwell *et al.*, 1990), e que após oxidação deve ser suficientemente estável de forma a não desencadear novas reacções de oxidação (Shahidi *et al.*, 1992).

O termo substrato oxidável inclui quase todos os componentes dos alimentos e dos tecidos vivos, incluindo proteínas, lípidos, carbohidratos e ADN. Esta definição enfatiza a importância do alvo escolhido e da fonte promotora de oxidação na caracterização de um antioxidante.

A importância relativa dos vários antioxidantes *in vivo* depende de quais as espécies reactivas de oxigénio que são geradas, como são geradas, onde são geradas e qual o dano oxidativo que é medido. É perfeitamente possível um oxidante proteger um sistema mas falhar na protecção de outros. Os antioxidantes inibidores da peroxidação lipídica podem não proteger outros alvos como ADN e proteínas contra danos e por vezes podem ainda agravar a danificação dos mesmos.

No caso dos alimentos esses danos podem não ter muita importância pois estragos no ADN e proteínas da matriz do alimento, a não ser em casos excessivos, não alteram o

sabor nem a textura dos alimentos. No entanto, é de extrema importância *in vivo*, porque por exemplo, o *terc*-butil-4-hidroxianisole (BHA) é um potente inibidor da peroxidação lipídica, mas em doses elevadas pode induzir cancro do estômago em ratos, possivelmente devido a danos provocados no ADN.

Compostos antioxidantes derivados das plantas, especialmente polifenóis, podem ser interessantes do ponto de vista de suplementos dietéticos e na preservação dos alimentos. No entanto, há questões que se levantam, como por exemplo, como podem estes antioxidantes ser avaliados? Quando são absorvidos, serão eles seguros?

2.1 Caracterização de Antioxidantes

Um composto pode exercer uma acção antioxidante através da inibição da formação de espécies reactivas de oxigénio ou directamente através da neutralização de radicais livres. *In vivo*, pode ainda actuar através de mecanismos que façam aumentar as defesas antioxidantes endógenas. No entanto, é importante ter em conta que um antioxidante que neutraliza radicais livres pode ele mesmo tornar-se numa espécie radical, que pode ser prejudicial. Através de experiências simples pode-se verificar a actividade directa de um antioxidante *in vitro*, e testar a possibilidade de haver efeitos pró-oxidantes em diferentes alvos moleculares. Assim, pode-se fazer uma selecção prévia dos antioxidantes que poderão ter uma acção *in vivo*, e também haver um alerta para aqueles que poderão causar danos.

Um composto que seja pouco efectivo *in vitro*, não deverá ser mais efectivo *in vivo*. Durante estes ensaios é necessário testar uma gama alargada de concentrações que sejam relevantes para o propósito a que se destina. Por exemplo, se um composto está presente *in vivo* numa concentração de 1 μM, e só é eficaz a inibir a peroxidação lipídica acima dos 20 mM, então é irrelevante, a não ser que haja a suspeita de que, de algum modo, o composto se concentra *in vivo*.

A escolha das fontes que geram espécies reactivas de oxigénio, devem originar espécies relevantes, e devem depender dos efeitos que se estiverem a considerar, sejam eles *in vivo* ou numa matriz alimentar.

2.2 Espécies Reactivas de Oxigénio

O oxigénio tripleto fundamental (O_2) representa um paradoxo para os organismos aeróbios: é tanto essencial, como potencialmente tóxico. Embora não muito reactivo no

seu estado molecular, o oxigénio é reduzido a água na cadeia respiratória mitocondrial por uma sequência de passos durante a qual são produzidos muitos intermediários reactivos (Halliwell & Gutteridge, 1999). A expressão "espécies reactivas de oxigénio" inclui radicais de oxigénio e certos agentes não radicais, mas que são agentes oxidantes, que podem ser convertidos em radicais facilmente (HOCl, HOBr, O_3, $^1O_2$, $ONOO^-$, H_2O_2). Por outras palavras, todos os radicais de oxigénio são espécies reactivas de oxigénio, mas nem todas as espécies reactivas de oxigénio são radicais de oxigénio (Halliwell *et al.*, 2004).

$$O_2 \xrightarrow{+e^-} O_2^{\cdot-} \xrightarrow[+2H^+]{+e^-} H_2O_2 \xrightarrow[+H^+]{+e^-} OH^{\cdot} + H_2O \xrightarrow[+H^+]{+e^-} H_2O$$

As espécies reactivas de oxigénio são formadas *in vivo* durante o metabolismo aeróbio normal e podem causar danos ao ADN, a proteínas e lípidos, apesar da existência de defesas naturais. Entre as espécies mais reactivas de oxigénio encontramos o Anião Radical Superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2) e o Radical Hidroxilo ($OH^{\bullet}$). No entanto há outras espécies que podemos encontrar *in vivo* e em matrizes alimentares (Tabela 2).

Tabela 2 – Espécies Reactivas de Oxigénio relevantes (Adaptado de Halliwell, 1995).

Espécies Reactivas de Oxigénio
$O_2^{\bullet -}$
Singleto O_2
H_2O_2
$HOCl$ (1)
$RO^{\bullet}$ (2)
$RO_2^{\bullet}$ (2)
$NO^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$, $ONOO^-$, HNO_2
$OH^{\bullet}$

(1) - Presente apenas *in vivo*;
(2) – Radicais formados pela quebra dos hidroperóxidos lipídicos;

O radical anião superóxido ($O_2^{\bullet -}$) resulta da exposição do oxigénio a radiação ionizante mas também é produzido pela mitocôndria e tem uma reactividade modesta, tal como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), comparativamente com o radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$).

A reactividade dos radicais hidroxilo é tão alta que limita a sua difusão nos sistemas biológicos, causando danos celulares logo que se forma. O H_2O_2, pelo facto de não apresentar carga é capaz de atravessar facilmente as biomembranas e no interior das células pode originar radicais hidroxilo. Apenas a activação de oxigénio molecular

requer energia, pelo que a formação dos radicais livres derivados, e mais perigosos, ocorre espontaneamente na presença de dadores de electrões e protões.

Em condições fisiológicas os níveis de ROS são mantidos baixos pelo sistema de defesas antioxidantes que as neutralizam directamente – defesas primárias – ou reparam/substituem as moléculas oxidadas – defesas secundárias (Costa e Moradas-Ferreira, 2003).

Quando, por alguma razão, este balanço é perturbado provocando danos oxidativos, então estamos na presença duma situação de stress oxidativo. Este desequilíbrio pode surgir por:

a) diminuição dos níveis de antioxidantes endógenos, resultante de mutações em enzimas do sistema de defesas antioxidantes, como superóxido dismutases ou glutationa peroxidase e/ou negligência no consumo de antioxidantes ou outros constituintes importantes da dieta;

b) um aumento na produção de ROS, por exemplo por exposição elevada ao O_2, ou activação excessiva de sistemas naturais que produzem ROS;

c) a) e b) em conjunto.

2.3 Mecanismos de Acção Antioxidante dos Flavonóides

Como já foi referido, dietas ricas em frutos e vegetais, protegem contra uma grande variedade de doenças, particularmente doenças cardiovasculares e cancerígenas. Pensa-se que os antioxidantes destes alimentos são os principais responsáveis por estes efeitos protectores. Estudos *in vitro* identificaram uma actividade biológica significativa exibida por polifenóis naturais.

A acumulação de produtos danificados por espécies reactivas de oxigénio pode ser crítica para o desenvolvimento de cancro, arteriosclerose, diabetes e inflamações crónicas. Estas espécies estão também implicadas em várias doenças humanas que incluem o processo de envelhecimento, a doença de Parkinson, doenças autoimunitárias e demência senil.

No contexto da relação entre os antioxidantes nutricionais e as condições de stress oxidativo, estados pró-oxidantes das células e peroxidação lipídica, tem havido intensa especulação gerada à volta de um possível papel dos fenóis simples e dos polifenóis das

plantas como componentes de extractos herbicidas medicinais, ou como parte de uma dieta regular no tratamento/prevenção de várias doenças que estão associadas com estados celulares pró-oxidantes.

Estudos mostraram que os flavonóides são antioxidantes efectivos em vários sistemas de oxidação química, demonstrando a sua capacidade de sequestrar radicais peroxilo, alcoxilo, superóxido, hidroxilo em ambientes aquosos e orgânicos (Ross *et al.*, 2002).

Estes compostos têm a capacidade de actuarem como antioxidantes através de um mecanismo de sequestração de radicais livres com a formação de espécies pouco reactivas, tais como radicais fenoxilo derivado de flavonóide e posteriormente quinonas (Figura 10) (Jovanovic *et al.*, 1994).

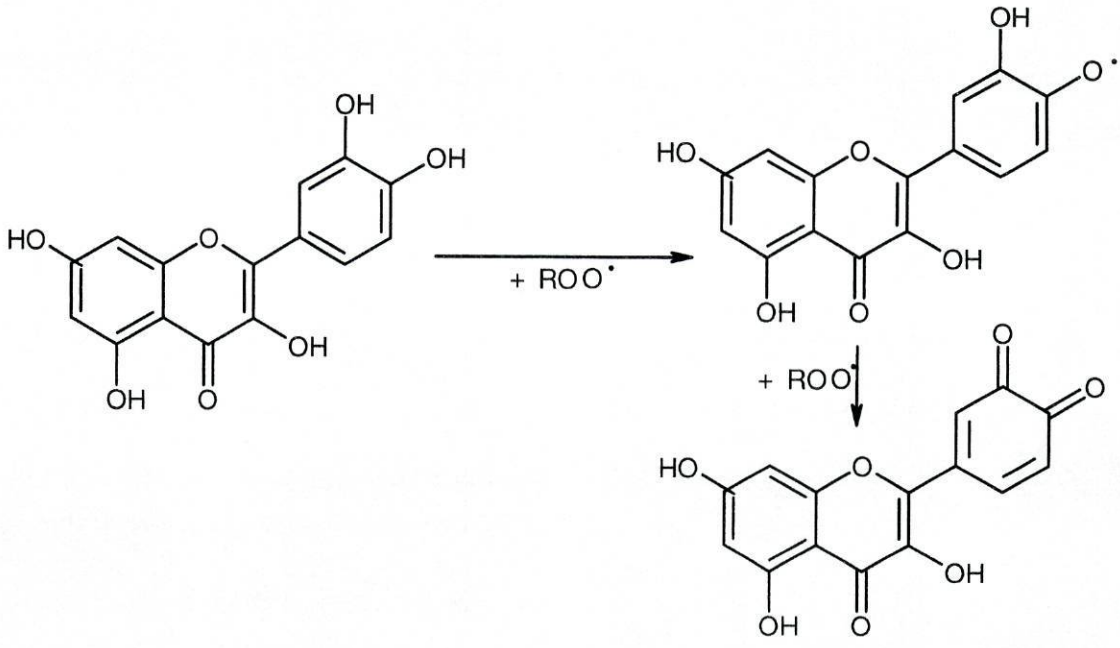


Figura 10 – Mecanismo antioxidante de actuação de um flavonóide (Jovanovic *et al.*, 1994).

Por outro lado, através da sua capacidade de quelatar metais de transição estes compostos podem inactivar os metais através da complexação, por dois mecanismos:

- A ligação do antioxidante ao metal altera o seu potencial redox e/ou a acessibilidade ao metal, impedindo que eles participem no formação de $OH^{\bullet}$;
- O metal de transição liga-se a um antioxidante, reagindo com este, prevenindo assim que ocorram reacções redox com alvos de maior importância.

Deste modo a reacção de Fenton é impedida, evitando assim o que se pensa ser a maior fonte de radicais hidroxilo. Há muita discussão acerca da contribuição relativa destes dois mecanismos, mas acredita-se que a capacidade antioxidante dos flavonóides reside principalmente da sua capacidade de doar um átomo de hidrogénio (Arora *et al.*, 1998).

O Fe (III) proveniente da alimentação pode interagir com as procianidinas e deste modo limitar a sua absorção e consequentemente a sua disponibilidade no organismo. Este fenómeno pode ter repercussões graves em pessoas com deficiência de ferro no organismo e sobretudo nas crianças e mulheres grávidas. Mas, a complexação de Fe (III) também apresenta benefícios na medida em que, quando complexado, este não é capaz de sofrer redução a Fe (II), que actua como catalisador da reacção de Fenton, da qual resultam radicais livres altamente nocivos para o organismo.

Reacção de Fenton: $Fe\ (II) + H_2O_2 \rightarrow Fe\ (III) + OH^- + HO^{\bullet}$

As procianidinas são ainda capazes de complexar o ião Al (III) limitando a sua absorção a nível intestinal e desta forma reduzir o risco de desenvolvimento da doença de Alzeimer, associada normalmente a uma elevada concentração deste ião (Orgogozo *et al.*, 1997).

A capacidade antioxidante dos flavonóides é determinada pela sua estrutura, especialmente pela presença de anéis aromáticos, que concedem a capacidade de suportar um electrão desemparelhado como resultado da deslocalização do sistema electrónico. Outro determinante importante na estrutura dos flavonóides é a presença de grupos hidroxilo. Existem estudos que indicam as agliconas com maior actividade antioxidante que os flavonóides conjugados. Este decréscimo pode ser causado por bloqueio aos grupos fenólicos responsáveis por sequestrar radicais ou também por uma diminuição da acessibilidade destes compostos às membranas.

Os flavonóides têm apresentado capacidades antioxidantes superiores às da vitamina E, possivelmente porque têm um sistema conjugado mais extenso e dois ou mais hidroxilos reactivos, que lhes permitem comportar um electrão desemparelhado. Foi também levantada a questão da localização do antioxidante e do radical derivado do antioxidante, e já foi verificado que a vitamina E actua essencialmente em meios

hidrofóbicos. O radical produzido por esta vitamina após a transferência de um H, não sai do meio hidrofóbico, mas devido à natureza polar do grupo fenol, este orienta-se para interfaces lipofílicas:hidrofílicas. Este arranjo físico permite que o radical derivado da vitamina E reaja com antioxidantes solúveis em água. As propriedades hidrofílicas dos polifenóis facilitam a sua localização na interface das camadas lipídicas de membranas, o que traz duas vantagens: a inibição dos ataques por radicais livres na fase aquosa e a reparação dos radicais livres lipofílicos (Laranjinha *et al.*, 1999).

Também tem sido divulgado que o grau de polimerização dos flavonóides pode influenciar as capacidades antioxidantes tendo os oligómeros maior capacidade que os monómeros (Ross *et al.*, 2002).

Apesar desta concepção do mecanismo de acção dos flavonóides como antioxidantes estar já muito discutida e revista, estudos recentes, especulam que a actividade antioxidante clássica, com base na doação de hidrogénios, sozinha não explica completamente os efeitos celulares verificados, por diversas razões.

1. Os flavonóides são extensamente metabolizados *in vivo*, resultando em alterações significativas dos seus potenciais redox. Já foi evidenciado que as formas bioactivas dos flavonóides *in vivo* são muito diferentes daquelas encontradas nas plantas, por exemplo, as formas glucosiladas, por vezes são agliconas, mas podem antes estar conjugadas ou serem metabolizados durante a absorção intestinal.

2. As quantidades dos flavonóides e dos seus metabolitos acumulados *in vivo* são menores que as registadas para nutrientes antioxidantes como ácido ascórbico e α-tocoferol. Consequentemente, os flavonóides têm menos probabilidade de expressarem a sua acção benéfica *in vivo* pois não são capazes de competir com concentrações tão altas como a do ácido ascórbico.

A evidência da acumulação de flavonóides sugere que o efeito celular dos flavonóides pode ser mediado pela sua interacção com proteínas específicas que são importantes em cascatas de sinalização intracelular (Williams *et al.*, 2004).

PARTE I

PROCIANIDINAS: CARACTERIZAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E DE ALGUMAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

No primeiro capítulo desta parte do trabalho seleccionaram-se e adaptaram-se técnicas para determinar a capacidade antiradicalar e o poder redutor de compostos antioxidantes (DPPH e FRAP respectivamente). Adicionalmente, ajustaram-se e desenvolveram-se metodologias de forma a monitorizar a oxidação lipídica com o objectivo de avaliar o efeito de compostos antioxidantes na inibição/retardamento da peroxidação lipídica. Para tal, utilizaram-se compostos antioxidantes padrão comerciais que, segundo a literatura, possuem actividade antioxidante.

Num segundo capítulo procedeu-se à extracção e separação de procianidinas de grainha de uva de forma a obter fracções contendo procianidinas com diferentes graus de complexidade. A actividade antioxidante das fracções resultantes foi avaliada utilizando as técnicas escolhidas, que já se encontravam inteiramente desenvolvidas.

Nos capítulos seguintes deste trabalho pretendeu-se caracterizar duas propriedades biológicas, utilizando para o efeito duas linhas celulares distintas.

Num primeiro capítulo pretendeu-se averiguar o efeito de procianidinas com diferentes complexidades estruturais na proliferação de células tumorais. Para tal, avaliou-se o efeito destes compostos na linha celular MCF-7, uma linha derivada de um carcinoma mamário *in situ*.

No segundo capítulo estudou-se o efeito das mesmas fracções de procianidinas, com diferentes complexidades estruturais, na modulação nutricional da captação de catiões orgânicos no epitélio intestinal. Para este estudo recorreu-se à linha celular Caco-2, uma linha celular derivada de adenocarcinoma de cólon humano com fenótipo enterocítico, e ao MPP^+ (1-metil-4-fenilpiridínio) como modelo de catiões orgânicos.

CAPÍTULO 1 – PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES PADRÃO

1 INTRODUÇÃO

Consoante a disciplina científica, a abrangência e os alvos de protecção dos antioxidantes são diferentes. Na indústria química os antioxidantes são normalmente compostos que retardam a autoxidação de produtos químicos como a borracha e o plástico. Nas ciências alimentares, os antioxidantes têm uma função mais alargada, uma vez que incluem compostos que previnem a oxidação dos alimentos para estes não se tornarem rançosos, de forma a não perderem o seu valor nutricional nem comercial, e também antioxidantes dietéticos – substâncias dos alimentos que diminuem significativamente os efeitos adversos das espécies reactivas de oxigénio e azoto, nas funções fisiológicas normais do homem. Os antioxidantes da dieta normalmente podem actuar como inibidores dos radicais das reacções em cadeia, quelatadores de metais, inibidores de enzimas oxidativas e como cofactores de enzimas antioxidantes (Huang *et al.*, 2005).

O efeito dos antioxidantes, normalmente, é medido pela monitorização da inibição da oxidação de um substrato adequado. Após a oxidação do substrato sob condições standard, a extensão da oxidação é medida por métodos químicos, instrumentais ou sensoriais. Então, as características principais de qualquer teste são um substrato adequado, um iniciador da oxidação e um método apropriado para medir a extensão da oxidação (Sanchez-Moreno, 2002).

1.1 Substrato

Os lipossomas são vesículas em que um volume aquoso está rodeado por uma membrana composta por moléculas lipídicas (normalmente fosfolípidos). Formam-se espontaneamente quando os lípidos são dispersos num meio aquoso, dando origem a uma população de vesículas que podem variar no tamanho desde 10 nm até 100 μm de diâmetro.

Os fosfolípidos são os componentes principais das membranas biológicas. Os mais comuns são os constituídos por moléculas de fosfatidilcolina (Figura 11). Estas moléculas são anfipáticas e possuem uma ponte glicerol que liga um par de cadeias aciladas de hidrocarbonetos a uma cabeça polar hidrofílica – fosfocolina.

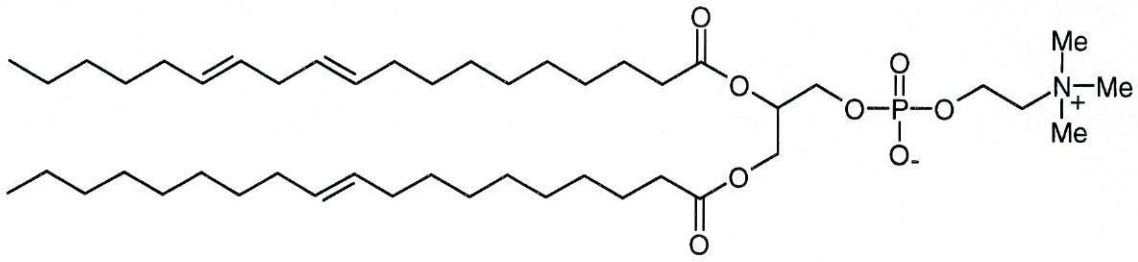


Figura 11 – Representação esquemática de fosfatidilcolina com caudas de ácido linoleico e ácido oleico.

As moléculas de fosfatidilcolina não são solúveis em água, e em meio aquoso permanecem adjacentes em folhas planas constituídas por bicamadas de forma a minimizar as interacções desfavoráveis entre a fase aquosa e a longa cadeia de ácido gordos (Figura 12). Estas interacções são completamente eliminadas quando as folhas se dobram sobre elas para formar vesículas fechadas.

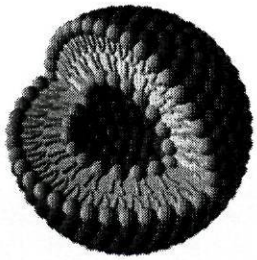


Figura 12 – Esquema 3D de lipossomas.

As fosfatidilcolinas também conhecidas por lecitinas podem ser provenientes de fontes naturais ou sintéticas. Normalmente são extraídas de gema de ovo ou feijões de soja, mas também podem ser obtidas de coração de boi ou da espinha dorsal. Os fosfolípidos de fontes naturais, como os que foram usados neste estudo, são uma mistura de fosfatidilcolinas que variam entre si no comprimento e no grau de insaturação dos ácidos gordos. As moléculas provenientes de plantas têm um nível maior de insaturação nas cadeias de ácidos gordos acilados.

Independentemente dos seus constituintes químicos, que determinam as propriedades como fluidez da membrana, densidade de carga e permeabilidade, os lipossomas são caracterizados pelo seu tamanho e forma. Eles podem ser constituídos por uma bicamada membranar única (vesículas unilamelares) ou por múltiplas lamelas membranares concêntricas (vesículas multilamelares) (Figura 13). Dependendo do seu

tamanho podem ser classificados como pequenos (20-50 nm), intermédios (50-100 nm) e grandes (100-1000 nm) (New, 1990).

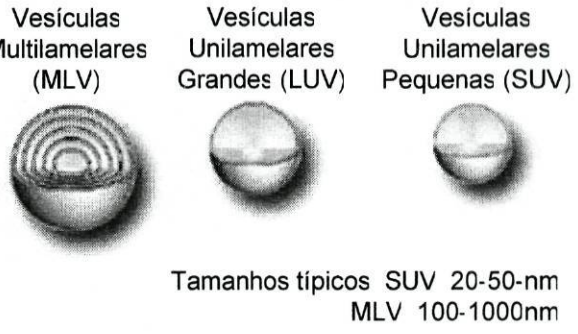


Figura 13 – Esquema de diferentes tipos de lipossomas.

As vesículas artificiais de fosfolípidos são frequentemente usadas como modelos de bicamadas fosfolipídicas que constituem membranas celulares e subcelulares. Em particular, os lipossomas preparados a partir de fosfatidilcolina contêm ácidos gordos polinsaturados e são bons modelos para investigar os mecanismos da peroxidação lipídica e a acção antioxidante de alguns componentes biológicos na bicamada fosfolipídica. Os fosfolípidos de ovo e soja são os mais usados como substratos uma vez que são os mais facilmente acessíveis.

As características cinéticas da oxidação de suspensões lipossomais foram investigadas por diversos investigadores. Barclay e colaboradores (1980) mostraram que a oxidação de lipossomas de fosfolípidos de ovo iniciada por um gerador de radicais livres em solução tem a mesma cinética da autoxidação lipídica (Figura 14).

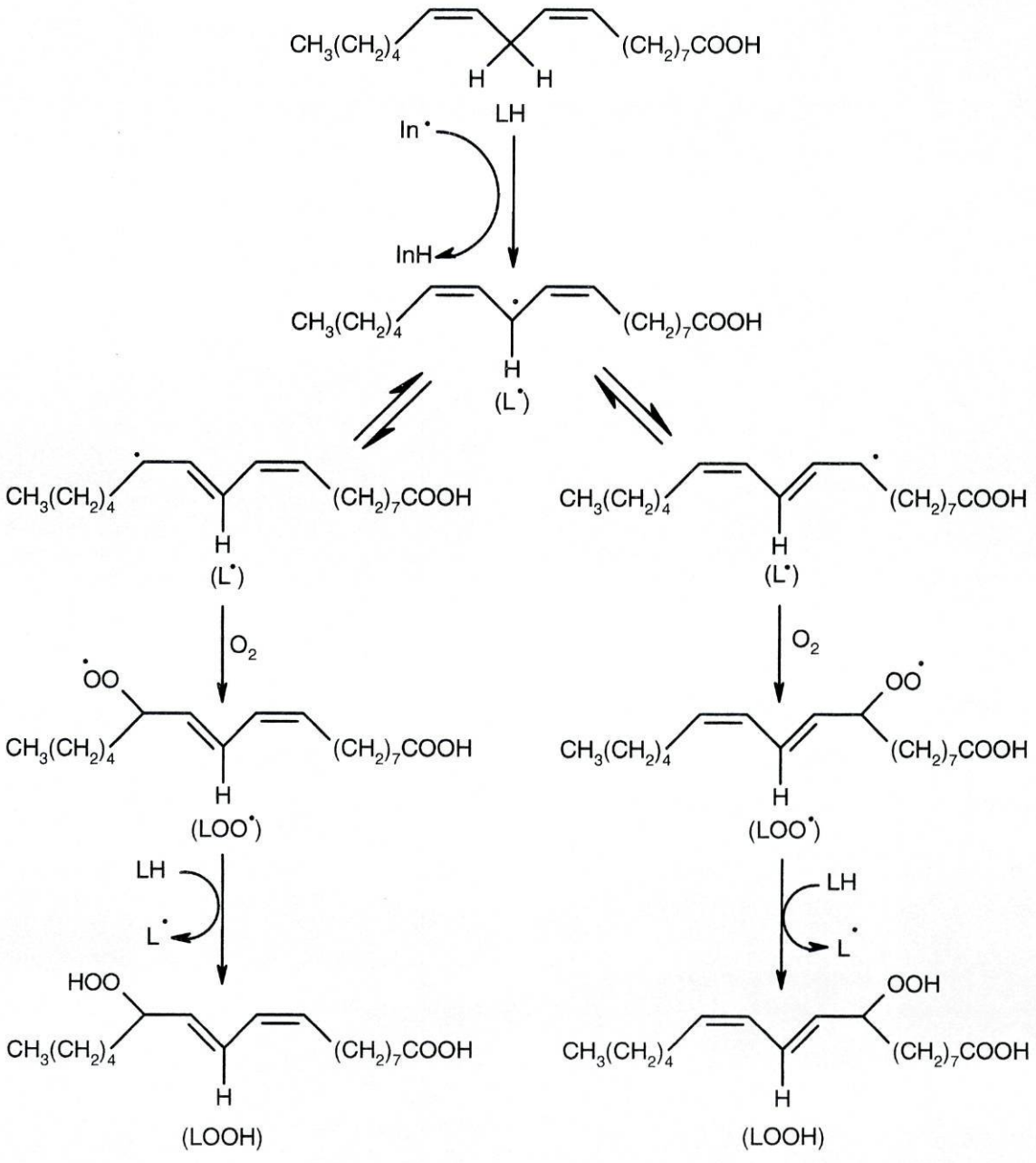


Figura 14 – Mecanismos de peroxidação lipídica do ácido linoleico (LH, ácido linoleico; L•, radical alquilo (estruturas de ressonância); LOO•, radical peroxilo; LOOH, hidroperóxido com ligações duplas conjugadas; In•, radical iniciador; InH, forma reduzida do radical iniciador).

Yamamoto e colaboradores, (1987) demonstraram que os ácidos gordos polinsaturados presentes nos lipossomas de fosfatidilcolina são oxidados pelo mesmo mecanismo que em solução e que a sua propensão para a oxidação é independente do meio de reacção. No entanto, estes estudos foram realizados em lipossomas multilamelares. Os lipossomas unilamelares são um modelo mais apropriado para a oxidação por radicais

livres uma vez que as biomembranas são em geral estruturas unilamelares (Koga *et al.*, 1997).

1.2 Iniciador

A oxidação "controlada" dos lipossomas constitui um modelo válido para o estudo da actividade antioxidante de compostos. O conceito "controlada" refere-se à ocorrência da oxidação a uma velocidade constante e conhecida de modo a permitir um estudo cinético da mesma. Esta condição pode ser conseguida pela utilização de AAPH (hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-metil propanimidamida)) como fonte de radicais iniciadores da oxidação em alternativa a outros iniciadores como Cu (II), lipoxigenase, peroxidases, peroxinitrito e mioglobina (Barclay & Inglod, 1981), utilizados frequentemente neste tipo de estudos. O AAPH é um composto azotado que sofre termólise a 37°C e origina radicais alquilo a uma velocidade constante, os quais após reacção com o oxigénio dão origem a radicais peroxilo (Figura15).

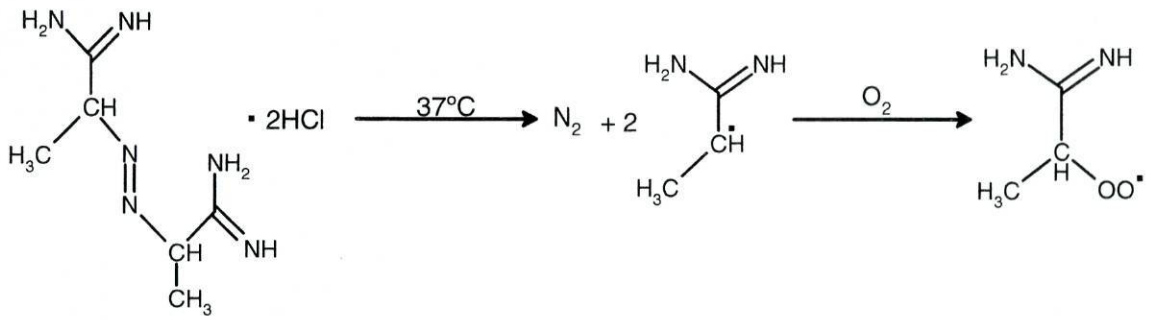


Figura 15 – Térmolise do AAPH.

Os radicais peroxilo provenientes da decomposição térmica do AAPH difundem-se com facilidade no meio aquoso onde são gerados e atingem rapidamente os lípidos onde atacam preferencialmente átomos de hidrogénio bis alílicos da cadeia carbonada de ácidos gordos insaturados, iniciando-se a peroxidação.

1.3 Técnicas de análise

As técnicas de análise podem dividir-se em dois grandes grupos: as que medem a extensão da oxidação lipídica e as que medem a capacidade de sequestrar radicais e quelatar iões metálicos.

Alguns dos métodos espectrofotométricos mais comuns para avaliar a capacidade de sequestrar radicais livres e avaliar o poder redutor de antioxidantes encontram-se compilados na Tabela 3:

Tabela 3 – Diferentes métodos *in vitro* que medem e/ou prevêem índices de actividade antioxidante (Adaptado de Aruoma *et al.*, 2003).

Método Analítico
Radical Triclorometilperoxilo ($CCl_3O_2^{\bullet}$)
Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity assay)
Método PCL (Photochemiluminescence assay)
TEAC I (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical $ABTS^{+}$ /metmyoglobin)
TEAC II (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ($ABTS^{\bullet+}$ com Dióxido de Manganês MnO_2)
TEAC III ($ABTS^{+}$ com Persulfato de Sódio KO_8S_2)
TOSC (Total Oxidant Scavenging assay)
TRAA (Tocopheroxyl Radical Attenuating Ability)
Método DPPH (Diphenyl-1-picrylhydrazyly assay)
Método DMPD (N,N-Dimethyl *p*-phenylendiamine assay)
Método TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter)
Método FRAP (The Ferric Reducing Ability Power assay)
Método TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

1.3.1 DPPH

Bondet *et al.*, (1997) descreveram um método envolvendo a utilização de um radical livre e estável, o $DPPH^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Figura 16), que reage com o antioxidante numa solução de metanol.

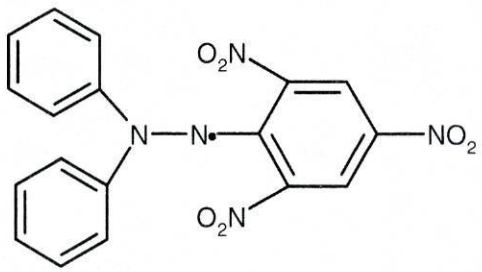


Figura 16 – Estrutura química do 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

A redução da concentração do $DPPH^{\bullet}$ é monitorizada pelo decréscimo da absorvância no comprimento de onda característico, durante a reacção. Na sua forma radical, o $DPPH^{\bullet}$ absorve a 515 nm, mas após a redução por um antioxidante ou uma espécie

radical a absorção desaparece. A capacidade de neutralizar radicais livres pode ser avaliada usando o DPPH como radical livre.

1.3.2 FRAP

O método FRAP (Ferric Reducing Ability Power) tem sido utilizado com frequência na avaliação dos componentes antioxidantes dos polifenóis da dieta. Esta técnica depende da redução do complexo de tripiridiltriazina férrica $[Fe(III)\text{-}TPTZ_2]^{3+}$ a tripiridiltriazina ferrosa $[Fe(II)\text{-}TPTZ_2]^{2+}$, por um antioxidante, normalmente em condições não fisiológicas, com pH a cerca de 3,6 (Figura 17).

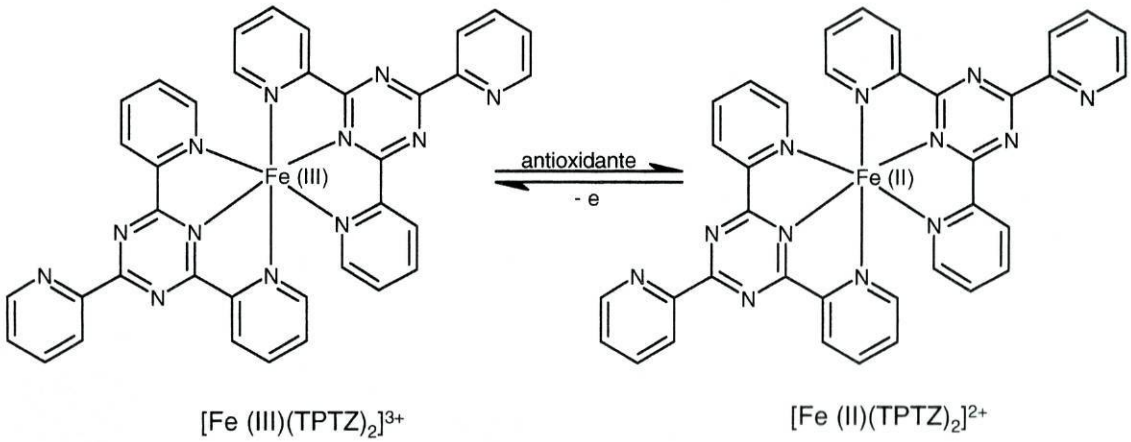


Figura 17 – Redução do complexo de tripiridiltriazina férrica a tripiridiltriazina ferrosa.

Nesta técnica o produto da reacção é detectado através de espectrofotometria pois a complexo $[Fe(II)\text{-}TPTZ_2]^{2+}$ tem um máximo de absorção a 593 nm, e, tal como a técnica TEAC, mede a capacidade redutora do antioxidante.

Para medir a extensão da oxidação utilizam-se técnicas mais sensíveis como monitorização do consumo de oxigénio (Burton *et al.*, 1981; Niki *et al.*, 1984, 1985), medição espectrofotométrica dos dienos conjugados (Niki *et al.*, 1985; Esterbauer *et al.*, 1989), determinação dos produtos secundários de oxidação por reacção com ácido tiobarbitúrico (Niki *et al.*, 1985), por detecção com técnicas cromatográficas (GC ou HPLC) (Esterbauer *et al.*, 1987) ou método do tiocianato por quimioluminescência (Niki *et al.*, 1985).

1.3.3 *Consumo de oxigénio*

O oxigénio intervém directamente na fase de propagação da oxidação lipídica. Durante a formação dos hidroperóxidos verifica-se um intenso consumo de oxigénio (Figura 14). Quando está presente um antioxidante, este actua sobre os radicais iniciadores e propagadores da oxidação, neutralizando-os. Deste modo, há uma diminuição do consumo de oxigénio por um período de tempo, até se esgotarem os antioxidantes. Após este período, o consumo de oxigénio volta ao normal. Estas variações no consumo de oxigénio podem ser monitorizadas com a utilização de um eléctrodo de oxigénio tipo Clark.

1.3.4 *Formação de dienos conjugados*

Durante a oxidação lipídica ocorre a formação de hidroperóxidos com ligações duplas conjugadas nos ácidos gordos insaturados, após a remoção de hidrogénio por radicais livres. O progresso de autoxidação é monitorizado pela absorção na zona dos UV a 233 nm (comprimento de onda de absorção máxima). Na presença de antioxidantes a formação de hidroperóxidos com ligações duplas conjugadas é inibida, verificando-se um período de tempo em que não há um aumento na medição da absorvância. Quando os antioxidantes se esgotam é retomada a formação de hidroperóxidos com ligações duplas conjugadas. Este método é um indicador real do estado de oxidação dos ácidos gordos.

1.4 Antioxidantes

Os flavonóides são das substâncias com capacidade antioxidante, presentes em maior quantidade na dieta. Vários estudos tentam relacionar os efeitos protectores destes compostos com a sua abundância nos alimentos e também tentam estabelecer uma relação estrutura-actividade entre os compostos. Entre as classes mais estudadas encontram-se os 3-flavanóis, os flavonóis e as antocianinas.

A quercetina (Figura 18) é o flavonol mais abundante da nossa dieta pois encontra-se presente em muitos frutos, vegetais e bebidas. Este flavonol é particularmente abundante nas cebolas e no chá.

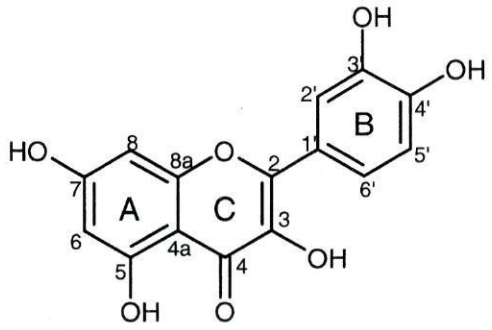


Figura 18 – Estrutura química da quercetina.

A quercetina possui o mesmo número de grupo hidroxilo nas mesmas posições que a catequina e a epicatequina, mas contém também um grupo carbonilo na posição 4 do anel C e uma ligação dupla na posição 2,3 do anel C a mais que a catequina e a epicatequina (Figura 2). Estas características estruturais conferem-lhe aptidões químicas diferentes dos 3-flavanóis.

O ácido cafeico (Figura 19) apresenta as características estruturais atribuídas aos flavonóides mais importantes, nomeadamente a estrutura *o*-catecol, uma cadeia lateral apresentando uma ligação dupla conjugada com o anel fenólico e com um grupo carbonilo, permitindo a estabilização do radical fenoxilo.

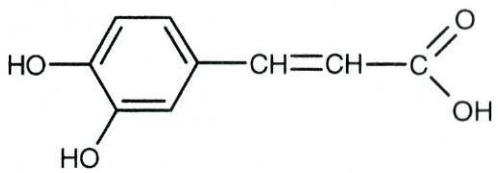
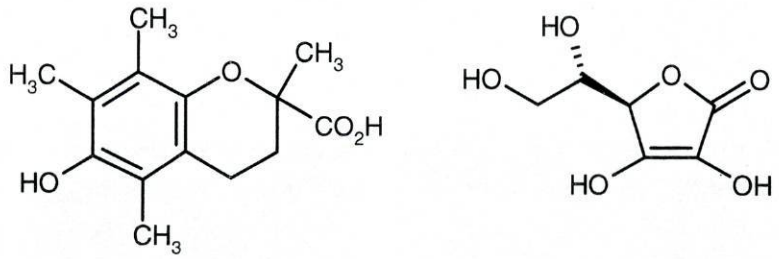


Figura 19 – Estrutura química do ácido cafeico.

O Trolox, o análogo hidrosolúvel da vitamina E (Figura 20), e o ácido ascórbico (vitamina C) (Figura 20) são dois compostos de referência que apresentam actividade antioxidante, e que são utilizados como antioxidantes de referência em muitos trabalhos (Sanchez-Moreno *et al.*, 2003; Rimando *et al.*, 2002; Fernández-Pachón *et al.*, 2004; Arnous *et al.*, 2002).



Trolox Ácido Ascórbico

Figura 20 – Estrutura química do Trolox e do Ácido Ascórbico.

Com a utilização destes compostos pretendeu-se relacionar as diferenças estruturais com as diferenças observadas na actividade antioxidante. Além disso, como são compostos que apresentaram efeito antioxidante noutros trabalhos, foram utilizados para desenvolver e aperfeiçoar as técnicas utilizadas para a avaliação e caracterização da actividade antioxidante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

DMSO, KH_2PO_4, ácido ascórbico e ácido perclórico (Merck, Darmstadt, Alemanha); AAPH (hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-metil propanimidamida)), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), $FeCl_3$, quercetina, catequina, epicatequina, ácido cafeico, trolox, Hepes, NaCl e L-α-Fosfatidilcolina de soja (Sigma-Aldrich, Espanha); TPTZ (2,4,6-tripiridil-*s*-triazina) e reagente de Fiske e Subbarow (Fluka, Espanha).

2.2 Avaliação da Capacidade Antiradicalar

A avaliação da capacidade antiradicalar foi determinada utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) segundo o método descrito na literatura com algumas modificações (Bondet *et al.*, 1997). A reacção foi efectuada em cuvetes de plástico a uma temperatura de 22-23ºC. Preparou-se uma solução 60 μM de radical DPPH em metanol. Colocaram-se 3 mL desta solução em cada cuvete a utilizar. O branco no espectrofotómetro Unicam 5625 UV/Vis foi efectuado usando metanol e o controlo foi a solução de DPPH sem a presença de qualquer antioxidante. Adicionaram-se os compostos a testar às cuvetes. Agitaram-se e efectuaram-se leituras da absorvância a 515 nm, com intervalos de 10 minutos durante um período de 30 min. Os compostos antioxidantes padrão foram dissolvidos em metanol e utilizados numa concentração final de 10 μM. Os ensaios foram efectuados em triplicado e os resultados expressos em μM equivalentes de Trolox, após a realização de uma curva de calibração utilizando soluções deste composto com diferentes concentrações (2,5 -50 μM) (Psarra *et al.*, 2002). Para os resultados finais utilizou-se uma janela de 0-20 minutos.

2.3 Avaliação do Poder Redutor

A avaliação do poder redutor foi realizada segundo o método FRAP (Ferric Reducing/ Antioxidant Power) desenvolvido por Benzie & Strain, 1996, com algumas modificações. Preparou-se o reagente FRAP do seguinte modo: 10 volumes de tampão acetato 300 mM, pH 3,6 + 1 volume de solução 10 mM de TPTZ (2,4,6- tripiridil-*s*-triazina) em 40 mM de HCl + 1 volume de solução de $FeCl_3$ 20 mM. Este reagente foi

aquecido numa estufa a 37ºC e foi diluído a 1/3 com tampão acetato ou metanol, consoante a solubilidade do composto a testar, para ter uma coloração tal que após a reacção se obtivessem valores dentro da gama de leitura do espectrofotómetro. O branco no espectrofotómetro foi efectuado com tampão acetato ou metanol e para controlo utilizou-se reagente FRAP. Colocaram-se 3 mL de reagente na cuvete e adicionou-se o composto a testar. Após a adição, as cuvetes foram rapidamente agitadas num vortex e fizeram-se as leituras de absorvância a 593 nm ao tempo 0 e de 4 em 4 minutos durante 20 minutos, a 37ºC. Os compostos antioxidantes padrão foram dissolvidos em metanol e foram testadas concentrações finais de 10 μM. Os ensaios foram efectuados em triplicado e os resultados também foram expressos em μM equivalentes de Trolox por regressão linear de uma curva de calibração utilizando soluções deste composto com diferentes concentrações (2,5 -50 μM). Para os resultados finais utilizou-se uma janela de 0-4 minutos.

2.4 Preparação de Lipossomas

Os lipossomas foram preparados a partir de uma solução de L-α-fosfatidilcolina (PC) de soja em clorofórmio, por evaporação até à secura com uma corrente de árgon, segundo o procedimento descrito na literatura (Rodrigues *et al.*, 2001). O filme lipídico resultante foi colocado sob vácuo durante 3 horas para remover os vestígios de solvente orgânico. Este filme foi ressuspendido em tampão Hepes (10 mM Hepes, 0,1M NaCl, pH 7,4), e a mistura foi agitada vigorosamente a uma temperatura acima da temperatura de transição de fase, de forma a produzir vesículas multilamelares (MLV). Foram efectuados 5 ciclos de congelamento/descongelamento para normalizar o espaço interno das vesículas. O congelamento foi conseguido mergulhando a solução em azoto líquido e o descongelamento foi efectuado num banho a 37ºC. As suspensões lipídicas foram mantidas a 37ºC durante 30 min para a solução atingir um equilíbrio. Seguidamente foi efectuada a extrusão da solução, num extrusor de aço inoxidável (Lipex). Foi usado um filtro de policarbonato (Corning) com poros de 100 nm para formar vesículas unilamelares grandes (LUV).

2.4.1 Doseamento de Lipossomas

Para a determinação da concentração correcta de lipossomas utilizou-se um método sugerido por New, 1990, o método de Bartellet modificado. Prepararam-se soluções

padrão de fósforo a partir de dihidrogenofosfato de potássio anidro em água desionizada, com concentrações entre 0,064-0,256 mM. Pipetou-se para tubos de 10 ml graduados, 0,5 mL de cada amostra a testar, de padrões e de água desionizada para o branco. Adicionou-se 0,4 mL de ácido perclórico 70% a cada tubo. Incubaram-se os tubos durante 1 hora num banho de areia a uma temperatura rigorosamente controlada entre 180°-200°C para se proceder à mineralização do fósforo. Retiram-se os tubos do banho de areia e deixaram-se a arrefecer à temperatura ambiente. Adicionou-se 4,6 mL de molibdato de amónio, e seguidamente 0,2 mL de reagente de Fiske e Subbarow (ácido 1-amino-2-naftil-4-sulfónico). Agitou-se, num agitador mecânico, cada um dos tubos e colocaram-se em banho de água fervente durante 7 min. Retiraram-se os tubos e acertou-se o volume com água desionizada. Deixou-se arrefecer e leu-se a absorvância a 880 nm. Como a L-α-fosfatidilcolina contém 1 mol de fósforo por cada mol de fosfolípido, a concentração foi retirada directamente da curva de calibração efectuada com os padrões de fósforo.

2.5 Procedimento de Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica dos lipossomas unilamelares grandes (LUV) de soja foi induzida por radicais peroxilo gerados a uma razão constante, por degradação térmica do composto azo, AAPH (hidrocloreto de (2,2'-azobis(2-metilpropanimidamida) na presença ou ausência dos antioxidantes e seguido através da monitorização do consumo de oxigénio e da produção de dienos conjugados.

2.6 Monitorização do Consumo de Oxigénio

O consumo de oxigénio foi monitorizado continuamente com um eléctrodo de oxigénio do tipo Clark (Hansatech®) em célula fechada e ao abrigo da luz, à temperatura de 37°C e sob agitação, segundo o método da literatura (Porto *et al.*, 2003). Foram realizados ensaios preliminares de forma a optimizar as condições experimentais, nomeadamente a concentração de AAPH, de lipossomas, e de antioxidante a testar. A mistura de reacção continha 1,3 mL de tampão Hepes, 200 μL de LUV (concentração final=340μM) e o antioxidante a testar dissolvido num volume de solvente que nunca excedeu 0,3% do volume final, de forma a evitar danos nos lipossomas. Esta mistura repousou num banho termostatizado a 37°C, durante 1 hora. Após este período, foi então adicionada à célula

do eléctrodo e a reacção foi iniciada com a adição de 30 μL de AAPH (100 mM em tampão Hepes) para uma concentração final de 10 mM. Os compostos antioxidantes padrão foram dissolvidos em DMSO e testados numa concentração final de 1,25 μM. A capacidade antioxidante foi avaliada pelo período de indução introduzido pelos compostos testados. Este período foi determinado graficamente através do perfil do consumo de oxigénio, pela intercepção das tangentes das rectas no período em que a oxidação foi inibida e quando esta inibição deixa de acontecer (Figura 21).

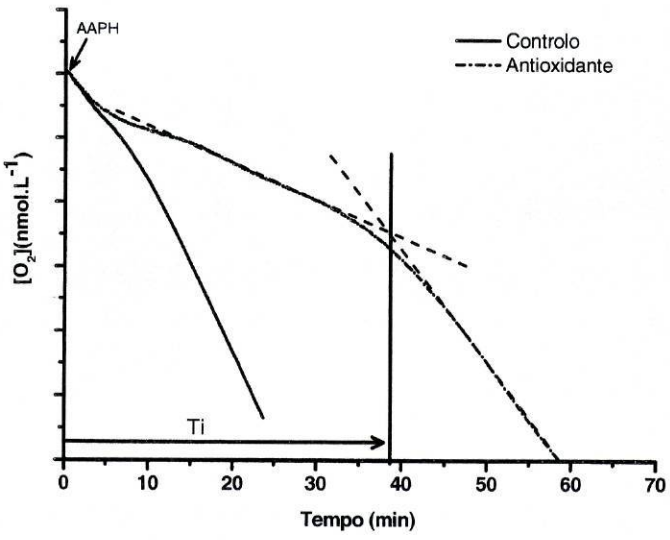


Figura 21 – Monitorização do consumo de oxigénio na presença e ausência de antioxidante. Ti – Tempo de indução.

Os ensaios foram efectuados em triplicado e os resultados foram expressos relativamente ao Trolox.

2.7 Monitorização da Formação de Dienos Conjugados

A monitorização dos dienos conjugados foi realizada a 37ºC num espectrofotómetro Shimadzu UV-265 de feixe duplo ao comprimento de onda de 233 nm (Esterbauer *et al.*, 1989). Realizaram-se estudos prévios para determinar a concentração de lipossomas e de AAPH adequadas para este estudo. Optou-se por uma concentração mínima de AAPH (5mM) visto que este absorve ao comprimento de onda utilizado para avaliar a formação de dienos conjugados. Quanto aos lipossomas optou-se por uma concentração final de 500 μM. Os lipossomas foram incubados em 990 μL de tampão Hepes, num banho de água a 37ºC com o antioxidante a testar. A reacção foi iniciada com a adição

de 10 μL de AAPH. Foram retiradas alíquotas de 60 μL desta mistura de 15 em 15 minutos e dissolvidos directamente em 940 μL de etanol absoluto numa cuvete de quartzo de 1 mL (Gonçalves *et al.*, 1998). A formação de dienos conjugados foi monitorizada durante um período médio de 3 horas, registando o valor de absorvância lido a 233 nm utilizando etanol como branco. Durante os ensaios, os tubos com a mistura de reacção foram mantidos ao abrigo da luz e tapados para não ocorrer evaporação da solução. A capacidade antioxidante foi avaliada pelo período de indução introduzido pelos compostos testados. Este período foi determinado graficamente pelo perfil da formação dos dienos conjugados, pela intercepção das tangentes das rectas no período em que a oxidação foi inibida e quando esta inibição deixa de acontecer (Figura 22).

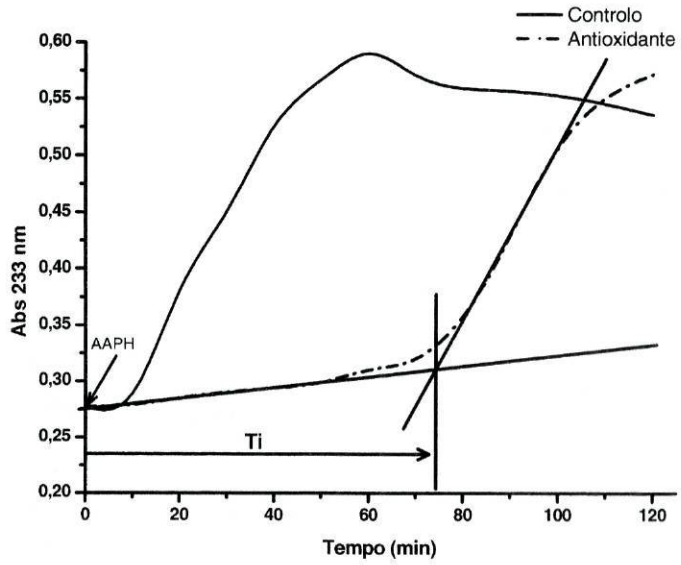


Figura 22 – Formação dos dienos conjugados na presença e ausência de antioxidantes. Ti – Tempo de indução.

Os ensaios foram efectuados em triplicado e os resultados foram expressos relativamente ao Trolox. Os compostos antioxidantes padrão foram dissolvidos em DMSO e testados na concentração de 1,25 μM.

2.8 Análise Estatística

Todos os ensaios foram efectuados no mínimo em triplicado. Os valores são expressos como médias aritméticas ± desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas

através de análise de variância a um factor (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni, e do teste de *t*-Student para comparações entre dois grupos. Foram consideradas significativas as diferenças com $P < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Compostos Antioxidantes Padrão

3.1.1 Avaliação da capacidade antiradicalar e do poder redutor

A avaliação da capacidade sequestradora de radicais de alguns compostos padrão foi efectuada utilizando o radical estável DPPH. A sua forma radicalar absorve a 515 nm mas quando reduzido por um antioxidante (AH) ou uma espécie radical ($R^{\bullet}$) a absorção cessa:

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow DPPH\text{-}R$$

Através da análise do Figura 23(a) percebe-se claramente a maior capacidade da quercetina para neutralizar radicais relativamente aos outros compostos testados, tal como já foi verificado noutros estudos (Matsuda *et al.*, 2003; Villanõ *et al.*, 2005). Seguidamente encontra-se o ácido cafeico e o ácido ascórbico. As diferenças encontradas entre estes compostos prendem-se provavelmente com as diferenças entre o número de grupos hidroxilo das moléculas e com a presença de anéis aromáticos que proporcionam deslocalizações electrónicas maiores nas moléculas (Rice-Evans *et al.*, 1996).

As moléculas que, depois de doarem hidrogénios dão origem a radicais estáveis são capazes de se ligarem ao DPPH e por isso continuarem a sequestrar radicais. Uma vez que, quanto maior for a deslocalização electrónica, maior é a estabilidade do radical e quanto maior a estabilidade do radical maior a facilidade com que a molécula doa os seus hidrogénios, então podemos compreender as diferenças dos valores encontrados para os diferentes compostos com base na sua estrutura química.

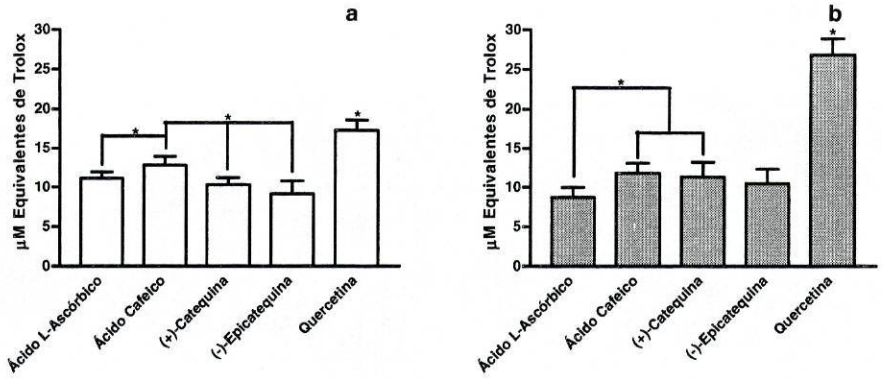


Figura 23 – Capacidade antiradicalar **(a)** e poder redutor **(b)** de 10 µM do ácido ascórbico, ácido cafeico, (+)-catequina, (-)-epicatequina e quercetina, avaliada pelos métodos do DPPH e FRAP respectivamente. Resultados expressos em µM de Trolox. * P <0,05

A (+)-catequina e a (-)-epicatequina (Figura 2) apresentam valores inferiores (Figura 23 (a)), mas que não diferem significativamente entre si. Pode-se concluir assim que a estereoquímica da molécula não interfere significativamente com a sua capacidade de sequestrar radicais (Xu *et al.*, 2004).

Para avaliar o poder redutor dos compostos utilizou-se o método FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power). A pH baixo, a redução de [Fe(III)-$TPTZ_2$] a [Fe(II)-$TPTZ_2$] dá origem a uma coloração azul intensa, cujas variações podem ser medidas a 593 nm. A redução deste composto é efectuada por acção de antioxidantes presentes na solução. Quanto maior a acção antioxidante, maior a extensão da reacção e por isso maior o valor de absorvância lido. Os resultados obtidos para os compostos padrão testados estão ilustrados no Figura 23(b).

Foi descrita uma relação entre a redução do metal e o número de grupos hidroxilo presentes nas moléculas (Pulido *et al.*, 2000). Os polifenóis têm a capacidade de quelatar iões metálicos ao nível do grupo *orto*-catecol nas posições 3',4'-dihidroxilo do anel B e nas posições 4-oxo, 3-OH ou 4-oxo, 5-OH do anel C (Rice-Evans *et al.*, 1996). A existência destes grupos nas moléculas está intimamente relacionada com a possibilidade de ocorrer a oxidação do flavonóide e a redução do metal (Figura 24). Está igualmente demonstrado que a conjugação da ligação dupla com o grupo 4-oxo do anel C é particularmente importante na aptidão para reduzir metais (Fernandez *et al.*, 2002).

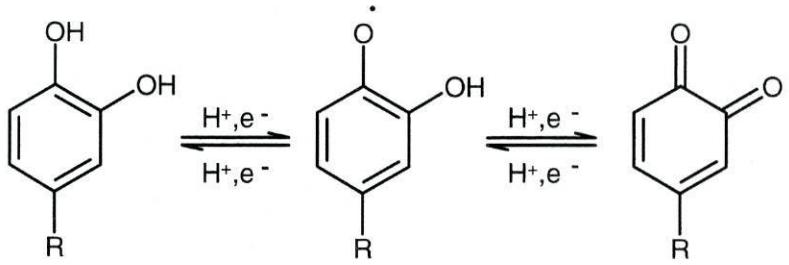


Figura 24 – Oxidação do grupo *orto*-catecol presente em flavonóides (Fernandez *et al.*, 2002).

Estes factos apoiam os resultados obtidos. A quercetina destaca-se largamente pela sua capacidade de quelatar metais relativamente aos outros compostos testados devido à presença dos requisitos mencionados anteriormente (Figura 18).

O ácido cafeico, a (+)-catequina e a (-)-epicatequina mostraram uma capacidade redutora semelhante, o que já seria de esperar para a (+)-catequina e a (-)-epicatequina (Xu *et al.*, 2004). Estes dois compostos diferem apenas na sua estereoquímica (Figura 2), não havendo alteração do número de grupos hidroxilo, nem das ligações duplas.

O ácido cafeico possui menos grupos hidroxilo (Figura 19), mas tem um grupo *orto*-catecol que, se pensa, terá um papel muito importante na quelatação dos metais, pois um dos mecanismos propostos envolve a oxidação deste grupo (Figura 24).

No entanto estes compostos não possuem conjugação no anel C (o ácido cafeico nem sequer possui o anel C), o que os torna menos eficazes na quelatação de iões metálicos comparativamente à quercetina. O ácido ascórbico (Figura 20) foi o composto que revelou menor capacidade de reduzir iões metálicos.

3.1.2 Avaliação da actividade antioxidante na peroxidação lipídica

Para avaliar a capacidade antioxidante do ácido L-ascórbico, ácido cafeico, (+)-catequina, (-)-epicatequina e quercetina prepararam-se soluções em DMSO (dimetilsulfóxido) e adicionaram-se alíquotas destes compostos de forma à concentração final ser de 1,25 μM tanto na monitorização do consumo de oxigénio como na formação de dienos conjugados.

A avaliação da capacidade antioxidante na inibição da peroxidação lipídica de lipossomas de fosfatidilcolina de soja foi efectuada utilizando AAPH como iniciador, uma vez que por decomposição térmica este dá origem a radicais peroxilo.

Na figura 25 estão esquematizados os resultados obtidos para a monitorização do consumo de oxigénio (a) e para a formação de dienos conjugados (b).

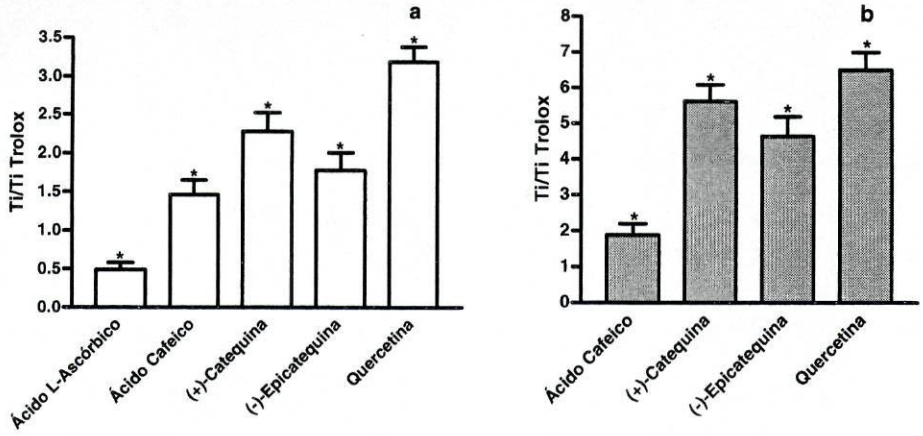


Figura 25 – Inibição da oxidação de lipossomas de fosfatidilcolina de soja por 1,25 μM de ácido ascórbico, ácido cafeico, (+)-catequina, (-)-epicatequina e quercetina monitorizada pelo consumo de oxigénio **(a)** e formação de dienos conjugados **(b)**. Os resultados são expressos como a razão do tempo de inibição pelo tempo de inibição obtido com o Trolox. * P <0,05

A monitorização do consumo de oxigénio permite avaliar a capacidade antioxidante na fase inicial e fase de propagação da oxidação ao passo que a formação de dienos conjugados é uma medida dos produtos primários da oxidação lipídica. Os resultados são expressos relativamente ao Trolox (análogo hidrosolúvel da vitamina E).

Através dos dados obtidos quer no consumo de oxigénio, quer na medição da formação de dienos conjugados, verificou-se que a relação obtida com os métodos espectrofotométricos de avaliação da capacidade antiradicalar e do poder redutor se mantém. A quercetina é o composto mais eficaz no retardamento da peroxidação lipídica apresentando tempos de inibição da oxidação muito superiores aos obtidos com o Trolox e com os outros compostos testados. A (+)-catequina também se evidenciou, exibindo tempos de indução apreciáveis. No entanto, o seu isómero estereoquímico (-)-epicatequina apresenta valores estatisticamente diferentes, sendo menores do que os da catequina. Estes resultados indiciam que a inibição da peroxidação lipídica poderá ser estereoselectiva (Caturla *et al.*, 2003; Tsuchiya, 2001). Uma vez que os lípidos se

encontram sob a forma de vesículas, de forma a mimetizar alvos biológicos como membranas celulares, a acessibilidade aos radicais é diferente do que se estivessem em cadeia aberta. Assim, de alguma forma, o grupo hidroxilo da catequina que se posiciona para a frente do plano da molécula está mais disponível para ceder hidrogénios aos radicais peroxilo do que o grupo hidroxilo da epicatequina que se encontra para trás do plano da molécula. Estes resultados discordam dos resultados descritos por Gaulejac *et al.* (1999) que descreve uma acção mais potente da epicatequina relativamente à catequina. No entanto estes autores obtiveram estes resultados na captação do anião superóxido de um sistema hipoxantina-xantina oxidase, e não na captação de radicais peroxilo nem na interacção dos polifenóis com sistemas lipídicos.

O ácido cafeico apresentou um efeito muito menor que os outros compostos na formação dos dienos conjugados e os resultados ácido ascórbico não foram apresentados porque este composto não revelou nenhum efeito protector. O carácter hidrofílico destes compostos é, possivelmente, responsável pela sua menor actividade em sistemas lipídicos.

4 CONCLUSÃO

Verificou-se que a quercetina foi o composto testado que exibiu uma capacidade antioxidante maior, tanto na captação de radicais livres como na quelatação de iões metálicos. Foi também o composto que apresentou maior efeito na inibição/retardamento da peroxidação lipídica, quando esta foi avaliada pelo consumo de oxigénio como quando se monitorizou a formação de dienos conjugados. Esta maior capacidade da quercetina relativamente aos outros é devido provavelmente às suas características estruturais.

Os restantes compostos testados demonstraram actividade antioxidante sendo o ácido ascórbico o que apresentou menor efeito em todas as técnicas utilizadas. Com a catequina obteve-se um efeito semelhante ao da epicatequina, e ambas tiveram uma actividade superior ao ácido cafeico. Estas diferenças foram observadas em todas os métodos utilizados, e prendem-se principalmente com as características da estrutura química das moléculas.

O carácter lipofílico destes compostos é crucial neste tipo de acção antioxidante nestas condições. De facto, este efeito não se verifica com padrões antioxidantes hidrofílicos como o ácido ascórbico. Como o ácido ascórbico é uma molécula hidrofílica, situa-se na junto da interface aquosa, não tendo capacidade de interagir com a cadeia hidrofóbica dos ácidos gordos insaturados (Laranjinha *et al.*1999). Numa fase inicial, é possível que consiga retardar um pouco a oxidação pois é capaz de sequestrar os radicais peroxilo formados pela decomposição térmica do AAPH, o que se traduz nos resultados obtidos pela monitorização do consumo de oxigénio. Mas uma vez que a oxidação se inicia na cadeia dos ácidos gordos, este deixa de ser capaz de impedir a cadeia de autoxidação lipídica e por isso de impedir a formação dienos conjugados.

CAPÍTULO 2 – PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE PROCIANIDINAS EXTRAÍDAS DE GRAINHA DE UVA

1 INTRODUÇÃO

Os 3-flavanóis (catequinas e procianidinas) representam no geral a maior parte do extracto polifenólico total das grainhas de uva, e a sua extrema complexidade é o resultado de um número grande de compostos com estruturas muito semelhantes. A composição polifenólica das grainhas pode variar com muitos factores, entre os quais, o tempo de maturação das uvas e diferente qualidade das castas. No entanto, é na grainha que se encontram a maior parte das formas polimerizadas das procianidinas, que contém cerca de 81 % das procianidinas oligoméricas e 60 % das poliméricas totais da uva (De Freitas & Glories, 1999; Mateus *et al.*, 2001).

A extracção dos 3-flavanóis não implica obrigatoriamente o esmagamento das sementes pois as procianidinas encontram-se essencialmente na camada envolvente. Esta camada é facilmente dissolvida com a utilização de uma solução hidroalcoólica. No entanto a extracção dos 3-flavonóis depende de vários factores como o solvente, o tempo de extracção e a temperatura.

A técnica mais utilizada para separar os compostos polifenólicos é a cromatografia líquida. Para separar os compostos segundo o seu grau de polimerização utiliza-se frequentemente a cromatografia líquida em coluna a baixa pressão, tendo como princípio a diferente afinidade dos compostos para a fase estacionária. A fase estacionária Fractogel TSK-HW 40(S), também conhecida por gel Toyopearl, foi a que revelou maior eficácia na separação de procianidinas com massa moleculares entre 10^2 e 10^4 daltons, num trabalho realizado por Darné & Madéro-Tamargo, (1979). As ligações de hidrogénio, as interacções hidrofóbicas e iónicas estabelecidas entre o solvente, a fase estacionária e as procianidinas com elevado grau de polimerização levantam dificuldades ao fraccionamento destes compostos.

Para separação e identificação dos compostos com o mesmo grau de polimerização também se recorrem a técnicas de cromatografia líquida, mas de alta eficiência (HLPC), utilizando como fase estacionária um gel de sílica C18. Com a utilização desta técnica é possível purificar diferentes compostos e também efectuar o seu doseamento por detecção dos compostos por espectrofotometria UV. Neste caso é utilizado o comprimento de onda de absorção máximo dos 3-flavonóis, 280 nm.

Neste trabalho, foram extraídas procianidinas da grainha de uva e separadas segundo o seu grau de complexidade, obtendo-se em cinco fracções. Posteriormente foi caracterizada a actividade antioxidante destas procianidinas utilizando os métodos já

descritos, de forma a tentar relacionar a actividade antioxidante com a complexidade estrutural das procianidinas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação das procianidinas oligoméricas de grainhas de uva

2.1.1 Extracção das procianidinas das grainhas de uva

As grainhas (40 g) foram colocadas em 500,0 mL de solução hidroalcoólica ($Na_2S_2O_5$ 1g/L; etanol 50% (v/v)) e extraídas de acordo com os procedimentos descritos na literatura ligeiramente modificados para o efeito (Michaud *et al.*, 1971; Darné & Madéro-Tamargo, 1979). As grainhas foram trituradas com um homogeneizador durante 10 min, tendo ficado a macerar em repouso durante cerca de 10 horas. Decantou-se a solução e o precipitado sólido foi novamente colocado em 500,0 mL de solução hidroalcoólica ($Na_2S_2O_5$ 1g/L etanol 50% (v/v)) e triturado durante mais 10 min, tendo ficado novamente em repouso durante cerca de 10 horas. O sobrenadante (1 L) foi centrifugado a 3500 rpm e concentrado num evaporador rotativo sob vácuo (a 30 °C) até perfazer um volume de cerca de 200 mL. A solução foi extraída com clorofórmio (3x100 mL) de modo a eliminar as clorofilas, os carotenóides e outros lípidos. A fracção aquosa foi concentrada num evaporador rotativo sob vácuo (30 °C) até perfazer um volume de cerca de 150 mL de forma a eliminar os resíduos de clorofórmio que restavam nesta fracção. Os compostos polifenólicos foram depois extraídos com acetato de etilo (3x150 mL). A fracção orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada, e concentrada num evaporador rotativo sob vácuo (a 30 °C) até perfazer um volume de cerca de 200 mL. Adicionou-se lentamente à solução 250 mL de hexano, observando-se a formação de um precipitado correspondente aos taninos condensados insolúveis. A solução foi centrifugada e o sobrenadante foi separado da solução por decantação. O sobrenadante foi novamente concentrado num evaporador rotativo sob vácuo (a 30 °C) até perfazer um volume de 25 mL aos quais se adicionaram mais 33 mL de hexano. O precipitado resultante foi recuperado após centrifugação e decantação do sobrenadante. No final, os dois precipitados foram reunidos e redissolvidos em 50 mL acetato de etilo, seco com sulfato de sódio anidro e o solvente foi eliminado por evaporação num evaporador rotativo sob vácuo (a 30 °C). O extracto seco constituído essencialmente por procianidinas oligoméricas (Michaud *et al.*, 1971) foi guardado a -20°C até à sua posterior análise.

2.1.2 *Fraccionamento das procianidinas por cromatografia em coluna*

O extracto de procianidinas de grainhas obtido foi dividido em pequenas porções que foram fraccionadas por cromatografia líquida em coluna a baixa pressão. Cada porção foi dissolvida em 4 mL de metanol e aplicada numa coluna de gel TSK-Toyopearl HW 40(S) (Tosoh, Japão) (250 x 16 mm, *i.d.*), utilizando metanol como eluente e um fluxo controlado de 0,8 ml/min, segundo o método descrito na literatura (De Freitas *et al.*, 1998, com modificações). A eluição das várias fracções foi seguida durante 8 h por detecção a 280 nm (comprimento de absorção máximo dos 3-flavanóis). A fracção correspondente às primeiras duas horas e meia de eluição, e que corresponde aos monómeros de catequina e epicatequina foi eliminada. As restantes fracções foram recolhidas de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4 – Esquema de tempo de recolha das diferentes fracções (Freitas *et al.*, 1998).

	Tempo (h)
Fracção I	2:30 - 4
Fracção II	4 - 4:35
Fracção III	4:35 - 6
Fracção IV	6 - 7
Fracção V	7 - 8

Após a passagem de cada porção, a coluna foi lavada com uma solução de 5% de ácido acético em metanol durante 2 h, de modo a eliminar quase a totalidade dos polifenóis retidos, sendo em seguida condicionada novamente com metanol, durante 2 h, de forma a remover o ácido acético da coluna.

As fracções resultantes foram concentradas no evaporador rotativo sob vácuo, redissolvidas em água destilada e desionizada e posteriormente liofilizadas. Fez-se um stock de cada fracção em água para estudos de actividade antioxidante que foi guardado em tubos eppendorf, borbulhados em árgon e congelados a -20°C até posterior utilização.

2.1.3 Análise das fracções de procianidinas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As fracções foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Merck® Ref. L-7100, equipado com um detector DAD (Diode Array) Ref. L-7450 A Merck®) por injecção directa de 20 µl usando 2 colunas em série Merck®, Lichrospher, de fase reversa C18 ODS (250 x 4,6 mm, *i.d.*) de acordo com o método descrito na literatura (De Freitas *et al.*, 1999). A temperatura do forno foi de 25°C e o fluxo de 1,0 ml/min. Os eluentes utilizados foram: solvente A, H_2O/CH_2COOH, 2,5% (v/v); solvente B, CH_3CN/solvente A (8:2). O gradiente foi resumido na tabela seguinte (Tabela 5). Os cromatogramas foram obtidos a 280 nm.

Tabela 5 – Gradiente de eluição usado no HPLC/DAD na análise das fracções de procianidinas.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	93	7
5	93	7
90	80	20
95	0	100
105	0	100
110	93	7

2.2 Caracterização da actividade antioxidante das fracções de procianidinas

Para avaliar a capacidade antiradicalar das fracções de procianidinas utilizou-se o método do DPPH, segundo o procedimento descrito na secção de material e métodos do capítulo 1. O poder redutor foi averiguado utilizando o método FRAP também descrito na secção de material e métodos do capítulo 1. Para ambos os métodos as fracções de procianidinas foram dissolvidas em água e utilizadas numa concentração de 2,5 µg/mL.

A avaliação do efeito das fracções de procianidinas na peroxidação lipídica foi efectuada utilizando a monitorização do consumo de oxigénio e a monitorização de dienos conjugados. Os compostos foram dissolvidos em água e testados numa concentração final de 313 ng/mL.

2.3 Análise Estatística

Todos os ensaios foram efectuados no mínimo em triplicado. Os valores são expressos como médias aritméticas ± desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas através de análise de variância a um factor (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni, e do teste de *t*-Student para comparações entre dois grupos. Foram consideradas significativas as diferenças com $P < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização das fracções de procianidinas

Segundo Freitas *et al.*, 1998, a complexidade estrutural das procianidinas de cada fracção, isto é, o grau de polimerização e de esterificação vai aumentando gradualmente ao longo da eluição. A fracção correspondente aos monómeros, obtida nas primeiras 2 horas e meia de eluição foi rejeitada, uma vez que o interesse esteve em estudar que a actividade antioxidante das procianidinas mais polimerizadas e complexas. Para o estudo de monómeros utilizaram-se compostos obtidos comercialmente.

Os cromatogramas das fracções I, II e III, obtidos por HPLC foram comparados com os padrões e os principais picos foram identificados como se mostra nas Figuras 26, 27 e 28. Foram ainda eluidas fracções IV e V mas não foram analisadas por HPLC/DAD uma vez que não existem padrões de comparação, para proceder à respectiva identificação.

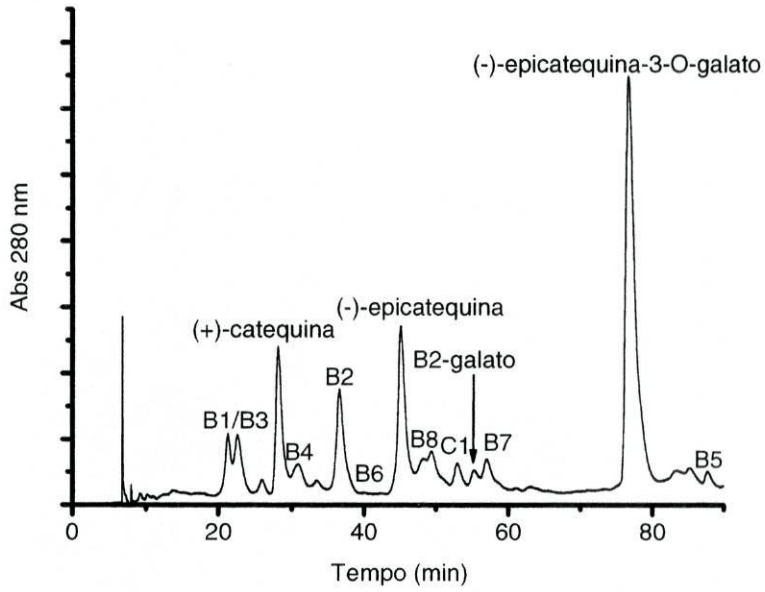


Figura 26 – Cromatograma de HPLC (Abs 280 nm) da Fracção I extraída do extracto de grainhas de uva obtido por cromatografia em gel TSK Toyopearl HW – 40 (S).

Pela análise da Figura 26 e com base nos tempos de retenção, foi identificado na fracção I o monómero monogalato (-)-epicatequina-3-O-galato, procianidinas diméricas (B_1, B_2, B_3, B_4, B_5, B_6, B_7, B_8 e B_2-galato) e ainda o trímero C_1. Os monómeros (+)-catequina e (-)-epicatequina que deveriam ter sido eluidos na primeira fracção que foi rejeitada,

estão também presentes nesta fracção. Este facto deveu-se ao facto da amostra injectada na coluna cromatográfica estar muito concentrada.

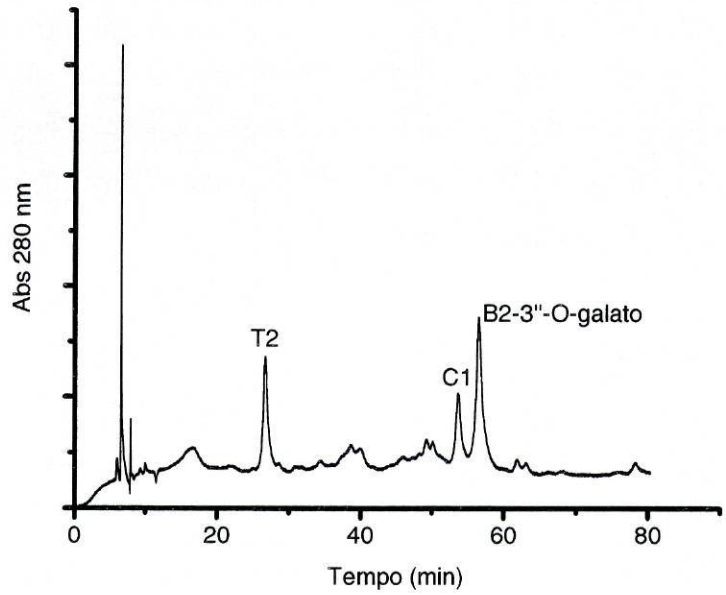


Figura 27 – Cromatograma HPLC (Abs 280 nm) da Fracção II extraída do extracto de grainhas de uva obtido por cromatografia em gel TSK Toyopearl HW-40 (S).

O cromatograma da fracção II apresentado na Figura 27 apresenta principalmente o dímero B_2 esterificado com ácido gálico, o B_2-3''-O-galato, o trímero C_1 e o trímero T_2.

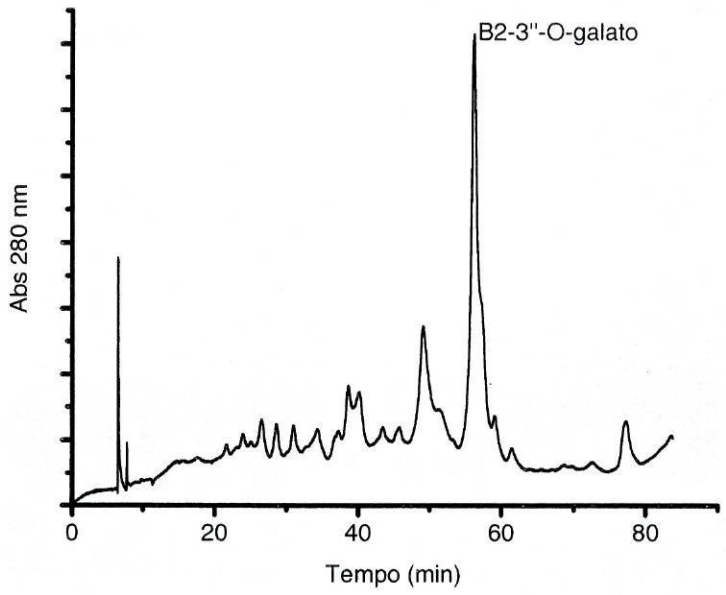


Figura 28 – Cromatograma HPLC (Abs 280 nm) da Fracção III extraída do extracto de grainhas de uva obtido por cromatografia em gel TSK Toyopearl HW-40 (S).

A fracção III (Figura 28) apresenta como seu principal constituinte o dímero monogalato B_2-galato e ainda algum C_1 que não foi totalmente eluido na fracção II.

De forma geral pode-se dizer que as fracções de procianidinas aumentam gradualmente o grau de polimerização e a complexidade estrutural: fracção I <fracção II <fracção III <fracção IV <fracção V (Tabela 6).

Tabela 6 – Composição fenólica esperada e peso molecular médio das fracções de procianidinas obtidas.

	Composição fenólica esperada	Peso Molecular Médio
Fracção I	(-)-epicatequina galato; dímeros B1 a B8; trímero C1	600
Fracção II	ésteres galato de dímeros; trímeros	800
Fracção III	trímeros	900
Fracção IV	ésteres digalato de dímeros	1000
Fracção V	trímeros galato e digalato	1200

3.2 Caracterização da actividade antioxidante das fracções de procianidinas

3.2.1 Avaliação da capacidade antiradicalar e do poder redutor

Através do método do DPPH e do método FRAP avaliou-se a capacidade de fracções oligoméricas de procianidinas extraídas de grainhas de uva sequestrarem radicais e quelatarem iões metálicos. Os resultados foram obtidos com as mesmas quantidades, em massa, de procianidinas e foram expressos em μM equivalentes de Trolox para facilitar a interpretação de resultados.

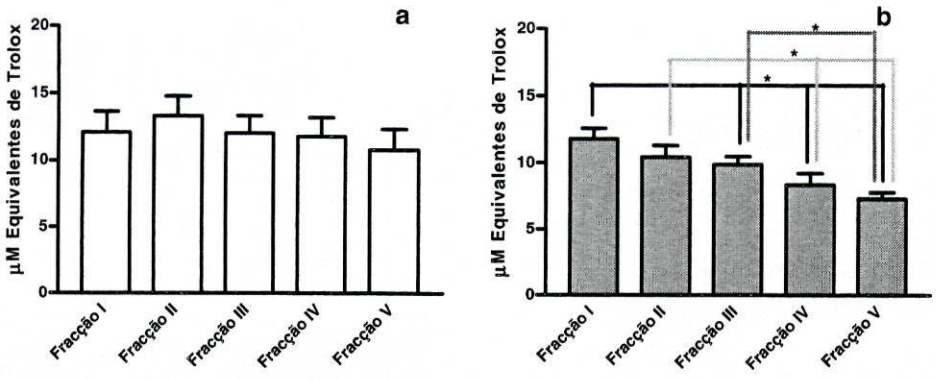


Figura 29 – Capacidade antiradicalar **(a)** e poder redutor **(b)** de 2,5 µg/mL de fracções de procianidinas, avaliada pelos métodos do DPPH e FRAP respectivamente. Resultados expressos em µM de Trolox. * P <0,05

Através da análise do gráfico da Figura 29(a) verificou-se que não existem diferenças significativas na capacidade antiradicalar das diferentes fracções, que diferem entre si na complexidade estrutural das respectivas procianidinas. De uma forma geral é possível observar uma tendência para a diminuição da capacidade de sequestrar radicais com o aumento da complexidade estrutural. No entanto, estas diferenças não são consideráveis sendo possível sugerir que pelo facto da reacção em questão ser feita em solução em condições não biológicas e não envolvendo outros compostos, não surgem impedimentos significativos na doação de hidrogénios ao radical DPPH.

Na Figura 29(b), pode-se observar que a capacidade de quelatar iões metálicos das procianidinas diminui claramente com o aumento da sua complexidade estrutural. Este facto deve-se provavelmente a factores de acessibilidade. As procianidinas (Figura 3) actuam provavelmente pelo mesmo mecanismo que a catequina, ou seja, através da oxidação do grupo *orto*-catecol do anel B. Como estes compostos só têm este local para a quelatação de metais, com o aumento da complexidade da estrutura cada vez é mais difícil o acesso a este grupo, o que se reflecte como uma gradual perda de capacidade de complexação de iões pelas fracções de procianidinas (Gaulejac *et al.*, 1999).

3.2.2 Avaliação da actividade antioxidante na peroxidação lipídica

Para avaliar a capacidade das fracções de procianidinas extraídas da grainha de uvas retardarem a oxidação lipídica, utilizaram-se os dois métodos já descritos anteriormente

(Capítulo 1): a monitorização do consumo de oxigénio e a monitorização da formação de dienos conjugados. Para este efeito utilizou-se uma concentração de 313 ng/mL de fracção de procianidinas em água.

Como se pode observar pela Figura 30, a fracção II exerce uma maior acção protectora na peroxidação lipídica, tanto no consumo de oxigénio como na formação de dienos conjugados. Esta fracção apresenta os valores mais elevados, mas não difere significativamente dos valores encontrados para a fracção I. É possível verificar que existe uma tendência para a diminuição da acção antioxidante com o aumento da complexidade estrutural das fracções. Tendo em conta que, com o aumento da complexidade estrutural aumenta o tamanho das moléculas, esta diminuição de efeito pode ser devida a impedimentos estereoquímicos, que não permitem às moléculas interagirem tão facilmente com os lipossomas e doarem hidrogénios aos radicais peroxilo que se formam nas cadeias de ácidos gordos constituintes dos lipossomas.

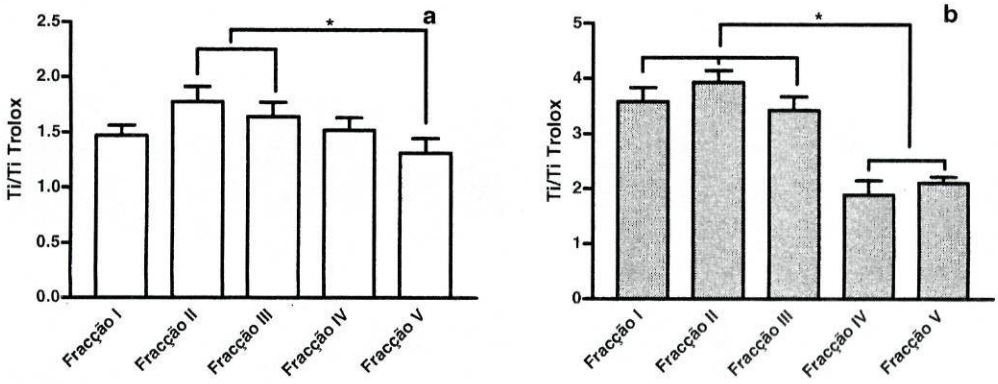


Figura 30 – Inibição da oxidação de lipossomas de fosfatidilcolina de soja por 313 ng/mL de fracções de procianidinas de grainhas de uva, monitorizada pelo consumo de oxigénio **(a)** e formação de dienos conjugados **(b)**. Os resultados são expressos como a razão do tempo de inibição pelo tempo de inibição obtido com Trolox. * $P < 0,05$

Pela Figura 30(b) observa-se que as fracções IV e V apresentam inibições da formação de dienos conjugados muito pequenas, que corroboram a hipótese destas moléculas, por serem maiores, não conseguirem aceder às cadeias de ácidos gordos dos lipossomas, ficando estas cadeias muito susceptíveis à oxidação, e por isso à formação de hidroperóxidos – produtos primários da oxidação lipídica.

4 CONCLUSÃO

As fracções de procianidinas de grainha de uva com diferentes complexidades estruturais exerceram actividade antioxidante nos estudos efectuados. Na captação de radicais livres, utilizando o método do DPPH, não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes fracções mas parece haver uma tendência para as fracções mais complexas terem menor efeito. Esta relação foi confirmada quando se avaliou o poder redutor. Através dos métodos da monitorização do consumo de oxigénio e formação de dienos conjugados, verificou-se que as fracções mais simples são mais eficazes a retardar a peroxidação lipídica iniciada com AAPH. Este facto deve-se provavelmente a impedimentos estereoquímicos apresentados pelas fracções mais complexas que poderão interferir na aproximação destes compostos às membranas dos lipossomas.

CAPÍTULO 3 – EFEITO DAS PROCIANIDINAS NA PROLIFERAÇÃO TUMORAL

1 INTRODUÇÃO

O cancro é um tumor maligno que se desenvolve nas células num determinado tecido. Um tumor maligno consiste num grupo de células alteradas (neoplásicas) que pode invadir os tecidos vizinhos e disseminar-se (metastizar) para outros órgãos do corpo.

Em condições normais, o processo de divisão celular é um processo ordenado e controlado, responsável pela formação, crescimento e regeneração de tecidos de um dado organismo. Algumas vezes, no entanto, as células perdem a capacidade de limitar e comandar o seu próprio crescimento passando, então, a dividir-se e multiplicar-se muito rapidamente e de maneira aleatória. Como consequência dessa disfunção celular, isto é, desse processo de multiplicação e crescimento desordenado das células, forma-se o que se conhece como tumor.

Estudos epidemiológicos sugerem que a frequência de cancro é muitas vezes determinada mais por factores ambientais e comportamentais do que por factores genéticos (Dumitrescu & Cotarla, 2005). Estes estudos epidemiológicos, confirmados posteriormente por estudos bioquímicos, mostraram que a dieta tem um papel importante na iniciação bem como na promoção e progressão desta patologia (Riboli, 2001; Borek, 2004).

Apesar das muitas estratégias terapêuticas, incluindo a quimioterapia, a cirurgia, a radioterapia, o sucesso das terapias utilizadas é, em muitos casos, limitado. Diferentes estratégias novas têm sido desenvolvidas para controlar e tratar o cancro. Alguns alimentos de origem vegetal, bem como algumas das bebidas que originam, são excelentes fontes de compostos polifenólicos. Estes, com propriedades farmacológicas diversas, apresentam um potencial valor como agentes quimioprotectores ou terapêuticos, sob a perspectiva de agentes moduladores do crescimento e da proliferação tumoral (Pouget *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2003; Forman *et al.*, 2004). Deste modo, moléculas com o potencial de alterar o crescimento celular das células tumorais, sem afectar significativamente a viabilidade das células normais, são agentes anti-tumorais com elevado potencial terapêutico. Alguns dos citostáticos actualmente usados na terapêutica são metabolitos das plantas como é o caso do paclitaxel e da vincristina (Pezzuto, 1997).

Diversos efeitos biológicos tais como actividade antiviral, antibacteriana, anticarcinogénica, antiinflamatória e antialérgica foram atribuídos às procianidinas (Laranjinha *et al.*, 1999; Santos Buelga & Scalbert, 2000). Além destes efeitos, tem sido

dada uma especial atenção à actividade antioxidante demonstrada pelas procianidinas, uma vez que estas podem exercer uma acção protectora na peroxidação lipídica e proteica, reduzindo desta forma o risco de doenças crónicas como doenças cardiovasculares (Carbonneau *et al.*, 1999; Frankel *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1993) e certos tipos de cancro (Block, 1992; Pouget *et al.*, 2001).

Para além das suas propriedades antioxidantes, os flavonóides podem exercer outras actividades que poderão não estar relacionadas directamente com a sua capacidade de captar radicais. A maior parte destas actividades estão relacionadas com interacções ligando-receptor, que incluem a proliferação, a regulação do ciclo celular e indução de apoptose (Williams *et al.*, 2004). Cada vez é mais evidente que a actividade de flavonóides como agentes preventivos deve ser avaliada de diferentes ângulos, de forma a abranger não só a capacidade antioxidante mas também a influência do ambiente físico-químico e a ocorrência de outras actividades biológicas.

Assim, este trabalho foi desenvolvido com o objectivo de avaliar os efeitos das procianidinas de grainha de uva como possíveis agentes com efeito no crescimento do carcinoma. Uma vez que estes compostos já demonstraram uma potente acção antioxidante (Capítulo 2), tornaram-se objectos de estudo interessantes, numa perspectiva de prevenção de tratamento tumoral.

Com este propósito, foi utilizada uma linha celular mamária (MCF-7), estrogénio-dependente, derivada de um adenocarcinoma mamário humano *in situ*. O cancro da mama, que é a malignidade mais comum na mulher, representa cerca de 29% dos casos de cancro (Boyle & Ferlay, 2005). No mundo ocidental, atinge uma mulher em cada dez, com meio milhão de novos casos ocorridos por ano, só na Europa. O cancro da mama continua a ser a primeira causa de morte das mulheres entre os 35 e os 55 anos e a segunda entre as mulheres de todas as idades na Europa (Boyle & Ferlay, 2005). Como tal, cada vez mais se tem desenvolvido um esforço a nível global na procura de novos métodos de diagnóstico e tratamento desta patologia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Timidina-[metil-^{3}H] (*88 μCi/μmol*) (Amersham Biosciences); TCA (ácido tricloroacético), DMSO (dimetilsulfóxido) (Merck®, Darmstadt, Germany); (+)-catequina, tris (hidrocloreto de tris-(hidroximetil)-aminometano) e MTT (brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio) (Sigma®, St. Louis, MO, USA).

Fracções I-V (FI – FV) de procianidinas de grainha de uva foram obtidas de acordo com a metodologia descrita no Capítulo 2 (Parte I). Todas as diluições destes compostos foram realizadas em etanol.

2.2 Células e Condições de Cultura

A linha celular epitelial humana MCF-7 é uma linha celular mamária, estrogénio-dependente, derivada de um carcinoma *in situ*.

As células foram cultivadas para crescimento em MEM suplementado com e 10% de FBS (soro fetal de Bovino), 100 unidades mL^{-1} penicilina, 100 μg mL^{-1} de estreptomicina e 0,25 μg mL^{-1} de amfotericina B (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) e mantidas em atmosfera húmida a 37 °C com 5% CO_2/ 95% O_2. O meio de cultura foi mudado a intervalos de 48 h e as células atingiram a confluência ao fim de 6-7 dias. Uma vez atingida a confluência, as células foram removidas enzimaticamente (0,25% de tripsina-EDTA, 1 min, a 37°C), foram diluídas de 1:4 e semeadas em placas de cultura de poliestireno (21 cm^2; Ø 60mm; Corning Costar, Corning, N.Y.) com meio MEM com 10% FBS. Para as experiências as células foram sedimentadas em placas de 24 poços de poliestireno (2 cm^2; Ø 16mm; Corning Costar).

2.3 Determinação da Viabilidade Celular

A determinação da viabilidade celular foi efectuada usando o método de redução do MTT (brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio) (Berridge *et al.*, 1996). Após as primeiras 24h de incubação em meio MEM com 10% FBS, as células foram tratadas com catequina ou com as fracções (FI – FV) de procianidinas de grainha de uva, em

MEM com 5% de FBS. O tratamento teve a duração total de 48 h, tendo o meio de incubação sido substituído ao fim de 24 h. Este tratamento foi removido e as células foram incubadas durante 3 h com 50 µL de MTT (5 mg/mL PBS) em 500 µL meio MEM (10% FBS). No final do tempo de incubação, a solução foi cuidadosamente aspirada e o produto azul da actividade da desidrogénase mitocondrial foi dissolvido em DMSO. Foi registada a absorvância a 540 e a 660 nm. A leitura a 660 nm corresponde a ligações inespecíficas do MTT. Foi calculada a diferença A_{540}-A_{660}, inferindo deste valor a viabilidade celular. Os resultados foram expressos em % do controlo.

2.4 Síntese de ADN: Incorporação de Timidina-^{3}H

Para avaliar o efeito pró- ou anti-proliferativo foram efectuados ensaios de incorporação da timidina-^{3}H na presença e ausência dos vários compostos, de acordo com a metodologia descrita por Miranda *et al.*, 1999. Após as primeiras 24h de incubação em meio MEM (10% FBS), as células foram tratadas com catequina ou com as fracções de procianidinas de grainha de uva, em MEM com 5% de FBS. As células controlo foram incubadas sob as mesmas condições experimentais mas na presença do solvente (etanol 0,1% (v/v)). O tratamento efectuado teve a duração total de 48 h, tendo este sido renovado após 24 h. Após o período de tratamento o meio foi substituído por MEM com 10% de FBS e as células foram incubadas com timidina-^{3}H (0,5 *µCi*/poço) durante 4 h, a 37 °C. Seguidamente o meio de incubação foi removido e as células foras fixadas com ácido tricloroacético (TCA; 10% p/v) durante 1 h, a 4 °C, para remover toda a timidina-^{3}H não incorporada pelas células. Após a secagem da placa à temperatura ambiente, durante cerca de 30 min, as células foram lisadas com NaOH 1M (280 µL/poço) e neutralizadas com HCl 5M. A timidina-^{3}H incorporada no ADN foi determinada por cintilometria líquida, em contador beta. A média das desintegrações/min das repetições de cada tratamento foi expressa em % do controlo.

2.5 Análise Estatística

Os valores são expressos como média aritmética ± erro estatístico médio (SEM). O significado estatístico das diferenças entre os vários grupos foi avaliado por análise de variância de 1 factor (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Para comparações entre

dois grupos, utilizou-se o teste *t*-Student. As diferenças foram consideradas significativas para $P < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existe evidência epidemiológica e, mais recentemente, bioquímica, de que a alimentação constitui um factor importante na prevenção, e até no tratamento de muitos carcinomas, em particular, na mulher, o da mama (Wayne *et al.*, 2004). Neste contexto têm sido realizados estudos, quer epidemiológicos, quer bioquímicos, para a identificação concreta de compostos presentes na dieta responsáveis por tais efeitos. Sendo já vasta a literatura existente sobre esta matéria, há ainda muita falta de conhecimento científico sobre a vantagem/desvantagem na presença de determinados compostos na dieta, quer no sentido da prevenção, quer mais especificamente na terapêutica de alguns carcinomas. Moléculas com o potencial de alterar o crescimento das células tumorais sem afectar significativamente a viabilidade das células normais são agentes antitumorais com elevado potencial terapêutico. É usual realizarem-se testes preliminares em linhas celulares tumorais humanas como primeiro passo na avaliação de compostos (moléculas) para prevenção e tratamento do cancro (Skehan *et al.*, 1990). Neste estudo foi utilizada uma linha celular de adenocarcinoma da mama humano, as células MCF-7.

De acordo com o apresentado na figura 31(a) verificou-se que quer a catequina, quer as FI e FII foram capazes, na concentração de 30 μg/mL, de reduzir de forma significativa a viabilidade celular. Curiosamente, na concentração de 60 μg/mL apenas a catequina reduziu significativamente a viabilidade celular (Figura 31(a)). Quando testados os mesmos compostos na proliferação celular (incorporação de timidina-^{3}H), verificou-se também uma inibição significativa para a concentração de 30 μg/mL e ausência de efeito para a concentração de 60 μg/mL, exceptuando-se a catequina. Desta forma, os resultados indicam um efeito antiproliferativo significativo das FI e II, apenas na concentração de 30 μg/mL. Perante estes resultados testaram-se concentrações mais baixas de todas as fracções ($\geq$ 0,06 – 30 μg/mL) e verificou-se que não havia uma interferência significativa na incorporação de timidina-^{3}H (resultados não apresentados).

Quando testadas as fracções mais complexas (FIII – FV) nas mesmas concentrações (30 e 60 μg/mL) foi possível observar (Figura 31(a)) um aumento significativo da viabilidade celular, o que não se traduziu num aumento de proliferação celular, excepto para a FIII na concentração de 60 μg/mL (Figura 31(b)). Tendo em conta a

complexidade destes compostos, podemos admitir que estas fracções (III – V) não atravessam a membrana plasmática exercendo um efeito sobre a viabilidade celular que poderá resultar, por exemplo, do conhecido papel protector que estes compostos têm sobre a peroxidação lipídica (mecanismo de reconhecida importância na integridade da membrana).

Relativamente ao inesperado efeito observado com a concentração de 60 μg/mL na proliferação celular, para todos os compostos excepto para a catequina, poderemos avançar com a hipótese de, nesta concentração, estes compostos exercerem um efeito pró-oxidante, capaz de, pelo menos, contrariar o efeito anti-proliferativo observado na concentração de 30 μg/mL.

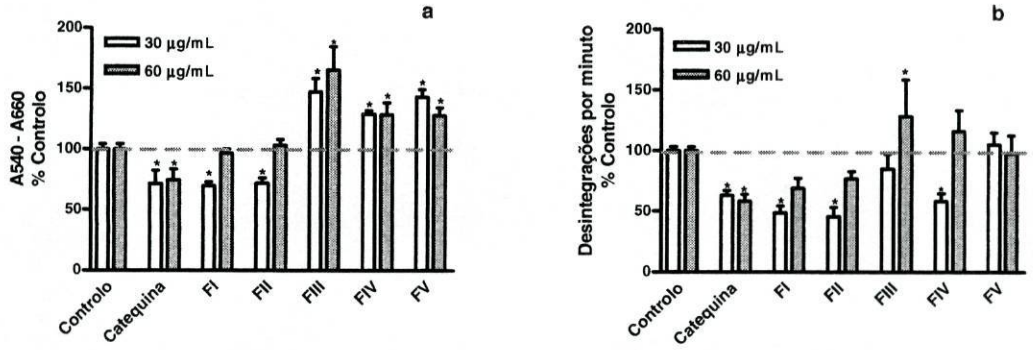


Figura 31 – Efeito da catequina e das fracções de procianidinas na viabilidade **(a)** e síntese de ADN **(b)** das células MCF-7, tratadas com estes compostos durante 48 h. As células MCF-7 foram tratadas na presença de catequina ou das fracções de procianidinas (FI-FV; 30 μg/mL ou 60 μg/mL) ou na ausência (controlo). Cada valor representa média ± SEM **P* <0,05 (aumento ou decréscimo significativo *vs* respectivo controlo).

É curioso notar que as fracções de procianidinas que apresentaram maior actividade antioxidante (fracções menos complexas; resultados apresentados no capítulo 2, parte I) foram as que apresentaram um efeito antiproliferativo com significado estatístico. Assim, este efeito poderá estar, em parte, relacionado com a capacidade antioxidante das procianidinas.

Os mecanismos envolvidos no efeito antiproliferativo podem ser vários. Não tendo constituído objectivo deste trabalho a investigação destes mecanismos, pode-se, no entanto, fazer alguma especulação com base nalguns dados presentes na literatura.

A linha celular testada é uma linha dependente de estrogénios. Assim, a catequina e as fracções de procianidinas poderão exercer alguma interferência nas vias dos estrogénios, provocando uma consequente diminuição do crescimento celular. Este facto poderá ser reforçado por alguns dados relativos a outros compostos fenólicos. Foi

demonstrado que, em algumas concentrações, o resveratrol (Bhat *et al.*, 2001) e a genisteína (So *et al.*, 1997), podem competir com o estradiol pela ligação aos receptores de estrogénios. A mesma propriedade também já foi descrita para a catequina e epicatequina (Damianaki *et al.*, 2000).

A regulação do ciclo celular é também um elemento essencial na regulação do crescimento da célula. Alguns compostos provocam perturbações na progressão do ciclo celular, parando-o, e consequentemente, impedindo o crescimento celular. Flavonóides como a quercetina, a luteonina e a epigalocatequina-3-galato e extracto de procianidinas podem interferir com o ciclo celular, bloqueando-o (Agarwal *et al.*, 1998; Casagrande *et al.*, 2001).

A indução da apoptose é também uma via capaz de inibir a proliferação celular. Num estudo de Nomoto *et al.* (2004), mostrou-se que proantocianidinas foram responsáveis por induzir apoptose em células de cancro do cólon. A epigalocatequina-3-galato também já foi relacionada com a indução de apoptose em células tumorais (Matito *et al.*, 2003), o que reforça a possibilidade deste também ser um possível mecanismo envolvido na redução da proliferação.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho não é possível descrever a via pela qual as fracções I e II e a catequina interferem na proliferação desta linha tumoral.

4 CONCLUSÃO

Em conclusão, as fracções de procianidinas de grainha de uva, bem como o monómero catequina, apresentaram, em determinadas concentrações, um efeito antiproliferativo. A presença destes compostos na dieta é um dado de relevância quer nutricional quer médico, podendo apresentar interesse quer num contexto de prevenção quer de terapêutica de neoplasias. O poder antioxidante das fracções de procianidinas de grainha de uva parece estar relacionado com a capacidade de inibir a viabilidade e a proliferação celulares. O mecanismo pelo qual estes compostos actuam é ainda desconhecido, mas será de todo o interesse entender a sua forma de acção.

CAPÍTULO 4 – EFEITO DAS PROCIANIDINAS NO TRANSPORTE INTESTINAL DE CATIÕES ORGÂNICOS

1 INTRODUÇÃO

A principal função do epitélio intestinal é absorver moléculas resultantes da digestão dos alimentos. Este epitélio constitui a principal via de entrada de moléculas e é também um importante local de secreção.

A difusão das moléculas através de membranas biológicas depende não só das características da membrana, como também das características físico-químicas das moléculas a transportar: tamanho, solubilidade, carga, polaridade, quiralidade, entre outras. Podem-se distinguir dois tipos de transporte: (1) o que ocorre livremente através da membrana e (2) o facilitado, em que a passagem do soluto se faz através de um transportador. O primeiro denomina-se *difusão simples* e ocorre predominantemente com moléculas de baixo peso molecular, apolares, polares sem carga e lipofílicas. Este tipo de transporte acontece sempre a favor do gradiente de concentração. O transporte de iões, moléculas polares, ou de maior peso molecular, ocorre com intervenção de proteínas membranares que facilitam o transporte dos solutos através das membranas biológicas. Se este transporte é efectuado a favor do gradiente de concentração, sem gasto de energia para a célula, denomina-se *transporte passivo*, se ocorrer contra o gradiente de concentração e, consequentemente, com gasto de energia para a célula, designa-se *transporte activo*. O transporte facilitado poderá ser designado de sistema uniporte quando o transportador transporta apenas um substrato. Quando os transportadores efectuam co-transporte (passagem simultânea de dois substratos) este pode ser simporte, se os substratos são transportados na mesma direcção ou antiporte, se os substratos são transportados em direcções opostas.

Uma vez que os catiões orgânicos são polares e apresentam carga positiva a pH fisiológico, há geralmente envolvimento de sistemas de transporte transmembranar na absorção, distribuição e eliminação destes compostos. Vários xeno- e endobióticos pertencem à classe dos catiões orgânicos. A maioria dos fármacos que são usados para fins terapêuticos, incluindo os anti-histamínicos, os relaxantes musculares, os bloqueadores dos canais de cálcio, entre outros, são catiões orgânicos. Além disso, algumas vitaminas (como a tiamina e a riboflavina) e algumas aminas endógenas bioactivas como a dopamina, a colina e a ^{1}N-metilnicotinamida (NMN) são também catiões orgânicos. A homeostasia destes catiões é determinada pela sua produção endógena, pela sua absorção no intestino delgado e a sua excreção pelo intestino, fígado e rins.

Cada vez se torna mais evidente que a absorção de certos nutrientes, em particular, e de xenobióticos, em geral, bem como os seus eventuais efeitos fisio-patológicos, podem ser influenciados pela ingestão concomitante de outras moléculas.

A total compreensão da interacção nutriente/nutriente, nutriente/xenobiótico ou xenobiótico/xenobiótico está muito aquém de totalmente explorada. No entanto é uma realidade cientificamente admitida. Apesar de estudos epidemiológicos sugerirem que a ingestão de polifenóis, nomeadamente procianidinas, pode exercer protecção em doenças crónicas e existirem dados experimentais nesse sentido (Tapiero *et al.*, 2002; Prescott *et al.*, 1999), existe muito pouca informação acerca da influência que estes compostos podem exercer na absorção de catiões orgânicos, em concreto. Note-se que, sobre esta matéria, será interessante avaliar estas interacções (procianidinas/catiões orgânicos), uma vez que como catiões orgânicos poderemos ter fármacos importantes nas terapêuticas de muitas doenças crónicas, ou xenobióticos, que muitas vezes contribuem para a génese da patologia em causa.

Em estudos recentes de Monteiro *et al.*, (2005a; 2005b) foi demonstrado que os vinhos, principalmente o tinto, e os chás, especialmente o verde, modulam a absorção de catiões orgânicos, o que poderá levar, consequentemente, a uma modulação da concentração plasmática destes compostos. Evidentemente, este facto deverá ser tido em conta pelos clínicos na avaliação do risco/benefício do consumo de vinhos em especial o tinto, e de chás, particularmente o verde.

Uma vez que as procianidinas se encontram em grande quantidade na alimentação mediterrânica (Auger *et al.*, 2004), sendo a ingestão média de procianidinas nesse tipo de dieta de cerca de 57,7 mg/dia por pessoa (Gu *et al.*, 2004), é de todo o interesse avaliar a influência que estes compostos podem exercer quando ingeridos em simultâneo com esta classe de moléculas. Para tal, foi utilizado um modelo de catiões orgânicos, o MPP^+ na linha celular Caco-2.

Durante os últimos anos o uso de linhas celulares de epitélio intestinal aumentou drasticamente em muitos campos de investigação, principalmente nas ciências biológicas. A maior parte dos estudos de transporte de moléculas através do epitélio intestinal tem sido realizada usando células Caco-2. Trata-se de uma linha celular derivada de adenocarcinoma de cólon humano com fenótipo enterocítico. As células Caco-2 como modelo estão muito bem caracterizadas e são o modelo mais adequado para estudos de permeabilidade (Balimane & Chong, 2005; Artursson *et al.*, 2001).

O catião orgânico de baixo peso molecular MPP^+ (1-metil-4-fenilpiridínio) (Figura 32) é utilizado como modelo neste estudo de transporte uma vez que é um catião extensivamente usado como modelo em estudos de transporte, em muitas linhas celulares (Martel *et al.*, 2001b; Martel *et al.*, 1999a; Calhau *et al.*, 2002; Inazu *et al.*, 2003; Martel *et al.*, 1999b), tendo a vantagem de não sofrer metabolização *in vivo* (Sayre, 1989).

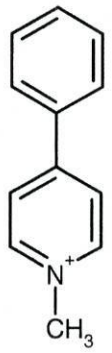


Figura 32 – Estrutura química do MPP^+ (1-metil-4-fenilpiridínio).

As características do transporte do catião orgânico MPP^+ foram estudadas nas células Caco-2, concluindo-se que a absorção de MPP^+ na membrana apical parece ocorrer através de um mecanismo mediado por um transportador pertencente à família ASF (*Amphiphilic Solute Facilitator*) (Martel *et al.*, 2000). A família de transportadores ASF inclui transportadores transmembranares de aniões orgânicos (OAT1-5), transportadores de urato (URAT1), transportadores de catiões orgânicos electroneutros (OCTN1-3) (Koepsell *et al.*, 2003) e transportadores de catiões orgânicos electrogénicos (OCT1, OCT2, EMT; Gründemann *et al.* 1998).

De acordo com os resultados obtidos por Martel *et al.*, (2001a), no transporte apical de MPP^+ nas células Caco-2 estão envolvidos os transportadores OCT1 e/ou OCT3.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

MPP^+-[^{3}H] (Acetato de N-metil-4-fenilpiridínio [^{3}H]; actividade específica 82 *Ci* mmol-1) (New England Nuclear Chemicals, Dreieich, Alemanha), MPP^+ (iodeto de 1-metil-4-fenilpiridínio) (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA); Triton X-100 e DMSO (dimetilsulfóxido), (Merck, Darmstadt, Alemanha); (+)-catequina, tris (hidrocloreto de tris-(hidroximetil)-aminometano), MTT (brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio), DTT (ditiotreitol), PAO (óxido de fenilarsénio) e DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (Sigma, St. Louis, MO, USA).

A catequina e as cinco fracções de procianidinas FI-V obtidas no capítulo 2, foram dissolvidas em etanol e o DTT, o PAO e o DTNB foram dissolvidos em DMSO. A concentração final de solvente na experiência foi de 1% e o controlo para estes compostos foi realizado na presença do solvente correspondente na mesma concentração.

2.2 Células e Condições de Cultura

A linha celular Caco-2 foi obtida de *American Type Culture Collection* (ATCC37-HTB Rockville, M.D., USA). As células foram mantidas em atmosfera com 5% CO_2-95% ar, à temperatura de 37 °C. Estas células (passes 15-84) cresceram em MEM (*Minimum Essential Medium*) (Sigma, St. Louis, M.O., USA), suplementado com 15% de soro fetal de Bovino, 25 mM Hepes, 100 unidades mL^{-1} penicilina, 100 μg mL^{-1} de estreptomicina e 0,25 μg mL^{-1} de amfotericina B (Sigma, St. Louis, M.O., USA). O meio de cultura foi mudado em intervalos de 48 horas e as células atingiram a confluência ao fim de 6-7 dias de cultura. Para a manutenção da divisão das células em cultura, as células foram dissociadas com 0,25% de tripsina-EDTA, diluídas a 1:3 e cultivadas em placas de petri com 21 cm^2 de área de crescimento (Corning Costar, Corning, N.Y.). Para as experiências, as células Caco-2 foram semeadas em placas de 24 poços de poliestireno (2 cm^2; Ø 16mm; Corning Costar). No período de 24 horas anterior a cada experiência, as células foram mantidas em meio de cultura sem soro fetal de Bovino. Todas as experiências foram realizadas em células Caco-2 com 9-11 dias de cultura. Cada cm^2 continha cerca de 300-900 μg de proteínas celulares.

2.3 Estudos de Transporte

Para os estudos de captação de MPP^+ pelas células Caco-2, as células em monocamada foram incubadas com MPP^+-[^{3}H] (200 nM) em 300 µL de meio de incubação Hanks com a seguinte composição (em mM): 137 NaCl, 5 KCl, 0,8 $MgSO_4$, 1,0 $MgCl_2$, 0,33 Na_2HPO_4, 0,44 KH_2PO_4, 0,25 $CaCl_2$, 0,15 Tris.HCl e 1,0 butirato de sódio, pH 7,4.
O meio das células foi aspirado e as células foram lavadas com meio Hanks a 37ºC; as células foram pré-incubadas durante 3, 20 ou 60 min, em meio Hanks a 37ºC. Os estudos de transporte foram efectuados em células cultivadas em monocamada, sendo o MPP^+-[^{3}H] colocado no bordo apical da membrana celular. A captação de MPP^+-[^{3}H] foi iniciada com a adição de 300 µL de meio a 37ºC, contendo 200 nM de MPP^+-[^{3}H]. Após 5 minutos de incubação, esta foi interrompida, colocando as células a 4 ºC e lavando-as com 500 µL de meio Hanks (4 ºC). As células foram solubilizadas com 300 µL de solução de detergente Triton X-100 (0,1% (v/v) em 5 mM de Tris.HCl, pH 7,4), à temperatura ambiente durante a noite. A radioactividade internalizada pelas células foi quantificada por cintilometria líquida em contador beta.
Efeito dos compostos: os compostos testados estavam presentes durante o período de pré-incubação e de incubação. Os controlos dos tratamentos foram efectuados utilizando os solventes dos compostos testados. Para os estudos de transporte as soluções stock de procianidinas foram preparadas em etanol (previamente filtrado – 0,22 µm, TPP, Trasadingen, Switzerland) numa concentração de 60 mg/mL e armazenados a -80ºC até posterior utilização.

2.4 Determinação de Proteínas

O conteúdo proteico celular foi determinado utilizando o método descrito por Bradford (1976). Utilizou-se como padrão a albumina sérica humana.

2.5 Determinação da Viabilidade Celular

A determinação da viabilidade celular foi efectuada usando o método de redução do MTT (brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio) (Berridge *et al.*, 1996). Este é um método colorimétrico dependente da redução do MTT nas células, através de uma desidrogénase mitocondrial, nas células viáveis, para formar um produto de cor azul. A

intensidade deste produto azul é uma medida da viabilidade celular. Em resumo, o meio de cultura foi removido e as células foram pré-incubadas com os compostos a testar em meio Hanks a 37ºC. Este tratamento foi removido e as células foram incubadas durante 3 h com 50 μL de MTT (5 mg/mL PBS) em 500 μL de meio Hanks. Esta solução foi cuidadosamente aspirada e o produto azul da actividade da desidrogénase mitocondrial foi dissolvido em DMSO. Foi registada a absorvância a 540 e a 660 nm. A leitura a 660 nm corresponde a ligações inespecíficas do MTT. Foi calculada a diferença A540-A660, inferindo daqui a viabilidade celular. Os resultados foram expressos em % de controlo.

2.6 Análise Estatística

Os valores são expressos como média aritmética ± erro padrão da média (SEM). O significado estatístico entre os vários grupos foi avaliado por análise de variância de 1 factor (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Para comparações entre dois grupos, utilizou-se o teste *t*-Student. As diferenças foram consideradas significativas para $P < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fracções de procianidinas foram obtidas após fraccionamento de extracto de grainha de uvas por cromatografia líquida em coluna de baixa pressão. Obtiveram-se cinco fracções contendo procianidinas com diferentes complexidades estruturais (Capítulo 2). Estudou-se o efeito destas fracções na modulação da captação de MPP^+-[^{3}H] em células intestinais, células Caco-2. Como já foi demonstrado por Martel *et al.*, (2000), a captação de MPP^+-[^{3}H] nas células Caco-2 é linear com o tempo pelo menos até 5 min de incubação. Por isso, para determinar a velocidade inicial da captação do catião, as células foram incubadas na presença de MPP^+-[^{3}H] (200 nM) durante 5 min.

De acordo com os resultados apresentados na figura 33, na menor concentração de fracções de procianidinas testada (6 μg/mL) apenas as fracções II e III apresentaram um efeito significativo, diminuição da captação apical de MPP^+. Na pré-incubação das células com 60 μg/mL durante 60 min, verificou-se uma diminuição significativa na captação de MPP^+-[^{3}H] relativamente ao controlo, em todas as fracções, excepto para a fracção V. Curiosamente, na presença de 600 μg/mL de procianidinas (Fracções I-V), durante 60 min, a captação apical de catião orgânico pelas Caco-2 foi significativamente maior.

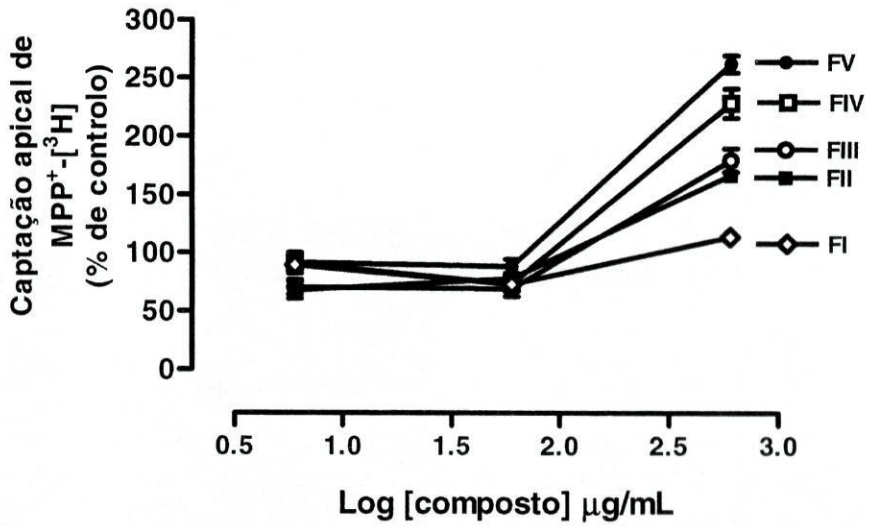


Figura 33 – Efeito de diferentes concentrações (6; 60; 600 μg/mL) de fracções de procianidinas (FI-FV; Fracção I – Fracção V) na captação apical de MPP^+-[^{3}H] nas células Caco-2. As monocamadas confluentes de Caco-2 foram pré-incubadas a 37 °C durante **60 min** e posteriormente incubadas com 200 nM MPP^+-[^{3}H] durante 5 min, na presença de EtOH (controlo) ou dos compostos testados. Cada valor representa média ± SEM (n=3-27).

Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Monteiro *et al.*, (2005a; 2005b), que efectuaram estudos sobre os efeitos de vinhos e de chás sobre a captação intestinal deste catião. Segundo estes autores, o vinho tinto, bem como os chás, principalmente o verde, aumentam a captação apical deste catião orgânico, em células Caco-2. As bebidas testadas por estes autores contêm grande quantidade de procianidinas na sua composição (Pascual-Teresa *et al.*, 2000).

Foi possível verificar que a captação de catiões orgânicos pelas células Caco-2 foi mais pronunciada quando foram testadas fracções de procianidinas de maior complexidade estrutural, tendo sido obtido o maior valor para a fracção V (262,2 ± 7,44 % de controlo). Deste modo, os resultados obtidos parecem evidenciar uma relação entre o efeito sobre a captação apical de MPP^+-[^{3}H] pelas células Caco-2 e o aumento da complexidade estrutural das procianidinas. Assim, os resultados obtidos mostram que a captação de MPP^+-[^{3}H], na presença de 600 μg/mL de fracções de procianidinas, aumenta com o aumento da complexidade estrutural: fracção I <fracção II ≈fracção III <fracção IV <fracção V (Figura 33).

Estes resultados sugerem que provavelmente o tempo de exposição das células a estes compostos influenciará o seu efeito. Para clarificar a dependência da captação do catião com o tempo de exposição da célula aos compostos em estudo, foram realizadas experiências de transporte com 3 e 20 min de pré-incubação, utilizando a concentração que mostrou resultados mais notórios (600 μg/mL). Como se pode observar na Figura 34, de facto, o efeito dos diversos compostos é diferente nos vários tempos de pré-incubação, especialmente quando a complexidade estrutural é maior. Adicionalmente, estes resultados parecem indicar que a complexidade também influenciará o efeito sobre o transporte. Assim, quando testado o monómero catequina, este provocou um decréscimo da captação apical de MPP^+-[^{3}H] em todos os tempos de pré-incubação testados. A fracção I, que curiosamente é a que possui uma constituição mais simples, apresenta uma diminuição da captação de MPP^+-[^{3}H] para um tempo de pré-incubação de 3 min, sendo este efeito contrariado quando o tempo de exposição aumenta. Da observação da Figura 34, conclui-se que as restantes fracções apresentam um aumento da captação do catião com o aumento do tempo de pré-incubação, ou seja com o tempo em que as procianidinas estão em contacto com as células.

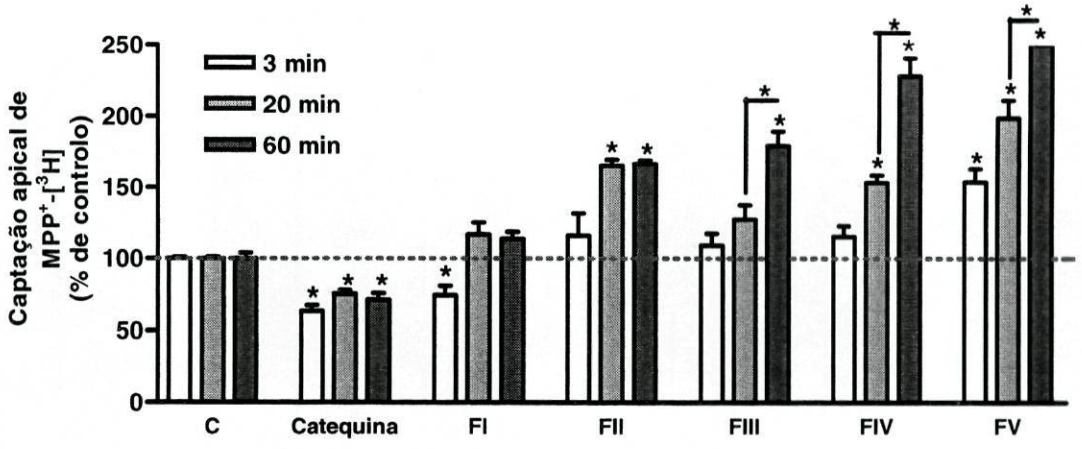


Figura 34 – Efeito de 600 μg/mL de fracções de procianidinas na captação apical de MPP^+-[^{3}H] nas células Caco-2. As monocamadas confluentes de Caco-2 foram pré-incubadas a 37 ºC durante **3, 20** e **60 min** e posteriormente incubadas com 200 nM MPP^+-[^{3}H] durante 5 min, na presença de EtOH (controlo) ou dos compostos testados. Cada valor representa média ± SEM (n=3-27) **P* <0,05 (aumento ou decréscimo significativo *vs* respectivo controlo).

Daqui poderemos inferir que o efeito observado numa dada concentração, com um determinado composto, no transporte apical de MPP^+, depende do tempo de exposição das células ao mesmo. Podemos avançar com pelo menos três hipóteses explicativas: durante o tempo de exposição (1) ocorrem transformações nos compostos de modo aos produtos, uma vez formados, interferirem no transporte em estudo, (2) ocorrem transformações no epitélio por exposição a estes compostos ou (3) ambas as anteriores.

Os resultados obtidos (Figura 34) reforçam a primeira hipótese levantada, da ocorrência de algum fenómeno durante o tempo de pré-incubação que é responsável pelas diferenças observadas relativamente às fracções mais complexas. Provavelmente estas, por possuírem maior número de grupos *orto*-dihidroxilo disponíveis, proporcionam mais locais de reacção.

Pelo facto das procianidinas terem um elevado poder redutor e, por isso, serem altamente sensíveis à oxidação (Jovanovic *et al.*, 1998), colocou-se a hipótese do estado redox do composto em estudo ser alterado ao longo do tempo de exposição. Estes resultados reforçam a aceitação da 1ª hipótese explicativa, uma vez que, durante os 60 min de pré-incubação é possível que as procianidinas se oxidem, uma vez que são sensíveis à perda de átomos de hidrogénio. Com o intuito de testar esta hipótese, induziu-se a oxidação nas procianidinas. Para tal, as procianidinas foram oxidadas por exposição ao ar durante 7 dias à temperatura ambiente.

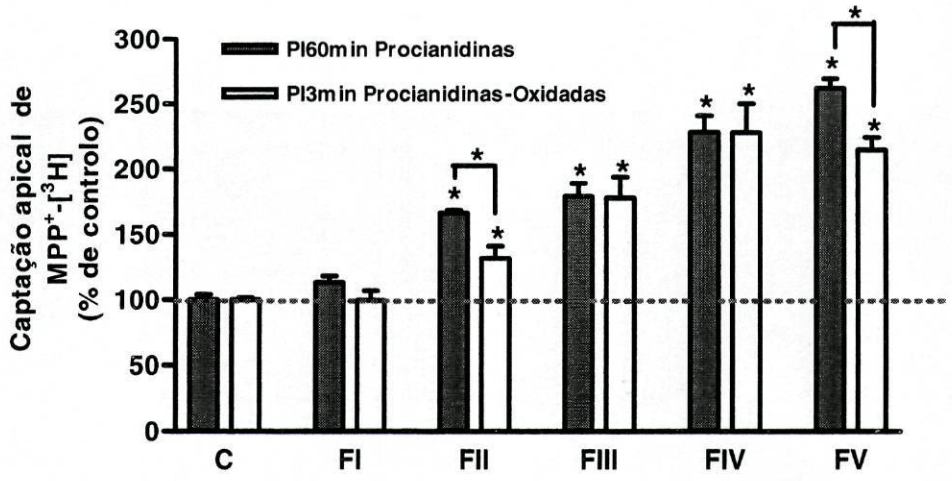


Figura 35 – Efeito das fracções de procianidinas (I-V) na concentração de 600 μg/mL, na captação apical de MPP^+-[^{3}H] nas células Caco-2. As monocamadas confluentes de Caco-2 foram pré-incubadas a 37 ºC durante **60 min** e durante **3 min** com as **procianidinas oxidadas.** Seguidamente, as células foram incubadas com 200 nM MPP^+-[^{3}H] durante 5 min, na presença de EtOH (controlo) ou dos compostos testados. Cada valor representa média ± SEM (n=3-27). **P* <0,05 (aumento ou decréscimo significativo *vs* respectivo controlo).

Como pode ser observado na Figura 35, tentou-se simular o efeito observado com as procianidinas expostas durante 60 min, pré-incubando as células Caco-2 durante 3 min com as mesmas procianidinas oxidadas. De facto, o efeito observado após a exposição durante 60 min às procianidinas foi semelhante ao observado após os 3 min com as mesmas sujeitas a prévia oxidação. Este resultado apoia a hipótese colocada, sugerindo a interferência de um processo de oxidação-redução na captação de catiões orgânicos através da membrana apical do enterócito. De modo a consolidar esta hipótese foram efectuadas experiências usando as fracções oxidadas e 60 min de pré-incubação. Confirmou-se então que a oxidação interfere no transporte do catião uma vez que os valores obtidos foram bastante superiores aos valores obtidos para o mesmo tempo de pré-incubação com as procianidinas sem sofrerem oxidação (resultados não apresentados). A título de exemplo, ao fim de 60 min de exposição das células Caco-2 à fracção III oxidada, na concentração de 600 μg/mL, observou-se uma captação significativamente superior, com valores de 248,55 ± 6,74 % do controlo, em comparação com 179,39 ± 10,07 % do controlo, exibidos sem oxidação.

Esta hipótese sugere-nos que: (1) o estado redox do composto é, estruturalmente, fundamental para o efeito que o mesmo é capaz de provocar no transporte em estudo

e/ou (2) o estado redox do composto influencia o estado redox de outras entidades e estas, consequentemente, o transporte. Nesta última premissa, é necessário admitir, por exemplo, a própria oxidação-redução do transportador. De acordo com D'Souza *et al.*, (2003), que estudou a actividade do transportador PepT-1 em células Caco-2, a alteração do estado redox do próprio transportador é um mecanismo de regulação da sua actividade.

Uma vez que o estado redox do composto em estudo influencia o efeito do mesmo sobre o transporte do MPP^+ nestas células, parece pertinente testar a hipótese do estado redox do(s) transportador(es) envolvido(s) modularem a actividade do(s) mesmo(s).

Para tal, foram testados como agentes oxidantes: (1) o PAO (óxido de fenilarsénio), ao qual a membrana é permeável e (2) o DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)), ao qual a membrana é impermeável. Através da utilização destes compostos pretendeu-se avaliar a influência do estado redox intra/extracelular na actividade do transportador. Verificou-se que tanto o DTNB como o PAO inibiram significativamente a captação de MPP^+-[^{3}H]. O DTNB, que não atravessa a membrana celular, exibiu um efeito mais marcado (38,82 ± 2,29 % de controlo) do que o agente oxidante ao qual a membrana é permeável (62,49 ± 1,76 % de controlo).

Paralelamente, na presença de 1 mM de DTT (ditiotreitol), um agente redutor, que sozinho não apresentou qualquer efeito, os oxidantes testados (PAO e DTNB) não foram capazes de reduzir significativamente este transporte. Estes resultados reforçam a hipótese que indicia que o estado redox da proteína transportadora poderá afectar a sua actividade. No hEMT, da sequência de aminoácidos descrita por Gründemann *et al.* (1998) conclui-se que existem 6 resíduos de cisteína no primeiro domínio extracelular e 4 em domínios intracelulares. Da análise da sequência de aminoácidos descrita por Hayer e os seus colaboradores (1999) verificou-se que o hOCT1 possui 7 resíduos de cisteína nos domínios extracelulares e não apresenta nenhum resíduo de cisteína intracelular. Relativamente a estes transportadores de catiões orgânicos, poderemos inferir que estes são os potenciais locais de oxidação extra e intracelular (Figura 36).

a

1 MPTVDDILEQ VGESGWFQKQ AFLILCLLSA AFAPICVGIV FLGFTPDHHC QSPGVAELSQ
61 RCGWSPAEEL NYTVPGLGPA GEAFLGQCRR YEVDWNQSAL SCVDPLASLA TNRSHLPLGP
121 CQDGWVYDTP GSSIVTEFNL VCADSWKLDL FQSCLNAGFL FGSLGVGYFA DRFGRKLCLL
181 GTVLVNAVSG VLMAFSPNYM SMLLFRLLQG LVSKGNWMAG YTLITEFVGS GSRRTVAIMY
241 QMAFTVGLVA LTGLAYALPH WRWLQLAVSL PTFLFLLYYW CVPESPRWLL SQKRNTEAIK
301 IMDHIAQKNG KLPPADLKML SLEEDVTEKL SPSFADLFRT PRLRKRTFIL MYLWFTDSVL
361 YQGLILHMGA TSGNLYLDFL YSALVEIPGA FIALITIDRV GRIYPMAMSN LLAGAACLVM
421 IFISPDLHWL NIIIMCVGRM GITIAIQMIC LVNAELYPTF VSGVGPACRG SDATSSRDQG
481 GRFARDHEGR REPWEKSKAQ RKHDLP

b

1 MPSFDEALQR VGEFGRFQRR VFLLLCLTGV TFAFLFVGVV FLGTQPDHYW CRGPSAAALA
61 ERCGWSPEEE WNRTAPASRG PEPPERRGRC QRYLLEAAND SASATSALSC ADPLAAFPNR
121 SAPLVPCRGG WRYAQAHSTI VSEFDLVCVN AWMLDLTQAI LNLGFLTGAF TLGYAADRYG
181 RIVIYLLSCL GVGVTGVVVA FAPNFPVFVI FRFLQGVFGK GTWMTCYVIV TEIVGSKQRR
241 IVGIVIQMFF TLGIIILPGI AYFIPNWQGI QLAITLPSFL FLLYYWVVPE SPRWLITRKK
301 GDKALQILRR IAKCNGKYLS SNYSEITVTD EEVSNPSFLD LVRTPQMRKC TLILMFAWFT
361 SAVVYQGLVM RLGIIGGNLY IDFFISGVVE LPGALLILLT IERLGRRLPF AASNIVAGVA
421 CLVTAFLPEG IAWLRTTVAT LGRLGITMAF EIVYLVNSEL YPTTLRNFGV SLCSGLCDFG
481 GIIAPFLLFR LAAVWLELPL IIFGILASIC GGLVMLLPET KGIALPETVD DVEKLGSPHS
541 CKCGRNKKTP VSRSHL

Figura 36 – Sequência de aminoácidos dos transportadores hOCT1 **(a)** e hEMT **(b)**. Os domínios transmembranares encontram-se a sublinhado e os resíduos de cisteína destes domínios estão destacados a cinzento. Os resíduos de cisteína pertencentes aos domínios extracelulares encontram-se destacados a vermelho e os mesmos resíduos intracelulares a amarelo.

Trabalhos realizados anteriormente sobre a regulação da actividade dos OCTs sugerem que esta poderá ocorrer por (i) modificações do estado de fosforilação/desfosforilação da proteína transportadora; (ii) internalização dos transportadores por interferência a nível do cito-esqueleto, e consequentemente, à concentração de transportadores expostos (funcionantes) na membrana plasmática; por último, (iii) modulação da expressão (Ciarimboli & Schlatter, 2005). Todavia, nenhum destes mecanismos parece suficiente para explicar os resultados aqui apresentados.

Curiosamente, a unidade monomérica das procianidinas, a catequina, diminuiu a captação de MPP^+-[^{3}H] em todas as condições testadas (Tabela 7). Provavelmente a catequina é menos sensível à oxidação (possui menor número de grupos hidroxilo capazes de doar hidrogénios) comparativamente aos oligómeros aqui testados, e por isso

incapaz de provocar um aumento da captação de MPP^+-[^{3}H] nestas células. No entanto, é também possível que a catequina e os dímeros usem o mesmo transportador que o MPP^+ e, por competição, estas moléculas sejam capazes de competir com este catião para o mesmo transporte, o que não se verifica com o aumento da complexidade das fracções testadas.

Tabela 7 – Efeito da catequina (600 µg/mL) na captação apical de MPP^+-[^{3}H] nas células Caco-2. As monocamadas confluentes de Caco-2 foram incubadas com 200 nM MPP^+-[^{3}H] durante 5 min, na presença de EtOH (controlo) ou dos compostos testados. Cada valor representa média ± SEM (n=3-27). *P <0,05 (aumento ou decréscimo significativo *vs* respectivo controlo).

		Captação de MPP^+-[^{3}H] (% de controlo)
Catequina	***PI60***	71,3 ± 4,69 *
	PI60 oxidada	79,6 ± 4,55 *
	PI3	63,5 ± 4,09 *
	PI3 oxidada	78,7 ± 4,24 *

Para testar esta possibilidade foram efectuadas experiências de *trans*-efeito. Neste tipo de experiências as células são postas em contacto com o substrato que é transportado eficientemente para o interior da célula (Figura 37a). Dada a presença do substrato, o transportador, funcionando em antiporte, facilitará o transporte do substrato marcado na direcção oposta (Figura 37b).

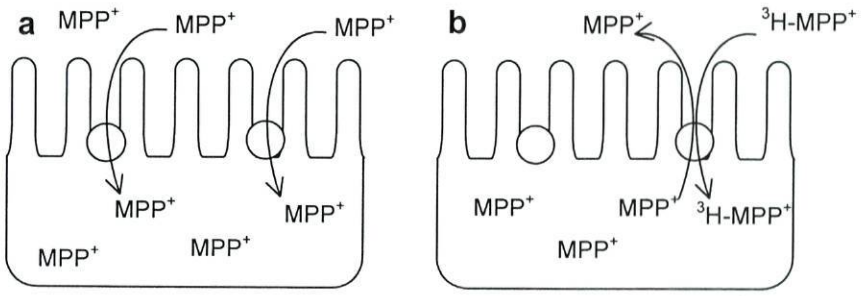


Figura 37 – Esquema explicativo do mecanismo de antiporte do MPP^+ na membrana apical de enterócitos; **a** - incubação com MPP^+ não marcado; **b** - antiporte de MPP^+ e MPP^+-[^{3}H].

Desta forma, as células Caco-2 foram pré-incubadas com MPP^+ não marcado durante 20 min. Após lavagem, as células foram incubadas com MPP^+-[^{3}H] na presença (ou ausência, controlo) dos compostos a testar, como o descrito anteriormente. Esta experiência permite-nos conhecer a eficiência do composto testado no antiporte. Os resultados estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 – Efeito da catequina, fracção I e fracção II (600 μg/mL) na captação apical de MPP^+-[^{3}H] nas células Caco-2. As monocamadas confluentes de Caco-2 foram pré-incubadas com 100 μM de MPP^+ não marcado, e posteriormente incubadas com 200 nM MPP^+-[^{3}H] durante 5 min, na presença de EtOH (controlo) ou dos compostos testados. Cada valor representa média ± SEM (n=3-27). *P <0,05 (aumento ou decréscimo significativo *vs* respectivo controlo).

	Captação de MPP^+-[^{3}H] (% de controlo)
Catequina	76,8 ± 5,42 *
FI	74,8 ± 6,15 *
FII	104,7 ± 11,0

Estes resultados vão ao encontro da possibilidade dos transportadores envolvidos na captação apical de MPP^+ serem usados pela catequina e pela fracção I, a fracção mais simples, ou seja estes serem inibidores competitivos (Figura 38b).

Da ausência de efeito na presença da FII (Tabela 12) podemos inferir que as restantes fracções (FIII-FV), mais complexas, não apresentarão qualquer efeito. Uma vez que a complexidade destas fracções é superior, não é provável que possam funcionar como inibidores competitivos, ou seja, que usem o mesmo transportador do MPP^+.

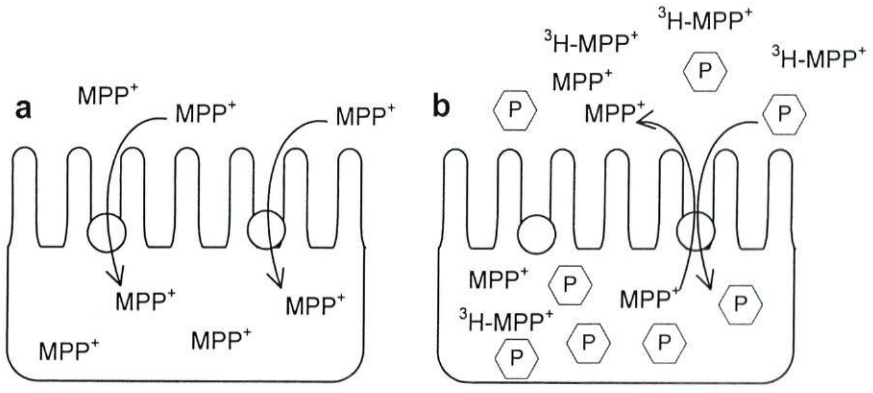


Figura 38 – Esquema explicativo do efeito de procianidinas (P-Procianidinas) sobre o transporte apical (antiporte) de MPP^+, no epitélio intestinal; **a** – incubação com MPP^+ não marcado; **b** – incubação com MPP^+-[^{3}H] e procianidinas .

Resumindo, o aumento do efeito das procianidinas com o aumento da concentração e da complexidade estrutural (maior peso molecular) pode ser abordado sob duas perspectivas: uma, sob aspectos de competição no transporte de MPP^+-[^{3}H] e outra relacionada com o estado redox da célula, que pode afectar directamente os transportadores.

Determinação da viabilidade celular

Foram efectuados ensaios de viabilidade às células tratadas com os compostos testados e verificou-se que não houve redução da viabilidade celular. Pelo contrário, parece haver um aumento da viabilidade celular em alguns tratamentos (resultados não apresentados).

Deste modo, estes resultados sugerem que os efeitos observados no transporte de catiões orgânicos não sejam consequentes a danos provocados na membrana celular e, portanto, na integridade celular.

4 CONCLUSÃO

1) Estes compostos presentes na dieta são capazes de modular (aumentando ou reduzindo) a captação apical de MPP^+ nas células Caco-2;

2) O transporte apical de MPP^+ nas células Caco-2 é modulado por fenómenos de oxidação-redução.

3) As interacções procianidina/nutriente, procianidina/fármaco e procianidina/tóxico resultantes da presença destes compostos na dieta deverão ser tidas em conta na avaliação da biodisponibilidade, farmacocinética e/ou toxicocinética de catiões orgânicos. A concentração e o tipo de compostos ingeridos são factores importantes nesta relação, que devem ser tidos em conta pelos clínicos, de forma a ajustarem as prescrições efectuadas. Tendo em conta que muitas das importantes moléculas são catiões orgânicos, a consequência destas interacções é crucial na saúde humana.

PARTE II

PIGMENTOS ANTOCIÂNICOS: CARACTERIZAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

Nesta parte do trabalho foram utilizadas as técnicas de avaliação da actividade antioxidante previamente descritas na parte I para caracterizar a actividade antioxidante de três extractos derivados de mirtilo, que continham antocianinas e derivados de antocianinas. O primeiro extracto continha antocianinas, um dos extractos derivados continha, maioritariamente, derivados pirúvicos de antocianinas e o outro era essencialmente composto por vinilpiranoantocianina-catequinas, também conhecidas como portisinas. Estes extractos têm a particularidade de serem de origem natural e apresentarem cores pouco comuns na Natureza: o de derivados pirúvicos é vermelho-laranja e o que é constituído por portisinas é azul. Neste primeiro capítulo, além da caracterização da actividade antioxidante dos extractos, também foi efectuada a caracterização estrutural dos mesmos.

No segundo capítulo foi efectuada a mesma caracterização da actividade antioxidante, não de extractos, mas de pigmentos puros individuais derivados de cianidinas, estruturalmente análogos aos que constituíam os extractos. Adicionalmente realizou-se também o estudo estrutura-actividade entre duas antocianinas e os seus respectivos glucósidos.

CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE EXTRACTOS DE MIRTILO PREPARADOS

1 INTRODUÇÃO

Desde sempre que as cores naturais de especiarias, ervas, bagas e vegetais têm feito parte das dietas diárias do ser humano. Têm sido consumidos ao longo das gerações, ajudando a identificar alimentos e avaliar o seu sabor. A cor define essencialmente o valor estético do alimento, pré-determina as expectativas de sabor e gosto do consumidor, e ainda modula o apetite. Assim sendo, a cor é um factor muito importante na indústria alimentar e o produtor irá tentar ao máximo reter a aparência natural da matéria-prima (Stintzing & Carle, 2004).

Enquanto que os pigmentos sintéticos são cada vez mais rejeitados pelo consumidor e considerados como pouco saudáveis (independentemente de tal situação estar provada ou não), a aceitação de alternativas naturais ou derivadas da natureza é promovida pela suposição psicológica que tais alternativas são saudáveis e de boa qualidade.

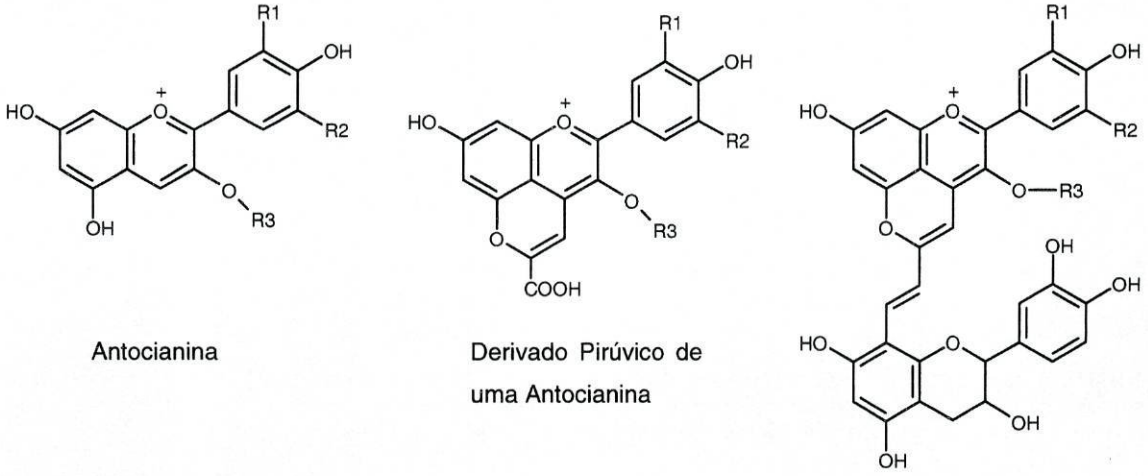
Os corantes alimentares naturais são obtidos exclusivamente a partir de fontes alimentares comuns por processos físicos não-selectivos. Estes corantes alimentares aparecem como extractos corados de frutos e plantas na lista de ingredientes. Uma vez que compostos corantes de alimentos são considerados como ingredientes, em oposição aos aditivos que requerem declaração com uma designação "E", a procura pelos corantes naturais está a ganhar importância.

A utilização de antocianinas como corantes alimentares apresenta-se como uma opção válida uma vez que estas preenchem os pré-requisitos primários de uma fonte de corantes alimentares: um bom estado higiénico, elevada estabilidade da cor, um elevado grau de pureza, e sabor e gosto fracos. Outros critérios incluem uma boa disponibilidade, um preço reduzido e colheitas com bom rendimento de pigmentos com uma força tintorial aceitável (Pszcola, 1998).

A cor apresentada por alguns pigmentos antociânicos recentemente descobertos suscitou o interesse de uma possível utilização na indústria alimentar uma vez que apresentam cores invulgares, como o azul e o laranja, a pH ácido. Estes pigmentos tornar-se-iam uma mais valia para a indústria alimentar se para além de fornecerem a cor ao alimento pudessem funcionar como antioxidantes alimentares.

Assim, neste trabalho pretendeu-se caracterizar as propriedades antioxidantes de três extractos: um de antocianinas extraídas de mirtilo que apresenta cor vermelha e foi designado de extracto A; o segundo, derivado do primeiro, contendo derivados pirúvicos de antocianinas com cor vermelho-laranja e denominado extracto B; e um

terceiro, derivado do segundo, que contém vinilpiranoantocianina-catequinas e que exibe a cor azul (extracto C), o que o torna de grande interesse para a indústria alimentar, pois até ao momento não se conhece nenhum corante natural com cor azul. As estruturas gerais destes pigmentos estão esquematizadas na Figura 39.



Antocianina

Derivado Pirúvico de uma Antocianina

Vinilpiranoantocianina-catequina (Portisina)

Figura 39 – Estrutura geral das antocianinas, derivados pirúvicos de antocianinas e vinilpiranoantocianina-catequinas (portisinas) presentes nos extractos A, B e C respectivamente, preparados a partir de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*). R1 e R2 são H, OH ou OMe. R3 é uma glucose, galactose ou arabinose.

A caracterização da actividade antioxidante dos extractos contendo estes pigmentos foi conseguida através da utilização dos métodos descritos anteriormente: o método do DPPH e FRAP para determinar a capacidade antiradicalar e o poder redutor e a monitorização do consumo de oxigénio e da formação de dienos conjugados para avaliar o efeito destes compostos na peroxidação lipídica. A oxidação lipídica é especialmente importante pois é uma das principais causas da deterioração dos alimentos o que consequentemente leva a uma perda do seu valor nutricional e comercial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

DMSO e reagente de Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemanha); quercetina, $AlCl_3$, $NaNO_2$, Na_2CO_3, Trolox (Sigma-Aldrich, Espanha); malvidina-3-glucósido (Fluka, Espanha).

2.2 Extractos de pigmentos

2.2.1 Preparação de extractos de mirtilo

Os extractos de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) foram preparados em laboratório segundo o método descrito na literatura (Pissarra *et al.*, 2003) (Mateus *et al.*, 2003).

O extracto A é constituído maioritariamente por antocianinas. O extracto B tem como componentes principais aductos de ácido pirúvico-antocianina, que se formam por reacção de ácido pirúvico com antocianinas a pH ácido. O extracto C foi preparado por reacção dos aductos de ácido pirúvico-antocianina com catequina por intermédio de acetaldeído a pH ácido, dando origem a pigmentos vinilpiranoantocianina-catequina, também conhecidos por portisinas (Mateus *et al.*, 2004).

2.2.2 Análise dos extractos de mirtilo por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Todos os extractos foram analisados por HLPC (Knauer K-1001) por injecção directa das amostras (20 µL) numa coluna C18 de fase reversa com 250 x 4,6 mm *i.d.* (Merck, Darmstadt); a detecção foi efectuada a 511, 528 e 570 nm para os extractos A, B e C, respectivamente, utilizando um detector DAD (Diode Array) (Knauer K-2800). Os solventes foram A: H_2O/HCOOH (9:1), e B: H_2O/CH_3CN/HCOOH (6:3:1). O gradiente consistiu de 20-85% de B durante 70 min com um fluxo de 1.0 mL/min A coluna foi lavada com 100% de B durante 20 min e depois foi estabilizada com as condições iniciais durante outros 20 min. O extracto C foi também analisado por HLPC utilizando as mesmas condições com um solvente B diferente: CH_3CN/H_2O/CH_3COOH (8:1.95:0.05).

2.2.3 Análise dos extractos de mirtilo por LC-MS

A análise dos extractos de mirtilo foi efectuada num cromatógrafo líquido (Hewlett-Packard 1100 series) equipado com uma coluna de fase reversa AQUA^{TM} (Phenomenex, Torance, CA, USA) (150 x 4,6 mm, 5µm, C18) termostatizada a 35 °C. Os solventes utilizados foram (A) solução aquosa 0,1% de ácido trifluoracético e (B) acetonitrilo. O gradiente utilizado foi o estabelecido na literatura (Pissarra *et al.*, 2003). Foi efectuada detecção dupla num espectrómetro com barra de diodos e num espectrómetro de massa. O detector de massa foi um Finnigan LCQ (Finnigan Corporation, San Jose, USA) equipado com uma fonte API, utilizando uma interface de ionização de electrospray (ESI). Tanto o gás utilizado foi uma mistura de azoto e hélio. A voltagem capilar foi de 3V e a temperatura capilar de 190 °C. O espectro foi gravado no modo de ião positivo com m/z entre 120 e 1500. O espectrómetro de massa foi programado para uma série de três varrimentos: um de massa total, um zoom dos iões mais intensos do primeiro varrimento, e um MS-MS do ião mais intensa utilizando uma energia de colisão relativa entre 30 e 60.

2.2.4 Análise dos extractos por UV-Vis

As curvas dos espectros de absorvância foram obtidas para todos os extractos entre os 360 e os 700 nm com um intervalo de amostragem de 1 nm, usando para o efeito células de plástico de 10 mm de percurso óptico e um espectrofotómetro UV-3101 Shimadzu.

2.2.5 Fenóis totais

O conteúdo de fenóis totais foi determinado utilizando o método de Folin-Ciocalteu, ajustado para uma microescala (Arnous *et al.*, 2001). A um tubo eppendorf com 790 µL de água destilada adicionaram-se 10 µL de amostra de extracto dissolvida em metanol (0,2 mg/mL) e 50 µL de reagente Folin-Ciocalteu. Agitou-se esta mistura e deixou-se em repouso 1 min. Seguidamente adicionaram-se 150 µL de solução aquosa de 20% de Na_2CO_3 e a mistura ficou a repousar no escuro durante 120 min à temperatura ambiente. Leu-se a absorvância a 750 nm das amostras e de padrões de Trolox com concentração conhecida. Utilizou-se esta curva de calibração para determinar a concentração de fenóis totais, que foi expressa em mg/L de equivalentes de Trolox.

2.2.6 Flavonóides Totais

O conteúdo de flavonóides totais dos extractos de antocianinas e seus derivados foi determinado utilizando um método colorimétrico com algumas modificações (Bao *et al.*, 2005). Alíquotas de extracto dissolvidas em metanol (0,2 mg/mL) foram transferidas para tubos eppendorf que já continham 1 mL de água destilada, e misturados com 75 µL de $NaNO_2$ a 5%. Após 5 min, foram adicionados 75 µL de solução de $AlCl_3$ 10% e deixou-se em repouso mais 5 min. Adicionou-se então 500 µL de NaOH 1M e deixou-se a mistura em repouso durante 15 min. O aumento do valor de absorvância foi medido a 510 nm. O conteúdo de flavonóides foi calculado recorrendo a uma curva de calibração onde se utilizou quercetina como padrão. Os resultados foram expressos em mg/L de equivalentes de quercetina.

2.2.7 Pigmentos Totais

Os extractos de mirtilo (0,2 mg/mL) foram analisados por HPLC (Knauer K-1001) numa coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm *i.d.*, Merck®- Darmstadt, Germany) por injecção directa das amostras (20 µL). A detecção foi efectuada a 511, 528 e 570 nm para os extractos A, B e C, respectivamente, utilizando um detector DAD (Knauer K-2800)., utilizando os programas descritos na literatura (Mateus *et al.*, 2003): solvente A H_2O/HCOOH (9:1) e solvente B CH_3CN/H_2O/HCOOH (3:6:1); o gradiente consiste em 20-85% de solvente B durante 70 min com um fluxo de 1 mL/min. A coluna foi lavada com solvente B durante 20 min e depois estabilizada com as condições iniciais durante mais 20 min. O extracto C foi analisado com as mesmas condições mas com um solvente B diferente - $CH_3CN/H_2O/CH_3COOH$ (8:1,95:0,05). As concentrações de pigmentos foram determinadas utilizando curvas de calibração de malvidina-3-glucósido, aducto ácidos pirúvico de malvidina-3-glucósido e vinilpiranomalvidina-3-glucósido-catequina para os extractos A, B e C respectivamente.

2.3 Caracterização antioxidante dos extractos de pigmentos

A avaliação da capacidade antiradicalar foi efectuada utilizando o método do DPPH e o poder redutor foi determinado recorrendo ao método FRAP, da mesma forma como se encontram descritos na secção de material e métodos do Capítulo 1 da Parte I. Para a

realização destes dois métodos os extractos foram dissolvidos em metanol e utilizados numa concentração final de 2,5 μg/mL.

Para avaliar o efeito destes extractos na peroxidação lipídica utilizaram-se os métodos descritos na secção de material e métodos do Capítulo 1 da Parte I. Na monitorização do consumo de oxigénio os extractos foram dissolvidos em DMSO e usou-se uma concentração final de 667 ng/mL. Esta concentração é superior à utilizada pelas fracções de procianidinas porque, com concentrações menores, não eram visíveis efeitos entre o controlo e os extractos A e B, uma vez que o oxigénio era consumido muito rapidamente. Para a monitorização da formação dos dienos conjugados os extractos foram também dissolvidos em DMSO e a concentração utilizada foi de 300 ng/mL.

2.4 Análise Estatística

Todos os ensaios foram efectuados no mínimo em triplicado. Os valores são expressos como médias aritméticas ± desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas através de análise de variância a um factor (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni, e do teste de *t*-Student para comparações entre dois grupos. Foram consideradas significativas as diferenças com $P < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os flavonóides, incluindo as antocianinas, são considerados a família mais importante de compostos fenólicos presentes nos frutos. Está descrita (Garcia-Alonso *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2003) uma boa correlação entre a concentração de compostos fenólicos presentes nos frutos e a capacidade antioxidante demonstrada por estes.

3.1 Caracterização estrutural e polifenólica dos extractos

Três extractos de mirtilo, um contendo antocianinas (A), outro derivados pirúvicos (B), e um terceiro vinilpiranoantocianina-catequinas (C) foram obtidos no laboratório. O maior interesse da possível utilização destes extractos reside nas suas cores invulgares (laranja e azul) em meio acídico, além de derivarem de precursores naturais. A cor dos extractos pode ser facilmente percebida pelos espectros UV-Vis da Figura 40.

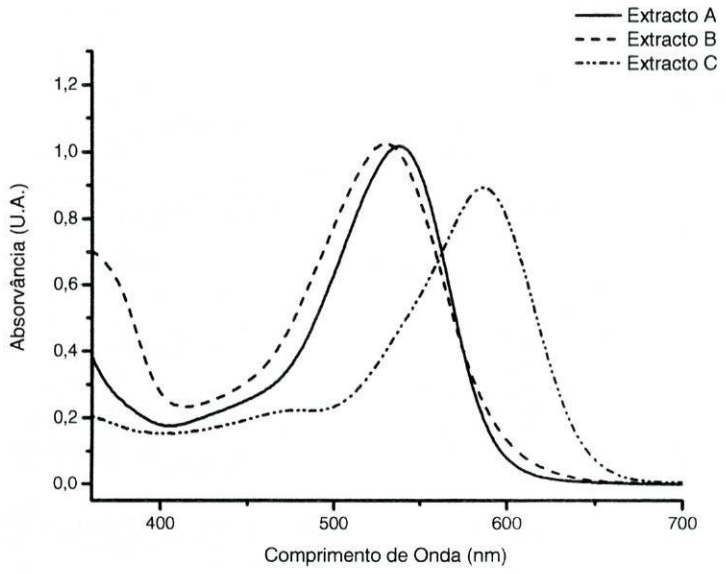


Figura 40 – Espectro UV-Vis do extracto A de mirtilo (λmáx=538 nm), extracto B de derivados pirúvicos de antocianinas (λmáx=531 nm) e extracto C de vinilpiranoantocianina-catequina (λmáx=586 nm).

O extracto A tem a cor vermelha associada às antocianinas, o extracto B tem desvios para comprimentos de onda menores, o que lhe dá tonalidades mais alaranjadas. O extracto C é o mais interessante devido à sua cor azul invulgar (λmáx=586 nm).

Foram utilizados métodos espectrofotométricos para avaliar o conteúdo de fenóis totais e de flavonóides totais dos extractos A (antocianinas), B (derivados pirúvicos de antocianinas) e C (vinilpiranoantocianina-catequina ou portisinas) e a análise por HPLC para avaliar o conteúdo nestes pigmentos em cada um dos três extractos. O extracto A é compostos por antocianinas (Figura 41), o extracto B é principalmente constituído por derivados pirúvicos de antocianinas (Figura 42) e o extracto C é constituído por pelos compostos azuis de vinilpiranoantocianina-catequina (portisinas) (Figura 43).

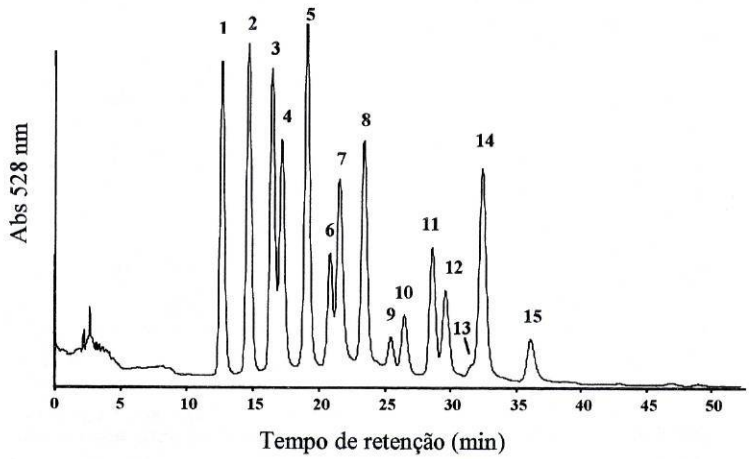


Figura 41 – Cromatograma de HPLC do extracto A preparado a partir de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) com detecção a 528 nm: (1) Delfinidina-3-Galactose, (2) Delfinidina-3-Glucose, (3) Cianidina-3-Galactose, (4) Delfinidina-3-Arabinose, (5) Cianidina-3-Glucose, (6) Petunidina-3-Galactose, (7) Cianidina-3-Arabinose, (8) Petunidina-3-Glucose, (9) Peonidina-3-Galactose, (10) Petunidina-3-Arabinose, (11) Peonidina-3-Glucose, (12) Malvidina-3-Galactose, (13) Peonidina-3-Arabinose, (14) Malvidina-3-Glucose, (15) Malvidina-3-Arabinose.

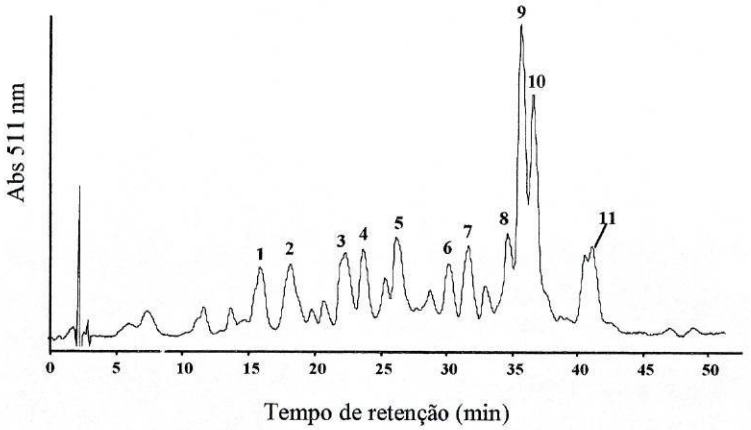


Figura 42 – Cromatograma de HPLC do extracto B de mirtilo após 5 dias de reacção com ácido pirúvico com detecção a 511 nm: (1) derivado pirúvico de Delfinidina-3-Galactose (ou Glucose), (2) derivado pirúvico de Delfinidina-3-Arabinose, (3) derivado pirúvico de Cianidina-3-Galactose (ou Glucose), (4) derivado pirúvico de Cianidina-3-Arabinose, (5) derivado pirúvico de Petunidina-3-Galactose (ou Glucose), (6) derivado pirúvico de Petunidina-3-Arabinose, (7) derivado pirúvico de Peonidina-3-Galactose (ou Glucose), (8) derivado pirúvico de Peonidina-3-Arabinose, (9) derivado pirúvico de Malvidina-3-Galactose, (10) derivado pirúvico de Malvidina-3-Glucose (11) derivado pirúvico de Malvidina-3-Arabinose.

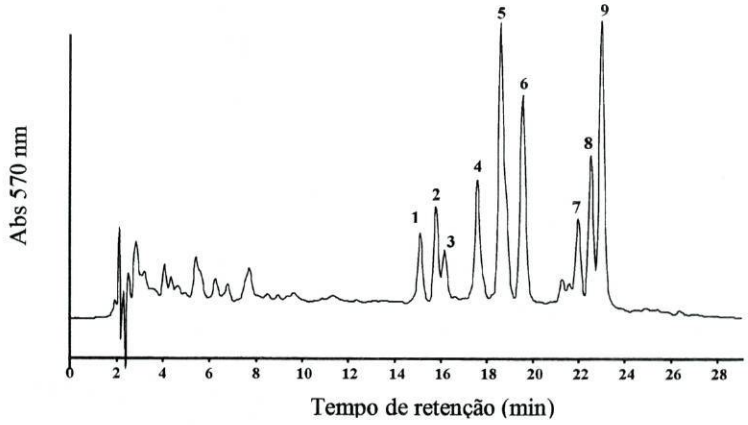


Figura 43 – Cromatograma de HPLC do extracto C derivado de mirtilo, detectado a 570 nm: (1) Vinilpirano-Delfinidin-3-Galactose (ou Glucose)-Catequina, (2) Vinilpirano-Delfinidin-3-Glucose (ou Galactose)-Catequina, (3) Vinilpirano-Cianidina-3-Galactose ou Glucose)-Catequina, (4) Vinilpirano-Cianidin-3-Arabinose-Catequina, (5) Vinilpirano-Petunidina-3-Glucose (ou Galactose)-Catequina, (6) Vinilpirano-Petunidina-3-Arabinose-Catequina, (7) Vinilpirano-Peonidina-3-Galactose (ou Glucose)-Catequina, (8) Vinilpirano-Malvidini-3-Arabinose-Catequina, (9) Vinilpirano-Malvidina-3-Glucose (ou Galactose)-Catequina.

O perfil cromatográfico dos pigmentos constituintes dos extractos, que estão indicados na legenda das Figuras 41, 42, e 43 foram determinados por LC/DAD-MS (Tabelas 9-11).

Tabela 9 – Análise das antocianinas presentes no extracto A, por LC/MS.

Pico	Antocianina	*m/z* (M^+)	Fragmentos (*m/z*)
1	Delfinidina-3-Galactose	465	303; 162
2	Delfinidina-3-Glucose	465	303; 162
3	Cianidina-3-Galactose	449	287; 162
4	Delfinidina-3-Arabinose	435	303; 132
5	Cianidina-3-Glucose	449	287; 162
6	Petunidina-3-Galactose	479	317; 162
7	Cianidina-3-Arabinose	419	287; 132
8	Petunidina-3-Glucose	479	317; 162
9	Peonidina-3-Galactose	463	301; 162
10	Petunidina-3-Arabinose	449	331; 162
11	Peonidina-3-Glucose	463	301; 162
12	Malvidina-3-Galactose	493	331; 162
13	Peonidina-3-Arabinose	433	301; 132
14	Malvidina-3-Glucose	493	331; 162
15	Malvidina-3-Arabinose	463	331; 132

Tabela 10 – Análise dos derivados pirúvicos (py) presentes no extracto B, por LC/MS.

Pico	Derivados pirúvicos de antocianinas (py)	*m/z* (M^+)	Fragmentos (*m/z*)
1	Delfinidina-3-Galactose (ou Glucose)-py	533	371;162
2	Delfinidina-3-Arabinose-py	503	371;132
3	Cianidina-3-Galactose (ou Glucose)-py	517	355;162
4	Cianidina-3-Arabinose-py	487	355;132
5	Petunidina-3-Galactose (ou Glucose)-py	547	415;162
6	Petunidina-3-Arabinose-py	517	415;132
7	Peonidina-3-Galactose (ou Glucose)-py	531	369;162
8	Peonidina-3-Arabinose-py	501	369;132
9	Malvidina-3-Galactose-py	561	399;162
10	Malvidina-3-Glucose-py	561	399;162
11	Malvidina-3-Arabinose-py	531	399;132

Tabela 11 – Análise dos pigmentos vinilpiranoantocianina-catequina (cat) (portisinas) presentes no extracto C.

Pico	Vinilpirano-Antocianina-Catequina (Cat)	*m/z* (M^+)	Fragmentos (*m/z*)
1	Vinilpirano-Delfinidina-3-Galactose(ou Glucose)-Cat	803	641; 489
2	Vinilpirano-Delfinidina-3-Galactose(ou Glucose)- Cat	803	641; 489
3	Vinilpirano-Cianidina-3-Galactose(ou Glucose)-Cat	787	625; 473
4	Vinilpirano-Cianidina-3-Arabinose- Cat	757	625; 473
5	Vinilpirano-Petunidina-3-Galactose(ou Glucose)-Cat	817	655; 503
6	Vinilpirano-Petunidina-3-Arabinose-Cat	787	655; 503
7	Vinilpirano-Peonidina-3-Galactose(ou Glucose)-Cat	801	639; 487
8	Vinilpirano-Malvidina-3-Arabinose-Cat	801	669; 517
9	Vinilpirano-Malvidina-3-Galactose(ou Glucose)-Cat	831	669; 517

Através da análise dos dados de espectrometria de massa verifica-se que todos os pigmentos originaram fragmentos iónicos após perderem o respectivo açúcar ($[M-162]^+$ para os glucósidos e galactósidos e $[M-132]^+$ para os arabinósidos). Para além disso, os pigmentos presentes no extracto C deram origem a um fragmento correspondente à perda de um açúcar e a uma fissão retro Diels-Alder da catequina ($[M-314]^+$ para os

glucósidos e $[M-284]^+$ para os arabinósidos). A estrutura geral dos pigmentos presentes nos extractos está ilustrada na Figura 39.

A complexidade estrutural dos extractos aumenta de seguinte forma: A <B <C. O conteúdo em antocianinas, derivados pirúvicos de antocianinas e portisinas foi determinado por HPLC através de uma curva de calibração de malvidina-3-glucósido, derivado pirúvico da malvidina-3-glucósido e vinilpiranomalvidina-3-glucósido-catequina, respectivamente.

Como se pode verificar pela Tabela 12, a quantidade de pigmentos e flavonóides é muito maior no extracto C do que no A ou B. Este resultado pode ser explicado pelo facto de o peso molecular dos extractos aumentar da seguinte forma: antocianinas (A) <derivados pirúvicos de antocianinas (B) <portisinas (C), o que leva a uma maior quantidade de produto em massa (g). Por outro lado, este extracto (C) foi obtido após mais passos de purificação o que contribui para que o extracto esteja mais concentrado.

Tabela 12 – Conteúdo de fenóis totais, flavonóides totais e pigmentos totais, de um extracto de mirtilo (A) (*Vaccinium myrtillus*) e os seus respectivos extractos de aducto de ácido pirúvico (B) e vinilpiranoantocianina-catequina (C). Os valores das médias estão seguidos de símbolos que são diferentes quando os valores das colunas diferem entre si P <0,05.

	Fenóis Totais (mg/L)	Flavonóides Totais (mg/L)	Pigmentos Totais (mg/L)
Extracto A	$257,9 \pm 8,5^{*}$	$153,1 \pm 9,3^{*}$	$78,8 \pm 4,0^{*}$
Extracto B	$320,4 \pm 7,5^{\#}$	$149,3 \pm 7,1^{*}$	$39,8 \pm 2,0^{\#}$
Extracto C	$318,1 \pm 13,8^{\#}$	$287,3 \pm 8,7^{\#}$	$100,7 \pm 5,0^{\S}$

3.2 Caracterização da actividade antioxidante dos extractos

3.2.1 Avaliação da capacidade antiradicalar e do poder redutor

Através da Figura 44(a) pode-se observar um aumento da capacidade antiradicalar com o aumento do conteúdo em flavonóides e pigmentos dos extractos (C> B> A). Estes resultados vão de encontro ao facto destas substâncias serem as principais responsáveis pela capacidade antioxidante dos frutos (Garcia-Alonzo *et al.*, 2004).

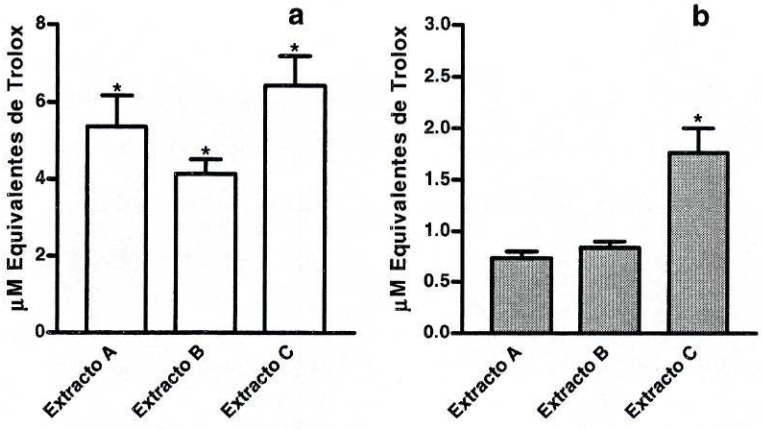


Figura 44 – Capacidade antiradicalar **(a)** e poder redutor **(b)** de 2,5 µg/mL de extractos de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) avaliada pelos métodos do DPPH e FRAP respectivamente. Resultados expressos em µM de Trolox. * $P < 0,05$

Através do método FRAP avaliou-se o poder redutor destes extractos. Os extractos A e B não mostraram diferenças significativas entre si enquanto que o extracto C foi o que revelou um maior poder redutor (Figura 44(b)). O extracto C (constituído por portisinas) foi o que demonstrou ter uma maior capacidade antiradicalar e uma maior actividade antioxidante. Apesar deste extracto ter uma maior quantidade de pigmentos, os efeitos observados podem também ser atribuídos à estrutura dos pigmentos, como resultado da extensa conjugação de electrões π que podem facilmente estabilizar a estrutura quando esta está sob a forma de radical.

Como já foi referido, as posições *orto*-catecol do anel B estão intimamente relacionadas com a capacidade antioxidante que os compostos apresentam. Assim, a actividade revelada pelo extracto que contém portisinas pode ser devido à existência de uma grande quantidade deste grupo nestas moléculas: possuem maior quantidade de grupos *o*-dihidroxilo que as moléculas dos extractos A e B, além de terem o grupo hidroxilo adicional do anel C da catequina (Figura 39).

3.2.2 Avaliação da actividade antioxidante na peroxidação lipídica

Os resultados obtidos com a monitorização do consumo de oxigénio mostram que todos os extractos captam eficientemente os radicais peroxilo formados na fase aquosa quando

comparados com o controlo (sem qualquer extracto), como pode ser verificado pela produção de uma fase lag no consumo de oxigénio (Figura 45).

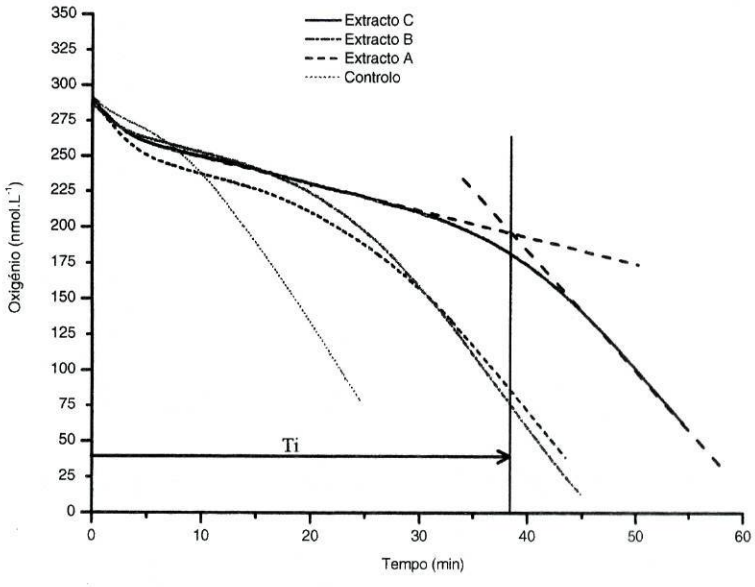


Figura 45 – Consumo de oxigénio durante a oxidação de lipossomas de fosfatidilcolina de soja (340 μM) induzido por AAPH (10 mM) na ausência de antioxidantes e presença dos extractos preparados de mirtilo. Ti – Tempo de indução.

Contudo, é de realçar que os tempos de indução das fases lag dos extractos A e B são semelhantes e muito menores que o extracto C. Este efeito é facilmente perceptível através da Figura 46(a).

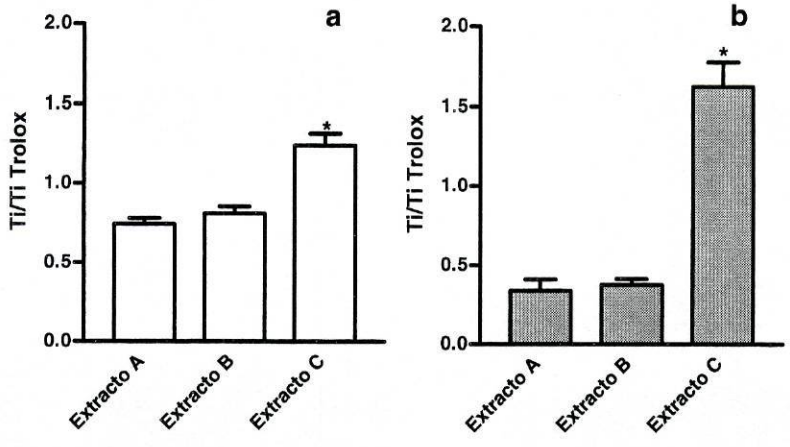


Figura 46 – Inibição da oxidação de lipossomas de fosfatidilcolina de soja por 667 ng/mL de extractos preparados de mirtilo, monitorizada pelo consumo de oxigénio **(a)** e de 300 ng/mL dos mesmos extractos na formação de dienos conjugados **(b)**. Os resultados são expressos como a razão do tempo de inibição pelo tempo de inibição obtido com Trolox. * P <0,05

A formação de dienos conjugados, compostos por hidroperóxidos e seus respectivos produtos de degradação, foi monitorizada através da medição do seu comprimento de onda característico, 233 nm. Quando os lípidos estão protegidos na presença de antioxidante, o tempo de indução da oxidação varia com a capacidade antioxidante do composto. A formação de dienos conjugados foi inibida até à exaustão dos compostos antioxidantes. O extracto C mostrou uma capacidade inibitória da formação dos dienos conjugados mais elevada através do aumento do tempo de indução (Figura 46(b)). Os outros dois extractos mostraram um aumento do tempo de inibição relativamente ao controlo, mas não tão significativo como o tempo de indução promovido pelo Trolox. Estes resultados vão de encontro aos obtidos com a monitorização do consumo de oxigénio. Pode também ser admitida a possibilidade de uma relação estrutura-actividade similar à que foi descrita para os métodos FRAP e DPPH.

4 CONCLUSÃO

Os extractos de mirtilo de antocianinas e seus derivados, especialmente o extracto C revelaram uma maior capacidade antiradicalar e antioxidante do que o extracto original de antocianinas (A). Esta capacidade está altamente relacionada com a composição de flavonóides dos extractos, especialmente com o tipo de pigmentos e com a sua quantidade. Pensa-se que os pigmentos presentes no extracto B e C contribuíram significativamente para a capacidade antiradicalar e antioxidante verificada.

O interesse na síntese destes extractos está na possibilidade de poderem vir a ser utilizados como corantes na indústria alimentar, uma vez que apresentam cores interessantes e invulgares (laranja e azul). As propriedades antioxidantes que estes compostos demonstraram *in vitro* reforçam o interesse de uma possível utilização. De facto, a oxidação lipídica é uma importante questão na indústria alimentar por duas perspectivas: a conservação dos alimentos e a saúde do consumidor.

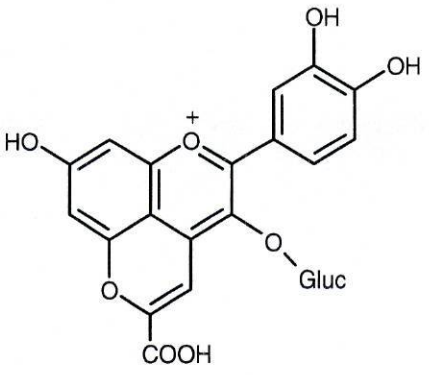
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE PIGMENTOS DERIVADOS DE ANTOCIANINAS

1 INTRODUÇÃO

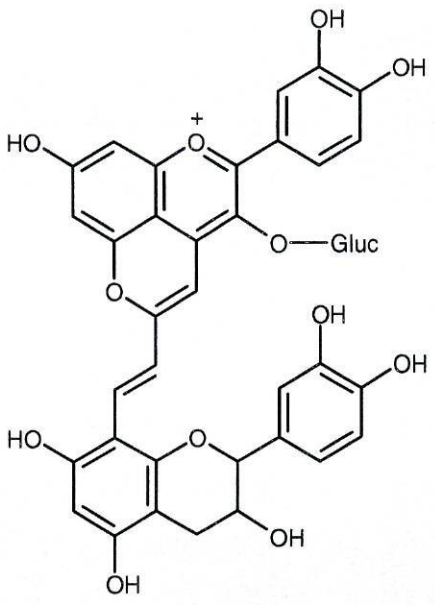
As antocianinas são espécies muito reactivas devido ao carácter acídico dos seus grupos hidroxilo e às propriedades nucleofílicas dos anéis fenólicos, sendo susceptíveis de sofrer vários tipos de reacção com diferentes tipos de compostos. Estas reacções levam a uma grande diversidade de produtos, muitas vezes com características distintas dos seus precursores, contribuindo decisivamente para a complexidade da constituição e caracterização dos alimentos ricos em antocianinas. Nos vinhos, em particular, existem muitas possibilidades de reacção das antocianinas com outros compostos pois a sua matriz é extremamente complexa.

Como resultado das reacções de antocianinas obtém-se uma variedade muito grande de compostos, dos quais se destacam dois tipos: os derivados pirúvicos de antocianinas e as vinilpiranoantocianina-catequinas (portisinas), que derivam dos primeiros. Estes pigmentos têm recebido bastante atenção devido às cores que apresentam: os primeiros são vermelho-laranja e os segundos têm cor azul. Estes pigmentos azuis, devido à sua cor e à sua estabilidade em meio ácido, têm sido testados para uma possível utilização em matrizes alimentares. Como foi demonstrado no capítulo anterior, além de uma cor pouco comum numa substância natural, estes compostos também apresentam uma elevada capacidade antioxidante, o que poderá aumentar ainda mais o interesse por este tipo de pigmentos.

Para tentar entender, de um modo mais claro, de que forma a estrutura está relacionada com a actividade antioxidante exibida por este tipo de pigmentos, foram efectuados os testes de actividade antioxidante descritos nos capítulos anteriores. Desta vez utilizaram-se os pigmentos puros e derivados de apenas uma antocianina, mas com o mesmo tipo de estrutura dos constituintes dos extractos utilizados anteriormente. A antocianina a partir da qual se obtiveram os pigmentos foi a cianidina (cy). Assim, foram testados a cianidina e a cianidina-3-glucósido (cy-3-gluc) (Figura 48) para perceber a influência do glucósido na estrutura. O derivado pirúvico da cianidina-3-glucósido (cy-3-gluc-py) e a vinilpiranocianidina-3-glucósido-catequina (vinylcy-3-gluc-cat) (Figura 47) foram objecto de teste de forma a comprovar a maior actividade antioxidante evidenciada pelos extractos, nomeadamente o que continha as portisinas.



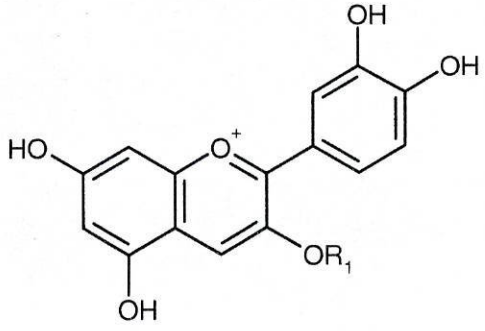
Derivado Pirúvico da cianidina-3-glucósido



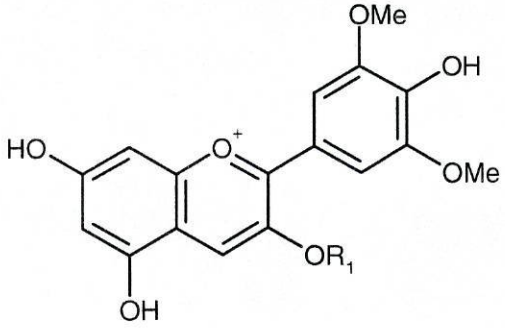
Vinilpiranocianidina-3-glucósido-catequina

Figura 47 – Estrutura química dos derivados da cianidina testados.

Numa fase posterior testaram-se também a malvidina e a malvidina-3-glucósido (Figura 48), de forma a tentar perceber a relação estrutura-actividade encontrada entre antocianinas diferentes e os seus respectivos glucósidos.



Cianidinas



Malvidinas

Figura 48 – Estrutura química da cianidina e da malvidina. R_1= H ou açúcar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Malvidina, cianidina, malvidina-3-glucósido e cianidina-3-glucósido (Fluka, Espanha); o derivado pirúvico da cianidina-3-glucósido e a vinilpiranocianidina-3-glucósido-catequina foram obtidos por síntese no laboratório.

2.2 Caracterização antioxidante de pigmentos

Para caracterizar a actividade antioxidante de antocianinas e pigmentos puros utilizaram-se os métodos DPPH e FRAP para avaliar a capacidade antiradicalar e o poder redutor, respectivamente. Para avaliar o efeito destes compostos na peroxidação lipídica monitorizou-se o consumo de oxigénio e seguiu-se espectrofotometricamente a formação de dienos conjugados. Para todos os métodos os pigmentos foram dissolvidos em metanol e nos métodos DPPH e FRAP foram utilizados numa concentração final de 10 μM. Na monitorização do consumo de oxigénio utilizou-se uma concentração final de 1,25 μM e na monitorização da formação de dienos conjugados usou-se uma concentração final de 2,5 μM. Neste método ajustou-se a concentração para o dobro da utilizada no método do consumo de oxigénio, pois a formação de dienos conjugados com 1,25 μM era muito rápida e não era possível avaliar as diferenças entre os diferentes tipos de pigmentos.

2.3 Análise Estatística

Todos os ensaios foram efectuados no mínimo em triplicado. Os valores são expressos como médias aritméticas ± desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas através de análise de variância a um factor (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni, e do teste de *t*-Student para comparações entre dois grupos. Foram consideradas significativas as diferenças com $P < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Pigmentos derivados de antocianinas

Uma vez que foram visíveis diferenças significativas nos extractos de mirtilo contendo antocianinas, derivados pirúvicos de antocianinas e portisinas, considerou-se de elevada importância explorar as propriedades antioxidantes de padrões de modo a avaliar eventuais relações estrutura-actividade.

3.1.1 Avaliação da capacidade antiradicalar e do poder redutor

Utilizaram-se os métodos DPPH e FRAP para avaliar a capacidade antiradicalar e o poder redutor da cianidina (Cy), da ciandina-3-glucósido (Cy-3-gluc), do derivado pirúvico da cianidina-3-glucósido (Cy-3-gluc-py) e da vinilpiranocianidina-3-glucósido-catequina (Vinylcy-3-glu-cat). A cianidina e a cianidina-3-glucósido foram obtidas comercialmente ao passo que o derivado pirúvico e a portisina foram sintetizados e purificados em laboratório de acordo com Mateus *et al.* (2004). Todos estes compostos demonstraram capacidade de captar radicais livre e de quelatar iões metálicos. Os resultados obtidos estão esquematizados na Figura 49.

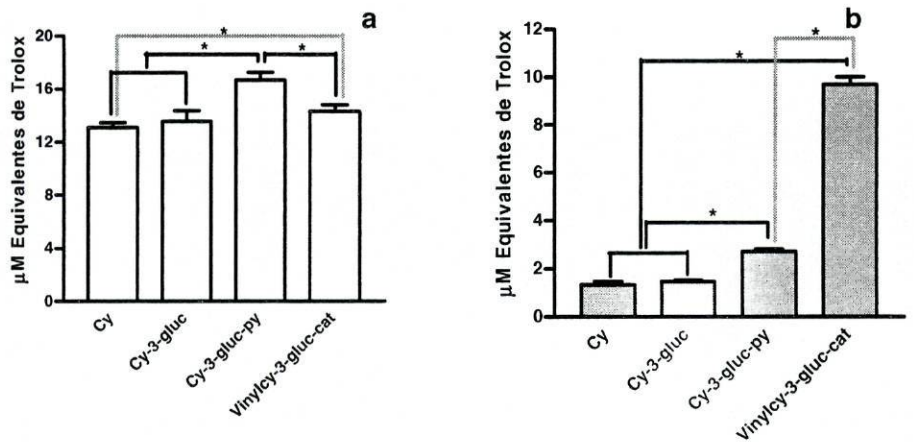


Figura 49 – Capacidade antiradicalar **(a)** e poder redutor **(b)** de 10 µM de cianidina, cianidina-3-glucósido e seus derivados avaliada pelos métodos do DPPH e FRAP respectivamente. Resultados expressos em µM de Trolox. * P <0,05

Através destes métodos, e nas condições testadas não de verificaram diferenças significativas entre a actividade da cianidina e da cianidina-3-glucósido. Estas moléculas diferem entre si apenas pela presença de uma molécula de glucose na posição O-3 do anel C (Figura 48).

A presença da molécula de glucose elimina um grupo hidroxilo que é capaz de doar o seu hidrogénio para captar radicais. Além disso, acrescenta volume à molécula o que pode incluir um factor de impedimento em algumas situações. Uma vez que estes métodos são feitos em solução, em condições não biológicas, não existem outros componentes entre os compostos a testar e o radical DPPH ou do ião metálico, o que poderá resultar que, nas condições testadas, os impedimentos estereoquímicos levantados pela molécula de açúcar não sejam significativos. A falta de um grupo hidroxilo na cianidina-3-glucósido não se reflecte nos resultados, o que é também de esperar pois quando a molécula apresenta grupos *orto*-catecol no anel B, os hidrogénios que têm um papel mais activo são os destas posições, uma vez que por deslocalização electrónica é mais fácil estabilizar a molécula com radical nesta posição (Rice-Evans *et al.*, 1996). De um modo geral, a cianidina-3-glucósido revelou um maior efeito que a cianidina, o que está de acordo com alguns autores. Existem apenas duas excepções em que a antocianidina monoglucosilada tem menor efeito que a antocianidina, que é o caso da pelargonina e da malvidina. Para a malvidina esta relação foi verificada como se pode verificar nas Figuras 51 e 52 (Acquaviva *et al.*, 2003; Kong *et al.*, 2003).

O derivado pirúvico da cianidina-3-glucósido e a portisina testados apresentam valores significativamente superiores aos da antocianidina e da antocianina. Estes compostos mostraram possuir uma maior capacidade de captar radicais livres e de quelatar iões metálicos. É de realçar o valor encontrado para a portisina no método FRAP, que foi muito superior aos seus precursores. Este facto poderá ser explicado pela existência de mais grupos *orto*-catecol que são responsáveis pela quelatação de iões metálicos (Rice-Evans *et al.*, 1996). Estes resultados estão em concordância com os obtidos com o extracto de antocianinas de mirtilo e seus derivados, onde se verificam capacidades superiores nos extractos contendo pigmentos derivados de antocianinas.

3.1.2 Avaliação da actividade antioxidante na peroxidação lipídica

Foi avaliada a capacidade das antocianidinas e alguns dos seus derivados inibirem a peroxidação lipídica em lipossomas (LUVs) de fosfatidilcolina de soja, utilizando a monitorização do consumo de oxigénio e a monitorização da formação de dienos conjugados para esse efeito. Os resultados obtidos vão de encontro aos verificados com o método do DPPH e do FRAP. A cianidina apresenta menor efeito que a cianidina-3-

glucósido a captar radicais peroxilo, apesar de não serem diferenças estatisticamente diferentes (Figura 50(a)). Através destes resultados verifica-se que a presença da molécula de glucose na posição 3 do anel C do catião flavílio não insere diferenças significativas na actividade antioxidante destas moléculas. Uma vez que os grupos que participam mais activamente na captação de radicais e quelatação de metais são os grupos *orto*-catecol do anel B, e a presença da glucose não interfere com a acessibilidade destes grupos, a actividade antioxidante não se altera com a presença do açúcar. O grupo hidroxilo da posição 3 do anel C é um grupo pouco reactivo e por isso não tem uma actividade relevante.

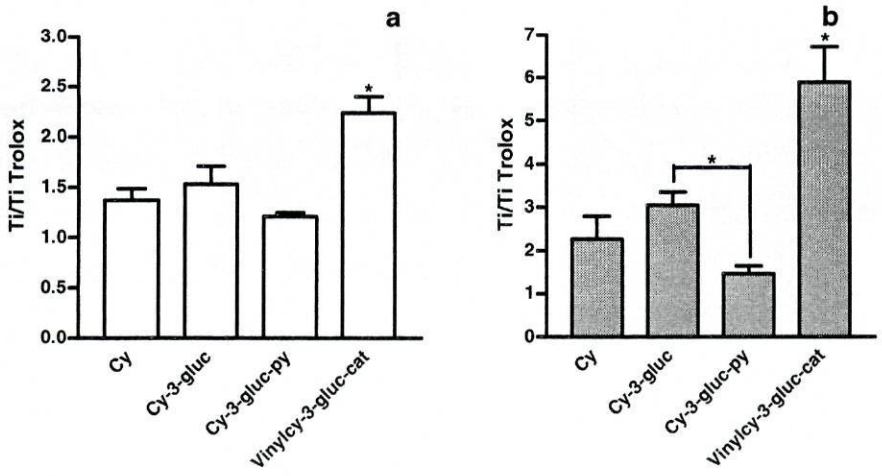


Figura 50 – Inibição da oxidação de lipossomas de fosfatidilcolina de soja por 1,25 μM de cianidina e seus derivados, monitorizada pelo consumo de oxigénio **(a)** e de 2,5 μM dos mesmos compostos na formação de dienos conjugados **(b)**. Os resultados são expressos como a razão do tempo de inibição pelo tempo de inibição obtido com Trolox. * P <0,05

O derivado pirúvico e a portisina derivada da cianidina mostraram uma inibição da peroxidação lipídica, tanto pelo consumo de oxigénio como pela inibição da formação de dienos conjugados. É curioso o facto do derivado pirúvico da cianidina-3-glucósido ter uma actividade menor do que a cianidina e a cianidina-3-glucósido. No entanto, esta diferença só é significativa na monitorização da formação dos dienos conjugados (Figura 50(b)). Esta observação pode ser devida a impedimentos estereoquímicos que estas moléculas apresentam e impossibilitam a aproximação aos radicais peroxilo formados nas cadeias de ácidos gordos não tendo a possibilidade de lhes ceder hidrogénios. É de realçar o facto da portisina derivada da cianidina ter um efeito apreciável na inibição da peroxidação lipídica. Apesar desta molécula ser grande, ela apresenta dois grupos *orto*-catecol que influenciam a actividade antioxidante e além

disso dispõe de uma extensa conjugação electrónica de electrões π, capaz de estabilizar a molécula (Figura 47). Uma vez mais, estes resultados estão de acordo com os que se observaram quando se utilizaram os extractos de pigmentos.

É também de destacar o facto da portisina não ser solúvel em água e por isso ter maior afinidade para a parte lipídica do que os outros compostos. Assim este composto encontra-se mais facilmente junto das cadeias de ácidos gordos do que os outros compostos testados, pois, como não são hidrofóbicos, provavelmente situam-se numa interface hidrofílica:lipofílica. Desta forma entende-se o facto das portisinas apresentarem valores tão elevados para a protecção dos lipossomas contra a peroxidação lipídica e a formação de produtos da oxidação.

3.1.3 Comparação entre as propriedades antioxidantes da cianidina e malvidina

A cianidina e a malvidina são duas das antocianinas mais abundantes na natureza. No entanto elas têm reactividades diferentes que são consequência da sua estrutura química. Estas duas moléculas diferem no seu padrão de hidroxilação e metoxilação, como pode ser verificado pela Figura 48.

O padrão de hidroxilação e metoxilação do anel B afecta tanto a estabilidade como a reactividade das moléculas. Os grupos *orto*-catecol são determinantes na actividade antioxidante exibida por uma molécula. Eles são locais de quelatação de iões metálicos e são grupos susceptíveis de doar hidrogénios de forma a captar radicais, ficando as próprias moléculas sob a forma de radical, mas estabilizadas devido à deslocalização electrónica que os anéis aromáticos proporcionam. A cianidina apresenta um grupo *orto*-catecol enquanto a malvidina apresenta grupos metoxilo no anel B. Os resultados obtidos para a actividade antioxidante destas duas antocianidinas e respectivos glucósidos, utilizando os métodos anteriormente descritos estão representados nas Figuras 51 e 52.

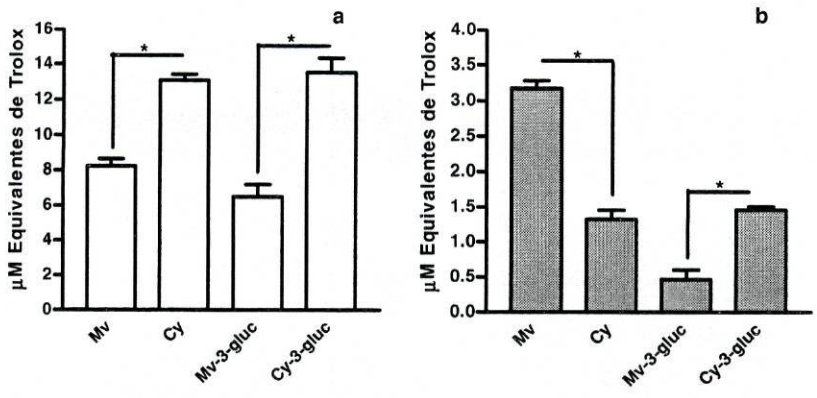


Figura 51 – Capacidade antiradicalar **(a)** e poder redutor **(b)** de 10 µM de cianidina, malvidina e seus glucósidos avaliada pelos métodos do DPPH e FRAP respectivamente. Resultados expressos em µM de Trolox. Resultados expressos em µM equivalentes de Trolox. * P <0,05

De uma forma geral observa-se que a malvidina tem um efeito menor que a cianidina e da mesma forma, a malvidina-3-glucósido tem um efeito menor que a cianidina-3-glucósido. A excepção verifica-se com o método FRAP em que a malvidina apresentou um valor muito superior ao da cianidina (Figura 51(b)). Um factor explicativo para este resultado poderá ser a diferente polaridade das moléculas, uma vez que os grupos metoxilo da malvidina lhe conferem uma diminuição de polaridade relativamente à cianidina. Esta diminuição de polaridade é um factor que favorece a quelatação de iões metálicos (Kähkönen & Heinonen, 2003). Na malvidina-3-glucósido a presença do açúcar aumenta a polaridade do composto havendo por isso uma diminuição da actividade verificada.

Quando se analisa a actividade destes compostos na interacção com sistemas lipídicos (Figura 52(a) e 52(b)) verifica-se que a relação se mantém: a capacidade antioxidante do glucósido de cianidina é superior à cianidina, e a capacidade do glucósido de malvidina é inferior à malvidina; quer a malvidina quer a malvidina-3-glucósido têm um efeito menor na actividade antioxidante do que a cianidina e a cianidina-3-glucósido respectivamente.

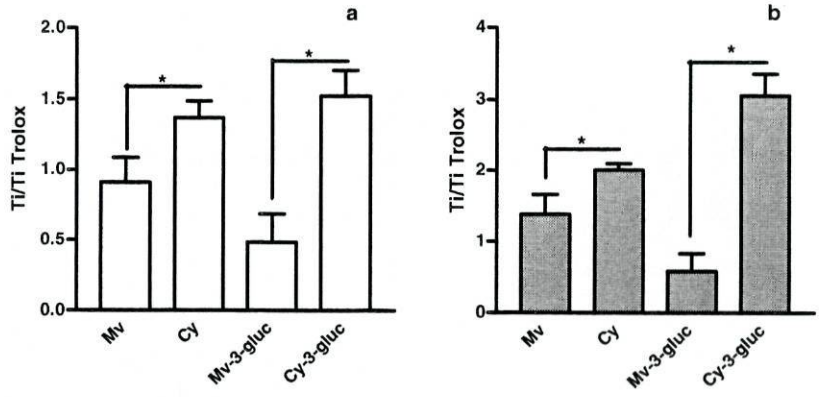


Figura 52 – Inibição da oxidação de lipossomas por 1,25 μM de cianidina, malvidina e seus glucósidos, monitorizada pelo consumo de oxigénio **(a)** e de 2,5 μM dos mesmos compostos na formação de dienos conjugados (b). Os resultados são expressos como a razão do tempo de inibição pelo tempo de inibição obtido com Trolox. * P <0,05.

4 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos demonstrou-se que a actividade antioxidante observada no extractos de mirtilo contendo pigmentos derivados de antocianinas é devida à presença de derivados pirúvicos de antocianinas e de vinilpiranoantocianina-catequina, respectivamente para o extracto B e C.

A portisina derivada da cianidina revelou ser um antioxidante com elevado poder redutor e eficiente na inibição/retardamento da peroxidação lipídica, provavelmente devido à elevada estabilização do radical livre na sua estrutura química.

A presença de uma molécula de glucose na estrutura da antocianina mostrou não interferir significativamente na actividade antioxidante da cianidina. Confirmou-se que a presença do grupo *orto*-catecol no anel B da antocianina é indispensável para aumentar a capacidade antioxidante da molécula.

CONCLUSÃO GERAL

Com este trabalho foi possível caracterizar a actividade antioxidante de compostos polifenólicos através de métodos desenvolvidos e aperfeiçoados durante o seu decorrer. Inicialmente confirmou-se a elevada capacidade antioxidante da quercetina devido às suas características estruturais. Verificou-se também que o carácter lipofílico do antioxidante é determinante na sua localização e por consequência na sua acção.

As procianidinas são compostos polifenólicos abundantes em muitos alimentos e bebidas e como tal foi importante conhecer e caracterizar a sua capacidade antioxidante. Estes compostos apresentaram elevada actividade antioxidante, que mostrou ser dependente da sua complexidade estrutural. Esta dependência prende-se provavelmente com impedimentos estereoquímicos apresentados pelas fracções constituídas por moléculas mais complexas.

Quando se avaliou o efeito destas fracções no crescimento celular de um tumor, verificou-se que as fracções que inibiram significativamente a viabilidade e proliferação celular foram aquelas que apresentaram maior actividade antioxidante. De alguma forma estas duas características poderão estar relacionadas. Por fim verificou-se que as procianidinas são capazes de modular (aumentar e diminuir) a captação de catiões orgânicos (MPP^+) num modelo celular de epitélio intestinal (células Caco-2), e que este transporte é mediado por fenómenos de oxidação-redução. A presença de procianidinas na dieta parece ser benéfica uma vez que devido às propriedades biológicas demonstradas, elas poderão ter uma acção no sentido de reduzir o risco de doenças crónicas como doenças cardiovasculares e certos tipos de cancro.

Futuramente será interessante tentar entender o mecanismo pelo qual as procianidinas inibem a proliferação celular e quais aquelas que são realmente princípios activos nesta inibição. Poder-se-ão realizar também ensaios *in vivo*, utilizando modelos animais de forma a averiguar o efeito que as procianidinas poderão exercer no crescimento de tumores. Adicionalmente será importante estudar em pormenor a regulação do transportador, confirmando quais os alvos de oxidação, qual a sua localização celular e quais os intermediários que poderão estar envolvidos nesta regulação.

O interesse na síntese de extractos de mirtilo está na possibilidade de serem utilizados como corantes na indústria alimentar, uma vez que apresentam cores interessantes e invulgares (laranja e azul). As propriedades antioxidantes que estes compostos demonstraram *in vitro* reforçam o interesse de uma possível utilização. De facto, a

oxidação lipídica é uma importante questão na indústria alimentar por duas perspectivas: a conservação dos alimentos e a saúde do consumidor.

Demonstrou-se que a actividade antioxidante observada nos extractos de mirtilo contendo pigmentos derivados de antocianinas é devida à presença de derivados pirúvicos de antocianinas e de vinilpiranoantocianina-catequinas. Verificou-se que a actividade antioxidante dos compostos antociânicos é altamente dependente da sua estrutura química. Esta actividade é tanto maior quanto maior a estabilização da estrutura química na forma radical. A presença ou ausência de grupos hidroxilo e moléculas de açúcar influenciam a actividade demonstrada pelos compostos. A vinilpiranoantocianina-catequina mostrou ser um composto com uma elevada actividade antioxidante devido à sua estrutura, além de apresentar uma cor muito pouco comum na natureza.

Seria de elevado interessante estudar o efeito destes compostos utilizando linhas celulares. Poderia avaliar-se a sua interferência no crescimento de células tumorais, averiguando a sua citotoxicidade. Seria muito importante realizar o estudo do efeito destes compostos quando ingeridos concomitantemente com outras substâncias. Pelo facto de possivelmente serem utilizados como corantes alimentares, estes compostos estarão sempre sujeitos a interacções com outros componentes, tanto durante o processamento dos alimentos como na sua ingestão. Por fim, para avaliar o risco de uma possível utilização em alimentos seria necessário efectuar estudos *in vivo*, recorrendo a modelos animais, de forma a compreender a toxicidade que estes compostos poderão apresentar.

LISTA DE REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acquaviva R., Russo A., Galvano F., Galvano G., Barcellona ML., Li VG., Vanella A., Cyanidin and cyanidin-3-O-β-glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants. *Cell Biology and Toxicology,* **2003**, 19, 243-252.

Agarwal C., Sharma Y., Zhao J., Agarwal R., A Polyphenolic Fraction from Grape Seeds Causes Irreversible Growth Inhibition of Breast Carcinoma MDA-MB468 Cells by Inhibiting Mitogen-activated Protein Kinases Activation and Inducing G1 Arrest and Differentiation. *Clinical Cancer Research*, **2000**, 6, 2921–2930.

Arnous A., Makris DP., Kefalas P., Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2002**, 15, 655–665.

Arnous A., Makris DP., Kefalas P., Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2001,** 49, 5736-5742.

Arora A., Nair M., Strasburg GM., Antioxidant activities of Isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1998**, 356, 2, 133-141.

Artursson P., Palm K., Luthman K., Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, 46, 27–43.

Aruoma OI., Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **2003**, 523-524, 9-20.

Auger C., Al-Awwadi N., Bornet A., Rouanet J.-M, Gasc F., Cros G., Teissedre P.-L, Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. *Food Research International*, **2004**, 37, 233–245.

Balimane PV., Chong S., Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discovery Today*, **2005**, 10, 5, 335-343.

Bao J., Cai Y., Sun M., Wang G., Corke H., Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their colour

properties and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2005,** 53, 2327-2332.

Barclay LRC., Le Page Y., Cabe EJ., Ingold KU. Autoxidation of a model membrane. A comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and in chlorobenzene. *Journal of American Chemical Society,* **1980**, 102, 7792-7794.

Barclay LRC., Ingold KU., Autoxidation of Biological Molecules. 2. The Autoxidation of a Model Membrane. A Comparison of the Autoxidation of Egg Lecithin Phosphatidylcholine in Water and in Chlorobenzene. *Journal of American Chemical Society*, **1981**, 103, 6478-6485.

Benzie I., Strain J., The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry,* **1996,** 239, 70–76.

Berridge MV., Tan AS., McCoy KD., Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, **1996**, 4, 14-19.

Bhat KPL., Lantvit D., Christov K., Mehta RG., Moon RC., Pezzuto JM., Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumour models. *Cancer Research*, **2001**, 61, 7456-7463.

Block G., A role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutrition Reviews*, **1992**, 50, 207-213.

Bondet V., Brand-Williams W. and Berset C., Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **1997**,30, 609–615.

Borek C., Dietary Antioxidants and Human Cancer. *Integrative Cancer Therapies*, **2004**, 3, 4, 333-341.

Boyle P., Ferlay J., Cancer incidence and mortality in Europe 2004, *Annals of Oncology*, **2005**, 16, 481–488.

Bradford MM., A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **1976**, 72, 248-254.

Burton GW., Ingold KU., Autoxidation of Biological Molecules. 1. The Autoxidation Activity of Vitamin E and Related Chain-Breaking Phenolic Antioxidants in Vitro. *Journal of American Chemical Society,* **1981**, 103, 6472-6477.

Calhau C., Martel F., Soares-da-Silva P., Hipólito-Reis C., Azevedo I., Regulation of [^{3}H]MPP$^+$ transport by phosphorylation/dephosphorylation pathways in RBE4 cells: role of ecto-alkaline phosphatase. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **2002**, 365, 349–356.

Carbonneau MA., Descomps B., Lèger CL., Consommation de polyphènols du vin des volontaires sans : amélioration de leur status antioxydatif et potentiellement antiathérogène. *Prog Agric Vit*, **1999**, 116 204-214.

Casagrande F., Darbon JM., Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: Regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochemical Pharmacology*, **2001**, 61, 1205–1215.

Caturla N., Vera-Samper E., Villaláin J., Mateo CR., Micol V., The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology & Medicine*, **2003**, 34, 6, 648–662.

Ciarimboli G., Schlatter E., Regulation of organic cation transport. *European Journal of Physiology*, **2005**, 449, 423-441.

Costa V., Moradas-Ferreira P., Mecanismos de adaptação de *Saccharomyces cerevisiae* a condições de stress. In Biotecnologia – Fundamentos e Aplicações (Lima N. e Mota M., LIDEL edições técnicas, Lda), **2003**, 67-82.

D'Souza VM., Buckley DJ., Buckley AR., Pauletti GM., Extracellular glucose concentration alters functional activity of the intestinal oligopeptide transporter (PepT-1) in Caco-2 cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2003**, 92, 3, 594-603.

Damianaki A., Bakogeorgou E., Kampa M., Notas G., Hatzoglou A., Panagiotou S., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P.-M., Castanas E., Potent Inhibitory Action of Red Wine Polyphenols on Human Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, **2000**, 78, 429–441.

Darné G., Madero-Tamargo J., Mise au point d'une méthode d'extraction des lipides solubles totaux, des glucides solubles totaux et des composés phénoliques solubles totaux des organes de la vigne. *Vitis* **1979**, 18, 3, 221-228.

De Freitas VAP., Glories Y., Bourgeois G. e Vitry C. Characterisation of Oligomeric and Polymeric Procyanidins from Grape Seeds by Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry. *Phytochemistry,* **1998**, 49, 1435-1441.

De Freitas VAP., Glories Y., Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis Vinifera* varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **1999**, 79, 1601-1606.

Dumitrescu RG., Cotarla I., Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? *Journal of Cellular Molecular Medicine*, **2005**, 9, 1, 208-221.

Elferink RPJO., Meijer DKF., Kuipers F., Jansen PLM., Groen AK., Groothuis GMM., Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1995**, 1241, 215-268.

Esterbauer H., Jürgens G.,Quenchenberger O., Koller E., Autoxidation of human low density lipoprotein : loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *Journal of Lipid Research*, **1987**, 28, 495-509.

Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Rotheneder M., Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low-density lipoprotein. *Free Radical Research*, **1989**, 6, 67-75.

Farines V., Monje MC., Telo JP., Hnawia E., Sauvain M., Nepveu F., Polyphenols as superoxide dismutase modulators and ligands for estrogen receptors. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 513, 103-111.

Fernandez MT., Mira ML., Florêncio MH., Jennings KR, Iron and Copper chelation by flavonoids – an electrospray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2002**, 92, 105-111.

Fernández-Pachón MS., Villaño D., García-Parrilla M.C., Troncoso A.M., Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 513, 113 – 118.

Forman MR., Hursting SD., Umar A., Barrett JC., Nutrition and Cancer Prevention: A Multidisciplinary Perspective on Human Trials. *Annual Review of Nutrition*, **2004**, 24, 223–254.

Frankel EN., Kanner J., German JB., Parks E., Kinsella JE, Inhibition of oxidation of low-density lipoprotein by phenolic substances in red wines. *Lancet*, **1993**, 341, 454-457.

Fuster V., Lewis A., Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: onsights from studies of vascular biology. *Circulation*, **1994**, 90, 2126.

Gali HU., Perchellet EM., Gao XM., Karchesy JJ. Perchellet JP., Comparison of the inhibitory effects of monomeric, dimeric and trimeric procyanidins on the biochemical markers of skin tumor promotion in mouse epidermis in vivo. *Planta Medica*, **1994**, 60, 235-239.

García-Alonso M., de Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo JC., Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry,* **2004**, 84, 13-18.

Gaulejac NSC., Vivas N., Freitas V., Bourgeois G., The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1999**, 79, 1081-1090.

Golstein JL., Swain T., Changes in tannins ripening fruits. *Phytochemistry*, **1963**, 2, 371-383.

Gonçalves E., Almeida LM., Dinis T., Antioxidant activity of 5-aminosalicylic acid against lipid peroxidation in the presence of vitamins C and E. *International Journal of Pharmaceutics*, **1998**, 172, 219-228.

Green MS., Jucha E., Association of serum lipids with coffee tea and egg consumption in free-living subjects. *Journal of Epidemiology and Community Health*, **1986**, 40, 324-329.

Gründemann D., Schechinger B., Rappold GA., Schömig E., Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nature neuroscience*, **1998**, 1, 5, 349-351.

Gu L., Kelm MA., Hammerstone JF., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Gebhardt S., Prior R. L. Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption. *Journal of Nutrition*, **2004**, 134, 613–617.

Guo C., Yang J., Wei J., Li Y., Xu J., Jiang Y., Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, **2003**, 23, 1719–1726.

Hagermen AE., Butler L.G., The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, **1981**, 256, 4494-4497

Halliwell B., Gutteridge JMC., *Free Radicals in Biology & Medicine*. 3rd Ed. Oxford University Press, London: **1999**.

Halliwell B., Whiteman M., Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, **2004**, 142, 231-255.

Halliwell B., How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Community*, **1990**, 9, 1-32.

Haslam E., Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry*, **1980**, 19, 2577-2592.

Hayer M., Bönisch H., Brüss M., Molecular cloning, functional characterization and genomic organization of four alternatively spliced isoforms of the human organic cation transporter 1 (*hOCT1/SLC22A1*). *Ann*als of *Hum*an *Gene*tics, **1999**, 63, 473-482.

Hertog MGL., Feskens EJM., Hollman PCH., Katan MB., Kromhout D., Dietary antioxidant flavonoid and risk of coronary disease. *Lancet*, **1993**, 342, 1007-1111.

Holt R., Lazarus S., Sullards M., Zhu Q., Scharmm D., Hammerstone J., Fraga C., Schimtz H., Keen C., Procyanidin dimmer B2[epicatechin-(4β-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2002**, 76, 798-804.

Huang D., Ou B., Prior RL., The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 1841-1856.

Inazu M., Takeda H., Matsumiya T., Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, **2003**, 84, 43–52.

Jovanovic SV., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic GS., Flavonoid as antioxidant. *Journal of American Chemical Society*, **1994**, 116, 4846-4851.

Jovanovic SV., Steinken S., Simic MG., Hara Y., Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. *Flavonoids in Health and Disease*, **1998**, Ed by Rice-Evans C., Packer L., Marcel Dekker, New York, 137-161.

Kähkönen MP., Heinonen M., Antioxidant activity of anthocyanin and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 628-633.

Kashiwada Y., Nonaka G., Nishioka I., Chang JJ., Lee KH., Antitumor agents: Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents. *Journal of Natural Products*, **1992**, 55, 1033-1043.

Koepsell H., Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annual Review Physiology*, **1998**, 60, 243–267.

Koepsell H., Schmitt B.M., Gorboulev V., Organic cation transporters. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, **2003**, 150, 36-90.

Koga T., Takahashi I., Ryo Y., Piskula M., Terao J., Kinetic studies on the formation of phosphatidylcholine hydroperoxides in large unilamellar vesicles by azo compounds. *Chemistry and Physics of Lipids*, **1997**, 86(1), 85-93.

Kong JM., Chia LS., Goh NK., Chia TF., Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, **2003**, 64, 923-933.

Laranjinha JAN., Cadenas E., Redox cycles of caffeic acid, α-tocoferol and ascorbic: implications for protection of low-density lipoproteins against oxidation. *Life*, **1999**, 48, 57-65.

Lila MA., Anthocyanins and Human Health: An *in vitro* investigative approach, *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, **2004**, 5, 306-313.

Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C., Bioavailability and bioefficacy of Polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2005**, 81 (suppl), 230-242.

Martel F., Calhau C., Azevedo I., Characterization of the transport of the organic cation [^{3}H]MPP$^+$ in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **2000**, 361, 505–513.

Martel F., Gründemann D., Calhau C., Schömig E., Apical uptake of organic cations by human intestinal Caco-2 cells: putative involvement of ASF transporters. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **2001a**, 363, 40–49.

Martel F., Keating E., Azevedo I., Effect of P-glycoprotein modulators on the human extraneuronal monoamine transporter. *European Journal of Pharmacology*, **2001b**, 422, 31–37.

Martel F., Ribeiro L., Calhau C., Azevedo I., Characterization of the efflux of the organic cation MPP$^+$ in cultured rat hepatocytes. *European Journal of Pharmacology*, **1999a**, 379, 211–218.

Martel F., Ribeiro L., Calhau C., Azevedo I., Comparison between uptake$_2$ and rOCT1: effects of catecholamines, metanephrines and corticosterone. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **1999b**, 359, 303–309.

Mateus N., Marques S., Gonçalves AC., Machado JM., De Freitas VAP., Proanthocyanidins composition of red Vitis Vinifera varieties from Douro Valley during ripening: influence of altitude. *American Journal of Enologie and Viticulture,* **2001**, 52, 2, 115-121.

Mateus N., Oliveira J., Haettich-Motta M., De Freitas V., New Family of Bluish Pyranoanthocyanins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2004,** 5, 299–305.

Mateus N., Silva AMS., Rivas-Gonzalo JC., Santos-Buelga C., De Freitas VAP., A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2003**, 51, 1919-1923.

Matito C., Mastorakou F., Centelles JJ., Torres JL., Cascante M., Antiproliferative effect of antioxidant Polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *European Journal of Nutrition,* **2003**, 42, 43–49.

Matsuda H., Wang T., Managi H., Yoshikawa M., Structural Requirements of Flavonoids for Inhibition of Protein Glycation and Radical Scavenging Activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2003**, 11, 5317 – 5323.

Michaud J., Lacaze P., Masquelier J., Fractionnement des oligomères flavanoliques du raisin. Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux, **1971**, 110, 111-116.

Miranda CL., Stevens JF., Helmrich A., Henderson MC., Rodriguez RJ., Yang YH., Deinzer ML., Barnes DW., Buhler DR., Antiproliferative and Cytotoxic Effects of Prenylated Flavonoids from Hops (*Humulus lupulus*) in Human Cancer Cell Lines. *Food and Chemical Toxicology*, **1999**, 37, 271-285.

Monteiro R., Calhau C., Martel F., Faria A., Mateus N., Azevedo I., Modulation of MPP^+ uptake by tea and some of its compounds in Caco-2 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **2005b**, in press.

Monteiro R., Calhau C., Martel F., Guedes de Pinho P., Azevedo I., Intestinal uptake of MPP^+ is differently affected by red and white wine. *Life Sciences*, **2005a**, 76, 2483-2496.

Moure A., Cruz JM., Franco D., Dominguez, JM., Sineiro J., Dominguez H., Nuñez MJ., Parajó JC., Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, **2001**, 72, 145-171.

New RRC., Liposomes: a pratical approach. Edited by R.R.C.New, IRL Press at Oxford University Press, **1990.**

Niki E., Kawakami A., Saito M., Yamamoto Y., Tsuchiya J., Kamiya Y., Effect of Phytyl Side Chain of Vitamin E on Its Antioxidant Activity. *The Journal of Biochemical Chemistry,* **1985**, 260, 4, 2191-2196.

Niki E., Saito T., Kawakami A., Kamiya Y., Inhibition of Oxidation of Methyl Linoleate in Solution by Vitamin E and Vitamin C. *The Journal of Biochemical Chemistry*, **1984**, 259, 7, 4177-4182.

Nomoto H., Iigo M., Hamada H., Kojima S., Tsuda H., Chemoprevention of Colorectal Cancer by Grape Seed Proanthocyanidin Is Accompanied by a Decrease in Proliferation and Increase in Apoptosis. *Nutrition and Cancer*, **2004**, 49, 1, 81–88.

Orgogozo JM., Dartigues JF., Lafont S., Letenneur L., Commenges D., Salamon R., Renaud S., Breteler MB., Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Revue Neurologique (Paris)*, **1997**, 153, 185-192.

Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo JC., Quantitative Analysis of Flavan-3-ols in Spanish Foodstuffs and Beverages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry,* **2000**, 48, 5331-5337.

Pezzuto JM., Plant-Derived Anticancer Agents. *Biochemical Pharmacology*, **1997**, 53, 121-133.

Pissarra J., Mateus N., Rivas-Gonzalo JC., Santos-Buelga C., De Freitas VAP., Reaction between malvidin 3-glucoside and (+)-catechin in model solutions containing different aldehydes. *Journal of Food Science,* **2003**, 68, 476-481.

Porto PALS., Laranjinha JAN., Freitas VAP., Antioxidant protection of low lipoprotein by procyanidins: Structure/activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, **2003**, 66, 947-954.

Pouget C., Lauthier F., Simon A., Fagnere C., Basly J.P, Delage C. and Chulia A.J., Flavonoids: Structural Requirements for Antiproliferative Activity on Breast Cancer Cells. *Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters*, **2001**, 11, 3095–3097.

Prescott E., Gronbaek M., Becker U., Sorensen TI., Alcohol intake and risk of lung cancer: influence of type of alcoholic beverage. *American Journal of Epidemiology*, **1999**, 149, 463-470.

Psarra E., Makris DP., Kallithraka S., Kefalas P., Evaluation of the radical and reducing properties of selected Greek white wines: correlation with polyphenolic composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **2002**, 82, 1014-1020.

Pszczola DE., Natural colors: pigments of imagination. *Food Technology*, **1998**, 52, 70-82.

Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F., Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2000**, 48, 3396-3402.

Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L., Flavonoids: Promising AnticancerAgents. *Medicinal Research Reviews*, **2003**, 23, 4, 519-534.

Riboli E., The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): Plans and Progress. *Journal of Nutrition*, **2001**, 131, 170S–175S.

Rice-Evans CA., Miller NJ., Paganga G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine,* **1996**, 20, 933-956.

Rimando AM., Cuendet M., Desmarchelier C., Mehta RG., Pezzuto JM., Duke SO., Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 3453-3457.

Rios LY., Bennett RN., Lazarus SA., Rémésy C., Scalbert A., Williamson G., Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *American Journal of Clinical Nutrition,* **2002**, 76, 1106-1110.

Rodrigues C., Gameiro P., Reis S., Lima JLFC., Castro B., Spectrophotometric determination of drug partition coefficients in dimysristoyl-L-α-phosphatidylcholine/water: a comparative study using phase separation and liposome suspensions. *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 428, 103-109.

Ross JA., Kasum CM., Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition*, **2002**, 22, 19-34.

Rusznyak ST., Szent-Gyorgyi A., Natural flavonoids. *Nature*, **1936,** 138, 27-29.

Sanchez-Moreno C., Cao G., Ou B., Prior R.., Anthocyanin and proanthocyanin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 4889-4896.

Sanchez-Moreno C., Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science Technology International*, **2002**, 8, 3, 121-137.

Santos-Buelga C., Scalbert A., Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of Food Science and Agriculture*, **2000**, 80, 1094-1117.

Satué-Garcia MT., Heinonen M., Frankel EN., Anthocyanins as antioxidants on human Low-Density Lipoprotein and Lecithin-Liposome Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45, 3362-3367.

Sayre LM., Biochemical mechanism of action of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine MPTP. *Toxicology Letters*, **1989**, 48, 121–149.

Schloss P., Mayser W., Betz H., Neurotransmitter transporters: A novel family of integral plasma membrane proteins. *Febs Letters*, **1992**, 307, 1, 76-80.

Shahidi F., Wanasundara PKJ., Phenolic antioxidants. *Critical Review Food Science Nutricion*, **1992**, 32, 67-103.

Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren JT., Bokesch H., Kenney S. and Boyd MR., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, **1990**, 82, 1107-1112.

So FV., Guthrie N., Chambers AF., Carroll KK., Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Letters*, **1997**, 112, 127- 133.

Spencer J., Chaudry F., Pannala AS., Srai SK., Debnam E., Rice-Evans C., Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2000**, 272, 236-241.

St. Leger AS., Cochrane AL., Moore F., Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*, **1979**, 313, 1017-1020.

Stensvold I., Tverdal A., Solvoll K., Foss OP., Tea consumption: relationship to cholesterol, blood pressure and coronary and total mortality. *Preventive Medicine*, **1992**, 21, 546-553.

Stintzing FC., Carle R., Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, **2004**, 15, 19-38.

Strong DR., Levin DA., Species richness of plants parasites and growth forms of their hosts. *American Naturalist*, **1979**, 114, 1-22.

Tapiero H., Tew KD., Nguyen B., Mathé G., Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & Pharma*cotherapy, **2002**, 56, 200-7.

Tebib K., Besancon P., Rouanet JM., Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissues lipids in rat fed hypercholesterolemic diets. *Journal of Nutrition*, **1994**, 124, 2451-2457.

Terao J., Piskuli M., Yao Q., Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1994**, 308, 278-284.

Tsuchiya H., Stereospecificity in membrane effects of Catechins. *Chemico-Biological Interactions,* **2001**,134, 41–54.

Villaño D., Fernández-Pachón MS., Troncoso AM., García-Parrilla MC., Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 538, 391–398.

Wayne SJ., Lopez ST., Butler LM., Baumgartner KB., Baumgartner RN., Ballard-Barbash R., Changes in Dietary Intake after Diagnosis of Breast Cancer. *Journal of the American Dietetic Association*, **2004**, 104, 10, 1561-1568.

Williams RJ., Spencer JPE., Rice-Evans C., Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*, **2004**, 36, 7, 838-849.

Williamson G., Manach C., Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2005**, 81 (suppl), 243-255.

Xu JZ., Yeung SYV., Chang Q., Huang Y., Chen ZY., Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers. *British Journal of Nutrition,* **2004**, 91, 873–881.

Yamamoto Y., Nikia E., Kamiya Y., Shimasaki H., Oxidation of lipids : 7. Oxidation of phosphatidylcholines in homogeneous solution and in water dispersion. *Biochimica et Biophisica Acta*, **1987**, 795, 332-340.