

TMUP
149
2007

Rui Miguel Freitas Gonçalves

U. PORTO

FC

**FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO**



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

ESTUDO DA INIBIÇÃO DE TRIPSINA POR COMPOSTOS FENÓLICOS

ISOLADOS DE FONTES NATURAIS.

EFEITO ANTINUTRICIONAL DE BEBIDAS COMUNS.

Departamento do Química Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Escola de Engenharia da Universidade do Minho

Setembro 2007

QD255.4
GONr E
2007



FC

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto



0000119612

Rui Miguel Freitas Gonçalves

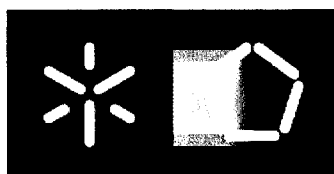
[Handwritten signature]
26/11/2007

U. PORTO

FC

**FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO**

duplicado

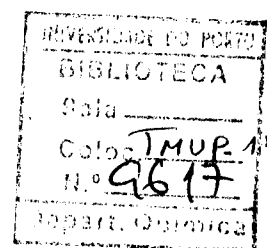


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

ESTUDO DA INIBIÇÃO DE TRIPSINA POR COMPOSTOS FENÓLICOS

ISOLADOS DE FONTES NATURAIS.

EFEITO ANTINUTRICIONAL DE BEBIDAS COMUNS.



Departamento de Química Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Escola de Engenharia da Universidade do Minho

Setembro 2007

Rui Miguel Freitas Gonçalves



FC **FACULDADE DE CIÊNCIAS**
UNIVERSIDADE DO PORTO



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

ESTUDO DA INIBIÇÃO DE TRIPSINA POR COMPOSTOS FENÓLICOS
ISOLADOS DE FONTES NATURAIS.
EFEITO ANTINUTRICIONAL DE BEBIDAS COMUNS.

Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Ciência e Segurança Alimentar.

Departamento de Química Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Escola de Engenharia da Universidade do Minho

Setembro 2007

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que de forma directa ou indirecta contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Antes de mais ao meu orientador Professor Doutor Victor de Freitas pela oportunidade de realização do trabalho, pelo apoio constante, pelo pragmatismo na sugestões feitas e pela pressão, positiva, que foi colocando sobre mim.

Seguidamente ao Professor Doutor Nuno Mateus pelas sugestões simples e directas que foi apresentando, pela boa disposição.

Aos meus colegas de trabalho: Ana Luísa; Frederico; Angélica; Raquel; Vânia; Natérica; Joana; Lígia; Susana; Iva; pela diversão, pela conversa, pela comida, e por alguma ciência que se foi fazendo entre duas fatias de torrada.

À Mestre Joana Oliveira e ao Mestre Luís Cruz por frequentemente me chamarem à realidade quando compliquei o que era simples. Por vezes é necessário manter as coisas simples.

À minha família, em particular aos meus Avós e Pai e em particular à minha Mãe pela paciência. Sem vocês nunca teria sequer chegado aqui.

Aos meus amigos, a minha segunda família, Hélder, Astorga, Ricardo, Vasco, Daniel, o outro Hélder. Passamos por muito de bom e de mau, vocês estão “aqui”. Ao Sérgio, ainda que longe ajudas-me todos os dias. Um agradecimento particular ao André pelas perguntas incessantes e por vezes difíceis, por complicar o que é simples e simplificar o que é complicado.

Ao Coutinho, Marisol, Margarida, Cecília e todos os outros... gostaria de um dia encontrar palavras para vos agradecer mas não é possível.

À Susana, pois mesmo as pessoas mais fortes têm momentos de fraqueza e felizmente que têm alguém em quem se apoiar.

Gostaria ainda de agradecer às Instituições que permitiram a realização deste trabalho:

Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e à Escola de Engenharia da Universidade do Minho pela organização conjunta do Mestrado em Tecnologia Ciência e Segurança Alimentar

Ao Instituto de Bebidas e Saúde – IBeSa – na pessoa do Engenheiro Machado Cruz pelo apoio financeiro concedido.

Objectivo

O estudo dos efeitos biológicos de compostos fenólicos é um tema de investigação actual. A compreensão dos mecanismos pelos quais os compostos fenólicos exercem a sua acção no organismo, pode permitir a valorização de produtos alimentares em que estes são abundantes. Este trabalho tem como objectivo principal estudar a inibição da actividade hidrolítica de tripsina por parte de compostos fenólicos de grainhas de uva, de vinhos, de sumos e de chás. Esta poderá ser benéfica para a saúde ao diminuir o valor calórico e ao abrandar a digestão de uma refeição levando a uma sensação de saciedade. Por outro lado pode contribuir para a diminuição da actividade de outras enzimas digestivas, cuja activação depende da actividade hidrolítica de tripsina.

Para o efeito pretende-se desenvolver um método colorimétrico para avaliar a actividade de tripsina baseado na hidrólise da N-Benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida. Este método permitirá testar a capacidade das procianidinas, purificadas a partir de grainhas de uva, na inibição da actividade de tripsina. Pretende-se avaliar o efeito da concentração de procianidinas na actividade da enzima bem como do seu grau de polimerização. Serão ainda efectuados estudos com outras famílias de compostos fenólicos, ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis, para avaliar o efeito inibitório dos mesmos.

Em seguida procurar-se-á verificar se este efeito inibitório é mantido em matrizes alimentares complexas com diferentes composições em compostos fenólicos como vinhos de mesa, vinho do Porto, sumos naturais e à base de concentrado.

Resumo

A actividade biológica dos compostos fenólicos no ser humano manifesta-se sobretudo por três mecanismos distintos; a quelatação de metais, a actividade antioxidante e a inibição enzimática. Do ponto de vista nutricional, a inibição da protease digestiva tripsina por parte dos compostos fenólicos, poderá ser benéfica por diminuir o valor calórico e abrandar a digestão de uma refeição levando a uma sensação de saciedade que permitirá o controlo de dislipidemias e outras doenças de origem alimentar. No entanto não podemos excluir a perda do valor biológico dos alimentos por diminuição da absorção de aminoácidos importantes para o metabolismo.

Na primeira fase deste trabalho desenvolveu-se um método colorimétrico para estudar o efeito de inibidores polifenólicos na actividade de tripsina com base na hidrólise de N-Benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BApNA). Este método, contrariamente ao habitual, tem como base a cinética da reacção de hidrólise e não a absorvância final.

Na segunda fase verificou-se a inibição de tripsina por parte de procianidinas oligoméricas de diferentes pesos moleculares (extraídas de grainha da uva) bem como por taninos hidrolisáveis. Concluiu-se que estes últimos apresentam um poder inibitório superior, no entanto, devido à sua reduzida presença em alimentos, não deverão ser inibidores relevantes na alimentação. Verificou-se que a inibição de tripsina aumenta com a concentração de procianidinas e com o seu grau de polimerização médio.

Numa terceira fase analisou-se o efeito inibitório de vinhos de mesa brancos e tintos; vinhos de Porto comerciais e enriquecidos com procianidinas e de sumos de frutas. Para os vinhos do Porto suplementados verificou-se um aumento da capacidade inibitória com o aumento da concentração em procianidinas.

Nos vinhos de mesa comerciais verifica-se poder inibitório superior com vinhos tintos. No que diz respeito aos sumos de fruta verificou-se uma relação directa entre o conteúdo de fenóis totais e a inibição enzimática.

Em todas as amostras analisadas a inibição parece depender não só da concentração total de compostos fenólicos mas também da sua complexidade estrutural.

A extrapolação de estudos realizados *in vitro* para actividade ocorrentes *in vivo* não é directa, sendo no entanto de esperar algum efeito antinutricional de procianidinas.

Abstract

The biological activity of phenolic compounds in the human being is exerted by three distinct mechanisms: metal chelation, antioxidant activity and enzymatic inhibition.

The inhibition of the digestive protease trypsin by phenolic compounds could be nutritionally beneficial by diminishing the caloric value and slowing the digestion of a meal leading to a sensation of fullness that may permit the control of lipid diseases and other illnesses of alimentary origin. However we cannot exclude the loss of biological value of foods through the reduction of the absorption of metabolically important amino acids.

In the first phase of the work a colorimetric method was developed to study the inhibitory effect of polyphenolic compounds on the activity of trypsin using the hydrolysis of N-Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide. This method uses the kinetics of the reaction instead of the final absorbance, used in the most common methods to test enzyme inhibition.

In the second phase the inhibition of trypsin by oligomeric procyanidins with different molecular weights (extracted from grape seeds) as well as by hydrolysable tannins was evaluated. The hydrolysable tannins presented a clearly larger inhibitory power; however, due to their reduced presence in foods, they should not account for a significant inhibition in human diet. It was also verified that trypsin inhibition increases both with the concentration of procyanidins as well as with the average degree of polymerization.

During the third phase the inhibitory effect of white and red table wines of commercial and procyanidin enriched Port wines and of fruit juices, was analysed. For the supplemented Port wines an increase of the inhibitory power with the increase of procyanidin concentration was verified. In the commercial table wines we verified that the red wine was a much better inhibitor than the white. Concerning the fruit juices we showed that the total phenolic compounds and the inhibition of trypsin activity are directly related.

In all the analyzed samples the inhibition seems to depend not only on the total phenolic compounds concentration but also on their structural complexity.

Extrapolation from *in vitro* studies to *in vivo* activities may not be done directly, even though we may expect some antinutritional effect by procyanidins.

Résumé

L'activité biologique des composés phénoliques dans l'être humain est exercée par trois différents mécanismes : chélation en métal, activité antioxydante et inhibition enzymatique.

L'inhibition de la protéase trypsine digestive par les composés phénoliques pourrait être nutritionnellement favorable en diminuant la valeur calorique et en ralentissant la digestion d'un repas menant à une sensation de plénitude qui peut permettre le contrôle des maladies lipidiques et d'autres maladies d'origine alimentaire. Cependant, nous ne pouvons pas exclure la perte de valeur biologique des aliments par la réduction de l'absorption des acides aminés métaboliquement importants.

Dans la première partie de ce travail une méthode colorimétrique a été développée pour étudier l'effet inhibiteur des composés polyphénoliques sur l'activité de la trypsine en utilisant l'hydrolyse de la N-Benzoyl-DL-arginine-P-nitroanilide. Cette méthode emploie la cinétique de la réaction au lieu de l'absorbance finale, utilisée dans les méthodes les plus communes à l'inhibition d'enzymes d'essai.

Dans une deuxième partie, l'inhibition de la trypsine par les procyanidines oligomériques avec des différents poids moléculaires (extraits de pépins de raisin) aussi bien que par les tannins hydrolysables a été évaluée. Les tannins hydrolysables ont présenté une puissance d'inhibition clairement plus supérieure ; cependant, en raison de leur présence réduite dans les aliments, ils ne devraient pas expliquer une inhibition significative dans le régime humain. On a également vérifié que l'inhibition de la trypsine augmente avec la concentration des procyanidines aussi bien qu'avec leur degré moyen de polymérisation.

Dans la troisième partie, l'effet inhibiteur des vins de table blancs et rouges commerciaux et des vins de Porto enrichis avec des procyanidines, ainsi que des jus de fruit, a été analysé. Pour les vins de Porto enrichis, une augmentation de la puissance d'inhibition a été observée avec l'augmentation de la concentration en procyanidines. Dans les vins de table commerciaux nous avons vérifié que le vin rouge était un inhibiteur bien meilleur que le vin blanc. En ce qui concerne les jus de fruit nous avons prouvé que la teneur en composés phénoliques et l'activité d'inhibition de la trypsine sont directement reliés.

Dans tous les échantillons analysés, l'inhibition de la trypsine semble dépendre non seulement de la concentration en composés phénoliques mais également de leur complexité structurale.

Agradecimentos	5
Objectivo	7
Resumo	9
Abstract.....	11
Résumé	13
Índice	15
Índice de Figuras	19
Índice de Tabelas	23
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	25
I. Introdução.....	27
1. Classificação de compostos polifenólicos.....	31
1.1. Compostos Não-flavonóides.....	31
1.2. Compostos Flavonóides.....	33
1.2.1. Antocianinas e antocianidinas.....	33
1.2.2. Taninos.....	35
1.2.2.1. Taninos hidrolisáveis.	35
1.2.2.2. Taninos condensados. Flavanóis.....	36
2. Distribuição de compostos polifenólicos na natureza e em alimentos.....	41
2.1. Distribuição de taninos hidrolisáveis nos alimentos.....	43
2.2. Distribuição de taninos condensados (proantocianidinas) nos alimentos.....	45

3. Interação entre Polifenóis e Proteínas.	47
3.1. Efeito da estrutura da proteína.	50
3.2. Efeito da estrutura do tanino.	51
3.3. Efeito do pH.	51
3.4. Efeito da Força Iónica.	52
4. Efeitos de compostos fenólicos sobre enzimas digestivas	53
4.1. Acção sobre Glicosidases.	54
4.2. Acção sobre Lipases.	55
4.3. Acção sobre Proteases.	57
4.4. A protease pancreática tripsina.	58
II. Descrição do Trabalho	61
III. Material e Métodos	65
1. Reagentes.	67
2. Extracção de Procianidinas de Grainhas de Uva.	67
3. Fraccionamento de Procianidinas.	68
4. Análise por Espectrometria de Massa.	69
5. Ensaios com Vinhos Comerciais e Enriquecidos com Procianidinas.	70
6. Ensaios com Sumos Comerciais.	70
7. Determinação de Fenóis Totais.	71
8. Ensaios de Actividade Enzimática.	72
9. Análise Estatística.	73

IV. Resultados experimentais	75
1. Composição polifenólica das fracções de procianidinas oligoméricas	77
2. Desenvolvimento do método para avaliar a inibição de tripsina.	79
2.1. Selecção das concentrações experimentais de substrato	79
2.2. Avaliação da estabilidade do substrato em solução.....	83
2.3. Avaliação da reacção entre polifenol e substrato (BApNA)	84
2.4. Selecção das concentrações experimentais de enzima.	86
3. Estudo do efeito da concentração de polifenol na actividade de tripsina.	89
4. Estudo cinético da inibição pelas fracções polifenólicas.	91
5. Comparação do efeito inibitório de compostos fenólicos de diferentes classes.....	93
6. Estudo do efeito do vinho na inibição da tripsina.	98
6.1. Estudos cinéticos com vinhos suplementados com procianidinas....	99
6.2. Estudos cinéticos com vinhos comerciais.....	103
9. Estudos cinéticos com bebidas não alcoólicas.	105
V. Conclusão.....	111
VI. Perspectivas Futuras.....	115
VII. Referências Bibliográficas	119

Figura 1. Estrutura geral dos ácidos benzóicos e cinâmicos.	31
Figura 2. Estrutura geral dos estilbenos.	32
Figura 3. Estrutura das isoflavonas mais abundantes em alimentos.....	32
Figura 4. Estrutura do núcleo flavânico.	33
Figura 5. Estrutura de antocianidinas 3-glucósido.	34
Figura 6. Estrutura de: ácido elágico (A) e pentagalol-glucose (B).	36
Figura 7. Estrutura geral dos flavan-3-óis.	36
Figura 8. Estrutura dos flavan-3-óis mais abundantes em alimentos.	36
Figura 9. Reacção de decomposição das proantocianidinas (Bate-Smith 1954).	37
Figura 10. Procianidinas diméricas de tipo A. Procianidina A2 (C ₄ -C ₈ e C ₂ -O ₇).	38
Figura 11. Procianidinas diméricas de tipo B.	39
Figura 12. Procianidinas triméricas. Trímero C1 epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina.	40
Figura 13. Estrutura geral de oligómeros e polímeros de proantocianidinas.	40
Figura 14. Mecanismo de formação de agregados polifenol-proteína. A baixas concentrações de proteína A e a altas concentrações de proteína B. Adaptado de Haslam (Haslam <i>et al.</i> 1988).	49
Figura 15. Clivagem de ligações peptídicas por tripsina num péptido natural (A) e num péptido sintético usado para quantificação da sua actividade, BApNA (B).	58

Figura 16. Representação estrutural da enzima tripsina com particular relevância para a tríade catalítica responsável pela actividade e especificidade da enzima adaptado de Gaboriaud (Gaboriaud <i>et al.</i> 1996).	59
Figura 17. Execução experimental das Fases 2 e 3 do trabalho.	63
Figura 18. Recta padrão para o método de Folin-Ciocalteu.	72
Figura 19. Estudos preliminares da cinética de actividade de tripsina com diferentes concentrações de BApNA (substrato) entre 0,05 e 0,40 g L ⁻¹ , em tampão fosfato (pH 7,5; 50 mM) a 37 °C. A concentração de tripsina foi de 0,072 g L ⁻¹	81
Figura 20. Cinética da actividade de tripsina (0,072 g L ⁻¹) incubada com BApNA (0,22 g L ⁻¹), em tampão fosfato (50 mM, pH 7,5) a 37 °C, na presença de oligómeros de procianidinas (0,18 g L ⁻¹). A tripsina foi adicionada após 180 segundos de incubação inicial. Ensaio em triplicado.	84
Figura 21. Comparação da cinética da actividade de tripsina (em triplicado) a duas concentrações de tripsina diferentes: A, 0,036 g L ⁻¹ ; e B, 0,072 g L ⁻¹ na ausência e na presença de procianidinas de grainha de uva (OPC) (0,18 g L ⁻¹). A concentração de BApNA foi 0,18 g L ⁻¹ ; pH 7,5; temperatura 37°C.	86
Figura 22. Estudo cinético da actividade de tripsina (0,072 g L ⁻¹), em tampão fosfato (50 mM; pH 7,5) a 37 °C, na presença de várias concentrações de procianidinas oligoméricas da fracção IV. A concentração de BApNA foi de 0,18 g L ⁻¹ . Para simplificar cada curva representa a média de ensaios em triplicado.	89
Figura 23. Cinética da actividade de tripsina (0,072 g L ⁻¹), em tampão fosfato (50 mM; pH 7,5) a 37 °C, na presença de fracções de procianidinas de extractos de grainhas de uva (223 mg L ⁻¹ para cada fracção). A concentração de BApNA foi 0,18 g L ⁻¹ . Para simplificar cada curva representa a média de ensaios em triplicado.	91
Figura 24. Velocidade relativa da actividade de tripsina (Vi/Vc) em função da concentração de inibidor para as fracções de procianidinas. ■ Fracção I; ▲ Fracção II; ● Fracção III; ■ Fracção IV; Fracção V.	92

Figura 25. Factor de Inibição de tripsina (declive de Vi/Vc) em função do peso molecular médio (A) e do grau de polimerização médio (B) de diferentes fracções de procianidinas... 94

Figura 26. Velocidade relativa da actividade de tripsina (Vi/Vc) em função da concentração de inibidor compostos não flavanóicos. ■ Ácido cafeico; ● Ácido gálico; ▲ Ácido tânico. 96

Figura 27. Cinética da actividade de tripsina ($0,072 \text{ g L}^{-1}$) em tampão fosfato (200 mM, pH 7,5) para diferentes volumes de um vinho suplementado com procianidinas ($2,0 \text{ g L}^{-1}$). A concentração de BAPNA foi de $0,18 \text{ g L}^{-1}$. Para simplificar cada curva representa a média de ensaios em triplicado. Ensaios efectuados a 37°C 99

Figura 28. Velocidade relativa da actividade de tripsina (Vi/Vc) em função do volume de vinho para vinhos suplementados com procianidinas. ■ Referência (sem procianidinas adicionadas); ▲ $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de OPC adicionadas; ● $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de OPC adicionadas; ■ $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de OPC adicionadas. 100

Figura 29. Velocidade relativa da actividade de tripsina (Vi/Vc) em função do volume de vinho para vinhos comerciais testados. ■ Vinho de Mesa Branco; ■ Vinho de Mesa Tinto; ■ Vinho do Porto Tinto..... 103

Figura 30. Concentração de compostos redutores, numa solução aquosa de ácido ascórbico (300 mg L^{-1}) e no extracto orgânico obtido após passagem no gel de C18..... 106

Figura 31. Compostos redutores totais obtidos pelo método de Folin-Ciocalteus para os sumos e para os extractos obtidos após passagem no gel C18. 106

Figura 32. Velocidade relativa da actividade de tripsina (Vi/Vc) em função do volume de sumo. ■ Isotónica; ■ Tutti-Frutti; ■ Frutos Vermelhos; ■ Laranja; ● Iced Tea..... 107

Tabela 1. Teores polifenólicos totais de alimentos comuns determinados por cromatografia e por colorimetria após reacção de Folin (Scalbert <i>et al.</i> 2000).....	43
Tabela 2. Distribuição e grau de polimerização de proantocianidinas em alimentos. (Gu <i>et al.</i> 2004).....	45
Tabela 3. Fraccionamento de procianidinas oligoméricas separadas por cromatografia líquida em coluna (gel Toyopearl TSK HW-40 S). Os tempos apresentados são cumulativos, assim a fracção IV foi recolhida entre as horas 1 e 5, logo, durante 4 horas.	68
Tabela 4. Sumos utilizados nos ensaios de inibição enzimática e seu conteúdo em ácido ascórbico, indicado pelo produtor na Tabela Nutricional.....	70
Tabela 5. Procianidinas presentes no extracto de grainhas de uva identificadas por espectrometria de massa.....	77
Tabela 6. Peso molecular médio e grau de polimerização médio de cada uma das fracções de procianidinas obtidas. A abundância relativa refere-se apenas aos compostos identificados nos espectros de massa.....	78
Tabela 7. Absorvância inicial de soluções de BApNA com concentrações entre 0,334 e 5,334 g L ⁻¹	80
Tabela 8. Absorvância inicial de soluções de BApNA com concentrações entre 0,050 e 0,400 g L ⁻¹ . Absorvância final 900 segundos de hidrólise por tripsina (0,072 g L ⁻¹) pH 7,5; 37°C.....	81
Tabela 9. Velocidade iniciais e relativas (Vi/Vc) da hidrolise de BApNA a duas concentrações de tripsina na presença e ausência de procianidinas (0,18 g L ⁻¹). Valores máximos de absorvância após 1300 s. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes.	88

Tabela 10. Velocidade inicial e velocidade relativa (V_i/V_c) da hidrólise de BApNA com várias concentrações de fracção de procianidinas oligoméricas de grau de polimerização médio 5,0. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes..... 90

Tabela 11. Velocidade relativa e absorvância final para ensaios cinético da actividade hidrolítica de BApNA ($0,18 \text{ g L}^{-1}$) por tripsina ($0,072 \text{ g L}^{-1}$) na presença das diferentes fracções de procianidinas (233 mg L^{-1}). Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes..... 92

Tabela 12. Factor de inibição da actividade de tripsina (F_i) e sua relação com o grau de polimerização e peso molecular médio das fracções de procianidinas analisadas. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes. 93

Tabela 13. Factor de inibição da actividade de tripsina (F_i) para o ácido tânico (tanino hidrolisável) e ácido gálico taninos hidrolisáveis testados. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes. 96

Tabela 14. Factores de inibição da actividade de tripsina e conteúdo fenólico total para vinhos do Porto enriquecidos com diferentes quantidades de procianidinas oligoméricas. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes. 101

Tabela 15. Factores de inibição (F_i) da actividade de tripsina e concentração fenólica total para vinhos comerciais. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes..... 104

Tabela 16. Factores de inibição da actividade de tripsina para sumos comerciais e conteúdo em fenóis totais obtido no extracto dos mesmos após passagem no gel C18. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes. 108

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Abs – Absorvância

BAPNA - N-Benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida

BSA – Albumina Sérica Bovina (*Bovine Serum Albumine*)

Cian – Cianidina

DMSO - Dimetilsulfóxido

EPC - Epicatequina

EPCG - Epicatequina galhato

EPGCG – Epigallocatequina galhato

$f()$ – em função de ()

F – Fração de procianidina

HPLC – Cromatografia líquida de Alta Eficiência

LC - Cromatografia Líquida

MS – Espectrometria de Massa

OPC - Procianidinas Oligoméricas

P – Nível de significância estatístico

U – Unidades de actividade enzimática

V_c - Velocidade inicial da reacção de hidrólise sem amostra

V_i - Velocidade inicial da reacção de hidrólise com amostra

Introdução

A alimentação humana tem merecido nas últimas décadas um olhar atento por parte da comunidade científica. O ser humano, graças a alterações drásticas nos hábitos de vida, tem vindo a aumentar o seu consumo de alimentos com baixo valor nutricional (Flegal *et al.* 1998). Os alimentos em questão apresentam valores calóricos elevados e, graças ao seu consumo, permitem exceder as doses diárias recomendadas de alguns nutrientes como hidratos de carbono e lípidos.

Este facto conjugado com a reduzida actividade física a que o Homem está actualmente sujeito nos países desenvolvidos, contribuiu para o aparecimento, ou para um aumento da incidência, de algumas doenças como cancro, diabetes tipo II, doenças cardiovasculares, hipercolesteremia não hereditária e obesidade (Pi-Sunyer 1993).

A busca de novas soluções farmacológicas eficazes na cura, tratamento e prevenção destas “doenças modernas” é uma área interessante e em constante evolução. A abordagem habitualmente seguida pela Química para esta busca é limitada já que se baseia na modificação de compostos já conhecidos de forma a aumentar o seu potencial farmacológico. Esta abordagem é dispendiosa e geralmente implica um aumento dos efeitos adversos de um dado medicamento ou princípio activo.

Uma parte do trabalho da comunidade científica na busca de compostos curativos/preventivos de doenças já foi feito pelas “medicinas tradicionais”. Estas já efectuaram por métodos empíricos e ao longo dos séculos rastreios de compostos com propriedades farmacológicas que, conjugados com alguma investigação científica, podem permitir identificar novas moléculas com valor terapêutico.

Independentemente das localizações geográficas é comum encontrar-se enraizado o uso de extractos vegetais como forma de tratamento de algumas doenças. Assim na China utiliza-se a raiz de *Paeoni lactiflora* para tratar problemas gástricos. No Japão usam-se partes de *Geranium thunbergi*. Na Europa ainda é comum actualmente o uso de plantas da família *Rosaceae* bem como de chás de folhas de *Rubus idaeus*. Estas plantas e os seus extractos apresentam em comum elevadas concentrações de compostos fenólicos (Haslam *et al.* 1988).

A actividade biológica de compostos fenólicos tem vindo a ser extensamente estudada e pode ser sumariada em três mecanismos principais; a quelatação de metais, a actividade antioxidante e a inibição enzimática (Haslam 1996). Foram já realizados vários estudos epidemiológicos para avaliar a capacidade destes compostos para prevenir ou tratar doenças modernas como hipertensão, hipercolesterolemia (Wan *et al.* 2001; Tapiero *et al.* 2002) e cancro (Gee *et al.* 2001).

Actualmente o trabalho realizado com compostos fenólicos centra-se sobre as áreas da biodisponibilidade (Manach *et al.* 2004), bioeficácia (Manach *et al.* 2005) e estabilidade (Cai *et al.* 2006; Kahle *et al.* 2006) em várias matrizes. Este trabalho tem como objectivo último caracterizar os efeitos que compostos fenólicos ingeridos, nos alimentos ou sob a forma de fármacos, podem exercer sobre alvos terapêuticos.

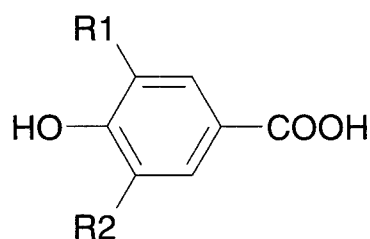
Como foi referido anteriormente existem três mecanismos principais de actuação biológica de compostos fenólicos. Destes, a inibição enzimática num contexto alimentar não foi ainda explorada muito amplamente. Será feito adiante um resumo dos estudos efectuados sobre este tema (Secção 4). De forma a perceber como os compostos polifenólicos interagem com as enzimas torna-se necessário conhecer a estrutura (Secção 1) e distribuição na natureza (Secção 2) dos compostos fenólicos mais relevantes, assim como as características da sua interacção com proteínas (Secção 3 da Introdução).

1. Classificação de compostos polifenólicos.

1.1. Compostos Não-flavonóides.

Os não-flavonóides são um grupo vasto de compostos como ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos, estilbenos e isoflavonas. Os ácidos benzóicos e cinâmicos (Fig. 1), frequentemente denominados ácidos fenólicos, encontram-se em frutos na forma livre em baixas concentrações quando comparados com as suas formas conjugadas (Clifford 1997). Estes ácidos aparecem numa variedade de produtos vegetais desde películas de uvas a cereais sobretudo sobre a forma de ésteres com ácido tartárico ou ligados a açúcares (Michael 1999).

R ₁	R ₂	Ácidos benzóicos
H	H	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico
OH	H	Ácido protocatéquico
OH	OH	Ácido gálgico
OCH ₃	H	Ácido vanílico
OCH ₃	OCH ₃	Ácido sirínico



R ₁	R ₂	Ácidos cinâmicos
H	H	<i>p</i> -cumárico
OH	H	cafeico
OCH ₃	H	ferrúlico
OCH ₃	OCH ₃	sinápico

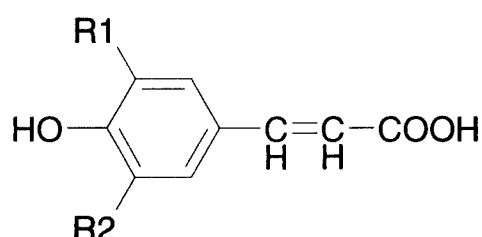


Figura 1. Estrutura geral dos ácidos benzóicos e cinâmicos.

Os estilbenos são 1,2 –diariletenos (Fig. 2). O anel A geralmente possui dois grupos hidroxilo na posição *meta*, enquanto o anel B está substituído por grupos hidroxilo e metoxilo nas posições *orto*, *meta* e/ ou *para*. O membro mais abundante desta família é o resveratrol abundante em uvas e em amendoins (Cassidy *et al.* 2000).

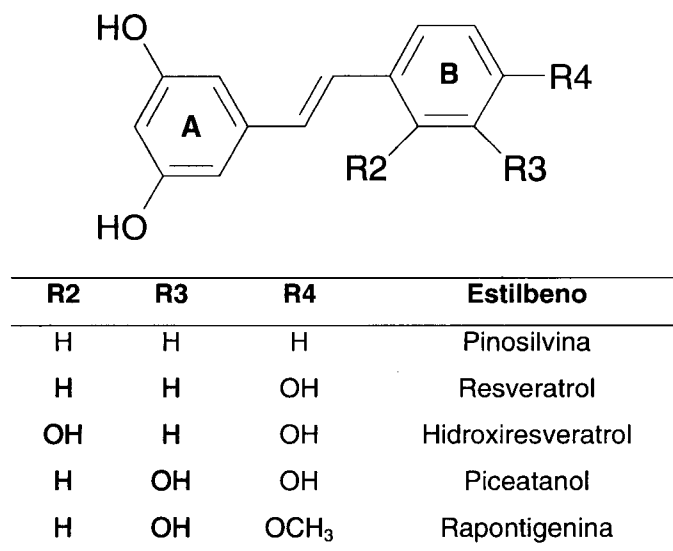


Figura 2. Estrutura geral dos estilbenos.

As isoflavonas são um grupo importante de compostos polifenólicos presentes sobretudo nas leguminosas e favaceas como a soja. A sua base estrutural é o 1,2–diarilpropano (Fig. 3). A sua propriedade biológica mais relevante é a semelhança com a hormona de mamíferos estrogénio tendo, por isso relevância farmacológica (Cassidy *et al.* 2000).

R1	R2	Isoflavona
H	H	Daidzeína
OH	H	Genisteína
H	OCH ₃	Gliciteína

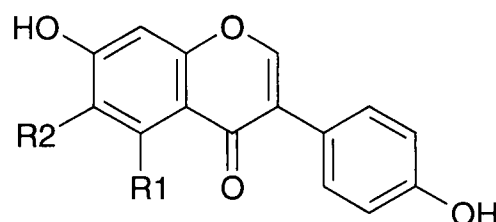


Figura 3. Estrutura das isoflavonas mais abundantes em alimentos.

1.2. Compostos flavonóides.

O grupo de compostos fenólicos mais relevante nos alimentos é o dos flavonóides. A este grupo pertence um número alargado de famílias de compostos como os flavanóis, os flavonóis, as flavanonas, as flavonas e as antocianinas, que diferem no seu padrão de oxidação.

Os flavonóides são caracterizados pela estrutura C6-C3-C6 com dois anéis fenólicos (A e B) e um anel heterocíclico pirânico (C) que os une (Fig. 4).

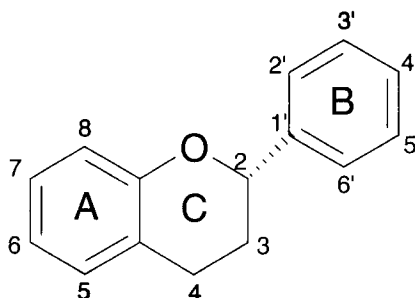


Figura 4. Estrutura do núcleo flavânico.

1.2.1. Antocianinas e antocianidinas.

As antocianinas são um grupo de compostos que apresentam um papel importante na cor dos frutos e cuja estrutura deriva de glucósidos do catião flavílio com diferentes graus de hidroxilação e metoxilação. Na sua forma não glicosilada denominam-se antocianidinas (agliconas).

A diversidade estrutural das antocianidinas (agliconas) depende do número e posição dos grupos hidroxilo e metóxilo ligados aos anéis aromáticos (A e B). Estas substituições interferem na cor apresentada por cada uma das antocianidinas e condicionam a sua aplicação como corantes na indústria alimentar (Brouillard 1983).

As antocianinas (Fig. 5) podem ainda diferir na natureza, número e posição dos açúcares (pentoses, metilpentoses e hexoses) ligados à molécula e na presença e natureza de ácidos esterificados na molécula de açúcar. Na maioria dos casos os açúcares ligam-se na posição O-3 podendo também ocorrer ligação em O-5 e O-7.

R1	R2	Antocianina
H	H	Pelargonidina-3-glucósido
OH	H	Cianidina-3-glucósido
OH	OH	Delfinidina-3-glucósido
OCH ₃	H	Peonidina-3-glucósido
OCH ₃	OH	Petunidina-3-glucósido
OCH ₃	OCH ₃	Malvidina-3-glucósido

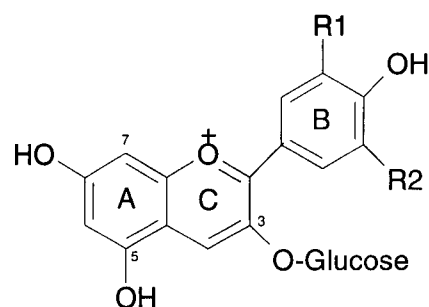


Figura 5. Estrutura de antocianidinas 3-glucósido.

Os açúcares podem ser mono, di e trissacáridos. Estes açúcares podem, como foi dito anteriormente, encontrar-se esterificados com ácidos fenólicos e outros. Graças à diversidade de padrões de glucosilação e acilação existem cerca de 300 antocianinas identificadas na natureza (Goffon *et al.* 1991).

A composição de frutos em antocianinas é muito variada, por exemplo:

- Uvas (*Vitis vinifera*): delfinidina, cianidina, petunidina, malvidina e cianidina 3-O glucósido (Baldi *et al.* 1995);
- Morango (*Fragaria*): pelargonidina-3-glucósido (Lopes-da-Silva *et al.* 2002);
- Framboesa (*Rubus*): cianidina-3-soforósido e cianidina-3-glucósido (Mullen *et al.* 2002);
- Mirtilo (*Vaccinium*): delfinidina, cianidina, petunidina, malvidina e peonidina glicosiladas com galactose, glucose e arabinose para formar 15 antocianinas diferentes (Kähkönen *et al.* 2003).

1.2.2. Taninos.

Segundo Bate-Smith e Swain taninos são compostos hidrossolúveis com pesos moleculares entre 500 e alguns milhares de Dalton, que para além das reacções normais das moléculas fenólicas, apresentam a capacidade para reagir com alcalóides, gelatina e outras proteínas formando precipitados (Bate-Smith *et al.* 1962). Esta definição exclui um grande número de compostos de menores pesos moleculares que anteriormente eram classificados como taninos. Este grupo de compostos que precipitam com as proteínas pode ser dividido em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (proantocianidinas).

1.2.2.1 Taninos hidrolisáveis.

Este grupo de compostos tem como base um ácido fenólico, o ácido gálgico (taninos gálgicos) e o ácido elágico (taninos elágicos) (Fig. 6A) ligados a uma molécula de açúcar. Na maior parte dos casos estes encontram-se na natureza sobre a forma de ésteres múltiplos com açúcares, nomeadamente a D-glucose formando estruturas complexas como é o caso da 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glucose (Fig. 6B) (Haslam 1989). Esta molécula é a base da biossíntese dos taninos hidrolisáveis mais complexos como o ácido tânico encontrado em partes não comestíveis de plantas (Haslam 1998).

Apesar de estarem presentes nas plantas essencialmente nas partes não comestíveis como ramos e raízes, estes compostos podem ser introduzidos na dieta através de operações tencológicas. Por exemplo, no caso do vinho podem passar da madeira para o vinho durante o envelhecimento em barrica.

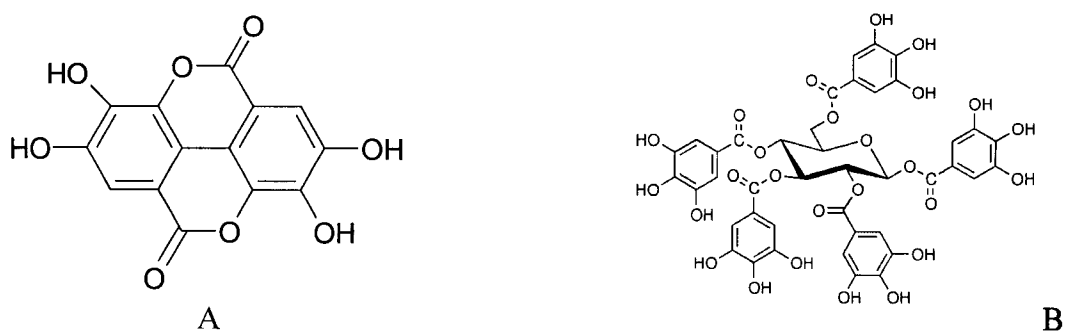


Figura 6. Estrutura de: ácido elágico (A) e pentagaloil-glucose (B).

1.2.2.2. Taninos condensados. Flavanóis.

Os taninos condensados (proantocianidinas). São polímeros constituídos por duas ou mais unidades de flavan-3-óis (Fig. 7). Os flavan-3-óis existem na natureza hidroxilados nas posições 5 e 7 do anel A e variam na esterioquímica do carbono 3 do anel C e no grau de hidroxilação do anel B.

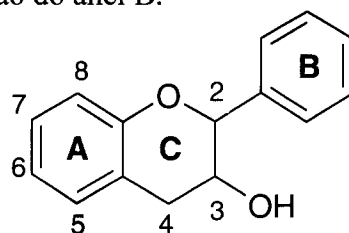
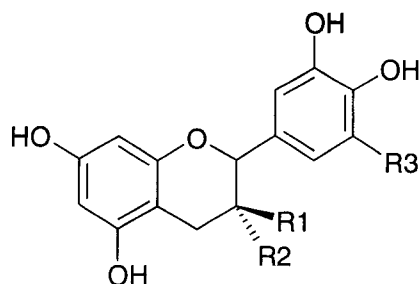


Figura 7. Estrutura geral dos flavan-3-óis.

Os compostos mais simples da família dos flavanóis são as catequinas e as galhocatequinas (Fig. 8).



	R1	R2	R3
(+)-catequina	OH	H	H
(-)-epicatequina	H	OH	H
(+)-gahocatequina	OH	H	OH
(-)-epigahocatequina	H	OH	OH

Figura 8. Estrutura dos flavan-3-óis mais abundantes em alimentos.

As estruturas poliméricas de flavan-3-óis (proantocianidinas) dividem-se em dois grupos: as procianidinas, derivadas de catequina e epicatequina e as prodelfinidinas, derivadas de galhocatequina e epigalhocatequina. Os nomes procianidinas e prodelfinidinas resultam do facto destes compostos por hidrólise ácida originarem respectivamente a cianidina e a delfinidina (Fig. 9) (Bate-Smith 1954).

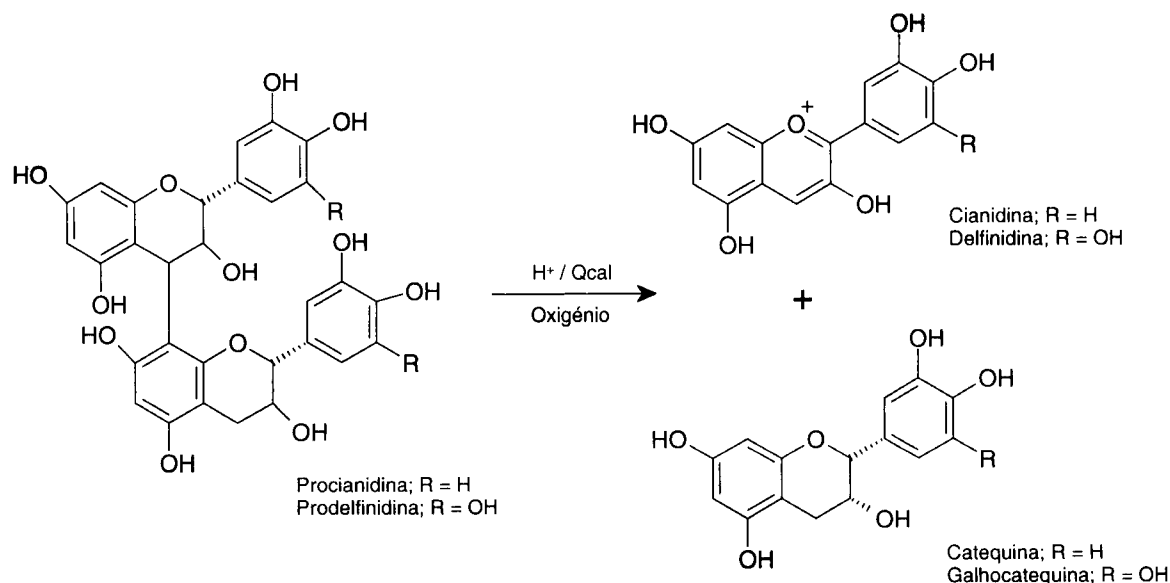


Figura 9. Reacção de decomposição das proantocianidinas (Bate-Smith 1954).

As proantocianidinas diméricas são convencionalmente classificadas de acordo com o seu tipo de ligação interflavanólica. Assim existem dois grupos de procianidinas diméricas A e B, utiliza-se ainda um subscrito numérico que caracteriza a hidroxilação do anel B (Schilling *et al.* 1973).

As procianidinas diméricas de tipo A possuem uma ligação do tipo C4-C8 acrescida de uma ligação éter entre o grupo hidroxilo do carbono 5 ou 7 do anel A de uma unidade e o carbono 2 do anel pirânico da outra unidade (Fig. 10) (Salagoity-Auguste *et al.* 1984).

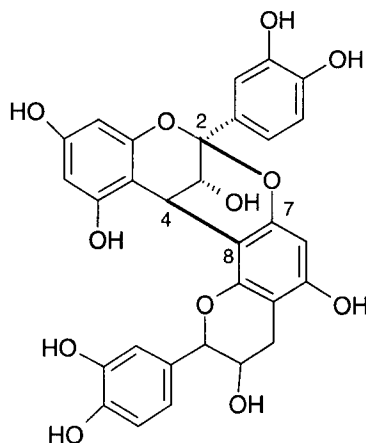
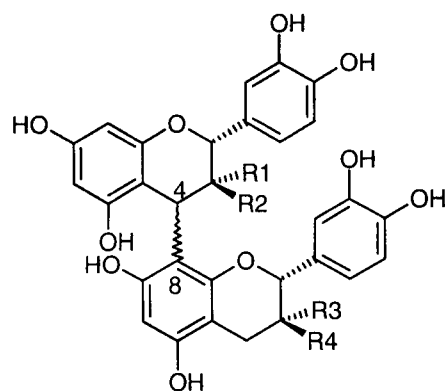


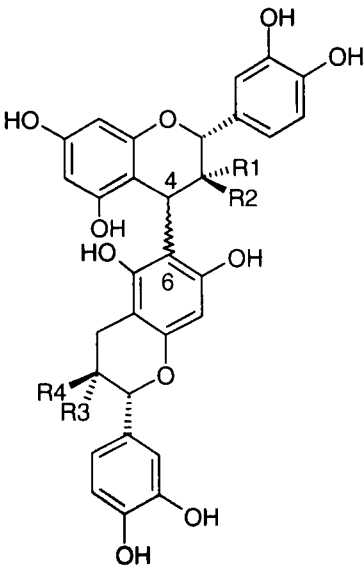
Figura 10. Procianidinas diméricas de tipo A. Procianidina A2 (C₄-C₈ e C₂-O₇).

As procianidinas diméricas de tipo B possuem apenas ligações interflavanólicas covalentes entre o carbono 4 de uma unidade flavan3-ol e o carbono 8 ou 6 da outra unidade. São ainda classificadas, numericamente, de acordo com a estereoquímica do carbono 3 do anel C de cada uma das unidades (Fig. 11).

Dímeros C4-C8



Dímeros C4-C6



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Dímeros C ₄ -C ₈	Dímeros C ₄ -C ₆
OH	H	H	OH	B ₁	B ₅
OH	H	OH	H	B ₂	B ₆
H	OH	H	OH	B ₃	B ₇
H	OH	OH	H	B ₄	B ₈

Figura 11. Procianidinas diméricas de tipo B.

As procianidinas triméricas são também divididas de acordo com o tipo de ligação interflavanólica em procianidinas de tipo C (Fig. 12) e D que possuem respectivamente duas ligações interflavanólicas de tipo B ou uma de tipo B e outra de tipo C.

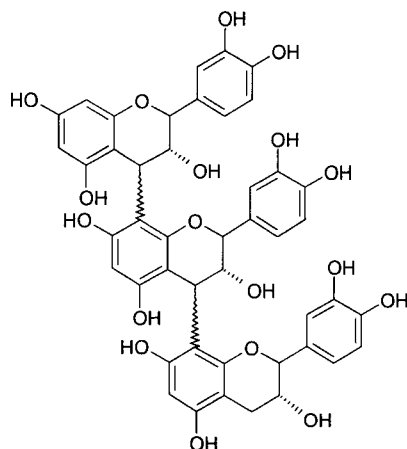


Figura 12. Procianidinas triméricas. Trímero C1 epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina.

Para além das estruturas monoméricas, diméricas e triméricas existem formas mais polimerizadas de proantocianidinas; os oligómeros que apresentam até 6 unidades de monómeros e os polímeros compostos por mais de 6 monómeros. Em ambos podem existir ligações de tipo C4-C8 e C4-C6 que permitem a formação de um número ilimitado de isómeros (Fig. 13) (Haslam 1998).

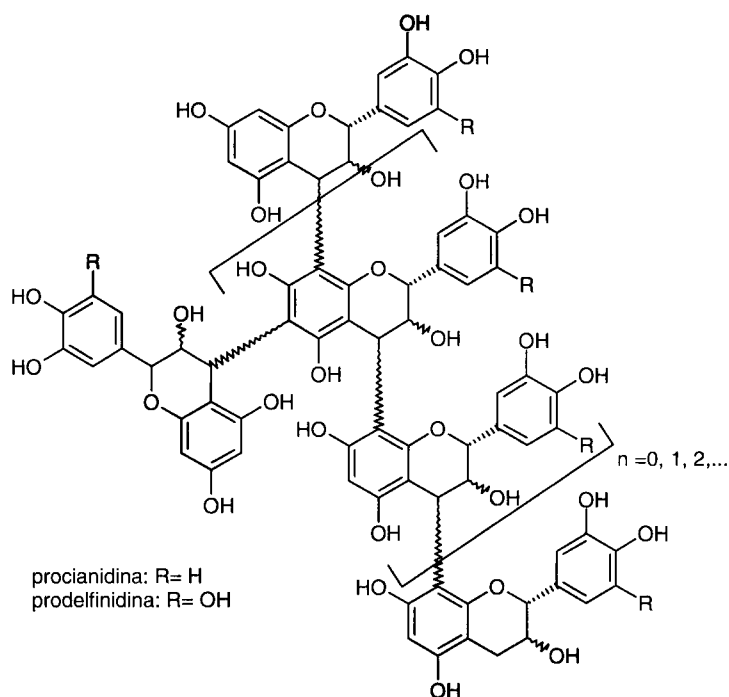


Figura 13. Estrutura geral de oligómeros e polímeros de proantocianidinas.

2. Distribuição de compostos polifenólicos na natureza e em alimentos.

A distribuição de compostos polifenólicos na alimentação humana tem vindo a ser estudada de forma a verificar se os efeitos farmacológicos detectado *in vitro* podem ocorrer em sistemas biológicos. Apesar dos compostos fenólicos serem estruturalmente muito diversos e distribuídos por um número alargado de espécies vegetais, os elementos deste grupo presentes em quantidade significativa na dieta humana não são muito variados. As principais fontes de polifenóis a dieta humana são alimentos vegetais (cereais, frutas e legumes) e os seus derivados (sumo, vinho, cerveja e chá).

O processamento alimentar pode alterar bastante a composição polifenólica de um produto final diminuindo ou aumentando o teor total de compostos fenólicos ou alterando a composição qualitativa. Por exemplo a maçã possui um conteúdo relativamente elevado de quercetina (1 mg g^{-1} peso fresco) totalmente presente na casca, o fruto descascado não possui qualquer outro flavonol (Burda *et al.* 1990); por outro lado a prensagem usada para produzir alguns sumos de maçã pode aumentar bastante o conteúdo fenólico por extracção de fenóis, por exemplo floridzina, das grainhas (Spanos *et al.* 1992). A determinação consensual do conteúdo de polifenóis na dieta humana ainda não foi conseguida, principalmente, por duas razões:

- Variabilidade nas técnicas analíticas (Tabela 1): a determinação de compostos fenólicos é geralmente efectuada por cromatografia recorrendo a padrões de compostos puros ou por ensaios colorimétricos como o método de Folin-Ciocalteu. A determinação cromatográfica é limitada pela disponibilidade de padrões, indisponíveis para produtos de oxidação e formas altamente polimerizadas, e pelos limites de detecção da técnica que quantifica cada composto individualmente (Santos-Buelga *et al.* 2000). Os métodos colorimétricos são afectados pela presença de outros agente redutores, como ácido ascórbico e antioxidantes exógenos que podem originar erros por excesso. Este composto chega a representar 40 % do teor total de compostos redutores em alguns legumes. (Souci *et al.* 1986).
- Variabilidade na dieta humana: sabendo que os compostos fenólicos estão presentes em frutos e legumes o seu consumo ao longo do ano depende

muito da disponibilidade de frutos frescos. Assim o consumo polifenólicos varia ao longo do ano e de acordo com a distribuição geográfica. As preferências pessoais são ainda outro facto que afecta a quantidade e tipo de polifenóis consumidos; por exemplo na Holanda realizou-se um estudo comparativo em que se verificou que o consumo de quercetina variava entre 3 e 34 mg /dia (Hertog *et al.* 1993).

Mesmo com estas limitações é possível traçar algumas generalidades sobre o consumo de polifenóis. A sua principal fonte na dieta humana são as frutas e bebidas: sumo, chá, vinho tinto, cerveja e café; exceptuando na Ásia onde a maior parte do consumo se dá a partir de soja e produtos derivado (molho de soja, tofu, etc) (Kirk *et al.* 1999). O consumo diário total é cerca de 1 g / dia quando é realizada uma dieta equilibrada, incluindo legumes frescos e frutos. Deste valor 1/3 é composto por ácido fenólicos e 2/3 são flavonóides; esta estimativa pode variar sobretudo graças ao consumo de café que aumenta o teor de ácido fenólicos na dieta (Scalbert *et al.* 2000). Os flavonóides consumidos em maior extensão são as proantocianidinas (distribuição generalizada) e as antocianinas (principalmente em frutos vermelhos) (Rasmussen *et al.* 2005). No âmbito do presente trabalho é relevante abordar a distribuição quer de taninos condensados, quer de taninos hidrolisáveis.

Tabela 1. Teores polifenólicos totais de alimentos comuns determinados por cromatografia e por colorimetria após reacção de Folin (Scalbert *et al.* 2000).

Alimento, quantidade		Fenóis totais	
		Cromatografia	Reacção de Folin Ciocalteu ^a
Vegetais			
	Batata, 200 g	28	57
	Tomate, 100 g	8	37
	Alface, 100 g	9	23
	Cebola, 20 g	7	18
	Maça, 200 g	239	440
Bebidas			
	Sumo de laranja, 100 mL	22	75
	Vinho tinto, 125 mL	97	225
	Café, 200 mL	150	179
	Chá preto, 200 mL	138	200
Outros alimentos			
	Chocolate preto, 20 g	102	168

a) índice não unitário de Folin expresso com base em padrões de catequina ou ácido gálico.

2.1. Distribuição de taninos hidrolisáveis nos alimentos.

Os taninos hidrolisáveis estão presentes em reduzida quantidade em alimentos. Os ácidos gálico e elágico são pouco abundantes em legumes e nas partes comestíveis de plantas de fruto. Geralmente nenhum dos dois existe sob a forma livre mas formando taninos gálicos e elágicos. Em algumas plantas como *Punicum granatum* (romã) são abundantes nas partes não comestíveis do fruto no entanto o processamento, nomeadamente a prensagem, pode levar ao seu aparecimento em sumos (Clifford *et al.* 2000).

Um estudo realizado com as partes comestíveis de diversos frutos permitiu concluir que apenas em morangos, framboesas e mirtilos existiam taninos elágicos detectáveis por HPLC-UV. Ainda assim as quantidades detectadas neste e em outros estudos estão entre 0,5 e 10 mg / g de fruto fresco (Daniel *et al.* 1989). O chá é uma bebida particularmente rica em flavanóis que também contêm alguns taninos gálicos e elágicos. Em folhas de chá, chá verde e chá oolong comercial foram já identificados

os taninos gállicos (1-O-galoil- β -D-glucose e 1,4,6-tri-O-galoil- β -D-glucose e um tanino elágico 1-O-galoil-4,6-(S)-hexahidroxidifenil- β -D-glucose) (Nonaka *et al.* 1984).

A determinação da ingestão diária média de taninos hidrolisáveis é bastante difícil sobretudo devido a diferenças nos padrões alimentares. Ainda assim apresenta-se em seguida a estimativa para países do sul da Europa proposta por Clifford e Scalbert (Clifford *et al.* 2000):

A ingestão a partir de vinhos é residual já que a quantidade de taninos elágicos em uvas é muito reduzida e a maioria do vinho não é envelhecido em madeira de carvalho nova na qual existe um teor elevado de taninos elágicos. Assim, a ingestão é sobretudo de frutos vermelhos em particular de morangos. Assumindo um consumo de 1,7 kg por ano (para a população francesa) e um consumo idêntico de produtos derivado de morango, a quantidade de taninos hidrolisáveis ingerido é apenas de 0,4 mg por dia de ácido elágico, não se sabendo que percentagem deste se encontra sobre a forma de taninos elágicos. Este valor é residual quando comparado com o teor diário de flavonóides, em particular flavanóis.

2.2. Distribuição de taninos condensados (proantocianidinas) nos alimentos.

Como foi referido a quantidade de proantocianidinas ingeridas corresponde a mais de metade do total de compostos polifenólicos ingeridos diariamente. Esta ingestão deve-se à sua grande abundância em vegetais mas sobretudo à sua distribuição alargada quer em legumes quer em frutas (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição e grau de polimerização de proantocianidinas em alimentos. (Gu *et al.* 2004).

Alimento	Grau de polimerização											Total	Tipo ^a
	1	2	3	4-6	7-10	>10							
	(mg/100 g peso fresco de alimentos ou mg/L bebidas)												
Mirtilo	4,0 ± 1,5	7,2 ± 1,8	5,4 ± 1,2	19,6 ± 3,4	14,5 ± 2	129,0 ± 47,3	179,8 ± 50,8	PC					
Groselha	0,9 ± 0,2	2,9 ± 0,4	3,0 ± 0,3	10,6 ± 1,7	9,9 ± 1,4	122,4 ± 28	147,8 ± 33	PC, PD					
Arando	7,3 ± 1,5	25,9 ± 6,1	18,9 ± 3,4	70,3 ± 13,1	62,9 ± 14,7	233,5 ± 49,1	418,8 ± 75,3	A, PC					
Morango	4,2 ± 0,7	6,5 ± 1,3	6,5 ± 1,2	28,1 ± 6,5	23,9 ± 3,5	75,8 ± 13,4	145,0 ± 24,9	PP, PC					
Maça ^b	9,6 ± 0,9	13,8 ± 0,6	9,3 ± 0,4	30,2 ± 1,2	25,4 ± 1,2	37,6 ± 2,6	125,8 ± 6,8	PC					
Sumo de Maça ^b	1 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	4 ± 0	1 ± 0	± ND	9 ± 0	PC					
Pêra	2,7 ± 1,5	2,8 ± 1,3	2,3 ± 0,9	6,5 ± 1,9	4,6 ± 1	13,1 ± 11,3	31,9 ± 7,8	PC					
Ameixa	11,4 ± 3,4	31,5 ± 7,4	23,9 ± 5,1	58,0 ± 12,5	33,8 ± 11,9	57,3 ± 24,4	215,9 ± 50,7	A, PC					
Pêssego	4,7 ± 1,4	7,0 ± 2,2	5,0 ± 1,4	17,7 ± 5,5	10,9 ± 3,7	22,0 ± 7,7	67,3 ± 20,9	PC					
Abacate	1,0 ± 0,8	1,5 ± 0,8	1,4 ± 0,4	3,2 ± 0,8	0,4 ± 0,7	± ND	7,4 ± 4,3	A, PC					
Sorgo	27,8 ± 1,2	78,2 ± 3,4	99,2 ± 7,7	585,5 ± 50	734,3 ± 69,3	2440,4 ± 271	3965,4 ± 402,5	PC					
Cevada	11,0 ± 0,3	21,4 ± 1,1	14,6 ± 1	27,2 ± 0,6	± ND	± ND	74,2 ± 3	PC					
Avelã	9,8 ± 1,6	12,5 ± 3,8	13,6 ± 3,9	67,7 ± 20,3	74,6 ± 21,9	322,4 ± 102,5	500,7 ± 152	PC, PD					
Pistachio	10,9 ± 4,3	13,3 ± 1,8	10,5 ± 1,2	42,2 ± 5,2	37,9 ± 4,9	122,5 ± 37,1	237,3 ± 52	PC, PD					
Amendoa	7,8 ± 0,9	9,5 ± 1,6	8,8 ± 1,7	40,0 ± 8,5	37,7 ± 8,4	80,3 ± 28,1	184,0 ± 48,2	PP, PC					
Noz	6,9 ± 3,4	5,6 ± 0,9	7,2 ± 1,2	22,1 ± 3,3	5,4 ± 0,8	20,0 ± 9,3	67,3 ± 14,7	PC					
Amendoin	5,1 ± 1	4,1 ± 0,7	3,7 ± 0,5	2,8 ± 0,2	± ND	± ND	15,6 ± 2,3	A, PC					
Manteiga de Amendoim	2,0 ± 0,9	3,0 ± 0,7	8,1 ± 3,5	± ND	± ND	± ND	13,2 ± 5,2	A, PC					
Chocolate Preto	31,4 ± 0,2	31,2 ± 0,9	21,1 ± 0,8	55,5 ± 3,5	38,5 ± 3	68,2 ± 8,8	246,0 ± 0,3	PC					
Chocolate de Leite	26,9 ± 3	26,2 ± 2,5	19,3 ± 2,6	51,4 ± 9,8	35,3 ± 7,2	32,8 ± 9,2	192,0 ± 28,8	PC					
Cerveja	4 ± 0	11 ± 1	3 ± 0	4 ± 0	± ND	± ND	23 ± 2	PC, PD					
Vinho Tinto	20 ± 1	40 ± 1	27 ± 1	67 ± 2	50 ± 1	110 ± 2	313 ± 5	PC, PD					
Sumo de Uva	18 ± 0	34 ± 0	19 ± 0	80 ± 0	69 ± 0	303 ± 2	524 ± 2	PC, PD					
Grainha de Uva (seca)	660,3 ± 8,3	417,3 ± 4,8	290,2 ± 4,5	664,0 ± 8,2	400,3 ± 31,3	1100,1 ± 86,3	3532,3 ± 105,8	PC					

a) tipo: PP-propelargonidinas; PC-procianidinas; PD- prodelfinidina; A-polímeros com ligação de tipo A

b) Maça Red Delicious com casca; Sumo de maça Red Delicious sem casca

Esta ingestão faz supor que os efeitos benéficos do consumo de polifenóis se devem, pelo menos em parte, à presença de proantocianidinas. As proantocianidinas encontradas de alimentos apresentam uma gama alargada de graus de polimerização e pertencem aos grupos das procianidinas e das prodelfinidinas.

Como se observa da tabela 2 (Gu *et al.* 2004) de um modo geral a concentração de proantocianidinas nos alimentos aumenta com o seu grau de polimerização. No entanto, estudos recentes apontam para uma maior absorção dos compostos com um grau de polimerização inferior a 3, indicado que serão estes os que apresentam maior actividade intraplasmática. (Deprez *et al.* 2001).

A metabolização das formas polimerizadas a formas mais simples, absorvíveis, ainda não foi inequivocamente provada. Existem estudos que apontam para a decomposição de procianidinas de chocolate em ambiente gástrico simulado (Spencer *et al.* 2000). Por outro lado, existem estudos que referem a estabilidade *in vivo* (em rato) de procianidinas diméricas e oligoméricas não estando disponíveis para absorção (Donovan *et al.* 2002; Gonthier *et al.* 2003).

Caso esta a degradação em estruturas monoméricas não ocorra as proantocianidinas permanecerão no estômago e intestino durante períodos alargados de tempo. A presença em grande quantidade e por algum tempo no tubo digestivo conjugada com a sua capacidade para complexar com proteínas faz destes compostos potenciais inibidores de enzimas digestivas.

3. Interação entre Polifenóis e Proteínas.

Na origem do nome tanino dado a alguns compostos fenólicos está a sua capacidade de, para além das reacções normais das moléculas fenólicas, interagirem com proteínas (Haslam *et al.* 1988). A interação polifenol-proteína tem vindo a ser largamente estudada. Os modelos utilizados reflectem as aplicações e relevância biológica de polifenóis. Para investigadores da área da transformação de peles, o colagénio e a gelatina são bons modelos da transformação de pele animal em couro, para estudos na área médica é comum serem utilizadas as proteínas ricas em prolina (Luck *et al.* 1994) ou a albumina sérica bovina (Carvalho *et al.* 2004). Não existe um modelo amplamente aceite para a indústria alimentar como tal abordaremos os resultados obtidos com outros modelos extrapolando para o que ocorre nos alimentares.

Por análise da diversidade estrutural dos compostos fenólicos e das proteínas constata-se que existem vários tipos de ligações que se podem estabelecer entre ambos e que podem justificar a formação de complexos proteína-polifenol. Estas interações são as hidrofóbicas, as pontes de hidrogénio, as ligações iónicas e as covalentes. De entre estas as duas primeiras são as mais importantes e por essa razão têm sido as mais estudadas.

Ligações hidrofóbicas

A ligação de taninos a proteínas como a gelatina apresenta características interessantes como a fixação de quantidades elevadas de tanino por unidade de massa de proteína. Esta propriedade parece estar relacionada com quantidade de resíduos de aminoácidos apolares da gelatina que compõem cerca de 50 % do seu conteúdo total de aminoácidos (Singleton *et al.* 1965).

Verificou-se que os detergentes e alguns solventes orgânicos podem diminuir parcialmente a formação de agregados entre taninos e gelatina (Goldstein *et al.* 1965). De particular importância são os detergentes não-iónicos como o Tween 80 que apresenta um carácter hidrofóbico elevado e que, para além de dissociar facilmente complexos entre polifenol e proteína, tem ainda a capacidade para estabelecer

associações hidrofóbicas com proteínas substituindo as moléculas polifenólicas nos agregados (Oh 1978).

Também foi verificada a associação entre compostos polifenólicos com polietilenoglicol (PEG). Este composto de carácter totalmente aprotéico apresenta à sua superfície vários grupos metileno que parecem ser responsáveis pela interacção com as moléculas de tanino (Metche *et al.* 1980).

Pontes de hidrogénio

As ligações por pontes de hidrogénio foram sugeridas como responsáveis pela reversibilidade da complexação polifenol-proteína que se verifica após a adição de ureia e cafeína (Mejbaum-Katzenellenbogen *et al.* 1959).

Outros estudos sobre a reversibilidade da interacção entre polifenol e proteína utilizando proantocianidinas mostraram a relevância das ligações de hidrogénio (Loomis 1974; Van Sumere *et al.* 1975). Estas ligações poder-se-ão estabelecer entre os átomos de hidrogénio dos grupos hidroxilo dos anéis fenólicos e os grupos carbonilo das ligações peptídicas e ainda entre os oxigénio dos referidos grupos hidroxilo e os grupos amina das ligações peptídicas. Poderão ainda estabelecer-se ligações de hidrogénio com as cadeias laterais de alguns aminoácidos polares.

Considerando estes dois tipos de interacção ainda subsiste a dúvida acerca da natureza exacta da interacção entre compostos polifenólicos e proteínas. No entanto, para a maioria dos taninos, nomeadamente para os de maior peso molecular, as interacções hidrofóbicas parecem ser determinantes. Supõe-se que a interacção é efectuada principalmente pelo emparelhamento dos anéis polifenólicos em estruturas planares de proteínas, esta interacção é reforçada pela sua cooperatividade e pelas ligações de hidrogénio (Charlton *et al.* 2002).

Foram efectuados estudos usando várias metodologias para avaliar a interacção entre proteínas e polifenóis (Hagerman *et al.* 1981; Haslam *et al.* 1988; Makkar *et al.*

1995; Siebert *et al.* 1998; Charlton *et al.* 2002; Carvalho *et al.* 2004). Com base nos resultados destes estudos confirmou-se um modelo anteriormente proposto para a interação (Haslam *et al.* 1988), apresentado na figura 14.

A baixas concentrações de proteína 14A existirá um grande excesso de tanino. Cada molécula polifenólica poderá associar-se em pontos distintos da proteína criando uma camada exterior com menor hidrofiliicidade do que a proteína forçando esta a sair de solução e precipitar.

No caso de se verificarem concentrações mais elevadas de proteína 14B existe a possibilidade de os polifenóis actuarem como ponte entre moléculas proteicas levando à formação de micelas (agregados) que poderão na parte externa ficar cobertas de moléculas polifenólicas levando à sua precipitação.

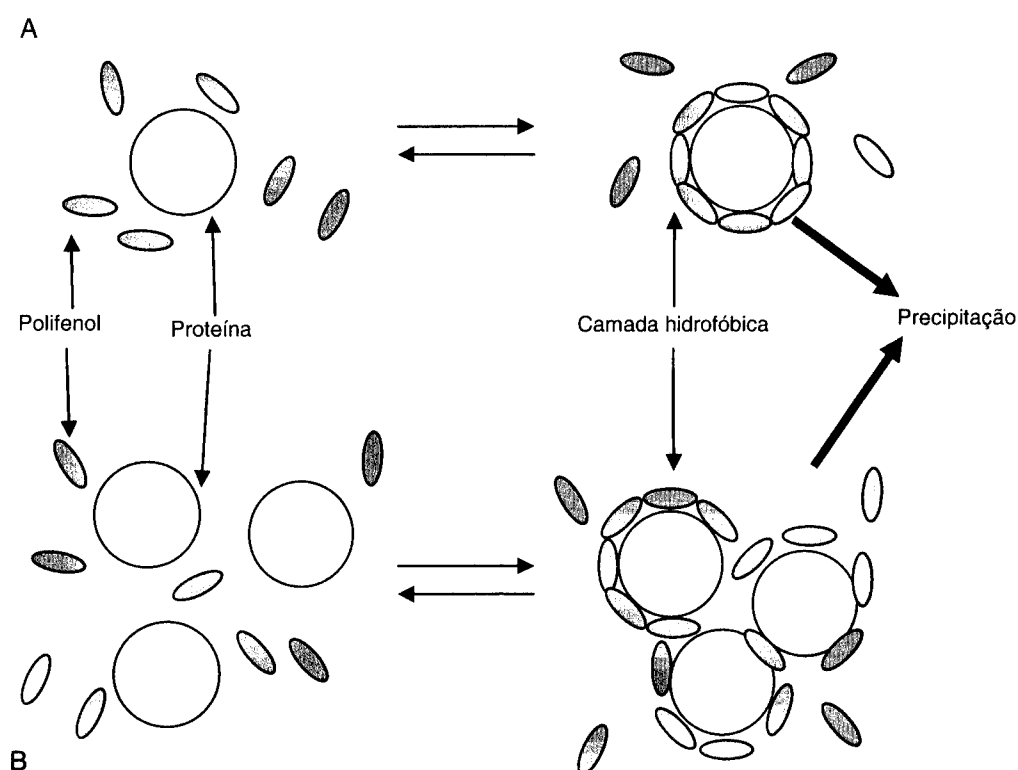


Figura 14. Mecanismo de formação de agregados polifenol-proteína. A baixas concentrações de proteína A e a altas concentrações de proteína B. Adaptado de Haslam (Haslam *et al.* 1988).

Os estudos de interacção polifenol-proteína não têm sido suficientes para explicar as razões para a ocorrência destas interacções mas têm permitido avaliar o efeito na interacção de alguns dos factores estruturais e do meio.

3.1. Efeito da estrutura da proteína.

A dimensão da proteína é um factor importante da interacção entre polifenóis e proteínas. Proteínas e péptidos naturais e de síntese com pesos moleculares inferiores a 20 000, exceptuando histatinas, têm pouca afinidade para complexar com procianidinas (Hagerman *et al.* 1981; Yan *et al.* 1995). A presença de alguns resíduos de aminoácidos como prolina, hidroxiprolina, arginina e histidina induz uma maior ligação entre proteína e polifenol. Para o caso de prolina a presença de um azoto como substituinte adjacente ao grupo carbonilo da ligação peptídica permite a este formar ligações de hidrogénio mais fortes por aumento do seu carácter nucleofílico (Hagerman *et al.* 1981). Assim se justifica a maior afinidade de proteínas com maior conteúdo em prolina (PRPs) para com procianidinas de uva do que proteínas globulares com reduzido teor em prolina (BSA) (Carvalho *et al.* 2004). Foi também verificado que as proteínas de pequena dimensão histatinas, ricas em histidina, possuem elevada capacidade para interagir com ácido tânico e taninos condensados (Yan *et al.* 1995). Para o caso de histidina um aumento da capacidade para formar pontes de hidrogénio não parece ser o mais relevante; o carácter apolar destes resíduos é apontado como causa para a sua elevada capacidade para complexar com procianidinas (Burley *et al.* 1988).

A rigidez estrutural da proteína está inversamente relacionada com a sua capacidade para formar complexos com moléculas de procianidinas. Assim, proteínas com estrutura terciária em hélice tripla ou em “random coil” apresentam uma afinidade superior para polifenóis (Hagerman *et al.* 1981). A flexibilidade estrutural permitirá a uma proteína estabelecer maior número de ligações com polifenóis já que os resíduos apolares tornam-se mais acessíveis para estabelecer ligações hidrofóbicas com os anéis dos polifenóis (de Freitas *et al.* 2001)

3.2. Efeito da estrutura do tanino.

Geralmente a capacidade de taninos condensados para formar agregados com proteínas aumenta com o seu aumento de peso molecular para valores até 3000 Da. O aumento do peso molecular leva a um aumento do carácter apolar (aumento de anéis aromático) facilitando as interacções hidrofóbicas com as proteínas. Simultaneamente este aumento do número de unidades monoméricas permite um aumento do número total de grupos hidroxilo. O aumento de peso molecular não é, por si só, suficiente para que ocorra um aumento da interacção entre proteínas e compostos polifenólicos. Para polímeros de (-)-epicatequina a rigidez estrutural da ligação interflavanólica leva a que o aumento da formação de agregados seja inferior do que para polímeros de (+)-catequina. Assim conclui-se que a flexibilidade estrutural das unidades monoméricas das proantocianidinas é necessária para que ocorra a sua interacção com as proteínas (de Freitas *et al.* 2001).

Para polifenóis de baixo peso molecular a interacção restringe-se a uma pequena superfície da proteína não permitindo baixar a sua solubilidade de forma significativa (Baxter *et al.* 1997). A presença de grupos galhato nas moléculas de proantocianidinas também potencia a interacção com proteínas, pensa-se que esta acção se deve a um aumento do número de grupos hidroxilo disponíveis no polifenol para estabelecer pontes de hidrogénio com os grupos carbonilo da proteína (de Freitas *et al.* 2001).

3.3. Efeito do pH.

Para proantocianidinas, o aumento de pH até 8 não afecta a interacção (Sumere 1975), acima deste limite as procianidinas perdem poder tanante. De referir que as procianidinas são ácidos fracos com pKa acima de 8 (Vernhet *et al.* 1996) assim, a pH superior a 8 ocorrerá a perda de átomos de hidrogénio passando os polifenóis e as proteínas a ter cargas semelhantes, negativas impedindo a sua interacção.

A formação de complexos entre proteína e taninos é favorecida a pHs próximos do ponto isoeléctrico da proteína, a este pH a repulsão electrostática das moléculas proteicas é minimizada (Hoon-Il *et al.* 1987) e a formação de pontes de hidrogénio é

maximizada (Van Buren *et al.* 1969). Assim proteínas globulares ácidas como albumina sérica bovina têm maior afinidade para polifenóis a pH ácido e proteínas básicas como lisozima têm maior afinidade a pH básico (Hagerman *et al.* 1978).

3.4. Efeito da Força Iônica.

A relação da capacidade de interacção com a força iónica está ainda por provar. Existem neste momento resultados controversos acerca deste tema. Com taninos condensados interagindo com BSA verificou-se que entre forças iónicas de 0,05 e 5 M não há variação da interacção (Hagerman *et al.* 1978). Outros autores nas mesmas condições demonstraram que a pH 3 o aumento da concentração de sais leva a um aumento da turbidez (medida da formação de agregados), a pH 4 não há efeito do aumento da força iónica e a pH 5 ou superiores ocorre uma diminuição da turbidez (Oh *et al.* 1987). Os estudos mais recentes demonstram que a pH 7 ocorre um aumento da turbidez quando se usam procianidinas de uva e se avalia o efeito sobre a interacção com Albumina Sérica Bovina (de Freitas *et al.* 2001). Uma possível explicação para este facto é a adsorção de iões cloreto à superfície do polifenol; dado que as procianidinas apresentam carga positiva ou neutra a pH neutro a adsorção de aniões diminui o seu carácter hidrofóbico que parece ser essencial para a formação de complexos com proteínas. Por outro lado, a adsorção de iões cloreto pode ocorrer após a interacção entre a procianidina e a proteína; neste caso poderá ser responsável pela solubilização deste por aumento do seu carácter hidrofílico.

4. Efeitos de compostos fenólicos sobre enzimas digestivas.

As propriedades antinutricionais de polifenóis são uma das características menos estudadas destas moléculas. Os estudos efectuados até ao momento que relacionem, em humanos, a ingestão de polifenóis com efeitos adversos na digestão ou absorção de nutrientes são escassos.

Com base em dados nutricionais em ciências veterinárias é possível admitir que estes efeitos existem. A alimentação de ruminantes com vegetação rica em procianidinas apresenta algumas desvantagens para a produção de gado, diminui a quantidade de alimento ingerida por diminuição da palatibilidade, diminui o valor nutritivo de outros componentes da dieta nomeadamente cereais, diminui o ganho de peso e produtividade de leite em bovinos (McNabb *et al.* 1993; Makkar 2003; Mueller-Harvey 2006). Estudos efectuados em ratos indicam que polifenóis de soja, de feijão e de favas aumentam a percentagem de aminoácidos ingeridos que são eliminados nas fezes indicando diminuição da digestibilidade da dieta ingerida (Gilani *et al.* 2003). Também são referidas perdas na digestibilidade de parede celular por parte de bactérias no estômago de ruminantes, pensa-se que os polifenóis complexam com as enzimas microbianas secretadas pelas bactérias endógenas inibindo-as ou, em alternativa, ligam-se aos carboidratos da parede celular das plantas ingeridas diminuindo a sua digestão (Reed 1995).

4.1. Acção sobre Glicosidasas.

A inibição de glicosidasas por polifenóis tem vindo a ser extensamente relatada e o interesse nesta acção está sobretudo relacionado com seu o potencial para controlar a diabetes. Sabe-se que, usando α -glucosidase solubilizada (a forma intestinal está ligada à membrana luminal das vilosidade), é possível detectar inibição da enzima com extractos de antocianinas aciladas de variados frutos e tubérculos. Foram identificados compostos com actividade inibitória em *Pharbitis nil*, *Ipomoea batatas* (Matsui *et al.* 2001), *Alstonia scholaris* (Jong-Anurakkun *et al.* 2007), *Piper longum* (Pullela *et al.* 2006), *Tournefortia hartwegiana* (Ortiz-Andrade *et al.* 2007) *Pinus densiflora* (Kim *et al.* 2004). Estes resultados indicam que a ingestão de extractos de antocianinas poderá permitir controlar o índice glicémico pós-prandial.

Em estudos subsequentes os extractos com maior poder inibitório estudado foram fraccionados de modo a obter os compostos que efectivamente inibiam a enzima. Verificou-se que a capacidade de inibição decrescia na ordem pelargoidina > peonidina > cianidina. Observou-se ainda que a desacilação de antocianinas diminuía consideravelmente o seu poder inibitório para a α -glucosidase (Matsui *et al.* 2001).

Estudou-se ainda a possibilidade destas mesmas formas aciladas (diaciladas) de antocianinas de frutos serem suficientemente activas para reduzir o efeito hiperglicémico em ratos. Concluiu-se que a peonidina 3-O-[2-O-(6-O-E-feruloil- β -D-glucosil)-6-O-E-cafeoil- β -D-glucosil]-5-O- β -D-glucose de *Ipomoea batatas* cv. Ayamurasaki é um potente inibidor da degradação de maltose (glucose-glucose) e não de sacarose (glucose-frutose). À concentração de 100 mg Kg⁻¹ conseguiu inibir em 17 % o aumento da concentração de glucose no sangue após ingestão de maltose (2 g Kg⁻¹) (Matsui *et al.* 2002).

Num estudo mais recente usando antocianinas extraídas de morango comprovaram-se estes resultados com α -glucosidase e testou-se a α -amilase tendo-se verificado inibição com ambas as enzimas. As antocianinas são responsáveis pela maior parte da inibição de α -glucosidase mas são responsáveis por apenas 25 % da inibição observada para a amilase. A fracção fenólica não antocianica revelou um poder inibitório de α -amilase 3 vezes superior ao da fracção antocianica. Esta fracção foi analisada por LC-MS tendo-se verificado tratar-se de taninos elágicos (hidrolisáveis) dos quais se destacam Sanguina H6, Sanguina H10 e Lambertianina C e seus produtos de degradação (McDougall *et al.* 2005). Provou-se que, apesar de ambas as enzimas serem inibidas por compostos fenólicos de morango, a natureza estrutural dos inibidores é diferente para cada enzima. Estes resultados indicam que a interacção entre polifenóis e enzimas responsável pela inibição destas últimas apresenta especificidade contrariamente ao anteriormente assumido (McDougall *et al.* 2005).

4.2. Acção sobre Lipases.

A inibição por polifenóis de lipases tem vindo a ser alvo de estudo dado o interesse existente na sociedade actual em métodos naturais e simples para controlo da obesidade e deslipidemias. De entre os efeitos geralmente atribuídos aos polifenóis de chá estão as propriedades antiobesidade e hipocolesterolemicas (Koo *et al.* 2004).

A lipase pancreática, essencial para o metabolismo de lípidos na dieta é o alvo preferencial para a inibição da digestão/absorção de lípidos. A sua inactivação implica a diminuição ou paragem completa da absorção de lípidos no intestino (Nakai *et al.* 2005). Num estudo extensivo das propriedades inibitória de polifenóis de chá sobre a actividade de lipase pancreática foram estudados 54 polifenóis presentes em chá semi-fermentado (oolong). Foi comparada a concentração de composto que é necessária para a obtenção de uma redução de actividade de enzima de 50 %.

Verificou-se que de entre os polifenóis mais abundantes em extracto de chá, os mais activos na inibição de lipase são a epigalhocatequina-galhato (EGCG) e a galhocatequina-galhato (GCG). Verificou-se que para ambos os compostos os derivados digaloilados (epigalhocatequina 3,5 di-O-galhato e galhocatequina 3,5 di-O-galhato) eram ainda mais activos na inibição da lipase pancreática. Este padrão de aumento de inibição com a galoilação não foi consistente ao longo de toda a gama de polifenóis estudada. De facto taninos hidrolisáveis que possuem vários grupos galhato inibem a lipase pancreática em muito menor extensão.

Para além destes compostos fenólicos simples foram estudados compostos de maiores dimensões tendo-se verificado que oolongteanina 3-O-galato ($M_w = 942$) e oolonghomobisflavano A ($M_w = 929$) apresentam maior capacidade inibitória do que os polifenóis derivados de catequina presentes no chá. No mesmo trabalho foi efectuado um estudo que comparava o poder inibitório total de chá (oolong), de extracto de polifenóis poliméricos (EPPC) de chá e de EPPC tratado com tanase, de forma a gerar a despolimerização. Concluiu-se que existe uma clara relação entre o grau de polimerização dos polifenóis de chá e o seu poder inibitório. O EPPC tratado com tanase possuía um IC_{50} de $1,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto que o EPPC não tratado possui um IC_{50} de $0,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Nakai *et al.* 2005).

Num outro estudo foi testado o efeito de polifenóis de chá extraídos com acetato de etilo a partir de chá verde fresco. Verificou-se que este extracto composto maioritariamente por EGC e EGCG, inibia lipase pancreática em 34 % (a $0,05 \text{ g L}^{-1}$). (He *et al.* 2007).

Um extracto de grainhas de uva foi utilizado como inibidor de lipase pancreática e de lipoproteína lipase. Verificou-se que para a lipase pancreática 1 g L^{-1} de extracto de grainhas inibia a enzima a 80 % da sua actividade. Para a lipoproteína lipase esta mesma concentração só inibe a enzima em 30 % (Sanchez-Moreno *et al.* 2003). Neste trabalho não foi efectuada uma caracterização do extracto nem elucidada a relação da inibição com a composição em polifenóis daí que não se possa dizer com certeza a que classe de compostos polifenólicos se deve a inibição.

4.3. Acção sobre Proteases.

A inibição da digestão de proteínas pode ser benéfica para a saúde na medida em que diminui o valor calórico total de uma refeição e abranda a digestão da mesma levando a uma sensação de saciedade pela passagem do bolo alimentar através do tracto gastrointestinal (McDougall *et al.* 2005). O interesse para a saúde humana da inibição de proteases digestivas é menos claro do que para a inibição de lipases e glicosidases. A reserva de aminoácidos no homem é reduzida e uma diminuição na sua absorção pode provocar o catabolismo de proteínas internas (Reeds *et al.* 1994). Esta indefinição quanto ao interesse da inibição de proteases digestivas tem limitado o estudo nesta área. Ainda assim existem algumas evidências para a capacidade inibitória de polifenóis sobre proteases digestivas.

Foram realizados estudos com extractos de polifenóis de pêras, cacau e lentilhas tendo-se verificado que inibiam a tripsina. No entanto a sua composição fenólica não foi elucidada correctamente, supondo-se que teriam proantocianidinas ou taninos condensados (Quesada *et al.* 1996). Um grande número de estudos foram efectuados com polifenóis de várias fontes, em particular do chá, para testar a inibição de metaloproteases que actuam na fixação de tumores e na sua invasão de tecidos. Os resultados obtidos indicam existir inibição mas não foi ainda possível elucidar se esta se deve à actuação sobre as enzimas ou à quelatação de metais, cofactores destas enzimas (McDougall *et al.* 2005).

Uma enzima já estudada com alguma profundidade é a pepsina que actua no estômago clivando resíduos de aminoácidos de péptidos e proteínas, esta enzima é responsável pela hidrólise de 10 a 20 % da proteína total consumida (Insel *et al.* 2004). Usando uma solução de hemoglobina e um extracto de polifenóis simples de chá detectou-se uma inibição de 32 % da actividade de pepsina sobre a hemoglobina (He *et al.* 2007). No entanto, um outro estudo usando polifenóis simples (resveratrol, catequina, epigallocatequina-3-galato e quercetina) e bebidas (chá e vinho tinto) e três métodos de determinação diferentes mostrou existir um aumento de actividade de pepsina na presença de polifenóis (Tagliazucchi *et al.* 2005).

4.4. A protease pancreática tripsina.

A enzima tripsina (EC 3.4.21.4) é uma protease de serina presente no intestino delgado onde actua na degradação de proteínas clivando de forma específica a ligação peptídica entre aminoácidos de arginina e de lisina na extremidade carboxílica. Para além deste substrato natural a tripsina pode clivar substratos sintéticos como a N-Benzoil-L-Arginina Etil Ester (BAEE) e N-Benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) originando compostos corados que são utilizados na determinação da sua actividade (Fig. 15). Este último foi desenvolvido em 1961 (Erlanger *et al.* 1961) e tem sido usado para seguir várias reacções enzimáticas e não enzimáticas em que ocorre degradação de ligações éster.

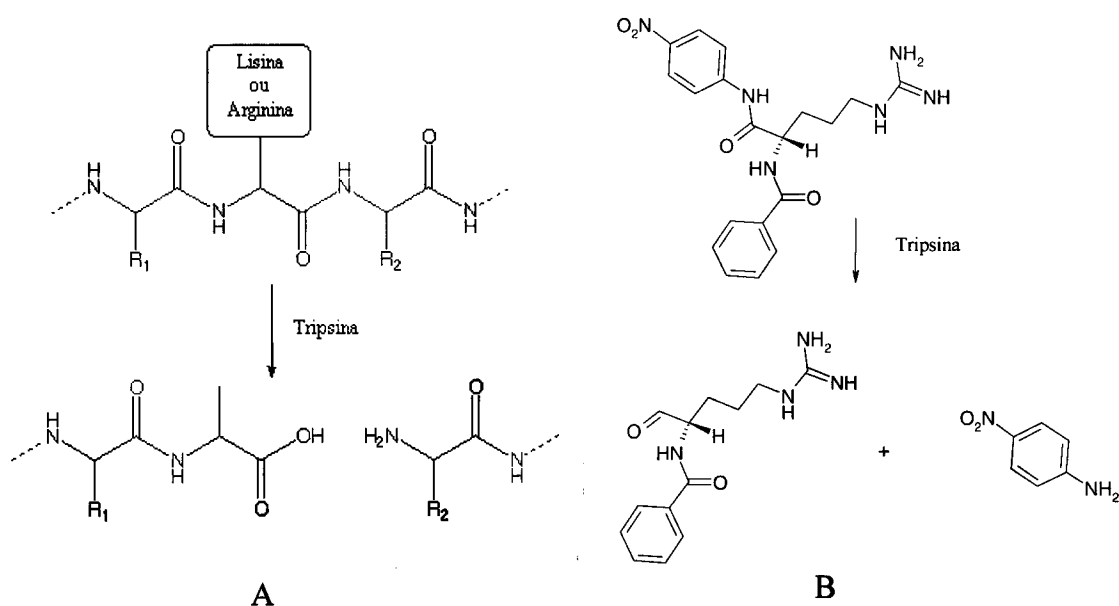


Figura 15. Clivagem de ligações peptídicas por tripsina num péptido natural (A) e num péptido sintético usado para quantificação da sua actividade, BAPNA (B).

No caso da tripsina foi já utilizado na pesquisa de actividade triptica (Volpicella *et al.* 2003; Mueller *et al.* 2007; Souza *et al.* 2007), para estudar as diferentes isoformas da enzima (Outzen *et al.* 1996; Oppert 2006) e na busca de inibidores da mesma (Novillo *et al.* 1997; Vaccari *et al.* 1998; Souza *et al.* 2007).

Para além da digestão de proteínas ingeridas a tripsina é responsável pela activação de outras enzimas digestivas envolvidas na degradação de outros nutrientes por clivagem de zimogéneos dando origem às formas activas (Neurath *et al.* 1976) num fenómeno em cascata.

Como todas as enzimas digestivas de mamíferos é activa à temperatura de 37°C. O seu pH óptimo situa-se entre 7 e 8 e é inactivada para pH inferior a 4.

A composição em aminoácidos de tripsina é conservada na maioria dos mamíferos. As tripsinas de porco, boi e rato são sequencialmente idênticas à humana em 78, 75 e 82 % respectivamente. A nível estrutural é uma proteína globular (Fig. 16) sendo que a tripsina de porco é, de entre as formas comercialmente disponíveis, a mais semelhante à humana com 222 aminoácidos iguais em 246 aminoácidos totais (Gaboriaud *et al.* 1996).

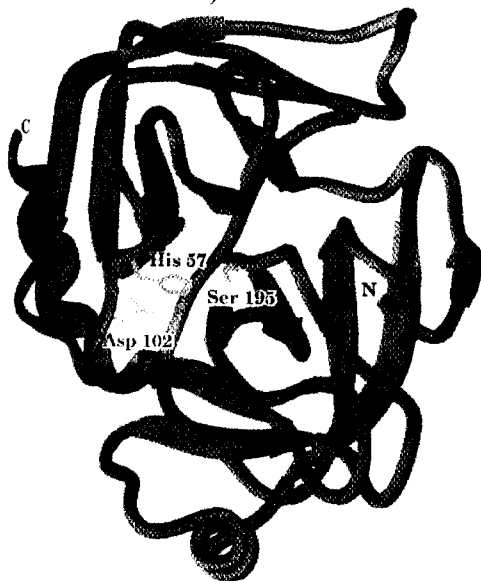


Figura 16. Representação estrutural da enzima tripsina com particular relevância para a tríade catalítica responsável pela actividade e especificidade da enzima adaptado de Gaboriaud (Gaboriaud *et al.* 1996).

Descrição do Trabalho

O trabalho realizado dividiu-se, quanto à execução experimental, em três fases distintas:

Iniciou-se o trabalho (Fase 1) adaptando um método colorimétrico de análise da actividade de tripsina com base na hidrólise de BApNA. Nesta fase testaram-se as condições de estabilidade e solubilidade do substrato, determinou-se qual a gama de concentrações de substrato e de enzima adequadas à realização dos ensaios de cinética enzimática e avaliou-se a interacção do substrato com os compostos fenólicos estudados.

Nas duas fases seguintes (2 e 3) foram efectuados os ensaios cinéticos para avaliar a actividade inibitória sobre tripsina de diferentes compostos fenólicos com diferentes origens utilizando o método desenvolvido na Fase 1 (Fig. 17).

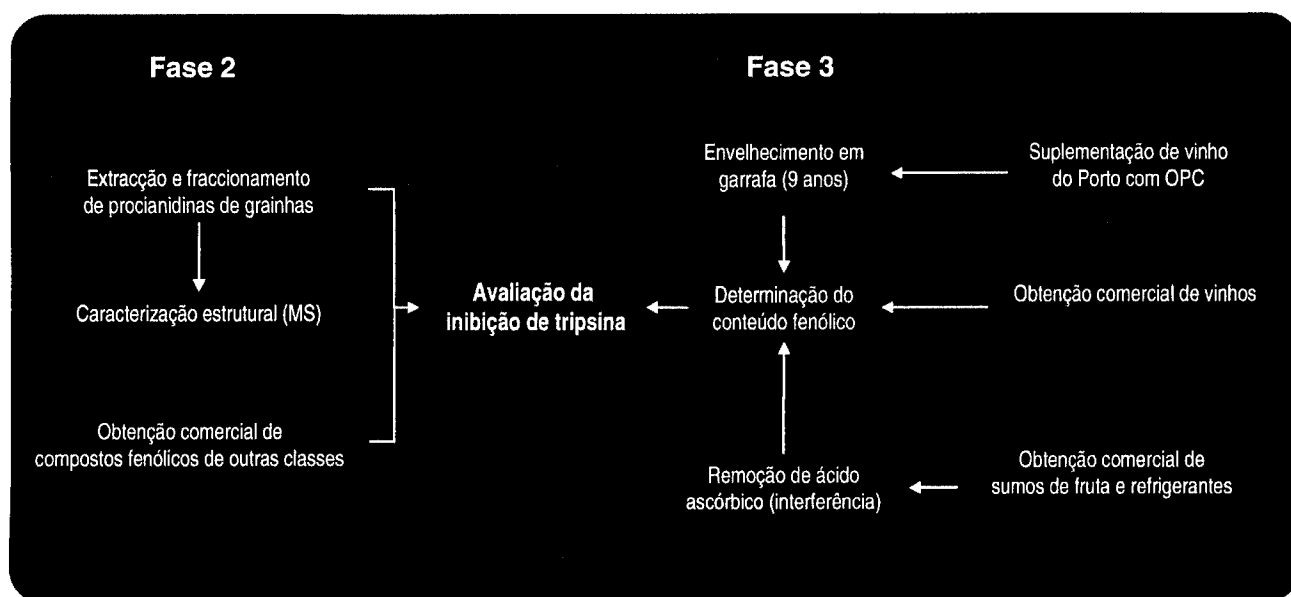


Figura 17. Execução experimental das Fases 2 e 3 do trabalho.

Material e Métodos

1. Reagentes

A protease digestiva tripsina (tipo IX-S de pâncreas de porco) e N-Benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) foram adquiridos à Sigma Aldrich e armazenados a -20 °C. A tripsina foi dissolvida a temperatura ambiente em tampão fosfato (50 mM) e congelada. O substrato BAPNA foi dissolvido em dimetilsulfóxido (44 g L⁻¹) para preparar uma solução stock que foi armazenada a 0°C. A solução de ensaio (2,5 g L⁻¹) foi preparada imediatamente antes de cada ensaio por diluição da solução stock com água desionizada e destilada.

2. Extração de procianidinas de grainhas de uva

As procianidinas oligoméricas foram extraídas de grainhas de uvas (*Vitis vinifera*) com uma solução de etanol/água/clorofórmio (1:1:2, v/v/v) usando um misturador (Ultra Turrax) de acordo com o procedimento descrito na literatura. (Darne *et al.* 1979). A fase hidroálcoolica superior, contendo as procianidinas, foi separada da fase orgânica contendo clorofilas, lípidos e outros compostos indesejáveis.

O etanol foi removido da fase hidroálcoolica a baixa pressão em evaporador rotativo (35°C). A solução aquosa resultante, contendo os compostos fenólicos, foi extraída com acetato de etilo seguido de precipitação com hexano de forma a obter as procianidinas oligoméricas (OPC) (Darne *et al.* 1979).

3. Fraccionamento de Procianidinas

O extracto de procianidinas de grainhas (OPC) obtido foi dividido em porções de cerca de 1 grama que foram fraccionadas por cromatografia líquida em coluna a baixa pressão. Cada porção foi dissolvida em 3 mL de metanol e aplicada numa coluna de gel TSK-Toyopearl HW 40(S) (Tosoh, Japão) (100 x 16 mm, *i.d.*). As amostras foram fraccionadas utilizando metanol e metanol acidificado com ácido acético como eluentes. Foi usado um fluxo controlado de 0,8 mL min⁻¹, segundo o método descrito na literatura (tabela 3) (de Freitas *et al.* 1998).

Tabela 3. Fraccionamento de procianidinas oligoméricas separadas por cromatografia líquida em coluna (gel Toyopearl TSK HW-40 S). Os tempos apresentados são cumulativos, assim a fracção IV foi recolhida entre as horas 1 e 5, logo, durante 4 horas.

	Tempo (h)	Solvente
Fracção I	0,5	Metanol
Fracção II	0,75	Metanol
Fracção III	1	Metanol
Fracção IV	5	Metanol
Fracção V	19	5 % CH ₃ COOH em Metanol
Fracção VI	27	10 % CH ₃ COOH em Metanol

As fracções V e VI foram diluídas em igual volume de água destilada sendo posteriormente evaporadas a vácuo num evaporador rotativo a 35°C de modo a remover o metanol utilizado na eluição.

As soluções resultantes foram passadas por um gel de C18 com um volume cinco vezes superior de água de forma a remover a totalidade do ácido acético presente. As procianidinas foram recolhidas num volume mínimo de metanol e seguiram um tratamento idêntico às restantes fracções (I a IV).

Todas as fracções foram concentradas em evaporador rotativo sob vácuo à temperatura de 35 °C, após adição de um pequeno volume de água destilada. Deste modo foi removido o metanol ficando as procianidinas em solução aquosa. Esta foi borbulhada com argon, congelada a -20°C e liofilizada.

4. Análise por espectrometria de massa

A composição de proantocianidinas nas fracções foi determinada por espectrometria de massa. Utilizou-se um equipamento de cromatografia líquida da série Hewlett-Packard 1100 com um detector de massas *Finnigan* LCQ (*Finnigan Corporation*, San Jose, California, USA), equipado com uma fonte API (*Atmospheric Pressure Ionization*) e uma interface ESI (*Electro Spray Ionization*), controlado informaticamente.

- Temperatura capilar: 270°C
- Voltagem capilar: 28 V
- Voltagem da fonte 4,5 Kw
- Gases auxiliar e de arrasto: azoto a fluxos de 6 e 1,2 mL min⁻¹ respectivamente
- Detecção: espectros obtidos em modo de ião negativo no intervalo m/z entre 150 e 2200 m/z, sendo o espectrómetro de massa programado para realizar três varrimentos: análise de massa total (MS), análise com zoom dos iões mais abundantes do primeiro varrimento (MS) e um varrimento MS-MS dos iões mais abundantes do segundo varrimento (MS³), com energia de colisão normalizada a 45%.

5. Ensaaios com Vinhos Comerciais e enriquecidos com Procianidinas

O vinho do Porto (*Vitis vinifera*, Touriga Nacional cv.) foi fornecido por Adriano Ramos Pinto, Vinhos S. A, possuía um teor alcoólico de 20 % v/v. A este vinho engarrafado foram adicionadas diferentes quantidades (0,5; 1,0; 2,0 g L⁻¹) de procianidinas oligoméricas extraídas de grainhas de uvas. Após a adição o vinho foi homogeneizado e armazenado em local fresco, seco e ao abrigo da luz durante 9 anos. Os restantes vinhos estudados são vinhos comerciais. O vinho de mesa tinto foi produzido a partir da colheita de 1993 pela empresa Adriano Ramos Pinto, Vinhos S. A.; possuía teor alcoólico de 12 % v/v. O vinho de mesa branco foi produzido pela empresa Sogrape Vinhos S. A; na vindima de 2005 e possuía um 9% v/v de álcool. O vinho do Porto comercial foi produzido pelo grupo Symington em 2003 e tinha um teor alcoólico de 21 % v/v.

6. Ensaaios com Sumos Comerciais

Os sumos comerciais utilizados foram adquiridos numa superfície comercial. Pretendeu-se que fossem representativos das bebidas consumidas pela população em geral e com uma composição variada (Tabela 4).

Tabela 4. Sumos utilizados nos ensaios de inibição enzimática e seu conteúdo em ácido ascórbico, indicado pelo produtor na Tabela Nutricional.

Nome comercial	Fabricante	Descrição	mg ácido ascórbico por 100 mL de sumo
Iced Tea Limão	Lipton, Unilever S A	Bebida refrigerante de extracto de chá com sumo de limão	—
Gatorade	Pepsi Corporation	Alimento complementar para desportistas (isotónica)	—
Compal Tutti-Frutti	Compal S A	Néctar de Tutti-Frutti à base de sumos concentrados	30
Compal Frutos-Vermelhos	Compal S A	Néctar de Frutos Vermelhos à base de concentrados	30
Compal Laranja	Compal S A	Néctar de Laranja à base de concentrado	30

7. Determinação de Fenóis Totais

O conteúdo de fenóis totais foi determinado utilizando o reagente de Folin Ciocalteus. Em meio alcalino, os fenóis reduzem a mistura de ácidos fosfotungstínicos e fosfomolibdicos em óxidos de tungstênio e de molibdênio, de cor azul.

Nas análises de sumos comerciais foi necessário remover o ácido ascórbico, uma das interferências relevantes para este método colorimétrico. Para tal acondicionou-se com água gel C18 num funil de vidro com uma placa porosa (G3), adaptado a um sistema de vácuo. Em seguida carregou-se 5 mL da amostra e passaram-se cerca de 500 mL de água desionizada para remover todo o ácido ascórbico a fracção fenólica foi recolhida com 50 mL de metanol. A fase orgânica foi depois evaporada em evaporador rotativo sob vácuo à temperatura de 35 °C, após adição de 5 mL de água destilada. Foi assim removido o solvente metanol ficando a fracção fenólica em solução aquosa.

A determinação dos fenóis totais dos vinhos e fracções fenólicas de sumo pelo reagente de Folin-Ciocalteu baseou-se no método descrito na literatura com algumas modificações (Kahkonen *et al.* 1999). As amostras de vinho foram inicialmente diluídas 10 vezes com água desionizada. 250 µL de vinho diluído foram misturados com 12,5 mL de água desionizada, 1,250 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 5 mL de carbonato de sódio (20 %). Após 30 minutos a temperatura ambiente para permitir a estabilização da cor a absorvância foi medida a 750 nm. Para as fracções fenólicas o procedimento foi idêntico exceptuando a diluição inicial.

De forma a estabelecer um valor padronizado para a concentração de compostos fenólicos foi traçada uma recta (Fig. 18) utilizando a catequina como padrão de concentração variando entre 0 e 1,2 g L⁻¹. Obteve-se uma equação de recta que foi usada para determinar a concentração de fenóis totais dos vinhos e sumos.

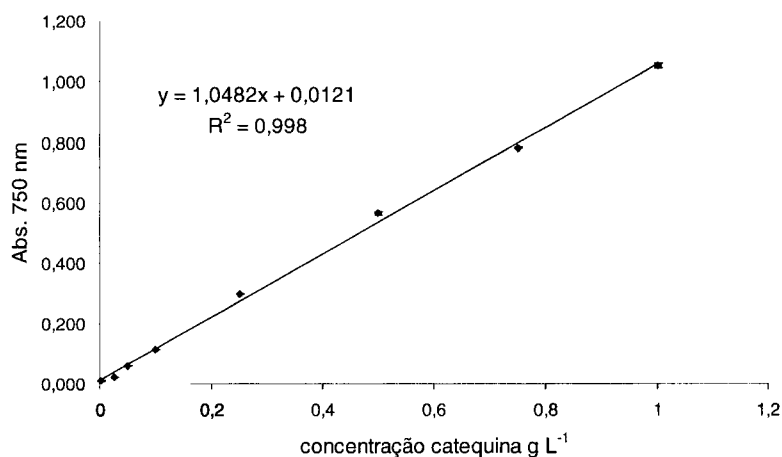


Figura 18. Recta padrão para o método de Folin-Ciocalteu.

8. Ensaio de Actividade Enzimática

A actividade de tripsina foi testada à temperatura fisiológica de 37 °C utilizando N-benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) como substrato. (Erlanger *et al.* 1961) Por acção da tripsina este substrato é degradado libertando *p*-nitroanilida, detectável espectrofotometricamente a 410 nm.

Em cada poço de uma placa de 96 poços foram misturados 20 µL de solução de ensaio de BAPNA (2,2 g L⁻¹) com diferentes volumes de amostra (compostos fenólicos comerciais, fracções de procianidina ou amostras de vinho e sumos). A reacção foi seguida durante 3 minutos antes da adição de 20 µL de tripsina (1 g L⁻¹ em tampão fosfato, pH 7,5 50 mM). O volume final na placa foi de 280 µL por poço ajustado com tampão fosfato.

A libertação de *p*-nitroanilida de BApNA foi seguida num leitor de placas de 96 poços Biotek Powerwave XS utilizando o software KC4. O pH utilizado é um pH fisiológico que ocorre no intestino humano após a neutralização do conteúdo gástrico por bicarbonato na porção inicial do duodeno (Swarbrick *et al.* 1998) e que se encontra no intervalo de pH óptimo para actuação da enzima.

9. Análise Estatística

Todos os ensaios foram efectuados pelo menos em triplicado. Os valores foram expressos como médias aritméticas $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas seguindo a análise da variância (ANOVA), as médias foram comparadas utilizando um teste de Tukey para comparações entre grupos utilizando o software Origin Pro (Origin Lab. Corporation, Massachusetts, USA).

Resultados Experimentais

1. Composição polifenólica das fracções de procianidinas oligoméricas.

As procianidinas oligoméricas extraídas das grainhas de uva (*Vitis vinifera*) foram fraccionadas de acordo com o método descrito na literatura (de Freitas *et al.* 1998). Obtiveram-se cinco fracções correspondentes a procianidinas com diferentes graus de polimerização. A composição exacta de cada fracção foi determinada por espectrometria de massa.

Os picos existentes nos espectros de massa de cada fracção foram identificados (Tabela 5) como sendo constituídos por catequinas monoméricas e procianidinas oligoméricas com vários graus de polimerização e respectivos ésteres galhato e digalhato; esta identificação correspondeu à existente na bibliografia (de Freitas *et al.* 1998).

Tabela 5. Procianidinas presentes no extracto de grainhas de uva identificadas por espectrometria de massa.

Fracção	Massa Molecular (m/z) [M-H] ⁺	Compostos flavanólicos
I	289	Catequina (monómero)
	441	Monómero galhato
	577	PC Dímero
II	577	PC Dímeros
	729	PC Dímero galhato
	865	PC Trímero
III	865	PC Trímero
	1017	PC Trímero galhato
	1153	PC Tetrâmero
	1305	PC Tetrâmero galhato
IV	1422	PC Pentâmero
	1594	PC Pentâmero galhato
V	1745	PC Pentâmero digalhato
	1761	PC Tetrâmero tetragalhato
	1881	PC Hexâmero galhato
	2017	PC Heptâmero
	2169	PC Heptâmero galhato

PC = procianidina

Com base nas massas de cada pico e na sua abundância relativa é possível calcular a peso molecular médio de cada fracção realizando uma média ponderada. Com uma abordagem semelhante é possível, usando o grau de polimerização de cada pico, determinar o grau de polimerização médio de cada fracção (Tabela 6).

Tabela 6. Peso molecular médio e grau de polimerização médio de cada uma das fracções de procianidinas obtidas. A abundância relativa refere-se apenas aos compostos identificados nos espectros de massa.

Fracção	Abundância relativa (%)	Massa Molecular (m/z) [M-H] ⁻	Peso molecular médio (m/z)	Grau de polimerização	Grau de polimerização médio
I	12	289	513	1	1,7
	23	441		1	
	65	577		2	
II	10	577	823	2	2,8
	12	729		2	
	78	865		3	
III	70	865	949	3	3,2
	7	1017		3	
	18	1153		4	
	4	1305		4	
IV	54	1422	1513	5	5,0
	46	1594		5	
V	3	1745	2052	5	6,8
	5	1761		4	
	6	1881		6	
	46	2017		7	
	41	2169		7	

Verifica-se assim que o grau de polimerização das procianidinas aumenta com a ordem de eluição da coluna de gel Toyopearl TSK-40S com os solventes usados. Foi possível separar as procianidinas oligoméricas de grainhas de uva com base no seu grau de polimerização tal como descrito na literatura (de Freitas *et al.* 1998; de Freitas *et al.* 2001).

2. Desenvolvimento do método para avaliar a inibição de tripsina.

Um dos principais objectivos deste trabalho foi o desenvolvimento de um método para determinação da acção inibitória de tripsina por parte dos polifenóis. Na literatura não existe nenhum método descrito para avaliar esta inibição. Com base nas informações recolhidas na literatura, e tal como foi referido na introdução, o BApNA tem sido utilizado como substrato cromogénico para avaliar a actividade de tripsina bem como para testar a sua inibição. Por esta razão foi escolhido para avaliar a inibição por compostos fenólicos.

Antes de se iniciar o estudo do efeito dos parâmetros estruturais de compostos fenólicos e de bebidas na actividade de tripsina foi necessário determinar as melhores condições experimentais nomeadamente as concentrações de substrato, de enzima e de polifenol.

2.1. Selecção das concentrações experimentais de substrato.

De forma a escolher as melhores condições experimentais para os ensaios de inibição de tripsina por compostos fenólicos foi realizada uma série de ensaios preliminares utilizando N-Benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BApNA) como substrato. Foram realizados ensaios preliminares numa gama bastante alargada de concentrações de substrato. Foram usadas concentrações de BApNA entre 0,33 e 5,33 g L⁻¹. A tabela 7 apresenta os valores da absorvância inicial do substrato, sem adição de enzima, para estes ensaios.

Tabela 7. Absorvância inicial de soluções de BApNA com concentrações entre 0,334 e 5,334 g L⁻¹.

Concentração de BApNA g L ⁻¹	Abs inicial
0,334	0,280
0,667	1,384
1,000	2,474
2,667	3,297
5,334	3,586

Pela análise da tabela 7 observa-se que nas concentrações acima de 0,667 g L⁻¹ a absorvância inicial excede o valor de 2. Este valor de absorvância está certamente fora dos limites de aplicabilidade da lei de Beer-Lambert e deve ser evitado. Também se verificou por inspecção visual que, exceptuando a solução de 0,334 g L⁻¹, todas as soluções se apresentavam ligeiramente turvas provavelmente indicando que se tinha ultrapassado o limite de solubilidade do substrato. Decidiu então utilizar-se concentrações de substrato mais baixas, na ordem de grandeza da mais diluída (0,334 g L⁻¹), em ensaios posteriores.

De modo a determinar qual a concentração de substrato ideal foram testadas concentrações de BApNA entre 0,05 g L⁻¹ e 0,40 g L⁻¹ na presença de tripsina (0,072 g L⁻¹).

A absorvância inicial destas soluções manteve-se em valores aceitáveis como se constata pela análise da tabela 8. De referir que algumas das soluções ainda se apresentavam turvas e que as diferenças de absorvância entre as soluções de concentração 0,30 a 0,40 g L⁻¹ não são significativas (0,271-0,279) apesar da concentração variar bastante. Mesmo com estas limitações considerou-se as absorvâncias iniciais verificadas nestas soluções eram aceitáveis e que estas concentrações de substrato podiam ser utilizadas nos ensaios de inibição (Fig. 19 e tabela 8).

Tabela 8. Absorvância inicial de soluções de BApNA com concentrações entre 0,050 e 0,400 g L⁻¹. Absorvância final 900 segundos de hidrólise por tripsina (0,072 g L⁻¹) pH 7,5; 37°C.

Concentração de BApNA g L ⁻¹	Abs inicial	Abs final
0,050	0,082	0,215
0,110	0,130	0,383
0,150	0,175	0,500
0,200	0,197	0,684
0,250	0,207	0,881
0,300	0,271	1,024
0,350	0,275	1,175
0,400	0,279	1,263

As curvas da figura 19 correspondem ao aumento de absorvância ao longo do tempo correspondente à libertação de *p*-nitroanilida ($\lambda_{\text{max}} = 410 \text{ nm}$) por hidrólise de BApNA sob acção de tripsina. Os valores de absorvância inicial foram subtraídos das representações gráficas das reacções de hidrólise após adição de tripsina. Verifica-se uma diferença na absorvância final medida e no comportamento das curvas experimentais para diferentes concentrações de substrato.

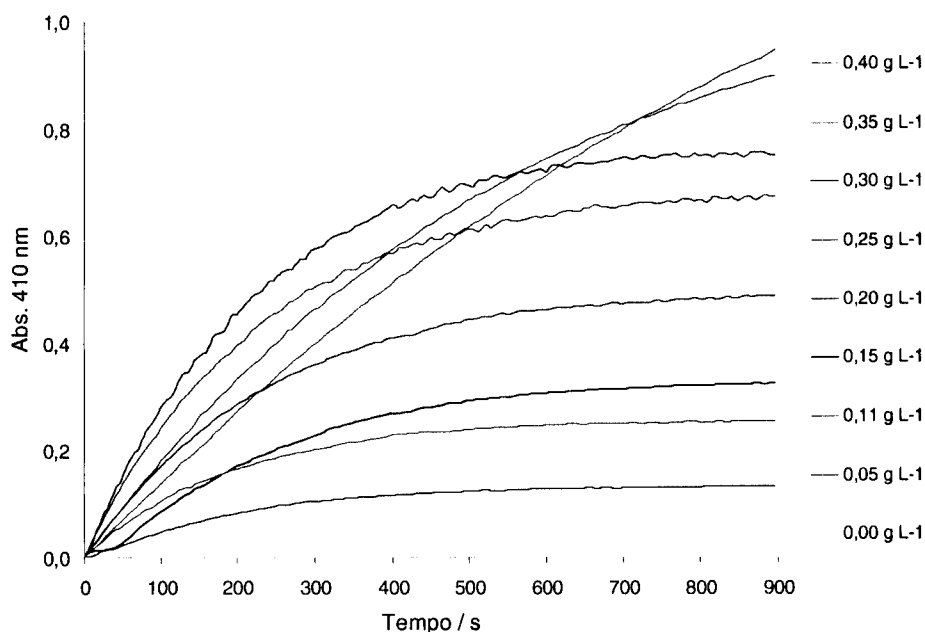


Figura 19. Estudos preliminares da cinética de actividade de tripsina com diferentes concentrações de BApNA (substrato) entre 0,05 e 0,40 g L⁻¹, em tampão fosfato (pH 7,5; 50 mM) a 37 °C. A concentração de tripsina foi de 0,072 g L⁻¹.

A baixas concentrações ($0,05-0,15 \text{ g L}^{-1}$) o substrato existente em solução é hidrolisado mais rapidamente do que nas outras concentrações levando a um aumento de absorvância até um valor máximo que se mantém constante. Este máximo corresponde à hidrólise da totalidade das moléculas de BApNA. Nestas condições a velocidade inicial de degradação, que corresponde ao declive durante a fase inicial de hidrólise do substrato, é mais reduzida.

Para as concentrações de substrato mais elevadas $0,35-0,40 \text{ g L}^{-1}$ o valor máximo de absorvância não é atingido durante o tempo de medição (900 s) indicando que não ocorreu hidrólise da totalidade do substrato. Nestas condições não ocorre a hidrólise total de BApNA no período estudado. Neste caso seria necessário aumentar o tempo de reacção ou utilizar uma quantidade superior de enzima por forma a obter a hidrólise total de BApNA. Curiosamente para estas concentrações a velocidade inicial é mais reduzida do que para as concentrações mais baixas o que parece indicar uma inibição da enzima por excesso de substrato.

Para as concentrações intermédias $0,15-0,30 \text{ g L}^{-1}$ observa-se uma curva com forma hiperbólica, atingindo o seu valor máximo de absorvância nos primeiros 2/3 do tempo estudado. Estas condições permitem determinar a velocidade inicial de hidrólise, antes da estabilização no valor máximo da absorvância correspondente à hidrólise da totalidade de substrato. Esta gama de concentrações apresenta-se assim como a mais adequada para efectuar a determinação das velocidades iniciais e foi usada nos ensaios subsequentes.

2.2. Avaliação da estabilidade do substrato em solução

Quando se tentou armazenar o substrato seguindo as indicações dadas pelo fabricante verificou-se a existência de um problema de solubilidade quando este era armazenado numa solução de DMSO em tampão fosfato (50 mM, pH 7,5) 1:50. As soluções apresentavam ao fim de algumas horas uma ligeira turvação.

O armazenamento no frio (-4°C) não melhorava esta condição, pelo contrário provocava uma floculação extensa da solução que não era removível por vortexação. Sendo o substrato estável até 75°C tentou-se o seu aquecimento a 50°C em banho-maria para remover a floculação. Verificou-se uma ligeira diminuição da turvação que ainda assim era insuficiente para se considerar a solução de substrato aceitável.

Tentou em seguida aumentar-se a concentração de DMSO por preparação de uma solução de DMSO em tampão fosfato e em água desionizada. Tentaram-se concentrações de DMSO entre 1:50 e 1:4. Verificou-se uma diminuição da turvação com o aumento da concentração de DMSO até que se obteve turvação nula com 1:4 DMSO em tampão fosfato e em água. Assumiu-se que nestas condições que a solução se tornara estável e decidiu armazenar-se a mesma no frio, verificou-se que a solução continuava a flocular.

Tentou-se dissolver o substrato BApNA apenas em DMSO e armazenar à temperatura de -4°C. Apesar deste solvente congelar a esta temperatura, após o seu descongelamento a solução permanecia límpida. Foi preparada uma solução stock de BApNA (40 g L⁻¹) em DMSO que foi depois usada para preparar as soluções de trabalho diluído a solução stock 1:20 com água desionizada. Deste modo as soluções finais eram límpidas. O mesmo não acontecia se fosse utilizado o tampão fosfato habitual (50 mM, pH 7,5). O volume final de solução de trabalho de substrato a adicionar nas reacções de hidrólise é cerca de 5% do volume total de solução tamponada, com base nesta diferença de volumes assumiu-se que o seu efeito para o pH da solução era negligenciável.

2.3. Avaliação da reacção entre polifenol e substrato (BApNA).

O substrato cromogénico BApNA apresenta na sua constituição dois anéis aromáticos (Fig. 15). Com base no conhecimento actual poder-se-ia pensar na ocorrência de alguma interacção entre este e os anéis aromáticos dos compostos fenólicos usados afectando a determinação da velocidade inicial da reacção de hidrólise. Por forma a avaliar esta possibilidade foi efectuado um ensaio de interacção entre estes dois compostos (Fig. 20).

Primeiramente o substrato BApNA ($0,18 \text{ g L}^{-1}$) foi incubado com procianidinas oligoméricas (OPC) durante 3 minutos. Ao longo deste período de incubação a reacção foi seguida a 410 nm para verificar se ocorria variação da absorvância da mistura. Observa-se uma absorvância inicial de $0,350$ correspondendo apenas à absorvância do extracto de procianidinas para a concentração testada.

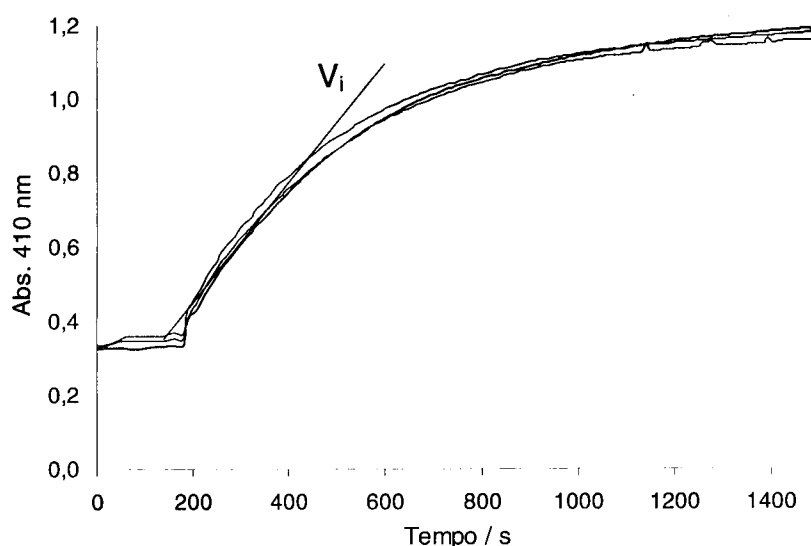


Figura 20. Cinética da actividade de tripsina ($0,072 \text{ g L}^{-1}$) incubada com BApNA ($0,22 \text{ g L}^{-1}$), em tampão fosfato (50 mM , $\text{pH } 7,5$) a 37°C , na presença de oligómeros de procianidinas ($0,18 \text{ g L}^{-1}$). A tripsina foi adicionada após 180 segundos de incubação inicial. Ensaio em triplicado.

Durante o período inicial de 3 minutos verifica-se que a absorvância permanece constante indicando que não ocorre interacção entre o extracto fenólico e o substrato ou que a ocorrer esta não afecta a absorvância da mistura e consequentemente a determinação da hidrólise do substrato por acção da tripsina.

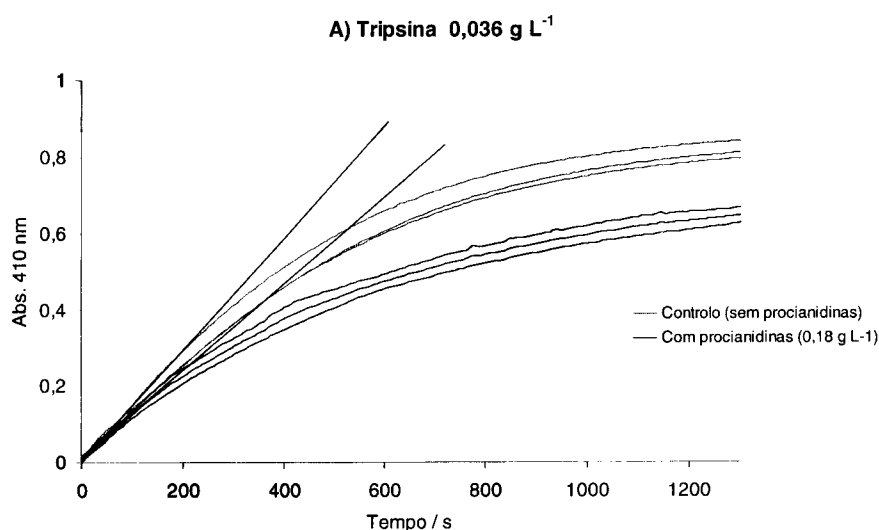
Após este período de incubação foi adicionada tripsina ($0,072 \text{ g L}^{-1}$) à mistura reaccional verificando-se de imediato o aumento da absorvância. A absorvância máxima correspondente à hidrólise total de BApNA foi de 1,2 registada no final do tempo de medição. Tal como foi observado nos gráficos da figura 19 (sem adição de compostos fenólicos), a velocidade de hidrólise diminui a partir dos 900 seg usando-se por isso o declive da parte inicial da curva correspondente à velocidade inicial (V_i).

Na figura 20 observa-se ainda a sobreposição das três curvas experimentais demonstrando mais uma vez a boa reprodutibilidade deste método.

2.4. Selecção das concentrações experimentais de enzima.

A secreção de enzimas digestivas, incluindo tripsina é bastante variável de acordo com a estimulação hormonal (secretina), hábitos alimentares, idade, estado nutricional e tamanho da refeição. Ainda assim é possível estimar que a quantidade média de tripsina na porção inicial do duodeno varia entre 1 e 5 U (unidades de actividade de enzima) por mililitro de fluido (Friess *et al.* 1998).

Foram realizados ensaios para determinar qual a quantidade de tripsina a utilizar nos testes de inibição enzimática. Assim foram escolhidas duas concentrações de enzima que permitem obter uma actividade volumétrica dentro do intervalo 1 a 5 U. Usaram-se as concentrações de $0,036 \text{ g L}^{-1}$ e $0,072 \text{ g L}^{-1}$. Aproveitou-se ainda para determinar se estas concentrações de enzima eram susceptíveis de inibição por um extracto complexo de procianidinas OPC (não fraccionadas). Procurou-se avaliar a actividade hidrolítica de tripsina realizando ensaios com as duas concentrações de enzima na ausência e na presença desse extracto de procianidinas ($0,18 \text{ g L}^{-1}$) (Fig. 21).



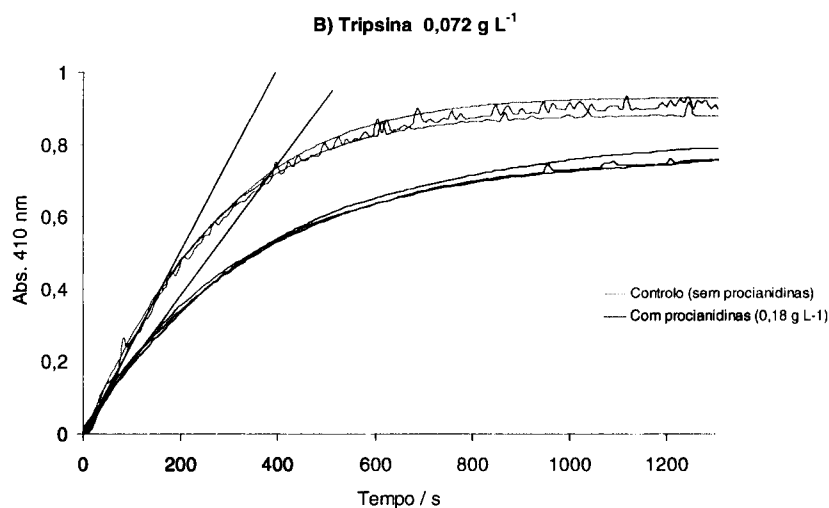


Figura 21. Comparação da cinética da actividade de tripsina (em triplicado) a duas concentrações de tripsina diferentes: A, $0,036 \text{ g L}^{-1}$; e B, $0,072 \text{ g L}^{-1}$ na ausência e na presença de procianidinas de grainha de uva (OPC) ($0,18 \text{ g L}^{-1}$). A concentração de BApNA foi $0,18 \text{ g L}^{-1}$; pH 7,5; temperatura 37°C .

Nos ensaios sem procianidinas verifica-se que para concentrações de tripsina de $0,072 \text{ g L}^{-1}$ atinge-se o valor máximo de absorvância ($0,89 \pm 0,03$) próximo dos 600 segundos (Fig. 21 B). Para o ensaio com menor concentração de tripsina (Fig. 21 A) não se atinge o máximo de absorvância dentro do tempo em que a reacção foi acompanhada (1300 s) o que indica que não ocorre a hidrólise total do substrato.

Os gráficos da figura 21 também permitem avaliar a influência da adição de procianidinas na actividade da tripsina. Tal como esperado, para ambos os casos, ocorreu uma diminuição da actividade de tripsina. Esta é observável pela diminuição simultânea da velocidade inicial e a intensidade final de absorvância, com a adição de polifenol.

Alguns autores, utilizando BApNA como substrato, recorreram apenas à variação da absorvância final como medida da actividade residual de tripsina para estudar a inibição desta enzima por compostos isolados de parasitas intestinais (Vaccari *et al.* 1998; Volpicella *et al.* 2003). No entanto, não foram ainda efectuados estudos cinéticos da actividade de tripsina na presença de compostos fenólicos sendo interessante verificar o seu efeito na velocidade inicial da reacção.

A tabela 9 apresenta a velocidade inicial da reacção de hidrólise enzimática bem como a absorvância final da mistura reaccional obtidas a partir da figura 20. A velocidade inicial foi calculada pelo declive da parte inicial das curvas. Foi ainda calculada a velocidade relativa, razão entre as velocidades iniciais na ausência (controlo) e na presença de polifenol.

Tabela 9. Velocidade iniciais e relativas (V_i/V_c) da hidrólise de BApNA a duas concentrações de tripsina na presença e ausência de procianidinas ($0,18 \text{ g L}^{-1}$). Valores máximos de absorvância após 1300 s. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes.

Concentração de tripsina	Velocidade inicial ($\text{s}^{-1} \times 10^2$)		Absorvância final	
	$0,036 \text{ g L}^{-1}$	$0,072 \text{ g L}^{-1}$	$0,036 \text{ g L}^{-1}$	$0,072 \text{ g L}^{-1}$
Sem procianidinas (V_c)	$0,127 \pm 0,008$	$0,193 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,03$	$0,89 \pm 0,03$
Com procianidinas (V_i)	$0,097 \pm 0,007$	$0,142 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,02$
Velocidade relativa (V_i/V_c)	$0,764 \pm 0,014^a$	$0,735 \pm 0,004^b$		

Para a concentração de enzima mais elevada ($0,072 \text{ g L}^{-1}$) o efeito inibitório é mais pronunciado uma vez que se verifica uma diminuição da velocidade relativa mais importante (maior sensibilidade) e melhor reprodutibilidade (diminuição do desvio padrão) do que para a concentração mais baixa ($0,036 \text{ g L}^{-1}$). Estes resultados indicam que a concentração mais elevada de tripsina é a mais apropriada e deve ser utilizada nos ensaios subsequentes.

As diferenças observadas quando se usa a absorvância final como termo de comparação não são tão significativas. Verifica-se que as diferenças na absorvância final na presença e na ausência de procianidinas são praticamente iguais para ambas as concentrações de tripsina testadas indicando que a comparação dos valores da velocidade de hidrólise é mais adequado ao objectivo pretendido.

3. Estudo do efeito da concentração de polifenol na actividade de tripsina.

Um inibidor da actividade de uma enzima exerce geralmente o seu efeito segundo um de dois mecanismos básicos: a associação à enzima na sua forma livre impedindo a ligação da molécula de substrato ou associação ao complexo enzima-substrato impedindo a reacção enzimática de ocorrer ou os produtos da reacção de se dissociarem da enzima (Nelson *et al.* 2002).

Em ambos os casos a inibição da actividade da enzima depende da concentração do inibidor utilizado. O estudo da inibição de tripsina por procianidinas começou com a determinação do efeito da concentração destas na inibição de tripsina. Foram realizados, para cada fracção de procianidinas de diferentes pesos moleculares, ensaios de actividade de tripsina na presença de uma gama de concentrações de compostos fenólicos entre 0 e 313 mg L⁻¹. Com base nestes resultados traçou-se, para cada uma das fracções de procianidinas usadas, um gráfico de Abs = f (tempo de reacção). Na figura 22 é observável esse gráfico para diferentes concentrações de fracção IV (peso molecular médio = 1513).

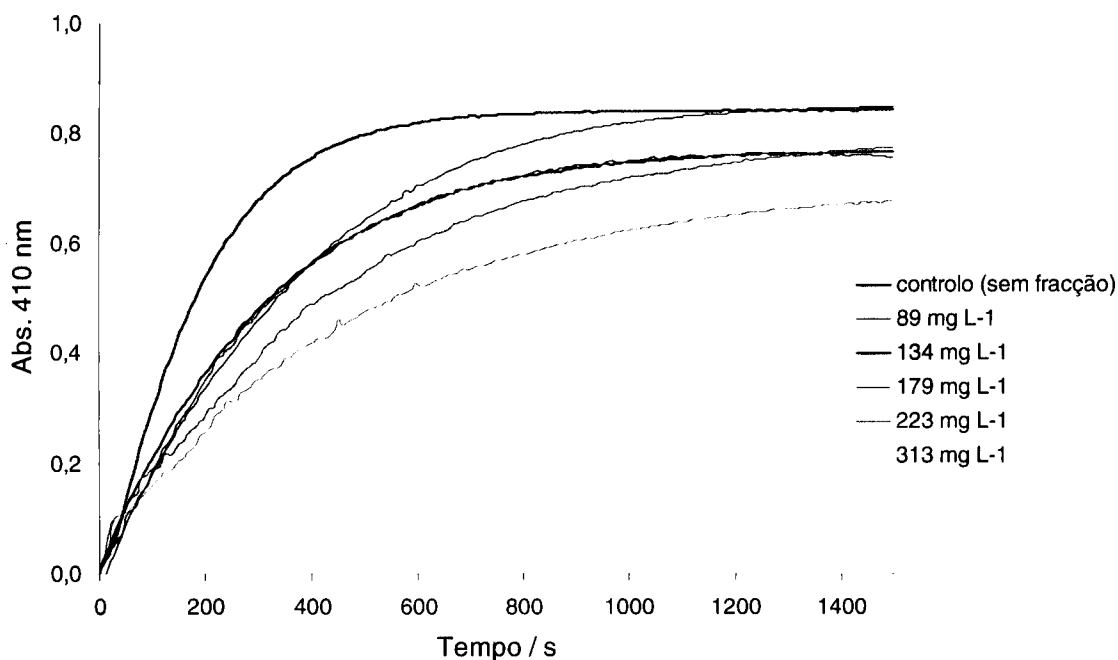


Figura 22. Estudo cinético da actividade de tripsina (0,072 g L⁻¹), em tampão fosfato (50 mM; pH 7,5) a 37 °C, na presença de várias concentrações de procianidinas oligoméricas da fracção IV. A concentração de BApNA foi de 0,18 g L⁻¹. Para simplificar cada curva representa a média de ensaios em triplicado.

Observa-se, de um modo geral, que a velocidade inicial da reacção, declive da parte inicial da curva, diminui com o aumento da concentração de procianidinas (verificado também para as outras fracções de procianidinas) indicando alguma diminuição da actividade de tripsina (Tabela 10). Também ocorre uma diminuição na absorvância final que segue a mesma tendência da diminuição da velocidade inicial sendo no entanto menos pronunciada.

Tabela 10. Velocidade inicial e velocidade relativa (V_i/V_c) da hidrólise de BApNA com várias concentrações de fracção de procianidinas oligoméricas de grau de polimerização médio 5,0. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes.

Concentrações de procianidinas (g L^{-1})	Velocidade inicial ($\text{s}^{-1} \times 10^3$)	Velocidade relativa (V_i/V_c)
0	$2,37 \pm 0,03^a$	$1,00 \pm 0^a$
89	$1,66 \pm 0,06^b$	$0,70 \pm 0,02^b$
134	$1,05 \pm 0,22^c$	$0,45 \pm 0,08^c$
179	$1,43 \pm 0,14^b$	$0,61 \pm 0,07^b$
223	$1,26 \pm 0,04^c$	$0,53 \pm 0,03^c$
313	$0,83 \pm 0,02^d$	$0,35 \pm 0,03^d$

A absorvância final é aproximadamente igual nos ensaios sem fracção fenólica e com 89 mg L^{-1} (Fig. 22). Este resultado também sustenta a hipótese de que a abordagem cinética é mais adequada (maior sensibilidade) do que o uso da absorvância final para estudar o efeito inibitório sobre tripsina de compostos fenólicos usando BApNA como substrato.

4. Estudo cinético da inibição pelas fracções polifenólicas.

Um dos objectivos deste estudo é avaliar o efeito da estrutura de procianidinas, nomeadamente o efeito do seu grau de polimerização na inibição de tripsina. Para tal um extracto hidroálcoolico de procianidinas de grainhas de uva foi fraccionado em gel de fase reversa obtendo-se fracções com grau de polimerização variado (secção 1 dos Resultados e Interpretação). A figura 23 apresenta a cinética da actividade da enzima quando incubada com 223 mg L^{-1} das diferentes fracções de procianidinas (I até V).

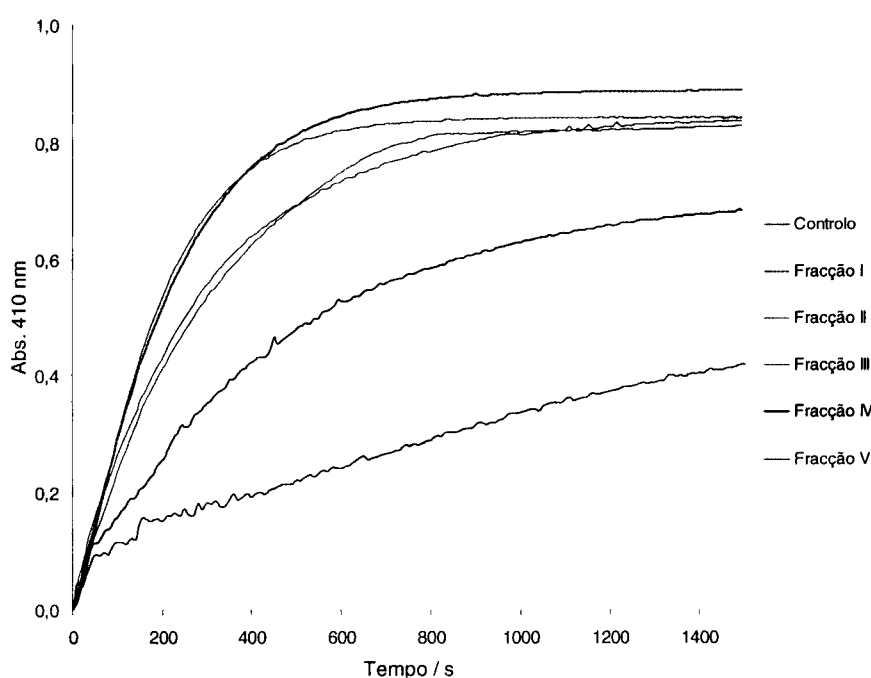


Figura 23. Cinética da actividade de tripsina ($0,072 \text{ g L}^{-1}$), em tampão fosfato (50 mM ; pH 7,5) a 37°C , na presença de fracções de procianidinas de extractos de grainhas de uva (223 mg L^{-1} para cada fracção). A concentração de BApNA foi $0,18 \text{ g L}^{-1}$. Para simplificar cada curva representa a média de ensaios em triplicado.

A tabela 11 mostra a actividade residual de tripsina com base na medição da absorvância final e a velocidade relativa para as fracções de procianidinas numa concentração de 233 mg L^{-1} . Observa-se para todos os casos uma diminuição da actividade de tripsina (velocidade inicial e absorvância final) na presença das fracções

apesar desta diferença ser maior para as fracções IV e V que apresentam um grau de polimerização maior.

Tabela 11. Velocidade relativa e absorvância final para ensaios cinético da actividade hidrolítica de BApNA ($0,18 \text{ g L}^{-1}$) por tripsina ($0,072 \text{ g L}^{-1}$) na presença das diferentes fracções de procianidinas (233 mg L^{-1}). Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes.

Amostra	Velocidade relativa V_i/V_c	Absorvância final
Controlo	—	$0,888 \pm 0,008^a$
Fracção I	$0,94 \pm 0,05^a$	$0,842 \pm 0,009^b$
Fracção II	$0,90 \pm 0,08^a$	$0,827 \pm 0,008^b$
Fracção III	$0,87 \pm 0,07^a$	$0,836 \pm 0,013^b$
Fracção IV	$0,52 \pm 0,03^b$	$0,683 \pm 0,010^c$
Fracção V	$0,38 \pm 0,05^c$	$0,413 \pm 0,009^d$

Como se observou anteriormente pela análise da figura 22 existe uma relação linear entre a inibição de tripsina e a concentração de procianidinas. Assim é de supor que a representação da velocidade inicial relativa (V_i/V_c) em função da concentração de polifenol [$V_i/V_c = f([polifenol])$] corresponde a uma recta com declive negativo. Este declive é uma medida da capacidade de cada composto fenólico para inibir a actividade de tripsina (Fig. 24). Esta grandeza é definida como factor de inibição (F_i).

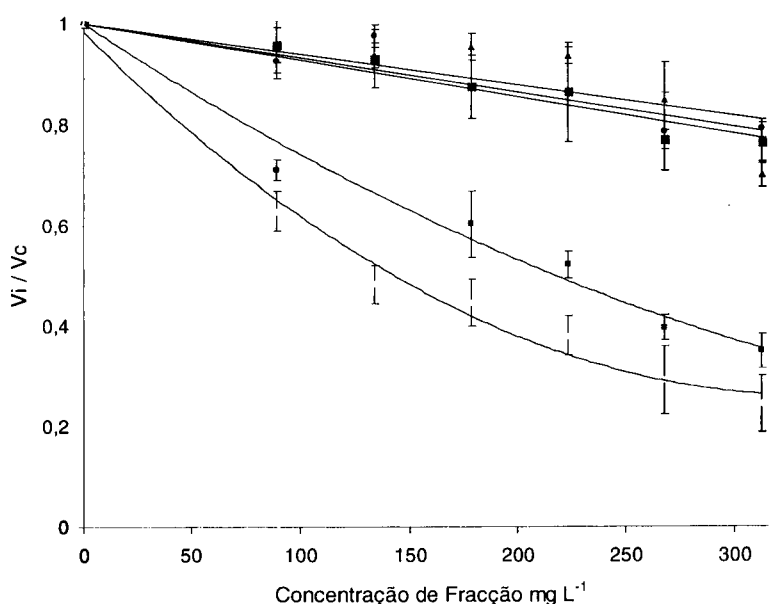


Figura 24. Velocidade relativa da actividade de tripsina (V_i/V_c) em função da concentração de inibidor para as fracções de procianidinas. ■ Fracção I; ▲ Fracção II; ● Fracção III; ■ Fracção IV; ○ Fracção V.

Verifica-se-se que a inibição de tripsina provocada pelas fracções I, II e III não é significativamente diferente. Para estas três fracções a representação de $V_i/V_c = f([polifenol])$ é uma recta para todas as concentrações de testadas. Por outro lado para as fracções mais polimerizadas (IV e V) a inibição é significativamente diferente e a curva experimental é uma recta apenas na fase inicial, isto é, para baixas concentrações de procianidinas.

Esta perda de linearidade para altas concentrações pode ser explicada por vários fenómenos podendo indicar que todas as moléculas de tripsina se encontram complexadas (inibidas) com procianidinas mesmo antes de se atingirem as concentrações mais elevadas havendo um excesso de procianidina em solução. A actividade residual de tripsina dever-se-á a algumas moléculas de tripsina que se encontrem ainda livres e disponíveis para hidrolisar BApNA. Nestas condições um aumento da concentração de procianidinas não implica necessariamente um aumento da inibição. Para calcular F_i nestes casos apenas foi usada a parte linear de cada curva experimental.

A tabela 12 apresenta os valores do factor de inibição (em valor absoluto) das várias fracções de procianidinas.

Tabela 12. Factor de inibição da actividade de tripsina (F_i) e sua relação com o grau de polimerização e peso molecular médio das fracções de procianidinas analisadas. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes.

Fracções	Peso molecular médio (de Freitas <i>et al.</i> 1998)	Grau de Polimerização médio	Factor de inibição (F_i) x 10^3
I	513	1,7	$0,82 \pm 0,11^a$
II	823	2,8	$0,77 \pm 0,09^a$
III	949	3,2	$0,74 \pm 0,12^a$
IV	1513	5,0	$2,00 \pm 0,09^b$
V	2052	6,8	$2,34 \pm 0,19^c$

O aumento do efeito inibitório torna-se mais visível com a representação do Factor de Inibição em função da peso molecular médio (Fig. 25 A) e do grau de polimerização médio (Fig. 25 B). Verifica-se que para pesos moleculares inferiores a 1000, correspondentes a um grau de polimerização de cerca de 3, o Fi permanece aproximadamente constante. Com o aumento da massa molecular o valor de Fi aumenta rapidamente com o aumento do número de locais de ligação à tripsina, indicando que a partir de trímeros o número de locais de ligação é suficiente para inibir a tripsina de forma extensa.

Estes resultados estão em concordância com resultados previamente obtidos para interacção das procianidinas com outras proteínas (albumina sérica bovina) em que se verificou por nefelometria um aumento da interacção com o aumento do grau de polimerização médio (Carvalho *et al.* 2004).

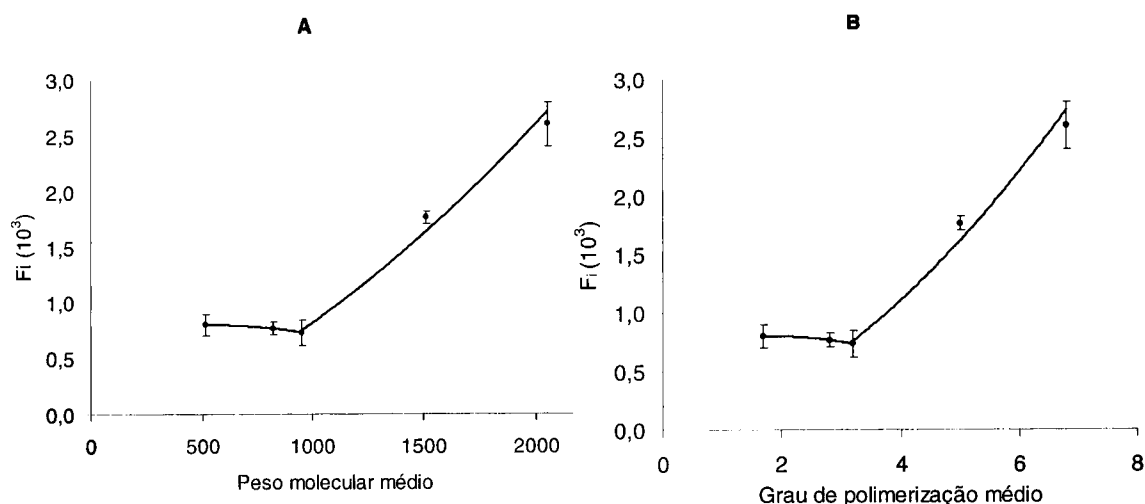


Figura 25. Factor de Inibição de tripsina (declive de V_i/V_c) em função do peso molecular médio (A) e do grau de polimerização médio (B) de diferentes fracções de procianidinas.

5. Comparação do efeito inibitório de compostos fenólicos de diferentes classes.

De modo a obter informação sobre a relação entre a inibição e as características estruturais de compostos fenólicos pertencentes a outras famílias para além das procianidinas decidiu estudar-se o efeito na actividade de tripsina de dois ácidos fenólicos (cafeico e gálico) e de um tanino hidrolisável (ácido tânico). Para todos foram realizados ensaios preliminares tentando verificar se as condições experimentais utilizadas para as fracções de procianidinas eram aplicáveis. Verificou-se que para os ácidos fenólicos foi possível utilizar concentrações de composto fenólico da mesma ordem de grandeza das usadas nos ensaios com as procianidinas.

Para os estudos efectuados com o ácido tânico verificou-se que as soluções deste com a N-Benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida eram pouco estáveis nas concentrações testadas. Estas soluções apresentavam uma turvação crescente que, em ensaios espectrofotométricos, provocaria difracção da luz incidente. Assim decidiu-se usar concentrações 10 vezes inferiores tendo-se verificado que não originavam turvação e permitiam observar alguma inibição da actividade da enzima, concentrações superiores provocavam turvação. A figura 26 representa a velocidade relativa (V_i/V_c) da actividade de tripsina na presença de diferentes concentrações de ácidos cafeico, gálico e tânico. Observa-se claramente uma diferença entre a actividade dos três compostos testados. O ácido gálico e o ácido tânico provocam inibição da enzima, por outro lado o ácido cafeico parece potenciar a actividade hidrolítica de tripsina.

O ligeiro aumento da actividade de tripsina com ácido cafeico não foi, até ao momento, relatado na literatura. Como tal não existe nenhuma explicação para este fenómeno sendo necessários mais ensaios para caracterizar o fenómeno ocorrido.

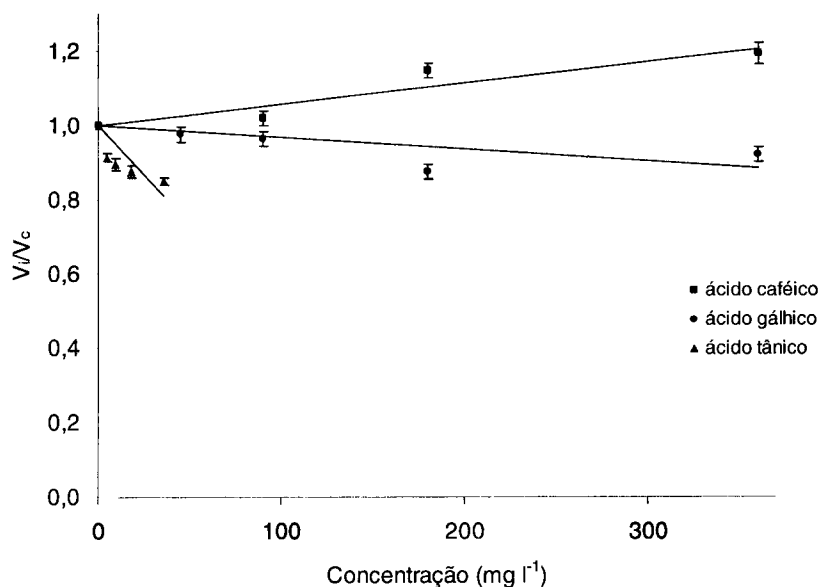


Figura 26. Velocidade relativa da actividade de tripsina (V_i/V_c) em função da concentração de inibidor compostos não flavanólicos. ■ Ácido caféico; ● Ácido gálgico; ▲ Ácido tânico.

Para as amostras que apresentaram inibição foi determinado o factor de inibição utilizando a parte inicial das curvas tal como efectuado com as fracções fenólicas (tabela 13).

Tabela 13. Factor de inibição da actividade de tripsina (F_i) para o ácido tânico (tanino hidrolisável) e ácido gálgico taninos hidrolisáveis testados. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes.

Amostra	Factor de inibição (F_i) $\times 10^3$
Ácido gálgico	$0,24 \pm 0,02^a$
Ácido tânico	$3,41 \pm 0,30^b$

Verifica-se uma diferença significativa entre os factores de inibição de ambos os compostos. O ácido gálgico apresenta um F_i significativamente inferior ao do ácido tânico. Estruturalmente o ácido tânico é uma mistura de compostos que têm como base açúcares como glucose aos quais estão esterificados vários grupos galhato, originando compostos como pentagaloil-glucose (Fig. 6B).

Este elevado número de grupos galato ligados entre si permite ao ácido tânico estabelecer pontes entre diversas moléculas proteicas, diminuindo a sua flexibilidade estrutural e capacidade de se movimentarem em solução podendo inclusive causar a sua precipitação (Haslam 1998). Esta diminuição de solubilidade poderá ser responsável pela diminuição da actividade de tripsina que foi verificada.

As moléculas de ácido gálgico, ainda que potencialmente muito reactivas com as proteínas visto serem capazes de participar em ligações por pontes de hidrogénio com as ligações peptídicas e interacções hidrofóbicas, apresentam um F_i inferior ao do ácido tânico. Provavelmente a dimensão do ácido gálgico não é suficiente para estabelecer fortes ligações com a enzima e formar complexos estáveis.

Na literatura está descrito que a 1,4,6-tri-O-galoil- β -D-glucose apresenta uma capacidade inibitória de lipase pancreática 50 vezes superior à do ácido gálgico (Nakai *et al.* 2005).

Estes resultados, quando comparados com os resultados obtidas com as procianidinas mostram que a inibição provocada por compostos fenólicos com base no 3-flavanol (procianidina fraccionadas) é inferior à provocada por taninos hidrolisáveis complexos como ácido tânico. Este resultado está em desacordo com os obtidos anteriormente com outras enzimas digestivas (Nakai *et al.* 2005). Do ponto de vista alimentar a inibição por proantocianidinas parece mais relevante já que a sua abundância em alimentos é bastante superior à dos taninos hidrolisáveis (secção 2 da Introdução). A presença de ácido tânico em alimentos deve-se exclusivamente à passagem residual vinda de porções não comestíveis das plantas durante o processamento. Este facto torna a inibição por proantocianidinas, ainda que mais fraca, muito mais frequente do que a inibição por taninos hidrolisáveis.

6. Estudo do efeito do vinho na inibição da tripsina

Um dos objectivos do presente trabalho foi avaliar o efeito inibitório da actividade de tripsina provocado por componentes de bebidas comuns. Assim decidiu testar-se o efeito inibitório de vinhos de diferentes proveniências.

O vinho é uma mistura alimentar bastante complexa, além dos compostos fenólicos, possui ácidos, aldeídos e açúcares que afectam as propriedades físico-químicas da mistura. Uma propriedade de particular importância quando se considera a actividade de enzimas é o pH. A enzima tripsina é totalmente inactiva a pHs inferiores a 4 sendo que a perda de actividade entre pH 7,5 e pH 5 é de cerca de 50 % (Outzen *et al.* 1996). A presença de ácidos como tartárico ($pK_a = 4$) poderá afectar o pH das misturas reaccionais avaliadas modificando assim a actividade inibitória. Assim ajustou-se o poder tamponante da solução de tampão fosfato a 200 mM de modo a garantir que não ocorria variação do pH após adição do vinho e que se mantem idêntico ao inicial (7,5).

6.1. Estudos cinéticos com vinhos suplementados com procianidinas.

Foi seleccionado um vinho do Porto enriquecido com um extracto de procianidinas de grainha (OPC) em concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹. O enriquecimento de vinhos com *taninos enológicos* é uma prática enológica que visa por um lado a melhoria do processo de clarificação dos vinhos e por outro lado a melhoria das características organolépticas dos vinhos, nomeadamente o sabor.

O efeito destes vinhos na inibição da actividade hidrolítica de BApNA apresentada pela tripsina foi testado da mesma forma que para os compostos fenólicos anteriores. Traçaram-se os gráficos de Abs = f (tempo) para diferentes volumes de vinho. A figura 27 mostra esta representação para o vinho enriquecido com maior quantidade de procianidinas (2,0 g L⁻¹) onde é visível uma clara inibição da actividade de tripsina com o aumento do volume de vinho testado.

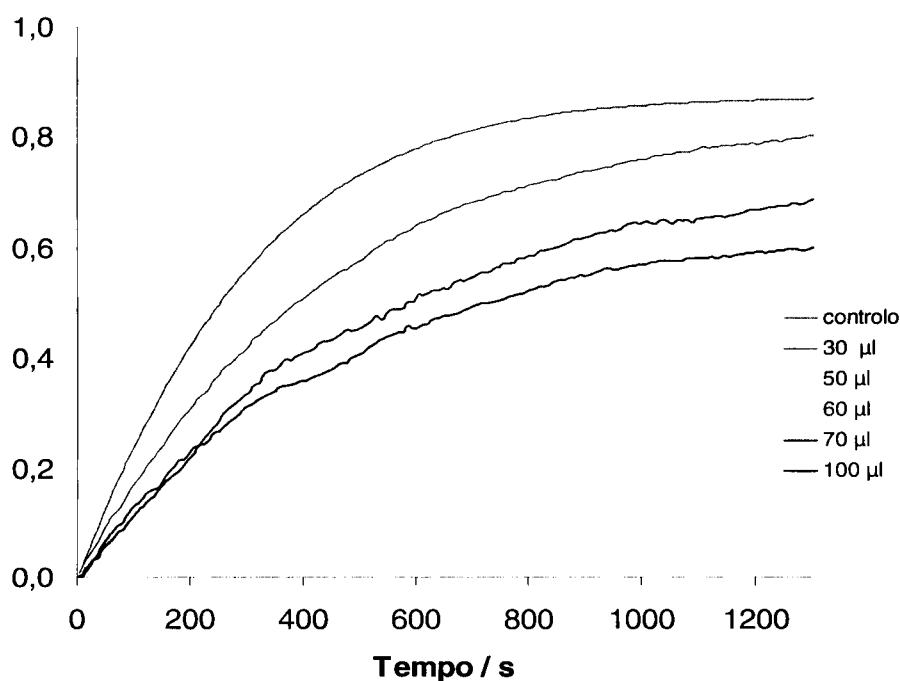


Figura 27. Cinética da actividade de tripsina (0,072 g L⁻¹) em tampão fosfato (200 mM, pH 7,5) para diferentes volumes de um vinho suplementado com procianidinas (2,0 g L⁻¹). A concentração de BApNA foi de 0,18 g L⁻¹. Para simplificar cada curva representa a média de ensaios em triplicado. Ensaios efectuados a 37°C.

Os resultados obtidos com os restantes vinhos suplementados em procianidinas são semelhantes. Com base nos dados de $Abs = f(\text{tempo})$ determinaram-se as velocidades iniciais relativas (V_i/V_c) para cada volume estudado e para cada um dos quatro vinhos. A representação das velocidades relativas em função do volume de vinho encontra-se na figura 28.

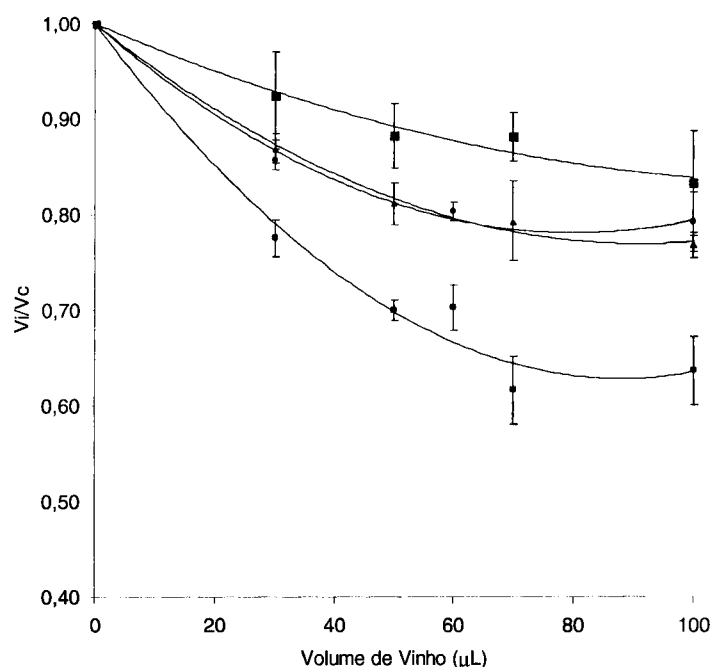


Figura 28. Velocidade relativa da actividade de tripsina (V_i/V_c) em função do volume de vinho para vinhos suplementados com procianidinas. ■ Referência (sem procianidinas adicionadas); ▲ 0,5 g L⁻¹ de OPC adicionadas; ● 1,0 g L⁻¹ de OPC adicionadas; ■ 2,0 g L⁻¹ de OPC adicionadas.

Pode observar-se uma diminuição da velocidade relativa com o aumento do volume de vinho para todos os vinhos. No entanto, esta diminuição é linear apenas para volumes baixos de vinho, tal como foi observado para os ensaios com as fracções de procianidinas IV e V.

Com base no declive da recta na fase inicial das curvas experimentais (menores volumes de vinho) determinou-se o Fi de tripsina pelos vinhos (tabela 15).

Tal como esperado o vinho do Porto não suplementado (referência) apresenta Fi bastante inferior ao dos outros vinhos sendo o vinho suplementado com $2,0 \text{ g L}^{-1}$ o que apresenta o valor de Fi mais elevado. A inibição verificada com os vinhos $0,5$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$ é semelhante entre si. Como se pode ver pela análise da tabela 14, existe uma correlação directa entre o factor de inibição destes vinhos e a concentração de compostos em fenóis totais uma vez que estre concentração é semelhante nos vinhos suplementados com $0,5$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$

Tabela 14. Factores de inibição da actividade de tripsina e conteúdo fenólico total para vinhos do Porto enriquecidos com diferentes quantidades de procianidinas oligoméricas. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes.

Suplemento de procianidinas OPC (g L^{-1})	Factor de inibição (Fi) $\times 10^3$	Fenóis totais * (g L^{-1})
Referência (0 g L^{-1})	$1,3 \pm 0,2^a$	$0,26 \pm 0,01^a$
$0,5 \text{ g L}^{-1}$	$2,3 \pm 0,2^a$	$0,47 \pm 0,01^b$
$1,0 \text{ g L}^{-1}$	$2,0 \pm 0,3^a$	$0,49 \pm 0,02^b$
$2,0 \text{ g L}^{-1}$	$5,1 \pm 0,5^b$	$0,73 \pm 0,01^c$

* expresso em equivalentes de catequina

Apesar das quantidades de procianidinas adicionadas serem diferentes as diferenças na concentração de fenóis totais após 9 anos não são significativas nos vinhos suplementados com $0,5$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de OPC. O vinho de referência apresenta o menor conteúdo de compostos polifenólicos e o vinho suplementado com a maior quantidade apresenta o teor mais elevado de fenóis totais.

Uma possível explicação para as alterações no conteúdo de fenóis totais no vinho são as reacções ocorrentes durante o envelhecimento do vinho em garrafa. A evolução de uma mistura tão variada de compostos orgânicos como é o vinho é bastante complexa sendo os produtos das transformações de compostos fenólicos ainda pouco conhecidos. Sabe-se que antocianinas e flavanóis condensam entre si, directa (Somers 1971; Liao *et al.* 1992) ou indirectamente, envolvendo o acetaldeído, (Bakker *et al.* 1993; Rivas-Gonzalo *et al.* 1995), formando estruturas com características físico-químicas diferentes das originais e por vezes mais polimerizadas que tendem a precipitar (Mateus *et al.* 2001)

De facto, foram observados depósitos aderentes à garrafa em todos os vinhos suplementados e no vinho de referência, indicativos de perda de componentes do vinho, contribuindo para uma diminuição do teor total em moléculas fenólicas. Estas transformações alteram certamente o poder inibitório dos polifenóis originais do vinho face à actividade de tripsina.

6.2. Estudos cinéticos com vinhos comerciais.

O método desenvolvido para o estudo da inibição de tripsina foi também aplicado a vinhos comerciais. Foram seleccionados vinhos de mesa branco e tinto e um vinho do Porto novo. A figura 29 apresenta o gráfico de V_i/V_c em função do volume de vinho. Novamente se observa, para volumes altos de vinho a velocidade relativa se mantém constante provavelmente como resultado de um excesso de compostos inibidores de tripsina sendo F_i calculado recorrendo à parte inicial das curvas.

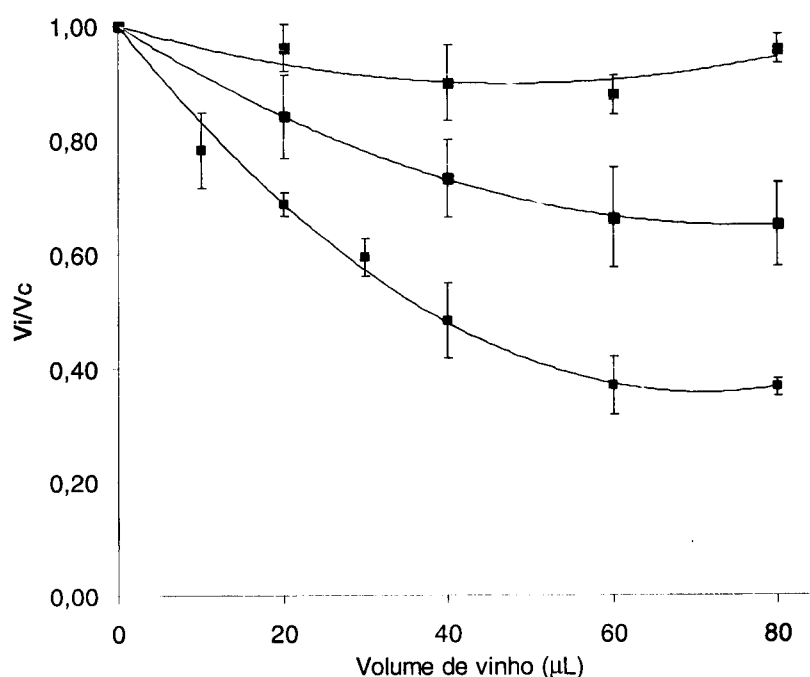


Figura 29. Velocidade relativa da actividade de tripsina (V_i/V_c) em função do volume de vinho para vinhos comerciais testados. ■ Vinho de Mesa Branco; ■ Vinho de Mesa Tinto; ■ Vinho do Porto Tinto.

Os resultados relativos aos vinhos de mesa mostram que o vinho de mesa tinto apresenta um factor de inibição bastante superior ao vinho branco (Tabela 15). Este resultado é concordante com o teor de fenóis totais que também é maior para o vinho de mesa tinto.

A comparação entre o vinho de mesa tinto e o vinho do Porto indica que o último tem uma capacidade para inibir a actividade de tripsina bastante superior. Este resultado é novamente concordante com o teor em polifenóis totais de cada um dos vinhos. Ainda assim, apesar de o valor para Fi ser 3,2 vezes superior para o vinho do Porto, o seu teor em fenóis totais não chega sequer ao dobro do determinado para o vinho de mesa tinto. Isto parece indicar que a quantidade de compostos fenólicos não é o único factor relevante sendo necessário simultaneamente considerar a sua complexidade estrutural e a natureza dos compostos fenólicos.

Tabela 15. Factores de inibição (Fi) da actividade de tripsina e concentração fenólica total para vinhos comerciais. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes.

Vinho Comerciais:	Factor de inibição (Fi) $\times 10^3$	Fenóis totais* (g L ⁻¹)
Vinho de Mesa Branco	$1,5 \pm 0,4^a$	$0,015 \pm 0,006^d$
Vinho de Mesa Tinto	$4,4 \pm 0,7^b$	$1,80 \pm 0,01^e$
Vinho do Porto	$13,7 \pm 1,7^c$	$3,15 \pm 0,02^f$

* expresso em equivalentes de catequina

Poder-se-ia pensar que as diferenças se deveriam a um maior teor em etanol no vinho do Porto, no entanto estudos realizados indicam que a interacção entre compostos fenólicos e proteína é prejudicada pela presença de etanol (Calderon *et al.* 1968) Neste caso esperar-se-ia um menor valor de Fi para o vinho com maior teor alcoólico.

9. Estudos cinéticos com bebidas não alcoólicas.

Uma abordagem idêntica à aplicada ao vinhos foi tentada com outras bebidas que são fontes importantes de compostos fenólicos na dieta. Estudou-se a inibição de tripsina na presença de algumas bebidas não alcoólicas com base em frutos. Escolheram-se três sumos de frutas diferentes, nomeadamente sumo de laranja, sumo de frutos vermelhos (uva, amora, morango, framboesa e arando) e um sumo de vários frutos (maça, uva, ananás, laranja); todos estes sumos são preparados à base de concentrado. Escolheram-se ainda duas bebidas, uma com base em extractos de chá e outra isotónica.

Dada a complexidade da composição dos sumos comerciais de fruta analisados foi necessário atender a alguns factores importantes durante a sua análise. Foi necessário filtrar estes sumos por forma a remover sólidos que poderiam originar interferências por difracção aquando das leituras colorimétricas. Foi ainda necessário considerar a presença de interferências nos ensaios de determinação do teor em polifenóis totais como o ácido ascórbico.

A adição de ácido ascórbico em sumos de fruta é muito frequente e tem como objectivo aumentar a estabilidade do sumo à oxidação, diminuir o pH do produto e conferir uma vantagem comercial já que o ácido ascórbico é um composto com propriedades vitamínicas importantes (Bremus *et al.* 2006). Este composto é redutor e uma das interferências reconhecidas na determinação de polifenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteus (Scalbert *et al.* 2000). Foi necessário proceder à sua remoção dos sumos através de um gel de C18 (ver parte experimental) (Georgé *et al.* 2005). A adsorção em coluna de gel C18 permite a remoção total do ácido ascórbico como se mostra num ensaio em água com concentrações de ácido ascórbico iguais às presentes nos sumos (300 mg L^{-1}) (Fig. 30).

Observa-se que na solução inicial o poder redutor total, medido no ensaio de Folin-Ciocalteu corresponde a cerca de $0,150 \text{ g L}^{-1}$ de catequina, na fase orgânica recuperada do gel de C18 a partir dessa solução este teor é nulo indicando uma remoção da totalidade do ácido ascórbico presente.

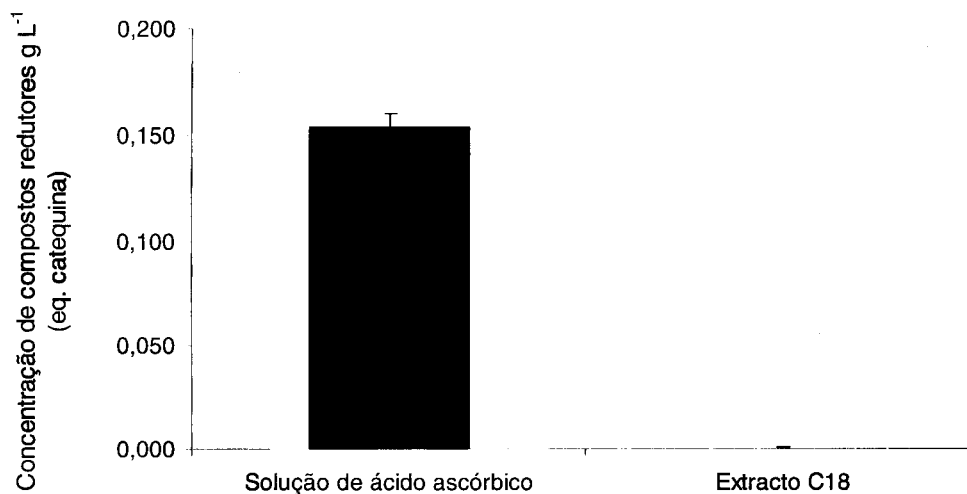


Figura 30. Concentração de compostos redutores, numa solução aquosa de ácido ascórbico (300 mg L^{-1}) e no extracto orgânico obtido após passagem no gel de C18.

Aplicou-se este método a sumos de fruta. A figura 31 apresenta o teor em fenóis totais determinado pelo método de Folin-Ciocalteu nos sumos de fruta e nos extractos obtidos após passagem no gel C18.

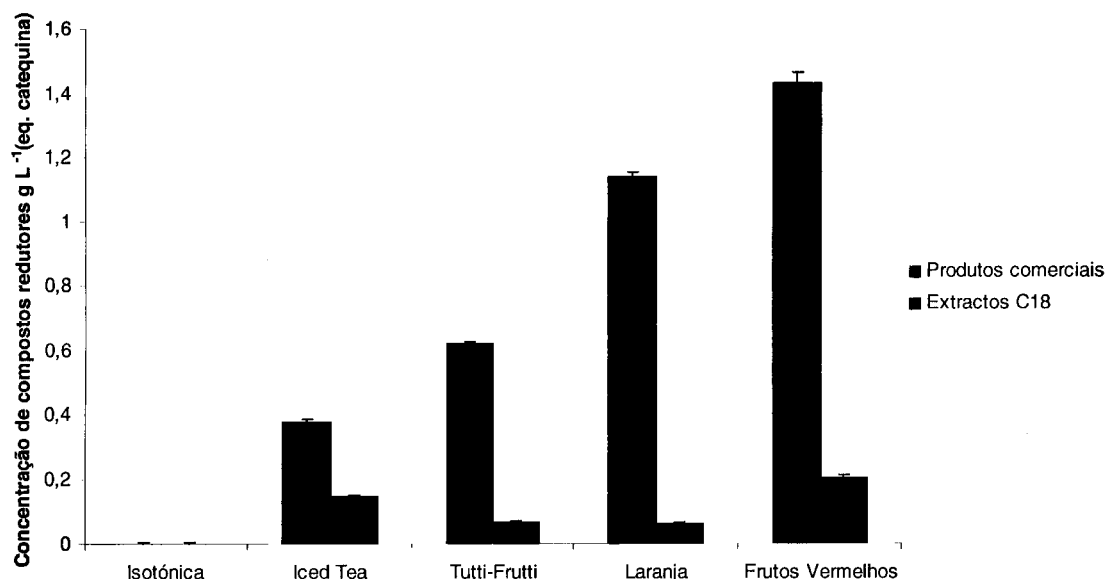


Figura 31. Compostos redutores totais obtidos pelo método de Folin-Ciocalteus para os sumos e para os extractos obtidos após passagem no gel C18.

Constata-se que para todas as amostras o teor em compostos redutores totais determinados pelo método de Folin-Ciocalteu diminui significativamente após a passagem por C18. Esta diminuição deve-se essencialmente à remoção de ácido ascórbico ficando em solução essencialmente os compostos fenólicos. No entanto, poderá também ocorrer remoção de compostos fenólicos hidrossolúveis que serão arrastados na fase aquosa juntamente com o ácido ascórbico bem como a retenção no gel de C18 de compostos fenólicos de grandes dimensões que poderão não ter sido removidos da coluna de C18 com simples eluição com metanol (Georgé *et al.* 2005).

Para todas as bebidas não alcoólicas foram realizados ensaios de inibição da tripsina. Estes foram efectuados com os sumos após clarificação por filtração não sendo efectuada adsorção em C18 já que não foi até ao momento relatada a interferência de ácido ascórbico na determinação da actividade de tripsina. Seguindo o método de avaliação de inibição de tripsina descrito anteriormente foram feitas representações de $\Delta\text{abs} = f(\text{tempo})$ a partir das quais se determinaram as velocidades relativas da hidrólise V_i/V_c do substrato BApNA. Representou-se $V_i/V_c = f(\text{volume de amostra})$ e determinou-se o factor inibitório (Fi) (Fig. 32).

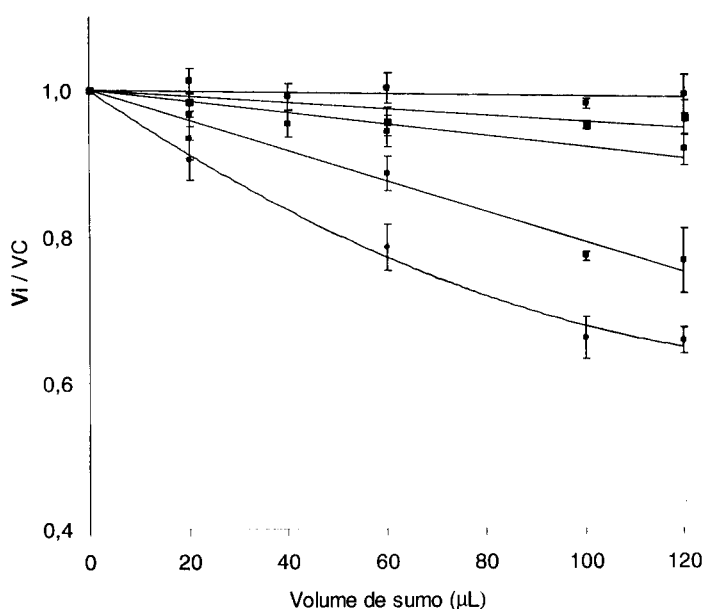


Figura 32. Velocidade relativa da actividade de tripsina (V_i/V_c) em função do volume de sumo. $\square$ Isotónica; $\blacksquare$ Tutti-Frutti; $\blacksquare$ Frutos Vermelhos; $\blacksquare$ Laranja; $\bullet$ Iced Tea.

Tal como observado para os ensaios anteriores a velocidade relativa da actividade de tripsina diminui com o aumento do volume de amostra.

Na tabela 16 estão representados os factores de inibição calculados para cada uma das amostras de sumo e os teores em fenóis totais das mesmas (após a remoção de ácido ascórbico).

Tabela 16. Factores de inibição da actividade de tripsina para sumos comerciais e conteúdo em fenóis totais obtido no extracto dos mesmos após passagem no gel C18. Valores com superscritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); valores com superscritos iguais não são significativamente diferentes.

Bebida	Factor de inibição (Fi) x 10 ³	Fenóis totais (g L ⁻¹) *
Iced Tea Limão	2,97 ± 0,07 ^a	0,148 ± 0,001
Isotónica	0,38 ± 0,08 ^b	não detectados
Néctar Tutti-Frutti	0,42 ± 0,03 ^b	0,068 ± 0,005
Néctar Frutos-Vermelhos	0,76 ± 0,03 ^c	0,203 ± 0,007
Néctar Laranja	1,95 ± 0,08 ^d	0,061 ± 0,007

* expresso em equivalentes de catequina

Não se verifica uma relação directa entre o teor de fenóis totais e o factor de inibição da actividade de tripsina contrariamente ao que se verificou nos ensaios efectuados com vinhos. Neste caso as amostras são bastante diferentes entre si já que foram obtidos a partir de matérias vegetais diferentes e por isso apresentam classes de compostos fenólicos e concentrações dos mesmos muito distintas.

A bebida isotónica e o néctar de tutti-frutti apresentam valores idênticos para a inibição da actividade de tripsina. A bebida isotónica não contém nenhum ingrediente de origem vegetal na sua composição, assim os compostos polifenólicos não estão presentes na sua composição. Para este caso a inibição detectada poder-se-á dever a algum outro componente da mistura. O néctar de tutti-frutti apresenta um valor para o teor em compostos fenólicos mais elevado mas, aparentemente, insuficiente para causar uma diferença significativa na inibição da actividade de tripsina.

O sumo de laranja apesar de apresentar um teor de compostos fenólicos mais reduzido que o sumo de tutti-frutti é mais eficaz a inibir a actividade de tripsina.

O refrigerante com extractos de chá foi o que apresentou maior valor de F_i , não sendo no entanto a bebida que apresenta o maior teor em compostos fenólicos. Por outro lado o néctar de frutos vermelhos apresenta teores em compostos fenólicos superiores e uma inibição da actividade de tripsina relativamente baixa. Para este caso podemos referir que, a indicação dada pelo produtor é de que este sumo contém flavonóides não sendo esclarecida a sua natureza. Estes poderão ser de várias classes, tendo em conta a composição do sumo (uva, amora, morango, framboesa e arando), as antocianinas serão um dos grupos maioritários. Os dados existentes até ao momento não indicam uma interacção muito extensa de antocianinas com proteínas. Num estudo da inibição de α -amilase verificou-se que a remoção de antocianinas de um extracto de framboesa diminuía apenas ligeiramente a inibição da enzima. Os autores do estudo concluíram que outros compostos fenólicos não antocianicos serão responsáveis pelo maior efeito inibitório de α -amilase nomeadamente os taninos elágicos (McDougall *et al.* 2005).

Analisando o conjunto destes resultados pode-se concluir que o conteúdo de compostos fenólicos não será o parâmetro mais importante mas sim a sua estrutura. No Iced Tea a presença de compostos poliméricos como procianidinas ou polímeros característico do chá como Oolonghomobisflavanos (Nakai *et al.* 2005) é provavelmente responsável pela elevada inibição da actividade de tripsina observada.

Conclusão

Em seguida apresentam-se, de forma resumida, quais os objectivos cumpridos e as conclusões mais relevantes.

Foi possível adaptar uma metodologia que permite estudar o efeito de inibidores polifenólicos na actividade de tripsina. Foi ainda possível utilizar uma abordagem cinética que, apesar de diferenciada da abordagem clássica, se provou versátil e robusta. Carece obrigatoriamente de mais estudos antes que possa ser generalizada e/ou estabelecida como metodologia de referência.

Ainda assim, recorrendo a esta metodologia, pôde verificar-se uma inibição significativa da enzima digestiva proteolítica tripsina por parte de procianidinas oligoméricas extraídas de grainha da uva bem como por taninos hidrolisáveis adquiridos comercialmente. Concluiu-se que estes últimos apresentam um poder inibitório superior, no entanto, devido à sua reduzida presença em alimentos, não deverão ser inibidores relevantes na alimentação humana.

Provou-se que a inibição de tripsina por procianidinas de grainhas de uva depende da concentração destes compostos fenólicos em solução. Provou-se ainda que a inibição por parte de procianidinas depende também do seu grau de polimerização médio sendo que esta aumenta com o aumento do grau de polimerização. Verificou-se que a inibição por taninos hidrolisáveis também depende da complexidade estrutural dos mesmos.

Este método colorimétrico foi utilizado com sucesso na análise do efeito inibitório da actividade de tripsina de vinhos e outras bebidas comercialmente disponíveis. Verificou-se que a interferência mais relevante neste método é o pH, no entanto esta limitação foi ultrapassada com uma cuidadosa tamponação das bebidas para o pH dos ensaios (7,5).

Verificou-se que vinhos de mesa brancos e tintos e vinhos do Porto comerciais e enriquecidos com procianidinas bem como sumos de frutas têm um efeito inibitório sobre tripsina. Para os vinhos do Porto suplementados verificou-se um aumento da capacidade inibitória da actividade de tripsina com o aumento da suplementação com extractos oligoméricos de procianidinas. Ao comparar estes últimos com os vinhos comerciais observa-se que esta inibição parece depender não apenas da concentração total de compostos fenólicos nos vinhos mas também da sua complexidade estrutural. A análise dos sumos de fruta mostrou uma relação entre o conteúdo de fenóis totais e a inibição enzimática, no entanto, tal como para os vinhos, parece haver uma relação entre esta inibição e complexidade estrutural dos polifenóis das bebidas.

A extrapolação de estudos realizados *in vitro* para actividades *in vivo* deve ser efectuada com o maior cuidado por forma a evitar quer alarmismos quer optimismos precipitados. Ainda assim, dado o papel chave da tripsina na activação da maioria das outras enzimas digestivas (Neurath *et al.* 1976), podemos esperar algum efeito antinutricional de compostos polifenólicos, nomeadamente das procianidinas. Os resultados obtidos suscitam algumas questões interessantes, principalmente devido à complexidade do processo digestivo.

Perspectivas Futuras

Com base nos resultados obtidos e na análise da literatura especializada não há dúvidas que os polifenóis têm um papel importante na inibição enzimática. Existem, no entanto, alguns pontos importantes por estudar antes de se poder definir as características antinutricionais dos polifenóis tais como a sua estabilidade digestiva, a relação entre complexidade estrutural e actividade inibitória e a interacção com os restantes componentes da matriz alimentar.

Durante a digestão gástrica simulada de extractos polifenólicos de vinho verificou-se que não existiam alterações na sua composição (McDougall *et al.* 2005). Neste mesmo estudo verificou-se que, no caso da digestão intestinal simulada, existia um fenómeno de conjugação entre polifenóis apenas se detectando 5 compostos fenólicos partindo de um vinho com mais de 20 antocianinas e derivados glicosídicos.

Numa revisão de resultados de estabilidade biológica pós digestão pancreática (Bermudez-Soto *et al.* 2007) é referido que não ocorre degradação significativa de compostos provenientes de fontes tão variadas como brócolos, cacau, framboesa, cebola, e sumos de fruta. É ainda relatado que durante a digestão pancreática ocorre, para a maioria das fontes, uma desglicosilação e por vezes uma conversão a chalconas. Assim se constata que a biodisponibilidade, pelo menos das formas mais poliméricas, de compostos fenólicos não é conhecida. É necessário saber se os polímeros fenólicos que, como provado *in vitro*, inibem enzimas digestivas, chegam intactos ao intestino. A clarificação do fenómeno da biodisponibilidade seria uma das vias a seguir num futuro próximo.

Como conclusão do presente trabalho foi apresentada uma relação entre o grau de polimerização de procianidinas e a sua capacidade para inibir tripsina. Foi ainda demonstrado que para outros composto fenólicos a complexidade estrutural parece estar também relacionada com o poder inibitório. Também se pode referir que o presente trabalho abordou apenas a inibição de uma enzima, ainda que chave, no metabolismo digestivo. Assim seria interessante efectuar um estudo idêntico ao realizado com outras enzimas digestivas, nomeadamente glicosidases e lipases. Para além disso seria importante ter em consideração alguns aspectos que se prendem com a origem dos polifenóis e a sua estrutura:

- Utilização de extractos hidroálcoolícos ricos em compostos fenólicos a partir de frutos variados com diferentes composições fenólicas.
- Avaliação do efeito da estrutura dos polifenóis na inibição das enzimas seleccionadas, tais como o grau de polimerização e galoilação de proantocianidinas, o tipo de unidade monomérica ((+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galhocatequina, (-)-epigalhocatequina), o tipo de ligação interflavanóide (C4-C6 ou C4-C8); em diferentes antocianinas, vitisinas e portisinas (piranoantocianinas).

O último ponto a clarificar é a interacção de outros componentes da matriz alimentar na interacção tanino-enzima. Não existem neste momento estudos efectuados no que se refere à influência de outros componentes da matriz na actividade inibitória de polifenóis, os dados existentes limitam-se à interacção de compostos fenólicos com proteínas (sem função enzimática). Por nefelometria provou-se que gomas alimentares (goma arábica e xantano) usadas como espessantes em várias aplicações industriais possuíam capacidade para inibir a formação e mesmo resolubilizar agregados entre proteína-polifenol já formados (Carvalho *et al.* 2006). Na sequência destes resultados seria interessante evidenciar o papel de polissacáridos presentes nos alimentos na inibição da complexação entre polifenóis e enzimas digestivas e na inibição da actividade de enzimas digestivas provocada pelos compostos fenólicos.

Referências Bibliográficas

Bakker, J., A. Picinelli, et al. (1993). "Model wine solutions: colour and composition changes during ageing." *Vitis* **32**: 111-118.

Baldi, A., A. Romani, et al. (1995). "HPLC/MS Application to Anthocyanins of *Vitis vinifera* L." *J. Agric. Food Chem.*(43): 2104-2109.

Bate-Smith, E. C. (1954). "Astringency in foods." *Food*(23): 124.

Bate-Smith, E. C. and Swain; (1962). *Flavonoid Compounds in Comparative biochemistry*. M. a. M. Florkin. New-York, Academic Press. **3**: 755-809.

Baxter, N. J., T. H. Lilley, et al. (1997). "Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline rich protein. Repeat results in complexation and precipitation." *Biochem J.* **36**: 5566-5577.

Bermudez-Soto, M. J., F. A. Tomas-Barberan, et al. (2007). "Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion." *Food Chemistry* **102**(3): 865-874.

Bremus, C., U. Herrmann, et al. (2006). "The use of microorganisms in L-ascorbic acid production." *Journal of Biotechnology* **124**(1): 196-205.

Brouillard, R. (1983). "The in vivo expression of anthocyanin colour in plants." *Phytochemistry*(22): 1311-1323.

Burda, S., W. Oleszek, et al. (1990). "Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. ." *J. Agric. Food Chem.*(38): 945-948.

Burley, S. K. and G. A. Petsko (1988). "Weakly polar interactions in proteins." *Adv. Protein Biochem.*(39): 125-189.

Cai, K. and A. Bennick (2006). "Effect of salivary proteins on the transport of tannin and quercetin across intestinal epithelial cells in culture." *Biochem Pharmacol* **72**(8): 974-980.

Calderon, P., J. Van Buren, et al. (1968). "Factors influencing the formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hydrolyzable tannins." *J Agric Food Chem* **16**(3): 554-588.

Carvalho, E., N. Mateus, et al. (2004). "Flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions." *Analytica Chimica Acta* **513**(1): 97-101.

Carvalho, E., M. Póvoas, et al. (2006). "Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein-tannin interactions." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**(6): 891-896.

Cassidy, A., B. Hanley, et al. (2000). "Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health." *J Sci Food Agric* **80**(7): 1044-1062.

Charlton, A. J., N. J. Baxter, et al. (2002). "Polyphenol/peptide binding and precipitation." *J Agric Food Chem* **50**(6): 1593-601.

Clifford, M. N. (1997). Astringency. Phytochemistry of fruits and vegetables: proceedings of the Phytochemical Society of Europe. T.-B. F.A.; and R. J. Robins. Oxford, Clarendon Press: 87-107.

Clifford, M. N. and A. Scalbert (2000). "Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden." *J Sci Food Agric* (80): 1118-1125

Daniel, E. M., A. S. Krupnic, et al. (1989). "Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts." *J Food Compos Anal* (2): 338-349

Darne, G. and J. Madero-Tamargo (1979). "Description of method for extracting total soluble lipids, total soluble glucides and total soluble phenols of vine organs." *Vitis* **18** 221-228.

de Freitas, V. and N. Mateus (2001). "Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**: 113-119.

de Freitas, V. and N. Mateus (2001). "Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins." *J. Agric. Food Chem.* **49**(2): 940-945.

de Freitas, V. A. P., Y. Glories, et al. (1998). "Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry." *Phytochemistry* **49**(5): 1435-1441.

Deprez, S., I. Mila, et al. (2001). "Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells." *Antioxid. Redox. Signal*(3): 957-967.

Donovan, J. L., C. Manach, et al. (2002). "Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grape seed extract or the procyanidin dimer B3." *Br. J. Nutr.*(87): 299-306.

Erlanger, B. F., N. Kokowsky, et al. (1961). "The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin." *Arch. Biochem. Biophys.* (95): 271-278.

Flegal, K. M., M. D. Carroll, et al. (1998). "Overweight and obesity in the United States: Prevalence and trends, 1960-1994." *International Journal of Obesity* **22**(1): 39-47.

Friess, H., J. Kleeff, et al. (1998). "Adaptation of the human pancreas to inhibition of luminal proteolytic activity." *Gastroenterology* **115**: 388-396.

Gaboriaud, C., L. Serre, et al. (1996). "Crystal Structure of Human Trypsin 1: Unexpected Phosphorylation of Tyr151." *J. Mol. Biol.* **259**: 995-1010.

Gee, J. M. and I. T. Johnson (2001). "Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health." *Curr Med Chem* **8**(11): 1245-1255.

Georgé, S., P. Brat, et al. (2005). "Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products." *J Agric Food Chem* **53**: 1370-1373.

Gilani, G. S. and E. Sepehr (2003). "Protein digestibility and quality in products containing antinutritional factors are adversely affected by old age in rats." *J Nutr* **133**(1): 220-225.

Goffon, J. P., M. Brun, et al. (1991). "High-Performance liquid chromatography of red fruit anthocyanins." *J Chromatogr* **537**: 101-121.

Goldstein, J. L. and T. Swain (1965). "The inhibition of enzymes by tannins." *Phytochemistry* **4**: 185-192.

Gonthier, M. P., J. L. Donovan, et al. (2003). "Metabolism of dietary procyanidins in rats." *Free Radic. Biol. Med.*(35): 837-844.

Gu, L., M. A. Kelm, et al. (2004). "Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption." *J. Nutr.*(134): 613 -617.

Hagerman, A. and L. Butler (1978). "Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins." *J Agric Food Chem* **26**: 809-812.

Hagerman, A. and L. Butler (1981). "The specificity of proanthocyanidin-protein interactions." *J Biol Chem* **256**(9): 4494-7.

Haslam, E. (1989). Plant Polyphenols, Vegetable Tannins Revisited. Cambridge, Cambridge University Press.

Haslam, E. (1996). Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. **59**: 205-215.

Haslam, E. (1998). Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. Cambridge, Cambridge University Press.

Haslam, E. and T. H. Lilley (1988). "Natural astringency in foodstuffs--a molecular interpretation." *Crit Rev Food Sci Nutr* **27**(1): 1-40.

He, Q., Y. Lv, et al. (2007). "Effects of tea polyphenols on the activities of [alpha]-amylase, pepsin, trypsin and lipase." *Food Chemistry* **101**(3): 1178-1182.

Hertog, M. G. L., P. C. H. Hollman, et al. (1993). "Estimation of daily intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults." *The Netherland. Nutr. Cancer*(20): 21-29.

Hoon-Il, O. and E. Johan (1987). "pH Dependence of Complex Formation Between Condensed Tannins and Proteins." *Journal of Food Science* **5**(52): 1267-1269.

Insel, P., E. R. Turner, et al. (2004). Nutrition, Jones and Bartlett.

- Jong-Anurakkun, N., M. R. Bhandari, et al. (2007). "alpha-Glucosidase inhibitors from Devil tree (*Alstonia scholaris*)." *Food Chemistry* **103**(4): 1319-1323.
- Kähkönen, M., J. Heinämäki, et al. (2003). "Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities." *J Sci Food Agric* **83**(14): 1403-1411.
- Kahkonen, M. P., A. I. Hopia, et al. (1999). "Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds." *J. Agric. Food Chem.* **47**(10): 3954-3962.
- Kahle, K., M. Kraus, et al. (2006). "Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion?" *Mol Nutr Food Res* **50**(4-5): 418-423.
- Kim, Y.-M., M.-H. Wang, et al. (2004). "A novel alpha-glucosidase inhibitor from pine bark." *Carbohydrate Research* **339**(3): 715-717.
- Kirk, P., P. R. E., et al. (1999). "Development of a soy food frequency questionnaire to estimate isoflavone consumption in US adults. ." *J. Am. Diet. Assoc.*(99): 558-563.
- Koo, M. W. L. and C. H. Cho (2004). "Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system." *European Journal of Pharmacology* **500**(1-3): 177-185.
- Liao, H., Y. Cai, et al. (1992). "Polyphenols interactions. Anthocyanins: Copigmentation and colour changes in red wines." *J Agric Food Chem* **59**: 299-305.
- Loomis, W. D. (1974). "Overcoming Problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles." *Methods Enzymol* **31**: 528.
- Lopes-da-Silva, F., S. de Pascual-Teresa, et al. (2002). "Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection." *European Food Research and Technology* **214**(3): 248-253.
- Luck, G. L. H. and E. Haslam (1994). "Polyphenols, Astringency and Proline-Rich Proteins." *Phytochemistry* **37**(2): 357-371.
- Makkar, H. P., M. Blummel, et al. (1995). "Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques." *Br J Nutr* **73**(6): 897-913.
- Makkar, H. P. S. (2003). "Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds." *Small Ruminant Research*(49): 241-256.
- Manach, C., A. Scalbert, et al. (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." *Am J Clin Nutr* **79**(5): 727-747.
- Manach, C., G. Williamson, et al. (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." *Am J Clin Nutr* **81**(1 Suppl): 230S-242S.

Mateus, N., A. M. S. Silva, et al. (2001). "Occurrence of anthocyanin-derived pigments in red wines." *J Agric Food Chem* **49**(10): 4836-4840.

Matsui, T., S. Ebuchi, et al. (2002). "Anti-hyperglycemic Effect of Diacylated Anthocyanin Derived from *Ipomoea batatas* Cultivar Ayamurasaki Can Be Achieved through the α -Glucosidase Inhibitory Action." *J. Agric. Food Chem.* **50**(25): 7244-7248.

Matsui, T., T. Ueda, et al. (2001). " α -Glucosidase Inhibitory Action of Natural Acylated Anthocyanins. 1. Survey of Natural Pigments with Potent Inhibitory Activity." *J. Agric. Food Chem.* **49**(4): 1948-1951.

Matsui, T., T. Ueda, et al. (2001). " α -Glucosidase Inhibitory Action of Natural Acylated Anthocyanins. 2. α -Glucosidase Inhibition by Isolated Acylated Anthocyanins." *J. Agric. Food Chem.* **49**(4): 1952-1956.

McDougall, G. J., S. Fyffe, et al. (2005). "Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion." *Phytochemistry* **66**(21): 2540-2548.

McDougall, G. J., F. Shpiro, et al. (2005). "Different polyphenolic components of soft fruits inhibit alpha-amylase and alpha-glucosidase." *J Agric Food Chem* **53**(7): 2760-2766.

McDougall, G. J. and D. Stewart (2005). "The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes." *Biofactors* **23**(4): 189-195.

McNabb, W. C., G. C. Waghorn, et al. (1993). "The effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on the digestion and metabolism of methionine, cystine and inorganic sulphur in sheep." *Br J Nutr* **70**(2): 647-61.

Mejbaum-Katzenellenbogen, W., W. Dobryszchka, et al. (1959). "Regeneration of protein from insoluble protein-tannin compounds." *Nature* **184**: 1799.

Metche, M. and M. Girandin (1980). "Les tannins des vegetaux." 242-288.

Michael, N. C. (1999). "Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**(3): 362-372.

Mueller-Harvey, I. (2006). "Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health." *J Sci Food Agric* **86**(13): 2010-2037.

Mueller, N. H., C. Yon, et al. (2007). "Characterization of the West Nile virus protease substrate specificity and inhibitors." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**(3): 606-614.

Mullen, W., J. McGinn, et al. (2002). "Ellagitannins, Flavonoids, and Other Phenolics in Red Raspberries and Their Contribution to Antioxidant Capacity and Vasorelaxation Properties." *J. Agric. Food Chem.* **50**(18): 5191-5196.

- Nakai, M., Y. Fukui, et al. (2005). "Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro." *J Agric Food Chem* **53**(11): 4593-4598.
- Nelson, D. L. and M. M. Cox (2002). *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman & Co.
- Neurath, H. and K. A. Walsh (1976). "Role of proteolytic enzymes in biological regulation (A review)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**(11): 3825-3832.
- Nonaka, G.-I., R. Sakai, et al. (1984). "Hydrolysable tannins and proanthocyanidins from green tea." *Phytochemistry* **23**: 1753-1755.
- Novillo, C., P. Castanera, et al. (1997). "Inhibition of digestive trypsin-like proteases from larvae of several lepidopteran species by the diagnostic cysteine protease inhibitor E-64." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**(3): 247-254.
- Oh, H. I. (1978). Physicochemical and nutritional aspects of tannin-protein interactions. West Lafayette, IN, Purdue University. **Ph. D.** .
- Oh, H. I. and J. E. Hoff (1987). "pH Dependence of Complex Formation Between Condensed Tannins and Proteins." *Journal of Food Science* **5**(52): 1267-1269.
- Oppert, B. (2006). "Two-dimensional analysis of proteinase activity." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **67**(2-3): 173-179.
- Ortiz-Andrade, R. R., S. Garcia-Jimenez, et al. (2007). "alpha-Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: An anti-hyperglycemic agent." *Journal of Ethnopharmacology* **109**(1): 48-53.
- Outzen, H., G. I. Berglund, et al. (1996). "Temperature and pH sensitivity of trypsins from atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with bovine and porcine trypsin." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **115**(1): 33-45.
- Pi-Sunyer, F. X. (1993). "Medical hazards of obesity." *Annals of Internal Medicine* **119**(7): 655-660.
- Pullela, S. V., A. K. Tiwari, et al. (2006). "HPLC assisted chemobiological standardization of [alpha]-glucosidase-I enzyme inhibitory constituents from *Piper longum* Linn-An Indian medicinal plant." *Journal of Ethnopharmacology* **108**(3): 445-449.
- Quesada, C., O. Nieto, et al. (1996). "Phenolic Inhibitors of alpha-Amylase and Trypsin Enzymes by Extracts From Pears, Lentils, and Cocoa." *Journal of Food Protection* **59**: 185-192.
- Rasmussen, S. E., H. Frederiksen, et al. (2005). "Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease." *Mol Nutr Food Res* **49**(2): 159-174.

Reed, J. D. (1995). "Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes." *J Anim Sci* **73**(5): 1516-1528.

Reeds, P. J. and T. W. Hutchens (1994). "Protein Requirements: From Nitrogen Balance to Functional Impact." *J. Nutr.* **124**(9_Suppl): 1754S-1764.

Rivas-Gonzalo, J. C., S. Bravo-Haro, et al. (1995). "Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde." *J Agric Food Chem* **43**(1444-1449).

Salagoity-Auguste, M. H. and A. Bertrand (1984). "Wine phenolics: analysis of low molecular weight components by high performance liquid chromatography." *J. Sci. Food. Ag.* (35): 1241-1247.

Sanchez-Moreno, C., G. Cao, et al. (2003). "Anthocyanin and Proanthocyanidin Content in Selected White and Red Wines. Oxygen Radical Absorbance Capacity Comparison with Nontraditional Wines Obtained from Highbush Blueberry." *J. Agric. Food Chem.* **51**(17): 4889-4896.

Santos-Buelga, C. and A. Scalbert (2000). "Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**(7): 1094-1117.

Scalbert, A. and G. Williamson (2000). "Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols." *J. Nutr.* **130**(8): 2073S-2085.

Schilling, G., K. Weinges, et al. (1973). "Procyanidine aus fruchten." *Liebigs Ann Chem*: 1471-1475.

Siebert, K. J. and P. Y. Lynn (1998). "Comparison of polyphenol interactions with PVPP and haze-active protein." *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* **56**(1): 24-31.

Singleton, V. L. and J. A. Rossi (1965). "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent." *Am J Enol Viti*: 16-144.

Somers, T. C. (1971). "The polymeric nature of wine pigments." *Phytochemistry* **10**: 2175-2186.

Souci, S. W., W. Fachmann, et al. (1986). Food Composition and Nutrition Tables. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH

Souza, A. A. G., I. P. G. Amaral, et al. (2007). "Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*)." *Food Chemistry* **100**(4): 1429-1434.

Spanos, G. A. and R. E. Wrolstad (1992). "Phenolics of apple, pear, and white grape juice and their changes with processing and storage: a review. ." *J. Agric. Food Chem.* (40): 1478-1487.

- Spencer, J. P. E., F. Chaudry, et al. (2000). "Decomposition of Cocoa Procyanidins in the Gastric Milieu." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*(272): 236–241.
- Swarbrick, J. and J. Boylan (1998). Encyclopedia of Pharmaceutical Technology New York, Marcel Dekker Inc.
- Tagliazucchi, D., E. Verzelloni, et al. (2005). "Effect of Some Phenolic Compounds and Beverages on Pepsin Activity during Simulated Gastric Digestion." *J. Agric. Food Chem.* **53**(22): 8706-8713.
- Tapiero, H., K. D. Tew, et al. (2002). "Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?" *Biomedicine and Pharmacotherapy* **56**: 200-207.
- Vaccari, L., D. Melfi, et al. (1998). "A novel proteinase and its specific protein-inhibitor in *Spinacia oleracea* leaf." *Plant Physiology and Biochemistry* **36**(6): 427-432.
- Van Buren, J. and W. B. Robinson (1969). "Formation of complexes between protein and tannic acid." *J Agric Food Chem* **17**(4): 772-777.
- Van Sumere, C. F., J. Albrecht, et al. (1975). "Plant proteins and phenolics." *Annu. Proc. Phytochem. Soc* **11**: 211-264.
- Vernhet, A., P. Pellerin, et al. (1996). "Charge properties of some grape and tannin wine polysaccharide and polyphenol fractions." *Am J Enol Vitic* **47**: 25-30.
- Volpicella, M., L. R. Ceci, et al. (2003). "Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors." *Eur J Biochem* **270**(1): 10-19.
- Wan, Y., J. A. Vinson, et al. (2001). "Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans." *Am J Clin Nutr* **74**(5): 596-602.
- Yan, Q. and A. Bennick (1995). "Identification of histatins as tannin-binding proteins." *Biochem J.*(311): 341–347.