

TMUP
233
2008

PORTO

IBMCO INEB

FC

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Daniel Carvalho

**Estudo de compostos fenólicos de bebidas
com potencial actividade anti-tumoral.
Efeitos biológicos *in vitro*.**

*Dissertação para Mestrado em Bioquímica na
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto*

QH604.7
CARd E
2008

Porto, 2008



FC

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto



D00011981

U. PORTO

FC

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

IBMC INEB

Laboratório Associado . Associate Laboratory

DANIEL OLIVEIRA CARVALHO

Licenciado em Bioquímica

**Estudo de compostos fenólicos de bebidas com
potencial actividade anti-tumoral.
Efeitos biológicos *in vitro*.**

*Dissertação para Mestrado em Bioquímica na
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto*

UNIVERSIDADE DO PORTO
BIBLIOTECA
Sala _____
Coloc. <u>TMUP</u> 233
N.º <u>20180</u>
Depart. Química

Universidade do Porto
Faculdade de Ciências
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

2008

Paula Gouveia

DANIEL OLIVEIRA CARVALHO

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

**Estudo de compostos fenólicos de bebidas com
potencial actividade anti-tumoral.
Efeitos biológicos *in vitro*.**

Orientador:

Professor Doutor Luís Guilherme de Lima Ferreira Guido, Professor Auxiliar no Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Co-orientador:

Doutor Alexandre do Carmo, do grupo CAGE do Instituto de Biologia Molecular e Celular.

Este trabalho de investigação científica foi realizado nos laboratórios CAGE do Instituto de Biologia Celular e Molecular, e nos laboratórios de Química Analítica e Qualidade Alimentar do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Instituto de Bebidas e Saúde



O trabalho beneficiou do apoio financeiro do Instituto de Bebidas e Saúde (iBeSa), através da concessão de uma bolsa de incentivo à pesquisa e investigação "P11-07".

Agradecimentos

Agora que concluo mais uma etapa do meu percurso académico, gostaria de agradecer a todos os que me apoiaram ao longo deste trabalho, e que de um modo geral estiveram do meu lado durante estes anos.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meus pais, que sempre me deram extremo apoio, me incentivaram e permitiram atingir todos os meus objectivos de vida até esta etapa.

Quero agradecer ao Professor Doutor Luís Ferreira Guido, orientador deste trabalho, pela total disponibilidade demonstrada, bem como pelo apoio, ajuda e interesse manifestados.

Ao Professor Doutor Alexandre do Carmo pelo interesse demonstrado e por me ter acolhido no seu laboratório.

Ao Simon Monard, técnico e responsável pelos instrumentos de citometria de fluxo do IBMC, pela ajuda concedida na análise dos resultados.

Ao Mestre Paulo Magalhães pelos sábios conselhos na resolução dos problemas, pelo imenso apoio demonstrado, toda a ajuda dedicada, e pelo enorme trabalho na extracção e purificação do xanto-humol cedido.

À Doutora Carla Oliveira e ao Doutor Valdemar Máximo do IPATIMUP, por gentilmente terem cedido a linha celular de cancro da tiróide para o trabalho.

Ao Professor Doutor Aquiles Barros, responsável pelo grupo de Química Analítica e Qualidade Alimentar (Requimte) por me ter acolhido no seu laboratório.

A todos os meus colegas de laboratório, pelo excelente ambiente em laboratório, pelos muitos e bons momentos proporcionados e toda a ajuda prestada.

Não posso também deixar de agradecer ao Engenheiro José Machado Cruz, representante do iBeSa, pela bolsa de investigação concedida e todo o interesse demonstrado ao longo da realização do trabalho de investigação.

Em último lugar, mas de todo não menos importante, agradeço muito à Raquel Costa pelo seu apoio incondicional, e a todos os meus amigos que de modo directo ou indirecto me apoiaram e estiveram comigo na concretização desta etapa.

A todos, os meus mais sinceros agradecimentos.

“NA CIÊNCIA, O CRÉDITO VAI PARA O HOMEM QUE CONVENCE O MUNDO DE
UMA IDEIA, NÃO PARA AQUELE QUE A TEVE PRIMEIRO”

WILLIAM OSLER

Índice geral

Agradecimentos	5
Índice	9
Índice de figuras	13
Índice de tabelas	17
Resumo	19
Abstract.....	21
Lista de abreviaturas	23

Índice

1	Introdução teórica	27
1.1	Compostos fenólicos	27
1.2	Química dos compostos fenólicos	27
1.2.1	Ácidos fenólicos	30
1.2.2	Flavonóides	30
1.2.3	Flavonóis	33
1.2.4	Flavanóis	34
1.2.5	Flavanonas	35
1.3	Os polifenóis e a saúde humana	36
1.3.1	Cancro	37
1.4	Métodos para a determinação da capacidade anti-proliferativa e citotóxica	38
1.4.1	Método colorimétrico da sulforodamina B (SRB)	38
1.4.2	Técnica de citometria de fluxo	39
1.5	Apoptose celular	41
1.5.1	Análise em gel de agarose do perfil de fragmentação de ADN	42
1.5.2	TUNEL (TdT-mediated dUTP nick-end labeling)	43
1.6	A oxidação	44
1.7	Metodologias analíticas para a determinação do poder anti-radicalar	46
1.7.1	Método do DPPH	46
1.7.2	Método da desoxirribose	48
1.8	Relação estrutura/actividade antioxidante dos polifenóis	50
1.9	Objectivos do trabalho	51
2	Material e métodos	55
2.1	Culturas celulares	55
2.1.1	Isolamento dos linfócitos T de sangue periférico	55
2.1.2	Descongelação das alíquotas	56
2.2	Preparação das soluções de polifenóis e reagentes utilizados	56
2.3	Avaliação do efeito anti-proliferativo e citotóxico de diferentes polifenóis	57
2.3.1	Marcação celular com CFSE	57
2.3.2	Método colorimétrico SRB	58

2.4	Estabilidade do xanto-humol no meio de cultura	60
2.4.1	Preparação das amostras	60
2.4.2	Condições cromatográficas	61
2.5	Fotografias de contraste de fase	61
2.6	Viabilidade das células <i>TPC-1</i> pelo método de exclusão por azul de tripano	61
2.7	Contagem celular	62
2.8	Análise em gel de agarose do perfil de fragmentação de ADN	62
2.8.1	Preparação das amostras	62
2.8.2	Extracção de ADN genómico	62
2.8.3	Preparação do gel e análise das amostras tratadas	63
2.9	Apoptose celular por TUNEL	63
2.9.1	Preparação das amostras	63
2.9.2	Técnica TUNEL	63
2.10	Poder anti-radicalar dos compostos fenólicos pelo método do DPPH	64
2.10.1	Preparação das soluções	64
2.10.2	Análise espectrofotométrica	65
2.11	Poder anti-radicalar dos compostos fenólicos pelo método da desoxirribose	65
2.11.1	Preparação das soluções	65
2.11.2	Análise espectrofotométrica	66
2.12	Análise estatística	67
3	Resultados obtidos e discussão	71
3.1	Efeito anti-proliferativo e citotóxico de diferentes compostos fenólicos	71
3.1.1	Marcação celular com CFSE	71
3.1.2	Método colorimétrico SRB	78
3.2	Estabilidade do xanto-humol no meio de cultura	85
3.3	Efeito dos polifenóis na viabilidade das células <i>TPC-1</i> pelo método de exclusão por azul de tripano	85
3.4	Análise em gel de agarose do perfil de fragmentação de ADN	86
3.5	Apoptose celular por TUNEL	87
3.6	Determinação do poder anti-radicalar para diferentes compostos fenólicos pelo método DPPH	88

3.7 Determinação do poder anti-radicalar para diferentes compostos fenólicos pelo método da desoxirribose.....	91
3.8 Relação entre a actividade anti-proliferativa e a actividade anti-radicalar.....	92
4 Conclusões e perspectivas futuras	97
5 Referências bibliográficas	101
6 Anexos.....	109

Índice de figuras

1 Introdução teórica

Figura 1.1 - Representação da estrutura química de algumas classes de compostos fenólicos.....	29
Figura 1.2 - Representação estrutural dos polifenóis em estudo neste trabalho.....	29
Figura 1.3 - Representação da estrutura geral dos flavonóides.....	30
Figura 1.4 - Representação das estruturas base das classes mais importantes de flavonóides.....	31
Figura 1.5 - Esquema representativo da formação de flavonóides e outros polifenóis, a partir de p-coumaril CoA e malonil CoA.....	32
Figura 1.6 - Estrutura base da chalcona.....	32
Figura 1.7 - Isomerização do xanto-humol a isoxanto-humol.....	33
Figura 1.8 - Estrutura base dos flavonóis.....	34
Figura 1.9 - Estrutura base do núcleo flavânico.....	34
Figura 1.10 - Esquema representativo da transformação da naringina em naringenina, após hidrólise no aparelho digestivo por acção bacteriana e/ou ácida.....	36
Figura 1.11 -Representação dos constituintes de um citómetro de fluxo (Silva T. L. et al, 2002).....	39
Figura 1.12 - Representação esquemática de uma câmara de fluxo, onde se observa a formação de um fluxo laminar (Silva T. L. et al, 2002).....	40
Figura 1.13 - Representação da estrutura da molécula de CFSE.....	40
Figura 1.14 - Representação do esquema geral de marcação celular com CFSE, e das etapas envolvidas na estabilização do fluorocromo no interior das células (http://www.nature.com).	41
Figura 1.15 - Esquema representativo das vias apoptóticas (www.roche-applied-science.com).....	42
Figura 1.16 - Representação da fragmentação de ADN em multímeros de 180 pb, devido à ocorrência de apoptose (www.roche-applied-science.com).....	43
Figura 1.17 - Princípio da marcação de ADN pela técnica TUNEL (www.roche-applied-science.com).....	43
Figura 1.18 – Esquema representativo dos passos gerais que envolvem a marcação celular por TUNEL (www.roche-applied-science.com).....	44
Figura 1.19 - Reacção de redução do DPPH por um composto antioxidante (HOR).....	46
Figura 1.20 - Representação gráfica da percentagem de DPPH em função da concentração de amostra.....	47

3 Resultados obtidos e discussão

Figura 3.1 - Resultados obtidos por citometria de fluxo, após incubação de linfócitos T (linha celular Jurkat) com diferentes concentrações de naringenina, durante 24 horas e 6 dias de incubação. A – Distribuição das células em função do seu tamanho (FSC) e complexidade (SSC),

em que se definiu uma região contendo as células vivas; B – Intensidade de fluorescência, reflectindo o teor em CFSE em função do número de células, para cada ensaio realizado, na região definida em A (n=2). 71

Figura 3.2 - Número de células viáveis final em cada condição experimental estudada, de modo a estimar a morte celular durante 24 horas de incubação com naringenina em diferentes concentrações..... 72

Figura 3.3 - Resultados obtidos por citometria de fluxo, após incubação de linfócitos T (linha celular Jurkat) com diferentes concentrações de naringenina, durante 48 horas e mantidas em cultura durante 6 dias antes da aquisição com CFSE. A – Distribuição das células em função do seu tamanho (FCS) e complexidade (SSC), em que se definiu uma região contendo as células vivas; B – Intensidade de fluorescência, reflectindo o teor em CFSE em função do número de células, para cada ensaio realizado, na região definida em A (n=2)..... 73

Figura 3.4 - Número de células final em cada condição experimental estudada, de modo a estimar a morte celular durante 48 horas de incubação com naringenina..... 73

Figura 3.5 - Histograma representativo da análise por citometria de fluxo do teor em CFSE, após incubação da linha de linfócitos T Jurkat com diferentes concentrações de naringenina, durante 48 horas e 3 dias de incubação (n=2). 74

Figura 3.6 - Histograma obtido por citometria de fluxo, após incubação de PBLs com diferentes concentrações de naringenina, durante 48h e 3 dias de incubação (n=2)..... 75

Figura 3.7 - Percentagem de células vivas e mortas em cada situação estudada, de modo a estimar a morte celular durante 48 horas de incubação com naringenina..... 76

Figura 3.8 - Resultados obtidos por citometria de fluxo, após incubação de linfócitos T (linha celular Jurkat) com diferentes concentrações de xanto-humol, durante 48 horas e 3 dias de incubação. O gráfico traduz a intensidade de fluorescência, de acordo com teor de CFSE em função do número de células, para cada ensaio realizado (n=2). 77

Figura 3.9 - Efeito do número de células na acção do xanto-humol sobre as *TPC-1* (n=2). 78

Figura 3.10 - Valores de absorvância obtidos pelo método SRB, para células fixadas na presença e na ausência de meio de cultura. São também apresentados os resultados para as células em contacto com 0,1% de DMSO (A) e etanol (B) (n=3). 79

Figura 3.11 - Efeito de diferentes polifenóis no crescimento de uma linha celular de cancro da tiróide (*TPC-1*), após 48 horas de exposição. Os dados dizem respeito à média de 3 triplicados, com excepção da quercetina e da rutina (n=6). * Estatisticamente significativo, $p \leq 0,05$ 80

Figura 3.12 - Valores de absorvância obtidos para as diferentes condições estudadas, com referência ao valor de absorvância no momento da adição dos polifenóis (t=0) (n= 9, com excepção da quercetina e da rutina (n=6)). 81

Figura 3.13 - Efeito do xanto-humol no crescimento de uma linha celular de cancro da tiróide (*TPC-1*), após 24, 48 e 72 horas de exposição (n=2). 82

Figura 3.14 - Quantidade de xanto-humol no meio de cultura ao fim de 24, 48 e 72 horas, e a diferentes concentrações. * Estatisticamente significativo, $p \leq 0,05$ (n=3). 85

Figura 3.15 - Determinação da actividade anti-proliferativa e do efeito citotóxico do xanto-humol e da naringenina, com base no método de contagem celular com azul de tripano (n=2).....	86
Figura 3.16 - Gel de electroforese do ADN isolado das TPC-1 tratadas com etanol (controlo), xanto-humol e quercetina (100 µM), durante 24 horas. O marcador de peso molecular está assinalado como PM (1 Kb).....	87
Figura 1.17 - Efeito do xanto-humol e da quercetina na percentagem apoptótica das TPC-1, pela análise de TUNEL. O gráfico representa a percentagem de células apoptóticas por comparação com todos os núcleos corados com DAPI. O tratamento com os compostos fenólicos provocou um aumento significativo da morte celular por apoptose, na concentração testada. *Estatisticamente significativo, $p \leq 0,05$ (n=3)	88
Figura 3.18 - Representação gráfica da percentagem de DPPH existente no meio reaccional em função da concentração de composto estudado.	89
Figura 3.19 - Comparação das percentagens de PAR para os compostos fenólicos analisados (n=2).	90
Figura 3.20 - Representação da percentagem de inibição de radicais livres por diferentes polifenóis, pelo método da desoxirribose (n=2).....	92

6 Anexos

Figura A.1 - Imagens de contraste de fase das células nas diferentes condições estudadas, com ampliação de 20x. Verifica-se, com o aumento da concentração de naringenina, um aumento da morte celular, por alteração da forma das células quando comparando com o controlo. Neste último as células apresentam forma esférica, com evidência nítida do núcleo e citoplasma (brilhante), adquirindo um aspecto irregular e sem brilho com a morte.....	109
Figura A.2 - Imagens de contraste de fase das células TPC-1 em contacto com diferentes concentrações de compostos fenólicos, com ampliação de 20x. Verifica-se, com o aumento da concentração de polifenol, uma diminuição do número de células, e em alguns casos (xanto-humol e quercetina) morte celular. Neste último caso as células são praticamente inexistentes, e perdem a forma que as caracteriza quando estão confluentes. Verifica-se que o xanto-humol foi mais eficaz a 100 µM, com um efeito também evidente mas mais fraco a 10 µM. A naringenina apenas inibiu ligeiramente a divisão e crescimento das TPC-1 a 100 µM.....	111

Índice de tabelas

2 Material e Métodos

Tabela 2.1 - Características dos compostos fenólicos estudados.....	56
Tabela 2.2 - Características dos solventes utilizados.....	57
Tabela 2.3 - Características da pré-coluna e da coluna utilizadas no sistema cromatográfico.....	60
Tabela 2.4 - Modo de preparação das soluções de DPPH.....	65
Tabela 2.5 - Modo de preparação da mistura reaccional nas células espectrofotométricas.....	65
Tabela 2.6 - Modo de preparação das soluções para o método da desoxirribose.....	66

3 Resultados obtidos e discussão

Tabela 3.1 - Média de fluorescência para cada condição analisada.....	75
Tabela 3.2 - Mediana de fluorescência para cada condição analisada.....	77
Tabela 3.3 - Valores de EC ₅₀ determinados com base nos diferentes tempos de exposição com xanto-humol, e em diferentes gamas de concentração.....	83
Tabela 3.4 - Parâmetros das regressões lineares e valores de EC ₅₀ e PAR para os compostos fenólicos analisados.....	89

Resumo

Os compostos fenólicos apresentam, para além da capacidade antioxidante, importantes actividades anti-virais, anti-alérgicas, anti-inflamatórias e anti-tumorais.

O principal objectivo deste trabalho foi a avaliação do efeito anti-proliferativo de polifenóis presentes em bebidas (naringenina, xanto-humol, ácido gálico, catequina, rutina e quercetina) numa linha celular de cancro humano da tiróide (*TPC-1*), usando o método colorimétrico da sulforodamina B (SRB). O corante liga-se a aminoácidos básicos e a avaliação colorimétrica permite determinar o número total de células e, conseqüentemente, a viabilidade celular, por relação directa com a quantidade de proteínas totais. Os resultados obtidos permitem concluir que o xanto-humol é, entre os compostos estudados, o mais efectivo na inibição da divisão das *TPC-1* a 100 μM e a quercetina a 10 μM . A rutina foi pouco efectiva em todas as concentrações testadas (entre 0,1 e 100 μM), com um efeito pouco dependente da concentração, ao passo que a catequina não inibe a divisão e crescimento das *TPC-1*. Os outros compostos fenólicos (naringenina e ácido gálico) foram efectivos na máxima concentração testada (100 μM). Verificou-se ainda que a quercetina apresenta efeito citotóxico a 10 μM , enquanto o xanto-humol apenas a 100 μM , na gama de concentrações referida. A inibição do crescimento das *TPC-1* pela naringenina, rutina e pelo ácido gálico deve-se à inibição da sua divisão (efeito anti-proliferativo), e não devido ao efeito citotóxico. Num estudo mais detalhado para o xanto-humol, este não revelou citotoxicidade para concentrações inferiores a 20 μM . A acção do xanto-humol e da naringenina foi confirmada por contagem celular com azul de tripano.

A técnica de citometria de fluxo foi aplicada numa linha celular de linfócitos T de leucemia (*Jurkat E6.1*), de modo a complementar os resultados do método SRB obtidos para o xanto-humol e para a naringenina, com resultados semelhantes. O efeito da naringenina sobre PBLs (peripheral blood lymphocytes), também por esta técnica, provou que este tipo de compostos podem actuar igualmente sobre células humanas.

Foram estudados compostos com efeito citotóxico, de modo a determinar se induzem a apoptose nestas células por análise de fragmentação de ADN em gel de agarose e por TUNEL. O xanto-humol é capaz de induzir a apoptose nas *TPC-1*, tornando-o um possível agente contra o cancro da tiróide em humanos. A quercetina não é capaz de induzir a fragmentação de ADN nas *TPC-1*, mas mostrou um pequeno efeito apoptótico pela técnica TUNEL.

Foi analisada a possível existência de uma relação entre o efeito anti-proliferativo e actividade anti-radicalar, determinada pelo método do DPPH e pelo método da desoxirribose, não se verificando qualquer tipo de relação.

Abstract

Phenolic compounds have important activities such as antioxidant, anti-viral, anti-allergic, anti-inflammatory and anti-tumoral capacity, and could be found in food, tea, fruit juices and beer.

The principal aim of this study was the evaluation of anti-proliferative effect of flavonoids in beverages (naringenin, xanthohumol, gallic acid, catechin, rutin and quercetin) in a human thyroid cancer cell line (*TPC-1*), using the sulforhodamine B (SRB) colorimetric assay. The dye binds to basic amino acids of cellular proteins and colorimetric evaluation allows the determination of the number of cells and consequent cellular viability, direct related with total protein content. The results obtained show that xanthohumol at 100 μM is the most effective on division of *TPC-1*, and quercetin at 10 μM . Rutin is lower effective in the all range of concentrations tested (0.1-100 μM), and catechin doesn't inhibit *TPC-1* division and growth. The other polyphenolic compounds (naringenin and acid gallic) were effective at the maximum concentration. Data supports that quercetin reveals cytotoxic effect at 10 μM , and xanthohumol only at 100 μM at the range of concentrations tested (0,1-100 μM). Naringenin, rutin and gallic acid inhibit cell growth by division inhibition (anti-proliferative effect), with no cytotoxic effect. A more detailed approach to xanthohumol allows to conclude that this compound is not cytotoxic at concentrations bellow 20 μM . Growth inhibition of *TPC-1* cells by xanthohumol and naringenin was confirmed by cell counting with trypan blue.

Flow cytometry was applied as complementary technique to SRB assay, for xanthohumol and naringenin, in a cell line of leukaemia T lymphocytes (*Jurkat E6.1*). The results were very similar in the two methods. The effect of naringenin in PBLs shows that this type of compounds could have the same action in human cells.

Compounds with cytotoxic effect were studied by the method of agarose gel analysis of DNA fragmentation and TUNEL to determinate whether compounds induce apoptosis in *TPC-1*. Xanthohumol is able to induce apoptosis in *TPC-1*, and quercetin is not able to induce DNA fragmentation but have a low apoptotic effect by TUNEL.

On the other hand, in this study a possible relationship between anti-proliferative effect and anti-radicalar activity was investigated. With this aim, the DPPH method and deoxyribose assay were used, and any relationship between those was verified.

Lista de abreviaturas

- ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
- ADN – ácido desoxirribonucleico
- CFDA-SE – carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
- CFSE – carboxyfluorescein succinimidyl ester
- CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
- DAD – dyode-array detection
- DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- dUTP - deoxyuridine triphosphate
- EC₅₀ – concentração efectiva para uma resposta de 50%
- EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
- FBSI - soro fetal de bovino inactivado
- FSC – forward scatter
- HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
- HBSS – Hank's buffered salt solution
- HPLC – high performance liquid chromatography
- MDA – malonaldeído
- PAR – poder anti-radicalar
- PBL – peripheral blood lymphocyte
- PBS – solução tampão fosfato
- PHA – phytohemagglutinin
- PMBC – peripheral blood mononuclear cell
- PVPP - polivinilpolipirrolidona
- RBC – red blood cell
- ROS – espécies reactivas de oxigénio
- SRB – sulforodamina B
- SSC – side scatter
- TBA – ácido tiobarbitúrico
- TCA – ácido tricloroacético
- TdT - terminal deoxynucleotidyl transferase
- TUNEL - terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling
- RPMI - Roswell Park Memorial Institute

1 Introdução teórica

- 1.1 Compostos fenólicos
 - 1.2 Química dos compostos fenólicos
 - 1.3 Os polifenóis e a saúde humana
 - 1.4 Métodos para a determinação da capacidade anti-proliferativa e citotóxica
 - 1.5 Apoptose celular
 - 1.6 A oxidação
 - 1.7 Metodologias analíticas para a determinação do poder anti-radicalar
 - 1.8 Relação estrutura/actividade antioxidante dos polifenóis
 - 1.9 Objectivos do trabalho
-

1 INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos caracterizam-se por conterem na sua estrutura vários anéis benzénicos substituídos por grupos hidroxilo. Estes compostos desempenham um papel importante na vida das plantas, encontrando-se em todos os seres vivos vegetais superiores (Landrault *et al.*, 2002). Normalmente designados por polifenóis, são sintetizados pelas plantas como resultado do seu metabolismo secundário e possuem estruturas químicas diversas, complexas e muito heterogéneas. Intervêm directamente na pigmentação, crescimento, reprodução e protecção das plantas contra infecções e agentes agressores (Naczki *et al.*, 2004).

Devido às suas características e propriedades antioxidantes, os polifenóis desempenham um papel importante na nutrição e na saúde humana. Um grande conjunto de estudos realizados demonstra que os flavonóides (uma das classes mais importantes dos polifenóis) possuem um efeito protector sobre o sistema cardiovascular, além de propriedades anti-virais, anti-alérgicas e anti-carcinogénicas. Estes compostos são actualmente usados como agentes antibióticos, anti-inflamatórios e anti-carcinogénicos, bem como no tratamento de outros problemas relacionados com a saúde como alergias, colesterol e hipertensão (Bravo, 1998). Os compostos fenólicos possuem grande importância na alimentação uma vez que, para além das propriedades referidas anteriormente, estão directa ou indirectamente relacionados com a qualidade dos géneros alimentícios, contribuindo para a sua cor, sabor, odor, adstringência e estabilidade oxidativa (Naczki *et al.*, 2004).

Dada a sua importância físico-química, organoléptica, taxonómica, nutricional e farmacológica, estes compostos têm suscitado um enorme interesse ao nível da investigação científica, pelo que neste capítulo será feita uma breve abordagem a aspectos químicos e à sua relação com a saúde humana.

1.2 Química dos compostos fenólicos

Os polifenóis constituem um amplo grupo de substâncias químicas, consideradas metabolitos secundários das plantas, com diversas, complexas e heterogéneas estruturas químicas. Tratam-se de substâncias químicas contendo um anel benzénico com um ou mais grupos hidroxilo (-OH) na sua estrutura, incluindo os seus derivados funcionais (ésteres, ésteres metílicos, glicósidos, entre outros). A nível biológico, a sua síntese pode

ser proveniente da via do xiquimato ou da via do acetato, sendo que os compostos com estruturas mais complexas podem ser formados devido à união de dois fragmentos fenólicos provenientes, cada um deles, de uma via diferente, como é o caso dos flavonóides (Bravo, 1998).

A natureza ácida dos polifenóis, responsável pelas suas propriedades químicas, é devida à quebra propícia da ligação oxigénio-hidrogénio que leva à formação de um anião fenóxido estável. O anião é estabilizado por deslocalização da carga negativa pelos diversos carbonos no anel aromático. Apesar de todos os compostos fenólicos exibirem propriedades ácidas, o seu grau de ionização é modificado pela presença de substituintes no anel aromático, o que explica a diferente natureza química destes compostos (Rodríguez, 1999; Gross *et al.*, 2001). A actividade antioxidante dos polifenóis está relacionada com a sua capacidade de quelatar iões metálicos, que por sua vez está relacionada com a sua acidez e deslocalização da carga negativa.

Os polifenóis variam de moléculas simples, como os ácidos fenólicos e os ácidos benzóicos, a compostos altamente polimerizados, como os taninos. Este grupo de compostos existe nas plantas sob a forma conjugada, com uma ou mais moléculas de açúcares unidas a grupos hidroxilo, surgindo em alguns casos ligações directas entre a molécula de açúcar e um carbono aromático. Por esta razão, a forma mais comum de os encontrar na natureza é sob a forma de glicósidos, solúveis em água e solventes orgânicos. Os açúcares associados aos polifenóis podem ser monossacáridos, dissacáridos ou oligossacáridos, sendo os mais frequentes a glucose, galactose e a xilose. Podem também encontrar-se livres ou unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgânicos, aminas, lípidos e outros compostos fenólicos (Bravo, 1998).

Não existe unanimidade na divisão dos compostos fenólicos por famílias químicas. No entanto, de acordo com Harborne (1998), os polifenóis podem ser agrupados em pelo menos dez classes diferentes, dependendo da sua estrutura química base. Na figura 1.1 são apresentadas as estruturas químicas básicas das principais classes de polifenóis.

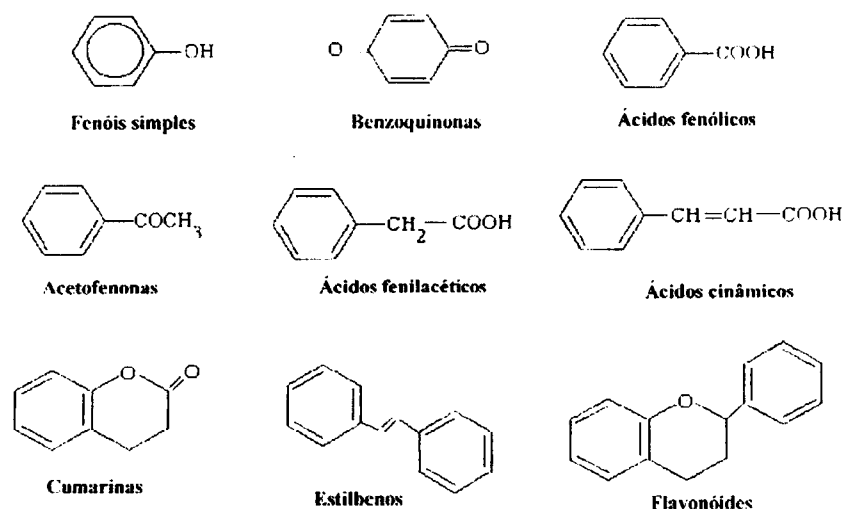


Figura 1.1 - Representação da estrutura química de algumas classes de compostos fenólicos.

No grupo de compostos fenólicos de baixo peso molecular, destacam-se os derivados dos fenóis simples e os flavonóides devido à sua importância. Dentro da classe dos flavonóides estão incluídos a naringenina, o xanto-humol, a catequina, a quercetina e a rutina, compostos de interesse neste trabalho. Foi também estudado o ácido gálico, um ácido fenólico (figura 1.2).

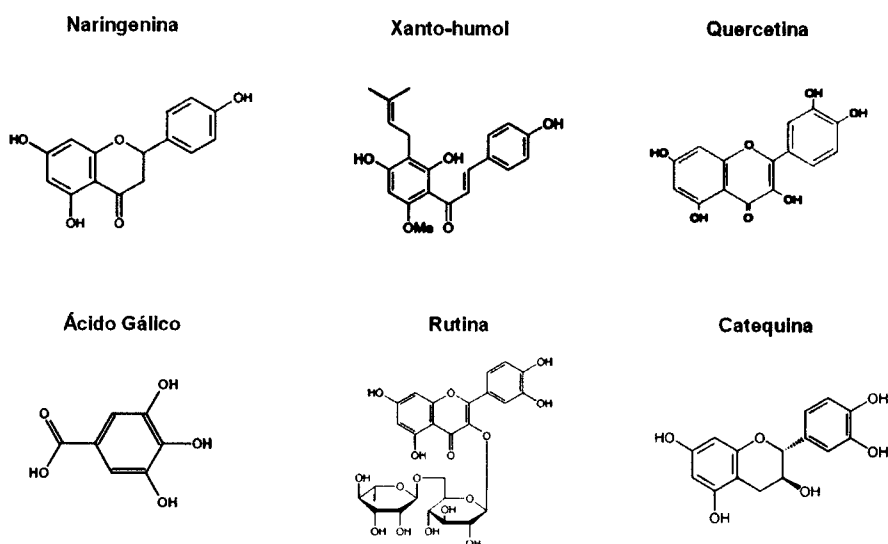


Figura 1.2 - Representação estrutural dos polifenóis em estudo neste trabalho.

1.2.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos, como o ácido gálico (figura 1.2), são frequentemente encontrados em plantas superiores. Podem ser encontrados na sua forma livre, com excepção dos correspondentes ésteres (metílicos e etílicos) e glicósidos que se encontram frequentemente conjugados (Bravo, 1998).

1.2.2 Flavonóides

Os flavonóides encontram-se presentes em alimentos de origem vegetal, e são muito importantes em termos nutricionais e biológicos (Kanaze *et al.*, 2004). Encontram-se amplamente distribuídos em frutos, vegetais, sumos de fruto, cacau, chás, vinhos e cervejas. Os polifenóis em questão podem ser encontrados no estado livre (agliconas), mas estão presentes quase exclusivamente na sua forma β -glicosilada (Kanaze *et al.*, 2004), onde os açúcares se podem ligar a um ou mais locais da molécula, tendo sido já identificados mais de 5000 flavonóides diferentes (Harnly *et al.*, 2006). Os glicósidos formam-se através da união de resíduos de D-glucose à posição 3 ou à posição 7 destes flavonóides, sendo a primeira substituição a mais frequente. Outras moléculas de açúcar que também se podem encontrar ligadas a este tipo de compostos são a D-galactose, a L-ramnose, a L-arabinose, a D-xilose e o ácido D-glucorónico (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

A sua presença na natureza sob a forma de glicósidos favorece a absorção intestinal e uma maior biodisponibilidade (Yilmaz *et al.*, 2004). No entanto, a forma aglicosilada permite maior reactividade na neutralização de radicais livres (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Estima-se que o valor médio diário de ingestão de flavonóides seja de 23 mg/dia, sendo os flavonóis os predominantes. A sua excreção ocorre primordialmente pela urina, dada a sua solubilidade em água (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Estes compostos fenólicos são constituídos por um esqueleto $C_6-C_3-C_6$, consistindo a sua estrutura básica em dois anéis aromáticos unidos por um anel pirano (figura 1.3), onde os átomos de carbono do anel C e A estão numerados de 2 a 8, e os carbonos do anel B de 1' a 6'. Têm origem biossintética mista, em que a sua formação ocorre pela união de uma sub-unidade fenólica (anel A),

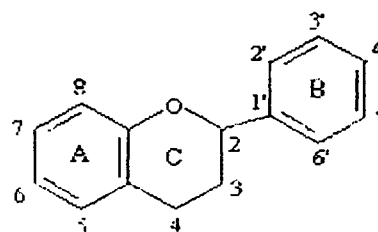


Figura 1.3 - Representação da estrutura geral dos flavonóides.

proveniente da via do acetato, a uma sub-unidade da via do xiquimato, constituída por um anel aromático (anel B) ligado a uma cadeia com três átomos de carbono.

Esta classe de polifenóis pode ser dividida em diversas famílias, dependendo do grau de oxidação do anel pirano (estrutura base). As classes mais importantes são seguidamente referenciadas e estão representadas na figura 1.4.

-Chalconas: não possuem anel pirano, uma vez que não ocorre ciclização entre o oxigénio da posição 1 e o carbono da posição 2;

-Flavonas: com uma insaturação entre os carbonos das posições 2 e 3;

-Flavonóis: o anel pirano está insaturado entre as posições 2 e 3, e hidroxilado na posição 4;

-Flavanóis: o anel pirano é saturado, hidroxilado na posição 3 e a função oxo não existe (posição 4);

-Flavanonas: o anel pirano está saturado;

-Antocianidinas: o anel pirano está insaturado entre as posições 3 e 4, e hidroxilado na posição 3.

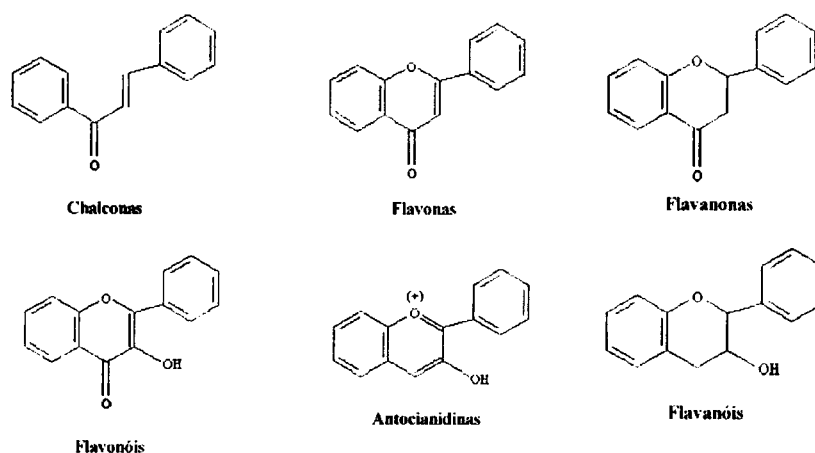


Figura 1.4 - Representação das estruturas base das classes mais importantes de flavonóides.

A formação dos flavonóides ocorre a partir da reacção do composto *p*-cumaril CoA com três moléculas de malonil CoA, levando à formação de chalconas, que ciclizam sob condições ácidas originando flavanonas (figura 1.5), como a naringenina (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

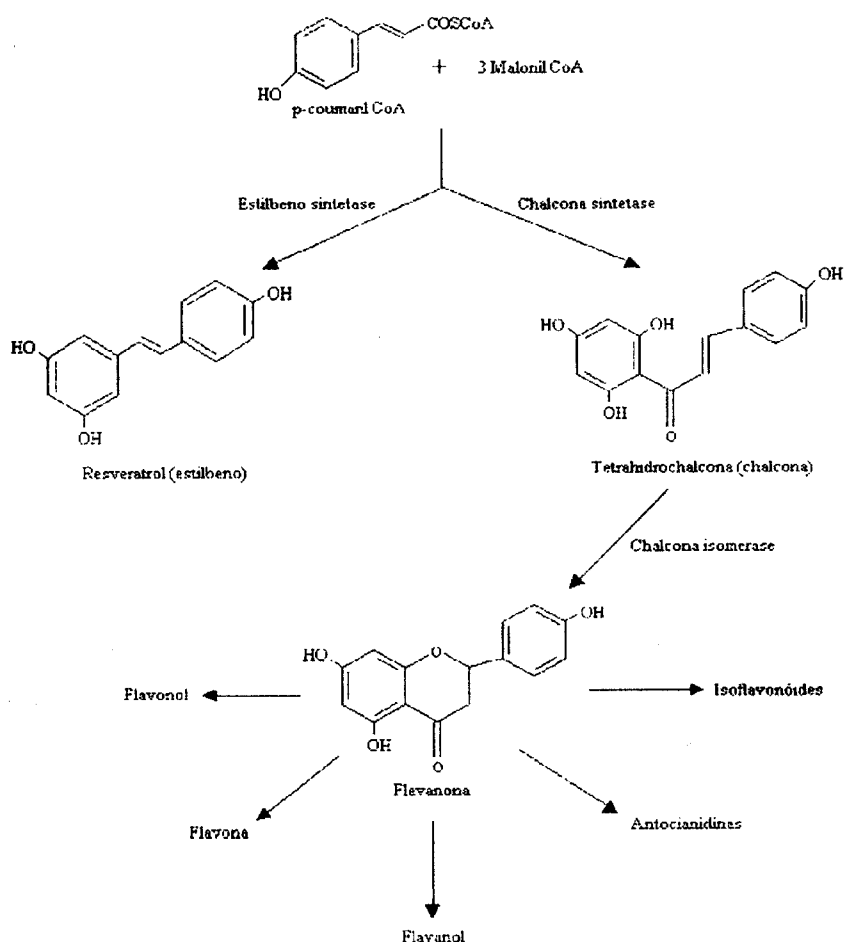


Figura 1.5 - Esquema representativo da formação de flavonóides e outros polifenóis, a partir de p-coumaril CoA e malonil CoA.

De seguida irá ser feita uma breve descrição dos compostos estudados, e das suas implicações a nível da saúde.

1.2.2.1 Chalconas

O termo chalcona caracteriza uma família de compostos possuindo como núcleo fundamental o 1,3 – difenilpropano, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupo cetona e/ou de um grupo hidroxilo (figura 1.6). Como vimos anteriormente, as chalconas são precursoras na via biossintética dos flavonóides.

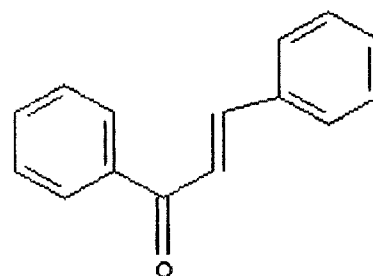


Figura 1.6 - Estrutura base da chalcona.

Uma das características mais marcantes nestes compostos é a pigmentação amarela que se torna vermelha em meio alcalino. As

chalconas são geralmente identificadas nas plantas, tendo um papel fundamental em sistemas ecológicos em função das cores produzidas nos vegetais, pois promovem a polinização como atraentes de insectos e/ou pássaros (Naczki *et al.*, 2004; Bravo, 1998).

O xanto-humol é um flavonóide prenilado que pertence à família das chalconas. Já foi identificado na planta de lúpulo (*Humulus Lupulus*), cujas flores femininas apresentam grande quantidade de resinas amargas e óleos essenciais, os quais conferem à cerveja o sabor amargo e o aroma característicos desta bebida (Stevens *et al.*, 2004), e também na planta medicinal chinesa *Sophora flavescens* (Gerhäuser *et al.*, 2005). Este prenilflavonóide tem recebido imensa atenção nos últimos anos, por lhe ter sido atribuído um importante efeito anti-proliferativo em células tumorais. Estudos comparativos de diferentes compostos fenólicos, revelaram que o xanto-humol foi o mais eficaz na frenagem da proliferação das células tumorais, demonstrando um efeito mais precoce e para concentrações mais baixas (Miranda *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004).

A concentração de xanto-humol na cerveja é muito baixa (0,002-0,69 mg/L) devido essencialmente à isomerização deste composto em isoxanto-humol (figura 1.7) durante a ebulição do mosto no processo de fabrico da cerveja (Stevens *et al.*, 1999). A fermentação, a filtração e a estabilização da cerveja com PVPP (polivinilpolipirrolidona) são igualmente responsáveis pelo baixo teor deste prenilflavonóide nesta bebida alcoólica.

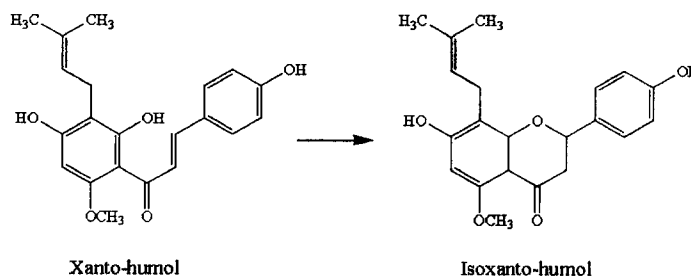


Figura 1.7 - Isomerização do xanto-humol a isoxanto-humol.

1.2.3 Flavonóis

Os flavonóis caracterizam-se pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupo hidroxilo na posição 3 (figura 1.8).

A quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona) é um flavonol que existe abundantemente nas plantas e está presente significativamente no vinho tinto, chá, maçã, cebola e em bebidas não alcoólicas. A quercetina também já foi identificada na cerveja, uma vez que o lúpulo contém este composto em quantidades significativas. É um dos flavonóides mais referenciados na literatura científica devido ao seu elevado potencial antioxidante, à prevenção de cardiopatias e cataratas em diabetes. Foram igualmente identificadas outras actividades, como anti-tumoral, imunológica, anti-inflamatória e anti-viral (Havsteen, 1983, Merck S.A., 2000). Dependendo da dieta, o consumo de quercetina na alimentação pode superar 500 mg diários (Havsteen, 1983). As suas propriedades antioxidantes manifestam-se através da inibição da peroxidação lípida, discutida mais à frente, por intermédio de vários mecanismos. Esta tem a capacidade para captar os radicais livres, exercendo assim um papel cito-protector em situações de perigo de lesões celulares (Havsteen, 1983; Merck S.A., 2000). Este composto revela ainda um papel relevante na parte cardiovascular, uma vez que provou diminuir a incidência de enfarte de miocárdio e derrames cerebrais (Rodríguez, 1999).

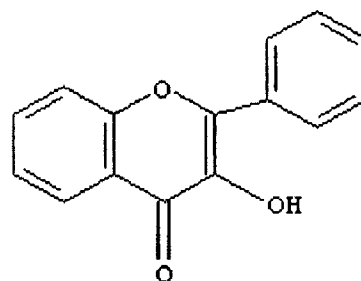


Figura 1.8 - Estrutura base dos flavonóis.

1.2.4 Flavanóis

De entre os flavanóis salientam-se os 3-flavanóis e os seus derivados estruturais – as proantocianidinas (taninos condensados). Os 3-flavanóis caracterizam-se por possuírem um anel heterocíclico saturado (anel C) onde os carbonos 2 e 3 são os centros assimétricos da molécula, resultando numa grande diversidade estrutural devido ao número e tipo de ligações entre as unidades básicas. Os 3-flavanóis encontram-se hidroxilados nos carbonos 5 e 7 do anel A e consoante o número de grupos hidroxilo presentes no anel B do núcleo flavânico e a estereoquímica do carbono 3 do anel C (figura 1.9), são classificados como catequinas, galocatequinas, epicatequinas e epigalocatequinas.

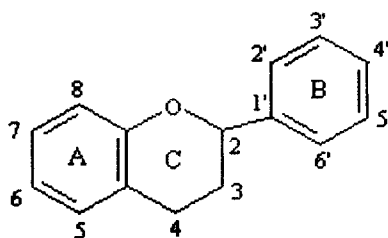


Figura 1.9 - Estrutura base do núcleo flavânico.

1.2.5 Flavanonas

As flavanonas funcionam como intermediárias das vias biossintéticas da maior parte dos flavonóides (figura 1.5). Caracterizam-se por possuírem um anel heterocíclico saturado (anel C) e um átomo de oxigénio na posição 4 (grupo carbonilo).

Estudos epidemiológicos indicam que o aumento do consumo de frutos e vegetais está associado a uma diminuição na incidência de doenças cardiovasculares (Bazzano *et al.*, 2002; Kris-Etherton *et al.*, 2002). Na verdade, os frutos e os sumos citrinos possuem um importante papel na dieta humana, contendo grandes quantidades de constituintes flavonóides. De entre os vários tipos de flavonóides presentes em frutos e vegetais, pode-se destacar a naringina (figura 1.10), muito abundante em citrinos (com referência à toranja e à laranja). Estes compostos têm sido utilizados como indicadores de qualidade, mas também têm sido investigados pelas suas propriedades farmacológicas.

Como referido, e a título de exemplo, a principal flavanona no sumo de toranja é a naringina (4'-5-7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglicósido), seguida da narirutina, dois isómeros glicosilados da naringenina. A quantidade de naringina pode variar entre 50 e 4000 ppm, dependendo da variedade do fruto, da sua maturidade, do método de produção do sumo (manual/comercial), e da marca do sumo comercial (Zhang *et al.*, 2004; Carvalho, 2007).

O estudo desenvolvido por Nogata e colaboradores (2006) faz referência à concentração de diferentes polifenóis, entre os quais a naringina, nos diferentes tecidos de citrinos. Chegaram à conclusão que este composto se encontra em elevada concentração no albedo (1900 mg/100 g peso fresco) e no flavedo (520 mg/100 g peso fresco), o que significa que a sua localização é maioritária no pericarpo. Sendo assim, métodos de extracção de sumo domésticos poderão não ser suficientes para a obtenção de sumos com elevadas quantidades de naringina (Carvalho, 2007).

Estudos sobre a distribuição destes flavonóides em citrinos (*Citrus*) demonstram que as flavanonas glicosiladas (7-O-glicosiflavanonas) são as mais abundantes em todas as espécies deste género, sendo as respectivas agliconas intermediários nos processos de biossíntese (Benavente-García *et al.*, 1995). As flavanonas glicosiladas são hidrolisadas no tracto gastrointestinal antes da absorção das respectivas agliconas. (Kanaze *et al.*, 2004; Yáñez *et al.*, 2005) (figura 1.10). De facto, após o consumo de naringina (através da ingestão de sumo de fruto ou naringina por si só), a naringenina é recuperada na urina onde praticamente não restam vestígios de naringina (Ameer *et al.*, 1996).

Muitas espécies citrinas acumulam elevadas quantidades de flavonóides durante o desenvolvimento dos seus diferentes órgãos (Benavente-García *et al.*, 1993; Castillo *et*

al., 1992). Possuem uma série de propriedades benéficas ao nosso metabolismo, podendo-se destacar a actividade anti-oxidante, directamente relacionada com a prevenção da peroxidação lipídica da membrana celular e com a protecção do dano oxidativo de substâncias com papel fisiológico, como a vitamina C e a adrenalina (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Para além destes, é revelado que os flavonóides presentes nos citrinos diminuem o colesterol e os lípidos sanguíneos, e possuem efeito anti-inflamatório e anti-carcinogénico (kanaze *et al.*, 2004). De facto, foi já demonstrado que compostos citrinos possuem efeitos a nível da proliferação celular, são capazes de inibir a angiogénese e a sinalização subcelular, e estimulam enzimas reparadoras de ADN (Gao *et al.*, 2006). Bastantes estudos foram desenvolvidos sobre estas capacidades e o poder antioxidante da naringenina e do consumo de citrinos em geral, num sistema *in vivo* em ratinhos (Andrade *et al.*, 2007; Gorinstein *et al.*, 2003; Gorinstein *et al.*, 2004).

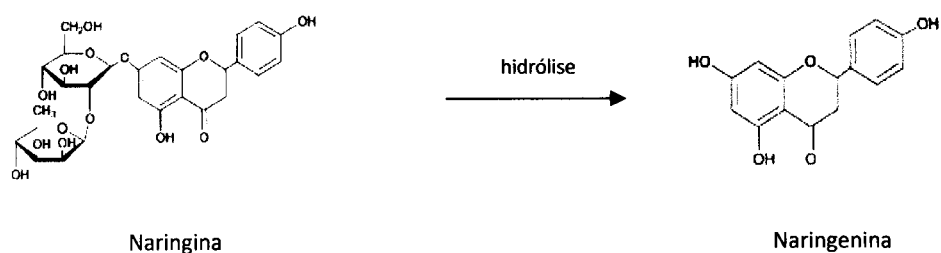


Figura 1.10 - Esquema representativo da transformação da naringina em naringenina, após hidrólise no aparelho digestivo por acção bacteriana e/ou ácida.

1.3 Os polifenóis e a saúde humana

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais abundantes na dieta humana. A estrutura química dos polifenóis pode afectar propriedades biológicas como a biodisponibilidade, actividade antioxidante, interações específicas com receptores celulares e enzimas, além de outras propriedades. Para entender o impacto na saúde humana, é essencial conhecer a natureza dos principais compostos fenólicos ingeridos, a sua origem dietética, as quantidades ingeridas em diferentes dietas, a sua biodisponibilidade e os factores que interferem na mesma (Scalbert *et al.*, 2000).

Os flavonóides, dos quais fazem parte os compostos em estudo neste trabalho, já foram detectados em diferentes bebidas como a cerveja, sumos e vinhos. A actividade antioxidante destes compostos está relacionada com a sua capacidade de quelatar iões metálicos e captar o oxigénio singlete, radicais superóxido e peroxinitrilo. Estas espécies oxigenadas e nitrogenadas reactivas podem reagir com os componentes celulares, tais

como o ADN, lípidos e proteínas, levando a lesões celulares e contribuindo para doenças crónicas (Cristobal *et al.*, 2000). A um consumo elevado de flavonóides tem sido associado uma diminuição na incidência de doenças cardiovasculares (Hertog, 1993).

Após estudarem a actividade anti-proliferativa de flavonóides do lúpulo, *in vitro*, em células de cancro da mama, do cólon e do ovário humanos (Miranda *et al.*, 1999), chegaram à conclusão que o xanto-humol e o isoxanto-humol desempenham um potencial papel quimiopreventivo contra estes tipos de cancro. Num outro estudo, Wang e seus colaboradores (2007) demonstraram que a naringenina apresentou uma elevada capacidade anti-proliferativa sobre uma linha celular de cancro da mama (MCF-7).

Estudos sobre os factores etiológicos de vários tipos de cancro, e de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, revelaram um factor comum: o stress oxidativo. Como vimos anteriormente, o stress oxidativo em organismos vivos ocorre quando existe um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes endógenas, provocando danos nos tecidos através da modificação oxidativa de biomoléculas celulares essenciais (Korantzopoulous *et al.*, 2003). É, portanto, evidente que a prevenção ou diminuição das principais reacções de oxidação poderiam constituir uma forma importante de diminuir o risco de cancro e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, que afectam milhões de pessoas em todo o mundo. Diversas investigações têm mostrado que a presença de antioxidantes, principalmente polifenóis, em produtos naturais tais como vegetais, frutos, produtos à base de soja, chá verde ou preto, cacau e chocolate, e até vinho e cerveja, podem reduzir estas reacções de oxidação. São vários, e cada vez em maior número, os estudos sobre o efeito benéfico da ingestão de alimentos ricos em antioxidantes, em modelos animais e humanos.

Segue-se uma breve descrição da relação entre o consumo de compostos fenólicos e o cancro.

1.3.1 Cancro

O cancro é definido como um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento e proliferação incontrolados de células. Pode ser induzido pelo estilo de vida, por factores ambientais ou genéticos. O uso de agentes supressores, bloqueadores ao transformantes são tentativas de controlar o cancro, vias pelas quais os flavonóides podem actuar (Benavente-García, 2007). Os mecanismos celulares de actuação destes compostos ainda não estão completamente esclarecidos, mas estudos recentes mostram que os flavonóides possuem uma acção benéfica em várias vias biológicas relacionadas com esta doença (bio-activação carcinogénica, sinalização celular, regulação do ciclo celular, angiogénese e inflamação). A sua acção está fortemente associada à inibição celular e

actividade anti-proliferativa, relacionada com a estrutura destes compostos (Benavente-García, 2007).

Um estudo prospectivo, envolvendo cerca de 10000 indivíduos com idades compreendidas entre 15 e 99 anos, foi realizado na Finlândia com o objectivo de relacionar a ingestão de flavonóides dietéticos com o risco de cancro do pulmão e de outros neoplasmas malignos. Após um período de acompanhamento de 24 anos, foi registada uma redução no risco de cancro do pulmão de 50 % nos indivíduos com maior ingestão de flavonóides (Knekt *et al.*, 1997). À semelhança deste estudo, Le Marchand e seus colaboradores (2000) encontraram uma associação inversa entre o consumo de quercetina e o risco de cancro do pulmão, num estudo envolvendo 582 pacientes e 582 controlos.

O xanto-humol, isolado do lúpulo, é o fitoquímico com propriedades quimiopreventivas de cancro mais estudado nos últimos anos (Stevens *et al.*, 2004). Como agente quimiopreventivo de largo espectro, o xanto-humol actua através da inibição da activação metabólica da pró-carcinogénese, da indução de enzimas carcinogénico-destoxificantes e da inibição do crescimento tumoral numa fase inicial (Stevens *et al.*, 2004). Num estudo detalhado, Gerhäuser e seus colaboradores (2002) identificaram o xanto-humol e o isoxanto-humol como sendo potentes moduladores da actividade de enzimas envolvidas na destoxificação e metabolismo carcinogénicos.

Recentemente, investigadores da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e da Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto estudaram o efeito de diversos compostos fenólicos na diminuição da proliferação das células tumorais e concluíram que o xanto-humol foi o composto fenólico que apresentou, sobre o crescimento celular, um efeito inibitório mais potente, demonstrando um efeito mais precoce e para concentrações mais baixas (Silva *et al.*, 2004), tal como verificado por Miranda e seus colaboradores (1999).

1.4 Métodos para a determinação da capacidade anti-proliferativa e citotóxica

De modo a estudar o efeito dos compostos fenólicos sobre linhas celulares tumorais, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo e ao método da sulforodamina B, apresentadas em seguida.

1.4.1 Método colorimétrico da sulforodamina B (SRB)

O método SRB é utilizado para a determinação da densidade celular, com base na medição do conteúdo celular proteico por coloração com sulforodamina B. Consiste num

desenvolvimento experimental bastante simples em placas de 96 poços, onde após um período de incubação as células são fixadas com ácido tricloroacético e coradas com SRB, e o excesso de corante é removido com ácido acético. O corante fica ligado electrostaticamente e de modo dependente do pH a aminoácidos básicos de proteínas celulares, e é solubilizado com a adição de tampão Tris para determinação espectrofotométrica. O método tem sido otimizado de modo a diminuir os poucos passos susceptíveis de erros, com referência ao passo de fixação celular, onde o meio de cultura é removido antes do passo de fixação (Papazisis *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 1999).

Os resultados são lineares para valores elevados de células e apresenta elevada sensibilidade, sendo que a sua resolução é de 1000-2000 células por poço. Este tipo de análise permite uma coloração não destrutiva, bastante estável e com absorvâncias na zona do visível (Skehan *et al.*, 1990). Permite ainda a análise de um elevado número de amostras em simultâneo, não requerendo aparelhos complexos e reagentes caros (Vanicha *et al.*, 2006). Tem ainda a vantagem de ser bastante eficiente e reprodutível, e um método economicamente acessível e prático para estudos onde se pretende determinar a citotoxicidade e actividade anti-proliferativa de diversos compostos químicos (Skehan *et al.*, 1990; Voigt, 2005).

1.4.2 Técnica de citometria de fluxo

(Lyons, 2000; Lyons, 1999; Lyons & Parish, 1994; Silva T. L. *et al.*, 2002)

A técnica de citometria de fluxo é desenvolvida recorrendo a um instrumento denominado citómetro de fluxo. Trata-se de um sistema constituído por vários elementos: uma fonte de radiação (lâmpada de mercúrio ou laser), uma câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para selecção do comprimento de onda, fotodíodos ou fotomultiplicadores para detecção e processamento de sinais, e uma unidade de processamento dos dados obtidos (figura 1.11).

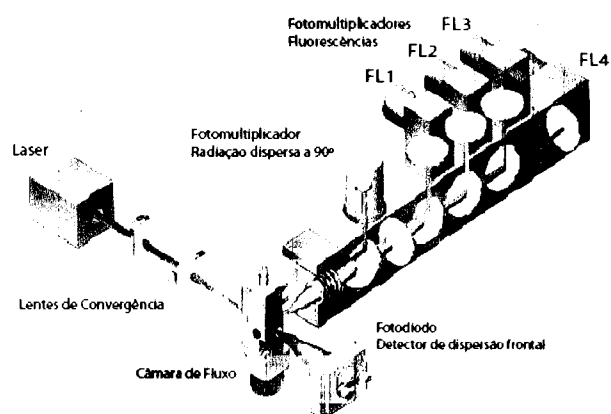


Figura 1.11 -Representação dos constituintes de um citómetro de fluxo (Silva T. L. *et al.*, 2002).

A base de funcionamento do citómetro permite que uma suspensão celular injectada na câmara a atravesse, ocorrendo a passagem individual das células através do feixe de radiação, situado perpendicularmente ao fluxo. A passagem individual das células é originada por focagem hidrodinâmica do fluxo da amostra, em que esta é injectada no seio de uma solução salina (*sheat fluid*) que também atravessa a câmara juntamente com a amostra (figura 1.12). É a diferença de velocidades entre os dois fluidos que permite que o fluxo se desenvolva em regime laminar, sendo a velocidade de escoamento da solução de revestimento (*sheat fluid*) superior à da amostra, e ajustável, permitindo assim uma redução e controlo da espessura da solução amostra de forma a passar uma célula de cada vez. Deste modo, podem ser detectadas até 10000 células (eventos) por segundo, pelo que se trata de uma técnica instrumental tremendamente rápida, fiável e com numerosas aplicações.

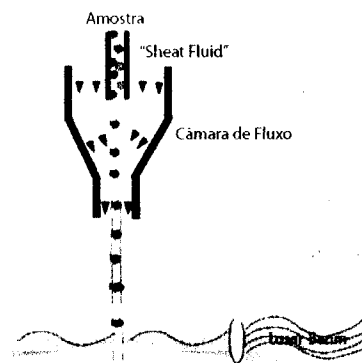


Figura 1.12 - Representação esquemática de uma câmara de fluxo, onde se observa a formação de um fluxo laminar (Silva T. L. et al, 2002).

Ao interceptar a célula, o feixe de radiação pode sofrer dispersão na direcção frontal ou lateral, sendo detectada directamente pelos fotodíodos ou desviada 90° por lentes antes de ser detectada. A combinação destas radiações permite obter informação acerca das dimensões celulares, da granularidade/complexidade e da morfologia. Assim, é possível distinguir células mortas e células vivas, permitindo determinar de modo fiável percentagens de células viáveis e não-viáveis.

De modo a possibilitar a detecção celular por citometria pode-se recorrer a compostos intracelulares fluorescentes (clorofilas, NAD(P)H, entre outros) ou a corantes fluorescentes (fluorocromos).

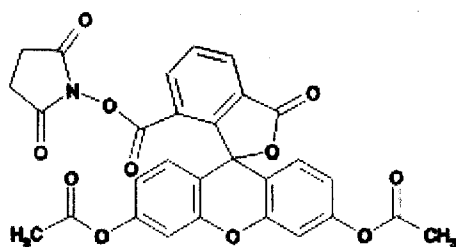


Figura 1.13 - Representação da estrutura da molécula de CFSE.

No que diz respeito a este trabalho foi utilizado o marcador CFSE (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*) para possibilitar o seguimento da proliferação de linhas celulares de linfócitos T. O CFSE consiste numa molécula fluorescente com dois grupos acetato e um éster como grupo funcional (figura 1.13).

A forma diacetato do CFSE é uma molécula não tóxica e sem fluorescência, o CFDA-SE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*), que se difunde passivamente para o

interior das células. Uma vez no interior da membrana citoplasmática de células viáveis, as esterases removem os grupos acetil do diacetato e formam um composto fluorescente (CFSE). Esta molécula é retida dentro das células ou à sua superfície, e está impossibilitada de sair das células por ligações a grupos amina de proteínas (figura 1.14). Aquando da divisão celular o CFSE segrega-se igualmente entre as células-filhas o que resulta numa divisão sequencial da intensidade de fluorescência celular ao longo das sucessivas gerações de células (possível até 10 gerações).

A técnica de marcação com CFSE permite análises quer *in vivo* quer *in vitro*, o que apresenta uma enorme vantagem em termos de investigação de cinética de proliferação e diferenciação celulares.

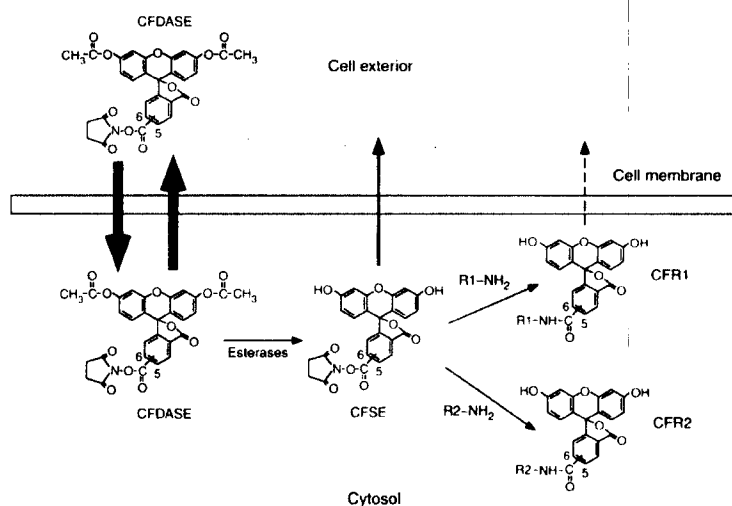


Figura 1.14 - Representação do esquema geral de marcação celular com CFSE, e das etapas envolvidas na estabilização do fluorocromo no interior das células (<http://www.nature.com>).

1.5 Apoptose celular

A apoptose é crucial em muitos processos biológicos, consistindo num acontecimento geneticamente programado que leva à morte celular em determinadas circunstâncias. Este processo permite a homeostasia celular, balanceando a proliferação celular, pelo que a sua desregulação provoca determinadas patologias, tais como o cancro, a doença de Alzheimer e a SIDA. Como tal, no desenvolvimento e degeneração celular a apoptose acompanha a proliferação celular.

Existem dois tipos de morte celular: apoptose e necrose. A necrose é um tipo de morte celular accidental, que provoca a destruição da membrana celular devido a lise e consequente libertação dos organelos, estando por isso associada à inflamação. Em contraste, a apoptose é altamente regulada, ocorrendo em células isoladas. Neste tipo de

morte celular ocorre a libertação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma que provoca alterações no potencial de membrana mitocondrial. De seguida, a activação das caspases leva à clivagem de proteínas relacionadas com a apoptose (figura 1.15). Um dos acontecimentos mais importantes é a condensação e degradação do ADN, antes da digestão das vesículas resultantes pelos macrófagos (www.roche-applied-science.com). São estas alterações morfológicas que permitem que este processo possa ser detectado por métodos bioquímicos, como os utilizados neste trabalho e descritos em seguida.

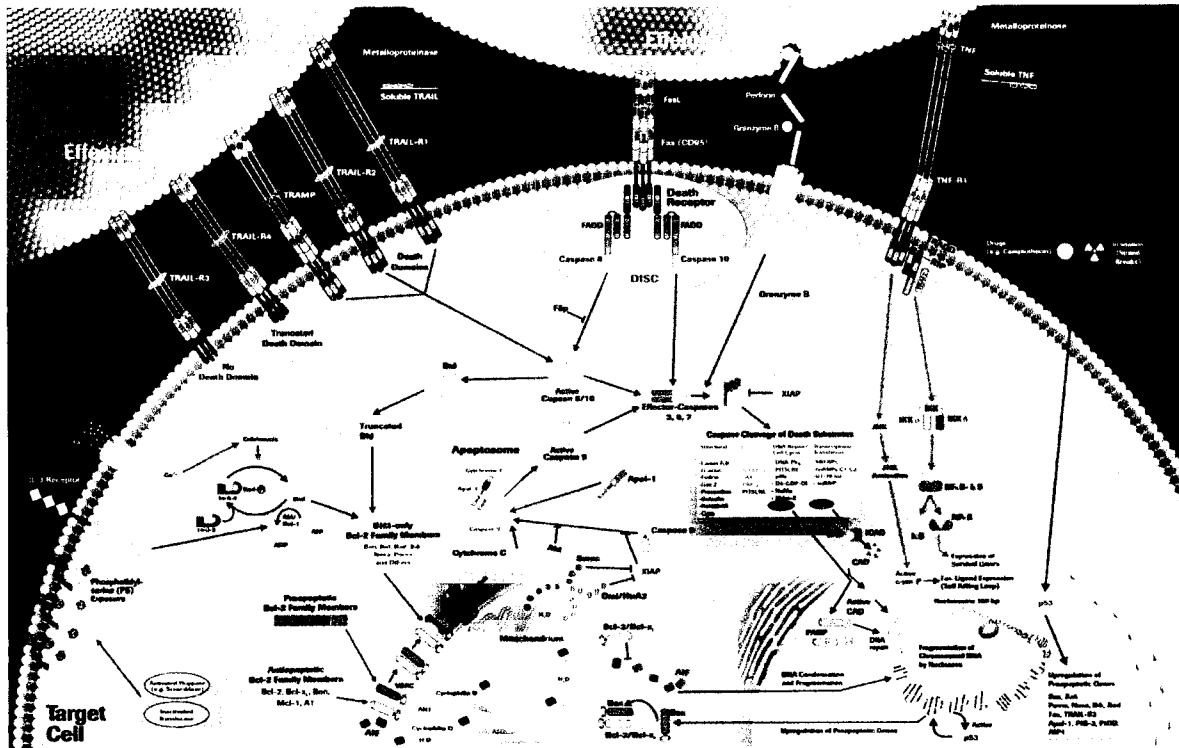


Figura 1.15 - Esquema representativo das vias apoptóticas (www.roche-applied-science.com).

1.5.1 Análise em gel de agarose do perfil de fragmentação de ADN

A apoptose é assinalada pela formação de fragmentos de ADN característicos quando o material genético é clivado por endonucleases dependentes de cálcio, entre os nucleossomas (Arends *et al.*, 1991). Os fragmentos de ADN são múltimeros com cerca de 180 pb, que durante a separação electroforética originam uma “escada de ADN” com intervalos de ~180 pb (figura 1.16). Esta característica pode ser utilizada como técnica de modo a verificar a ocorrência de apoptose.

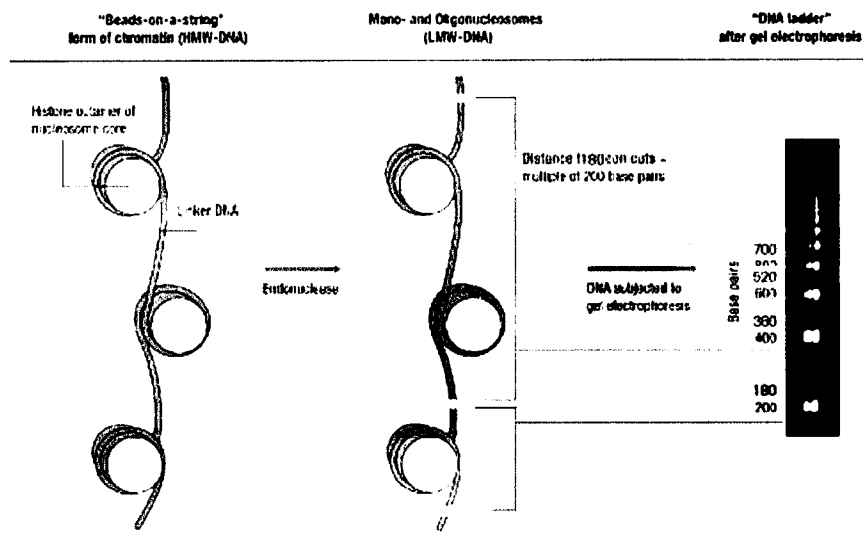


Figura 1.16 - Representação da fragmentação de ADN em múltiplos de 180 pb, devido à ocorrência de apoptose (www.rocke-applied-science.com).

1.5.2 TUNEL (TdT-mediated dUTP nick-end labeling)

Durante a apoptose a actividade da DNase gera fragmentos de ADN de baixo peso molecular, bem como lacunas nas cadeias de ADN (nicks). Este processo pode ser verificado por marcação, com nucleótidos modificados, no terminal livre 3'-OH, através de reacções enzimáticas. A técnica TUNEL permite determinar este acontecimento dado que faz uso de transferases terminais (TdT) como catalizadores da ligação de nucleótidos marcados em todas as extremidades 3'-OH, sendo um método bastante sensível (figura 1.17).

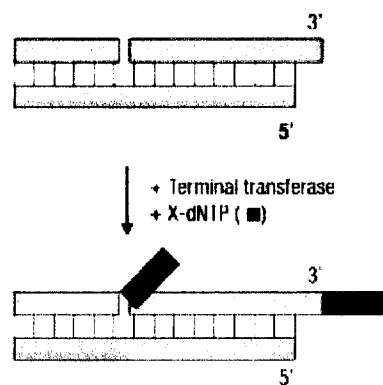


Figura 1.17 - Princípio da marcação de ADN pela técnica TUNEL (www.rocke-applied-science.com).

A técnica TUNEL consiste em colocar as células em crescimento sobre uma lamela de vidro de modo a ocorrer a sua adesão, as quais são sujeitas às condições experimentais a testar (figura 1.18). Seguidamente as células são fixadas, lavadas e incubadas com tampão de permeabilização de modo a ficarem mais sensíveis à marcação. São depois incubadas com a transferase terminal e com o nucleótido marcado com fluoresceína, ao abrigo da luz, para ocorrer a acção enzimática e consequente ligação dos nucleótidos às extremidades 3'-OH. De modo a contabilizar as células totais os núcleos são corados com DAPI, sendo possível observar fluorescência azul em todas as células e a verde surge unicamente as células apoptóticas, permitindo uma quantificação da percentagem apoptótica (Roche, 2006).

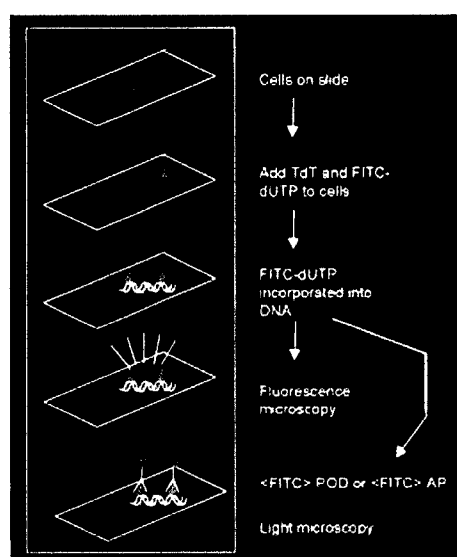


Figura 1.18 – Esquema representativo dos passos gerais que envolvem a marcação celular por TUNEL (www.roche-applied-science.com).

1.6 A oxidação

Todos os organismos aeróbios necessitam de oxigénio molecular como aceitador electrónico para uma produção eficiente de energia. Contudo, o oxigénio é um forte oxidante, tornando-se impossível impedir oxidações secundárias promovidas por esta molécula, que podem ter consequências graves se os seus produtos não forem neutralizados por um sistema antioxidante eficiente (Sorg, 2004).

A redução completa do oxigénio molecular envolve quatro electrões, resultando água como produto final da cadeia respiratória (Sorg, 2004). Porém, podem ocorrer situações em que o oxigénio é parcialmente reduzido, resultando como produtos destas reacções secundárias vários intermediários com alto poder oxidante, que podem conduzir a oxidações secundárias. Aproximadamente entre 2 a 5% do oxigénio utilizado nas mitocôndrias é responsável pela formação destes produtos secundários (Urso *et al.*, 2003). Outras possíveis fontes de espécies oxidantes são poluentes do ar, tabaco e fumo, radiação UV e uma dieta rica em ácidos gordos polinsaturados (Pietta, 2000; Sorg, 2004).

As células dos organismos vivos possuem dois sistemas de defesa contra os danos produzidos pelos radicais livres, sendo o primeiro um sistema de defesa enzimático, constituído pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase, e o segundo um sistema de defesa não enzimático, constituído por antioxidantes dietéticos, como a vitamina E e a glutathione (Yilmaz *et al.*, 2004).

Embora o organismo tenha capacidade de prevenir reacções indesejáveis e de reparar moléculas e tecidos danificados, estes mecanismos de defesa não são suficientemente abrangentes para prevenir e reparar os danos causados por todas as reacções indesejáveis, ocorrendo a acumulação dos produtos destas reacções, que se tornará prejudicial ao fim de um certo período de tempo. Esta situação de desequilíbrio entre a formação de espécies com poder oxidante e a sua destruição denomina-se por stress oxidativo e pode conduzir a um metabolismo anormal, à perda de funções fisiológicas, a doenças e, inclusivamente, à morte (Sorg, 2004).

Existem duas classes de compostos responsáveis pela situação de stress oxidativo, sendo elas os radicais livres, espécies que possuem pelo menos um electrão desemparelhado, sendo bastante instáveis e promovendo transferências electrónicas rápidas; e as espécies reactivas de oxigénio (ROS), intermediários instáveis que derivam do oxigénio molecular (Sorg, 2004). Os alvos biológicos principais dos radicais livres e das ROS são as proteínas, cuja oxidação conduz à perda de função ou à degradação prematura nos proteossomas, os lípidos, cuja oxidação altera as propriedades físicas das membranas celulares e, consequentemente, a sua função, e o ADN, cuja oxidação pode conduzir a mutações genéticas, a síntese proteica anormal, a alteração na expressão genética, a apoptose e à morte celular (Sorg, 2004). De facto, quando as ROS são produzidas em excesso podem induzir a peroxidação lipídica e provocar a propagação de reacções de radicais livres, levando a um aumento do stress oxidativo implicado com o cancro humano e outras doenças degenerativas da idade, tais como inflamações, arteriosclerose e doenças neurodegenerativas (Conforti *et al.*, 2007).

1.7 Metodologias analíticas para a determinação do poder anti-radicalar

As reacções em cadeia dos radicais livres são aceites como um mecanismo de peroxidação lipídica. Os captadores desses radicais podem actuar directamente reagindo com eles e capturando-os, pondo termo às reacções de peroxidação (Liu & Yao, 2006; Yu *et al.*, 2002; Bondet *et al.*, 1997). Os dois métodos que se seguem, o método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e da desoxirribose, permitem determinar a capacidade anti-radicalar de diferentes amostras, com base em diferentes fundamentos.

1.7.1 Método do DPPH

O método DPPH (Guido, 2004) é o método indirecto mais antigo e mais usado para determinar a actividade antioxidante de um composto, ou seja, permite determinar a capacidade que esse composto tem para inibir ou retardar a degradação oxidativa (Stratil *et al.*, 2006). Actualmente, este método tem sido muito usado para determinar a capacidade das amostras em captar os radicais livres devido à sua simplicidade (Liu & Yao, 2006; Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Brand-Williams *et al.*, 1995).

A actividade anti-radicalar pode ser determinada por um método espectrofotométrico que se baseia na capacidade de um radical estável, o 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]), em reagir com doadores de hidrogénio, como é o caso dos compostos fenólicos (Sendra *et al.*, 2006). Esta reacção de redução pode ser acompanhada pela medição do decréscimo de absorvância de uma solução de DPPH a $\lambda=515$ nm (máximo de absorvância), em que a coloração violeta do DPPH em solução transforma-se em amarelo pálido (Guido, 2004). Na Figura 1.19 está representada a reacção de redução do DPPH[•], por aceitação de um radical hidrogénio de um composto antioxidante, tornando-se uma molécula diamagnética estável (Liu & Yao, 2006; Gülcin, 2006). Este método é mais selectivo em relação a doadores de hidrogénio do que outros métodos, como por exemplo o ABTS, sendo condição a existência de grupos hidroxilos livres, incluindo os formados por rearranjos moleculares.

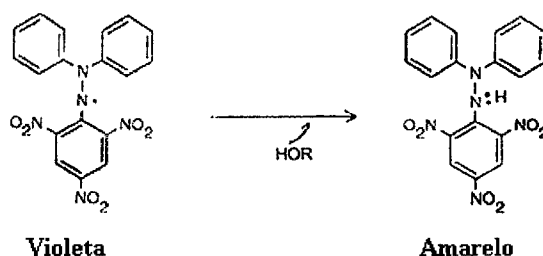


Figura 1.19 - Reacção de redução do DPPH por um composto antioxidante (HOR).

Existem duas versões de avaliação do método do DPPH: a dinâmica e a estática. A velocidade de redução do DPPH após a adição de uma amostra contendo compostos fenólicos é medido na primeira versão. A quantidade de DPPH inativado pela amostra é medida graficamente, como a percentagem de DPPH que ficou por reagir (como veremos a seguir), na versão estática. Assim, a primeira versão caracteriza a reactividade, ao passo que a segunda testa a estequiometria da reacção com um composto puro ou a quantificação de grupos hidroxilo livres numa amostra mais complexa (Stratil *et al.*, 2006).

Os resultados são expressos em termos de PAR (Poder Anti-Radicalar), definido pela seguinte fórmula:

$$PAR = \frac{1}{EC_{50}} * 100,$$

onde, EC_{50} representa a quantidade mínima de antioxidante necessário para reduzir para metade a concentração inicial de DPPH. Assim, quanto menor for o valor de EC_{50} maior será o poder anti-radicalar da amostra.

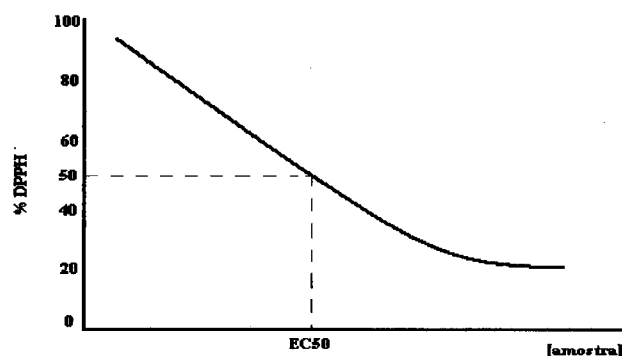


Figura 1.20 - Representação gráfica da percentagem de DPPH em função da concentração de amostra.

O que se pretende é fazer uma representação gráfica da percentagem de DPPH que ficou por reagir em função da concentração da amostra (figura 1.20).

A percentagem de DPPH restante no meio reaccional é calculada da seguinte forma:

$$\%DPPH = \frac{Abs\ amostra}{Abs\ controlo} * 100,$$

onde:

Abs amostra = absorvância da amostra após 120 minutos de reacção com o DPPH;

Abs controlo = absorvância do controlo após 120 minutos.

Com base na equação obtida por regressão linear obtém-se o valor da concentração efectiva de amostra necessária para reduzir a quantidade de DPPH em 50% do seu valor inicial, o EC₅₀. Este valor é obtido da forma que se segue:

$$\%DPPH = m * [amostra] + b \Leftrightarrow EC_{50} = \frac{(50 - b)}{m},$$

m = declive da recta obtida;

b = ordenada na origem.

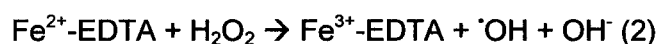
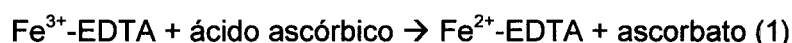
O valor do PAR é obtido pela expressão apresentada anteriormente.

1.7.2 Método da desoxirribose

O oxigénio activo e os radicais livres provocam danos a nível tecidual, originando várias doenças (Sorg *et al.*, 2004; Karawita *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2002). As formas superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e radical hidroxilo (·OH) do oxigénio activo são produtos do metabolismo normal e atingem as moléculas biológicas provocando sérios danos nas células e nos tecidos (Yen & Chen, 1995). Dentro das espécies reactivas de oxigénio, o radical hidroxilo é o mais reactivo devido à forte capacidade para reagir com várias biomoléculas (Karawita *et al.*, 2005). Assim, o método da desoxirribose surgiu de modo a possibilitar a determinação da capacidade das amostras em captar radicais hidroxilo.

O método da desoxirribose consiste na preparação de uma mistura de FeCl₃ e EDTA, que na presença de ácido ascórbico a pH 7,4, formam um complexo de Fe²⁺-EDTA (equação 1). De seguida, com a adição de peróxido de hidrogénio, ocorre a formação do complexo Fe³⁺-EDTA e dos radicais hidroxilo – reacção de Fenton (equação 2). De referir, que o complexo Fe³⁺-EDTA também produz radicais hidroxilo a partir dos peróxidos, mas a velocidade de produção é dez vezes mais fraca do que com o ião Fe²⁺, que, no que diz respeito às várias espécies de iões metálicos, é o pró-oxidante mais forte (Gülcin, 2006).

Os radicais hidroxilo vão actuar sobre a desoxirribose, uma aldopentose, provocando a sua degradação em fragmentos menores, que na presença de ácido tricloroacético (TCA) e elevadas temperaturas dão origem ao malonaldeído (MDA) (equação 3). Por fim, o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em meio ácido, e origina uma cor rosa com máximo de absorvância nos 532 nm (equação 4) (Cheng *et al.*, 2003; Yen & Chen, 1995; Yuan *et al.*, 2005; Aruoma *et al.*, 1993).



O ácido ascórbico e o peróxido de hidrogénio podem actuar como catalisadores da reacção 2, permitindo a produção de radicais hidroxilo (Gião *et al.*, 2005; Aruoma *et al.*, 1993).

A capacidade de uma amostra captar radicais hidroxilo pode ser determinada calculando a percentagem de inibição desses radicais, produzidos na mistura reaccional de Fenton (Karawita *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005), de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{Inibição} = \frac{(Abs_{(532nm)} \text{controlo} - Abs_{(532nm)} \text{amostra})}{Abs_{(532nm)} \text{controlo}} \cdot 100$$

Se um composto com capacidade antioxidante for adicionado, este irá competir com a desoxirribose pelos radicais hidroxilo, inibindo a formação de cor. Assim, o poder anti-radicalar da amostra pode ser usado para minimizar os efeitos adversos dos radicais produzidos (Cheng *et al.*, 2003).

Para se obterem resultados fiáveis por este método é necessário que a amostra não reaja com precursores do radical em estudo (como por exemplo com o peróxido de hidrogénio) (Halliwell *et al.*, 1995); no caso de se usarem iões metálicos para se produzir o radical hidroxilo, o antioxidante em estudo não deve formar quelatos com esses iões (pode ser evitado usando os iões de ferro já ligados ao EDTA); o antioxidante não deve interferir com o poder inibitório, mesmo que adicionado à mistura reaccional no fim da incubação.

Dado que se trata de um método que envolve a presença de radicais, é muito sensível a qualquer interferência, sendo por isso difícil obter resultados fidedignos, podendo resultar em interpretações ambíguas. Em estudos com polifenóis, estes podem precipitar pela captação de radicais hidroxilo mas também devido às suas características pró-oxidantes.

1.8 Relação estrutura/actividade antioxidante dos polifenóis

A capacidade antioxidante dos flavonóides está em grande parte relacionada com a estrutura do anel B (figura 1.3), uma vez que substituintes OH em posições 3' e 5' são responsáveis por um aumento da capacidade antioxidante. A insaturação entre os carbonos 2 e 3 no anel C também contribui para este efeito, pelo que a remoção do substituinte OH em posição *orto* ou da insaturação referida, provoca um decréscimo na capacidade anti-oxidante em cerca de metade (Bravo, 1998).

Existem essencialmente três requisitos na estrutura química dos flavonóides possivelmente responsáveis pela elevada capacidade de neutralização de radicais exercida por esta classe de compostos, sendo eles:

- presença do grupo orto-dihidroxi ou grupo catecol no anel B, o que confere uma maior estabilidade à forma radicalar, pois contribui para a deslocalização dos electrões;

- ligação dupla conjugada com a função 4-oxo, o que aumenta a deslocalização electrónica a partir do anel B;

- grupos hidroxilo nas posições 3 e 5 com função oxo, que promove a deslocalização electrónica do grupo 4-oxo para estes dois substituintes (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Deste modo, flavonóides como a quercetina, com substituintes OH em posições 3' e 4' no anel B e insaturação entre os carbonos 2 e 3 no anel C, possuem um potencial antioxidante 5 vezes superior à das vitaminas E e C. Removendo o substituinte OH em posição *orto* ou removendo a insaturação entre os carbonos 2 e 3 no anel C, a capacidade antioxidante decresce mais de 50% (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

A actividade antioxidante de um flavonóide é, então, determinada pelo anel B, enquanto que a restante estrutura base tem apenas uma pequena influência. Isto verifica-se devido a uma maior capacidade electro-doadora deste anel, havendo uma maior influência da restante estrutura base com o decréscimo da actividade antioxidante do anel B (Silva *et al.*, 2002). O arranjo espacial dos substituintes presentes na molécula torna-se um factor que contribui bastante para a actividade antioxidante destes compostos (Heim *et al.*, 2002). Em termos gerais, o factor que determina o carácter antioxidante de um dado flavonóide será a estabilidade redox do radical formado a partir do flavonóide original (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

1.9 Objectivos do trabalho

Conhecendo actualmente a importância dos polifenóis na saúde humana, nomeadamente como agentes quimiopreventivos contra alguns tipos de cancro (Miranda *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2007), o estudo destes compostos em diferentes linhas celulares humanas tumorais tem tido cada vez mais interesse.

O principal objectivo deste trabalho consistiu em avaliar o grau de inibição da síntese de ADN por soluções modelo de polifenóis presentes em bebidas (naringenina, xanto-humol, quercetina, rutina, catequina e ácido gálico), e estudar o efeito citotóxico destes compostos *in vitro*, através do método SRB, numa linha celular tumoral. Em alguns casos os resultados foram complementados com análise por citometria de fluxo e pelo método de exclusão com azul de tripano. No que diz respeito aos polifenóis com efeito citotóxico, a sua capacidade em induzir a apoptose sobre as linhas celulares estudadas foi determinada por avaliação da fragmentação de ADN em gel de agarose e pela técnica TUNEL.

Pretendeu-se também encontrar uma relação entre a capacidade anti-proliferativa dos polifenóis e a sua conhecida capacidade anti-oxidante. Para tal, foi determinada a capacidade anti-radicalar dos compostos fenólicos pelo método do DPPH e da desoxirribose, que foi comparada com o efeito antiproliferativo.

2 Material e métodos

- 2.1 Culturas celulares
 - 2.2 Preparação das soluções de polifenóis e reagentes utilizados
 - 2.3 Avaliação do efeito anti-proliferativo e citotóxico de diferentes polifenóis
 - 2.4 Estabilidade do xanto-humol no meio de cultura
 - 2.5 Microfotografias de contraste de fase
 - 2.6 Viabilidade das células *TPC-1* pelo método de exclusão por azul de tripano
 - 2.7 Contagem celular
 - 2.8 Análise em gel de agarose do perfil de fragmentação de ADN
 - 2.9 Apoptose celular por TUNEL
 - 2.10 Poder anti-radicalar dos compostos fenólicos pelo método do DPPH
 - 2.11 Poder anti-radicalar dos compostos fenólicos pelo método da desoxirribose
 - 2.12 Análise estatística
-

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Culturas celulares

As células de linha celular de cancro da tiróide (*TPC-1*), gentilmente cedidas pelo Doutor Valdemar Máximo do IPATIMUP, foram cultivadas em meio RPMI 1640+GlutaMAX™-I, 2,55 mM HEPES (GIBCO®, Invitrogen™) suplementado com 10% de soro fetal de bovino inactivado (FBSI), 1% de piruvato de sódio 1% de penicilina/estreptomicina, e foram mantidas a 37°C numa atmosfera húmida (90% de humidade) e 5% de CO₂.

As culturas foram estabelecidas em frascos de 75 cm² indicados para o efeito, com mudança de meio e de recipiente a cada 72 horas até ser atingida 80-90% de confluência. Para a mudança das células, procedeu-se à sua lavagem com PBS 1x e em seguida foram incubadas com 0,25% tripsina-EDTA durante 3 a 5 minutos, a 37°C. Posteriormente, foram removidas da superfície do frasco com a ajuda da adição de meio novo (para parar a acção da tripsina), e centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos. Após a sua ressuspensão em meio RPMI, as células foram plaqueadas em novos frascos (diluição de 1:20) ou utilizadas para o trabalho experimental.

Neste trabalho foram também utilizadas: uma linha celular imortalizada de linfócitos T de leucemia (*Jurkat E6.1*) e células primárias isoladas de sangue periférico (PBLs), estimuladas com PHA (visando o enriquecimento para linfócitos T), como teste em células normais. Estas células, ao contrário das anteriores, crescem em suspensão, pelo que o meio de cultura foi renovado sempre que necessário.

Meio RPMI – 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de 2-glutamina, 500 U/mL penicilina G, 50 µg/mL de streptomicina e 1% (v/v) de FBS.

2.1.1 Isolamento dos linfócitos T de sangue periférico

Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram obtidas a partir de *buffy coats* (mistura leucocitária) de doadores de sangue saudáveis após centrifugação por gradiente de *Lymphoprep* (Nycomed, Oslo, Norway) durante 40 minutos a 1800 rpm. As PBMCs foram lavadas com HBSS e os eritrócitos contaminantes (RBCs – *red blood cells*), sempre presentes em várias fases da preparação de PBMCs, foram removidos por lise recorrendo a uma solução hipotónica de lise (10 mM Tris, 150 mM NH₄Cl, pH 7,4) a 37°C durante 10 minutos. Foram seguidamente lavadas duas vezes com HBSS (de forma a remover o anel de plaquetas) e os linfócitos T de sangue periférico foram obtidos

depois de colocar as células mononucleares em meio de cultura a 37°C, 5% de CO₂ e 99% de humidade durante a noite. Recolheu-se a suspensão de células não-aderentes, correspondente às PBLs. Dada a menor capacidade de divisão em relação à linha celular utilizada nos ensaios anteriores, estas células necessitam da presença de um activador (PHA - *phytohemagglutinin*) no meio de cultura em que se encontram.

HBSS – 10 mM de Tris, 150 mM de NH₄Cl, e pH=7,4.

2.1.2 Descongelação das alíquotas

A descongelação da alíquota de células foi efectuado rapidamente, de forma a que o DMSO (solução de congelamento- FBSI+10% DMSO), que é tóxico para as células, não permanecesse muito tempo em contacto com estas. As células foram descongeladas a 37°C e lavadas com PBS, em sucessivas centrifugações a 1200 rpm durante 5 minutos. Em seguida, procedeu-se a uma centrifugação em que as células sedimentadas foram ressuspendidas em meio RPMI e colocadas a crescer na incubadora com temperatura, CO₂ e humidade controladas.

2.2 Preparação das soluções de polifenóis e reagentes utilizados

As diferentes soluções de polifenóis foram preparadas a partir do respectivo reagente comercial (tabela 2.1). O xanto-humol foi isolado e purificado da planta do lúpulo nos laboratórios da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto pelo Mestre Paulo Magalhães, e gentilmente cedido pelo mesmo.

Tabela 2.1 - Características dos compostos fenólicos estudados

Composto fenólico	Fórmula química	Pureza	Fabricante
Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	~ 95%	Fluka
Xanto-humol	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	> 90%	
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	≥ 98%	Fluka
Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	≥ 95%	Sigma
Quecertina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	≥ 98%	Sigma
Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₁₆	≥ 98%	Sigma

Os compostos sólidos foram dissolvidos em etanol ou DMSO (de acordo com as diferentes solubilidades), e as soluções de menor concentração foram preparadas por diluição da solução concentrada. Os compostos foram dissolvidos no solvente puro dado que a utilização de misturas de solvente/água induz a precipitação de alguns compostos.

Foram por isso dissolvidos em etanol, à exceção da rutina e da quercetina que foram dissolvidos em DMSO, dada a baixa dissolução em etanol.

Os solventes utilizados ao longo deste trabalho estão apresentados na tabela 2.2. Nos ensaios biológicos foi necessário filtrar, em condições estéreis, os solventes em filtros de 0,45 µM, de modo a eliminar contaminações.

Tabela 2.2 - Características dos solventes utilizados

Reagente	Fórmula química	Fabricante
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	<i>Merck</i>
Dimetilsulfóxido	C ₂ H ₆ SO	<i>Sigma</i>
Metanol	CH ₃ OH	<i>Panreac</i>
Acetonitrilo	CH ₃ CN	<i>SDS</i>
Ácido fórmico	HCOOH	<i>Normapur</i>

2.3 Avaliação do efeito anti-proliferativo e citotóxico de diferentes polifenóis

A proliferação celular foi avaliada numa linha de linfócitos T de leucemia (*Jurkat E6.1*) e em PBLs num sistema *in vitro*, através da avaliação da divisão celular por incorporação de um corante fluorescente (CFSE) e medição por citometria de fluxo (*FACScan™* da *BD-Becton, Dickinson and Company*, com o software *CellQuest pro* versão 7.0 e *Flow Jo*, para processamento dos resultados). Foi também avaliada numa linha celular de cancro da tiróide (*TPC-1*), com recurso ao método SRB.

2.3.1 Marcação celular com CFSE

Para a determinação da perda de fluorescência de CFSE, a linha celular foi ressuspendida numa concentração de 10⁷ células/mL e lavada três vezes com PBS 1x. O CFSE foi adicionado numa concentração final de 5 µM, e as células foram incubadas durante 10 minutos a 37°C com agitação ocasional e protegidas da luz (incorporação do fluorocromo). A solução de CFSE foi preparada de acordo com o procedimento fornecido pela marca de venda do kit de marcação com CFSE para análise de proliferação celular (*Molecular Probes™*). De seguida foram lavadas duas vezes com PBS/20%FBSI e ressuspendidas em meio de cultura (RPMI).

Após cultura, as células sujeitas a diferentes condições experimentais foram lavadas duas vezes com PBS 1x e, para cada amostra, foi adquirido um número

constante de células para cada estudo, usando as características FSC (tamanho) e SSC (complexidade). A proliferação e a divisão celular foram assim determinadas pela perda sequencial da intensidade de fluorescência de CFSE. O procedimento utilizado é semelhante ao descrito por Kanno e seus colaboradores (2005).

2.3.1.1 Preparação das amostras

Células de uma linha imortalizada de linfócitos T (*Jurkat E6.1*) foram colocadas em crescimento sob condições apropriadas, seguidas de marcação com CFSE e colocadas em placas de 6 poços sujeitas a diferentes concentrações de compostos fenólicos (0,1, 1,0, 10 e 100 μM) durante 48 horas, após 24 horas de pré-cultura (um total de 3 dias de incubação). Foram utilizadas 5×10^6 células por poço, e as soluções de polifenóis foram preparadas em DMSO. De notar que o DMSO é tóxico para as células quando em concentração superior a 0,4%, pelo que foram adicionados 20 μL de cada solução de polifenol ao respectivo poço (concentração de DMSO final de 0,4%). No final da incubação as células foram centrifugadas, lavadas com PBS 1x e ressuspensas em PBS 1x para análise por citometria de fluxo.

Foram preparadas 2 placas (duplicado), e em cada placa foi incluído um controlo positivo, um controlo apenas com DMSO (de modo a verificar a existência de toxicidade), e as diferentes diluições de composto.

No caso das PBLs, a experiência envolveu seis dias de incubação, dado que estas células têm menor capacidade de divisão, e como tal exigem a presença de um activador da divisão (PHA). No ensaio foram envolvidos um controlo sem PHA, um controlo com PHA, um controlo com DMSO (de modo a verificar a existência de toxicidade), e as concentrações estudadas de composto.

2.3.2 Método colorimétrico SRB

A proliferação celular foi avaliada numa linha celular de cancro da tiróide (*TPC-1*), através do método colorimétrico da sulforodamina B (SRB).

O método SRB permite a medição do conteúdo celular proteico, e tem sido largamente utilizado em estudos de proliferação celular. Apresenta boa linearidade, elevada sensibilidade e baixo custo. Este corante liga-se a aminoácidos básicos de proteínas celulares, e a avaliação colorimétrica possibilita a determinação do número de células (por relação directa com a massa total de proteínas).

A técnica de SRB foi realizada de acordo com os passos descritos no manual que acompanha o kit adquirido (Sigma[®]):

- Fixação das células com ácido tricloroacético 50% frio, durante 1 hora a 4°C;
- Lavagem da placa com água destilada;
- Adição da sulforodamina B a 4%, e esperar 30 minutos;
- Lavagem com ácido acético a 10% para remoção do corante não ligado (mínimo de lavagens para impedir a quebra das ligações do corante com as proteínas);
- Solubilização do corante internalizado com solução Tris 10 mM (pH=9,5);
- Leitura de absorvância a 565 nm e 690 nm (*background*).

Para saber se o efeito observado pela análise dos diferentes compostos estudados se deve a uma diminuição da divisão celular (anti-proliferativo) ou morte celular (citotoxicidade), foi medida a absorvância no momento de incubação das células com os polifenóis (t=0), que foi depois comparada com o valor no final da experiência. Um valor de absorvância em t=0 superior ao valor no final da experiência significa que houve uma diminuição do número de células devido à sua morte, e um valor de t=0 inferior ao valor final poderá significar efeito anti-proliferativo, caso o número de células seja inferior às do controlo no final do tempo de exposição.

2.3.2.1 Preparação das amostras

As células, colocadas em crescimento sob condições apropriadas, foram distribuídas em placas de 96 poços (2×10^3 células por poço, num volume total de 200 μ L). Em seguida foram sujeitas a diferentes concentrações de compostos fenólicos (0,1, 1,0, 10 e 100 μ M) 48 horas de exposição e 72 horas de incubação. As soluções de polifenóis (tabela 2.1) foram adicionadas às células numa concentração inferior a 0,1%, dada a toxicidade celular do veículo.

Em cada placa foi incluído um controlo positivo, um controlo negativo, e as diferentes diluições de composto (todas contendo veículo).

2.3.2.2 Optimização do método

As células, colocadas em crescimento sob condições apropriadas, foram distribuídas em placas de 96 poços (2×10^3 e 5×10^3 células por poço, num volume total de 200 μ L). Em cada placa as células foram sujeitas à presença e à ausência de etanol e DMSO (concentração final de 0,1%), durante 48 horas de exposição e 72 horas de incubação.

Foi também determinado o poder anti-proliferativo do xanto-humol em 3 e 4 dias de incubação, para verificar se o tempo de incubação influenciava os resultados finais.

2.4 Estabilidade do xanto-humol no meio de cultura

2.4.1 Preparação das amostras

Para determinar a estabilidade do xanto-humol, como base de exemplo para os restantes polifenóis, este composto foi adicionado ao meio de cultura num gama de concentrações (0,1, 1, 2,5, 5, 10 e 100 μM), durante 24, 48 e 72 horas, e a mistura foi analisada por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) com detecção espectrofotométrica.

As análises por CLAE, com detecção espectrofotométrica, foram realizadas num cromatógrafo com as seguintes características:

- Unidade de gradiente quaternária *Jasco*, modelo PU-2089 *Plus*;
- Unidade de degaseificação *Jasco*, modelo DG-1580-54;
- Bomba *Jasco*, modelo PU-1580;
- Amostrador automático *Jasco*, modelo AS-950;
- Detector de múltiplos comprimentos de onda *Jasco*, modelo MD-1510;
- Caixa de interface *Jasco*, modelo LC-Net II/ADC.

O sistema acima descrito foi controlado através do programa HSS-1500, versão 3.4.7, *Jasco*, que operou em conjunto com o programa *Borwin-PDA*, versão 1.50, *JMBS Developments*, para o processamento dos dados cromatográficos e com o programa *Spectra-Manager*, versão 1.40, *Jasco*, para o processamento de espectros de absorção.

As características da pré-coluna e da coluna utilizada neste sistema cromatográfico encontram-se especificadas na tabela seguinte:

Tabela 2.3 - Características da pré-coluna e da coluna utilizadas no sistema cromatográfico

Características	Pré-coluna	Coluna
Fabricante	<i>Phenomenex</i> [®]	<i>Phenomenex</i> [®]
Comprimento	10 mm	250 mm
Diâmetro interno	4,6 mm	4,6 mm
Diâmetro de partícula	5 μm	5 μm
Tamanho do poro	100 Å	100 Å

2.4.2 Condições cromatográficas

Fase estacionária – coluna de fase reversa *Phenomenex*[®] C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm).

Fase móvel constituída por 100% metanol (A) e 0,1% de ácido fórmico em água (B), a um fluxo constante de 0,300 mL.min⁻¹ nas seguintes condições de gradiente:

- Início da injeção (0 minutos) – 90% de B;
- 0-110 minutos – muda para 0% de B;
- 0-130 minutos – 100% de A.
- Volume de amostra injectado – 20 µL.

2.5 **Fotografias de contraste de fase**

As células foram tratadas do mesmo modo descrito para o método SRB, sendo que no final do tempo de exposição aos polifenóis foram visualizadas ao microscópio óptico de contraste de fase, acoplado a uma câmara que permite a obtenção de imagens.

2.6 **Viabilidade das células *TPC-1* pelo método de exclusão por azul de tripano**

Com o objectivo de verificar o efeito citotóxico e anti-proliferativo de alguns polifenóis, células expostas a estes compostos foram coradas com o corante vital azul de tripano, para contabilizar o número de células vivas e de células mortas. O método de exclusão do azul de tripano baseia-se no princípio de que células viáveis apresentam membranas intactas, que evitam a entrada do corante, enquanto que membranas metabolicamente inactivas de células mortas (não viáveis) não conseguem evitar a penetração do corante na célula. Logo, células azuis correspondem a células mortas.

As células, colocadas em crescimento sob condições apropriadas, foram distribuídas em placas de 6 poços (5x10⁴ células por poço, num volume total de 2 mL), tal como referido por Miranda e seus colaboradores (Miranda *et al.*, 1999). Em seguida foram sujeitas a diferentes concentrações de compostos fenólicos (0,1, 1,0, 10 e 100 µM) durante 48 horas de exposição e 72 horas de incubação. As soluções de polifenóis foram preparadas em etanol ou DMSO, e adicionadas às células numa concentração de 0,1%, dada a toxicidade celular do veículo. Em cada placa foi incluído um controlo e as diferentes diluições de composto (todas contendo veículo).

No final das 48 horas foi recolhido o meio de cultura, assim como as células aderentes por tripsinização. Estas foram centrifugadas durante 5 minutos a 1200 rpm e

ressuspensas em novo meio de cultura. Após este procedimento procedeu-se à sua contagem numa câmara de Neubauer, usando azul de tripano.

2.7 Contagem celular

Para a contagem de células foi utilizada uma câmara de *Neubauer*, diluindo numa proporção de 1:1 a cultura celular com 0,5% de azul de tripano.

O número total de células no frasco de cultura foi calculado tendo por base a equação: nº células contadas x factor diluição x volume total da cultura no frasco.

2.8 Análise em gel de agarose do perfil de fragmentação de ADN

Esta experiência teve como finalidade determinar se algum dos polifenóis com efeito citotóxico é capaz de induzir a apoptose nas células de cancro da tiróide, através da análise da fragmentação de ADN em gel de agarose, que caracteriza este efeito.

2.8.1 Preparação das amostras

As células, colocadas em crescimento sob condições apropriadas, foram distribuídas em placas de 6 poços num total de 3×10^5 células e 2 mL por poço. Em seguida foram sujeitas a uma concentração de compostos fenólicos de 100 μM , durante 24 horas de exposição e 48 horas de incubação. Os tempos foram menores, dada a citotoxicidade dos compostos estudados, com o intuito de preservar material genético para posterior extracção. As soluções de polifenóis foram preparadas em etanol ou DMSO, e adicionadas às células numa concentração de 0,1%. Em cada placa foi incluído um controlo e as diferentes diluições de composto (todas contendo veículo).

No final da incubação foi retirado o meio existente em cada poço e as células existentes nos poços foram lavadas com PBS1x e em seguida incubadas com 0,25% tripsina-EDTA durante 3 a 5 minutos, a 37°C. Posteriormente, foram removidas da superfície do frasco com a ajuda da adição de meio novo (para parar a acção da tripsina), e centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos. Após a sua ressuspensão em 400 μL de meio RPMI, as células foram conduzidas para o extractor de ADN.

2.8.2 Extracção de ADN genómico

O material genético foi extraído de forma automática, recorrendo ao aparelho Maxwell™16 e a Maxwell™16 Cell DNA Purification Kits (Promega™).

O procedimento experimental foi desenvolvido tal como o indicado no manual técnico do instrumento.

2.8.3 Preparação do gel e análise das amostras tratadas

A quantidade de ADN genómico isolado foi quantificado através do aparelho BioMate 3 (Thermo Electron Corporation), e o mesmo (6 µg) foi colocado num gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídio, e as bandas foram separadas durante cerca de 2 horas em tampão TAE 1x, num aparelho de electroforese HORIZON®11-14 Horizontal Gel Electrophoresis (*Whatman System*®), alimentado por um voltímetro Whatman Biometra PS304 (*Whatman System*®).

As bandas no gel foram visualizadas por UV no aparelho *GENEFLASH* Syngene Bio Imaging (*Syngene*™), que permitiu recolher imagens do mesmo.

TAE – 89 mM de tampão Tris e 89 mM de EDTA, pH~8,5.

2.9 **Apoptose celular por TUNEL**

2.9.1 Preparação das amostras

Prepararam-se as lamelas lavando-as com álcool a 70% e foram colocadas em placas de 24 poços. As *TPC-1* (1×10^4 células/mL) foram cultivadas nas lamelas de vidro numa placa de 24 poços (500 µL por poço), sendo feita a incubação com os compostos fenólicos após 1 dia de incubação, numa concentração de 100 µM, ou solvente (controlo) durante 24 horas.

2.9.2 Técnica TUNEL

A avaliação da apoptose celular foi feita recorrendo à técnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labelling), utilizando “*In situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein” (Roche Diagnostics, Basileia, Suíça), de acordo com as instruções do fabricante (Roche, 2006):

- Fixação das células durante 30 minutos em *para*-formaldeído a 4% (cerca de 100 µL);
- Lavagem, durante 5 minutos, em PBS 2x;
- Permeabilização das células durante 2 minutos em gelo com tampão de permeabilização;
- Lavagem, durante 5 minutos, em PBS 2x;
- Incubação do controlo positivo com 2µl DNase/ 100µL de TrisHCL 50 mM, pH=7.5, durante 5 minutos;

- Lavagem do controlo positivo, durante 5 minutos, em PBS 1x;
- Secagem das paredes dos poços com papel absorvente;
- Incubação com a solução de TUNEL (1 enzima: 10 tampão), durante 60 minutos a 37°C, em câmara húmida (cerca de 20 µL);
- Lavagem, durante 5 minutos, em PBS 2x;
- Incubação em DAPI (Roche Diagnostics, Basileia, Suíça), 5 minutos;
- Lavagem, durante 5 minutos, em PBS-T 2x;
- Montagem em glicerol/PBS;
- Visualização ao microscópio de fluorescência Olympus, BH-2 (Reino Unido), com ampliação de 200x.

Tampão de permeabilização - Triton-X-100 0,1% em citrato de sódio 0.1%.

PBS-T - PBS pH=7,4, Tween-20 0.5%, 100 ml de PBS + 500 µl de Tween-20

O controlo positivo corresponde a células fixadas tratadas com DNase.

Os núcleos foram contrastados com DAPI/metanol para marcação dos núcleos totais e a apoptose foi determinada pela contagem de células marcadas com fluoresceína (em apoptose), a qual foi dividida por 1000 núcleos totais corados com DAPI (corante nuclear).

2.10 Poder anti-radicalar dos compostos fenólicos pelo método do DPPH

2.10.1 Preparação das soluções

As soluções stock de compostos fenólicos, de concentração 1×10^{-3} M, foram preparadas tendo em atenção a massa molar de cada um dos compostos. Para cada um deles pesou-se a quantidade necessária, dissolveu-se em metanol e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, fez-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se a solução.

Para cada um dos compostos analisados foram efectuadas várias diluições de modo a resultar num gradiente de cores visível a olho nú. As diluições efectuadas foram estimadas por tentativa, variando para cada composto, de modo a que a concentração intermédia testada correspondesse a 50% de redução de DPPH. As soluções de DPPH foram preparadas da forma que se segue:

Tabela 2.4 - Modo de preparação das soluções de DPPH

Solução	Modo de Preparação
Solução stock de DPPH $6,75 \times 10^{-4}$ M em metanol	Pesou-se 0,0133 g de DPPH, dissolveu-se com metanol, e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL; Perfez-se o volume com metanol e procedeu-se à homogeneização da solução.
Solução trabalho de DPPH $6,75 \times 10^{-5}$ M em metanol	Retirou-se 20,0 mL da solução de stock, transferiu-se para um balão volumétrico de 200 mL, e perfez-se o volume com metanol.

2.10.2 Análise espectrofotométrica

Após a mistura, numa célula espectrofotométrica, de cada um dos reagentes indicados na Tabela 2.5, agitou-se e guardou-se as amostras à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 120 minutos, para que a reacção ocorresse. Ao fim deste intervalo de tempo, mediram-se as absorvâncias das amostras e dos controlos contra o branco a 515 nm.

Tabela 2.5 - Modo de preparação da mistura reaccional nas células espectrofotométricas

	Amostra	Branco	Controlo
DPPH (mL)	2,850	-	2,850
Solução diluída polifenol (mL)	0,150	-	-
Metanol (mL)	-	3,000	0,150

2.11 Poder anti-radicalar dos compostos fenólicos pelo método da desoxirribose

2.11.1 Preparação das soluções

As soluções de compostos fenólicos, de concentração 1×10^{-3} M, foram preparadas tendo em atenção a massa molar de cada um dos compostos. Para cada um deles pesou-se a quantidade necessária, dissolveu-se em metanol e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, perfez-se o volume com metanol e homogeneizou-se a solução. As soluções necessárias para o método da desoxirribose estão apresentadas na tabela 2.6, bem como o seu modo de preparação.

Tabela 2.6 - Modo de preparação das soluções para o método da desoxirribose

Solução	Modo de Preparação
Solução tampão fosfato (25 mM e pH=7,4)	Pesou-se 9,0 g de fosfato de sódio e após completa dissolução, em água, ajustou-se o pH com HCl a 6M.
Solução de EDTA 1mM	Pesou-se 0,0372 g de EDTA, e após dissolução transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, ajustando o volume com água millipore.
Solução de FeCl₃·6H₂O 1 mM	Dissolveu-se 0,0270 g de FeCl ₃ ·6H ₂ O em água millipore, e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, ajustando-se o volume final.
Solução de 2-desoxi-D-ribose 36 mM	Pesou-se 0,1207 g de desoxirribose e pós dissolução em água, o volume foi ajustado para 25 mL.
Solução de H₂O₂ 10 mM	Pipetou-se 86 µL de peróxido 35% para água, num volume final de 100 mL.
Solução de ácido ascórbico 1 mM em tampão fosfato (25 mM e pH=7,4)	Pesou-se 0,0177 g de ácido ascórbico, e após dissolução com tampão fosfato, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL. Perfez-se o volume com com tampão e homogeneizou-se a solução.
Solução de TCA 10% (m/v)	Dissolveu-se 2,5 g de TCA em água millipore, num volume de 25 mL.
Solução de hidróxido de sódio 0,05 M	Pesou-se 0,2 g de NaOH, e após dissolução em água, transferiu-se para um balão de 100 mL.
Solução de TBA 1,0% (m/v) em NaOH (0,05 M)	Dissolveu-se 0,25 g de TBA em NaOH 0,05M, num volume de 25 mL, com homogeneização da solução.

2.11.2 Análise espectrofotométrica

A técnica foi executada de acordo com os passos otimizados por Moreira (2007).

Na mistura reaccional, colocou-se 400 µL de tampão fosfato 25 mM num tubo de ensaio, e adicionou-se 100 µL de cada reagente pela seguinte ordem:

- solução padrão de polifenol (100 µM);
- EDTA 1 mM;
- FeCl₃·6H₂O 1 mM;
- H₂O₂ 10 mM;

- ácido ascórbico 1 mM;
- 2-desoxi-D-ribose 36 mM.

A mistura foi agitada num *vortex* e foi colocada num banho a 37°C durante 60 minutos. Após incubação, a cor foi desenvolvida adicionando 1,00 mL de TCA 10% e 1,00 mL de TBA 1,0% (agitando em cada etapa), aquecendo durante 30 minutos a 85°C. As amostras foram arrefecidas no gelo e o volume foi ajustado para 5,00 mL com água millipore. As absorvâncias foram medidas a 532 nm, e comparadas com o controlo contendo 100 µL de metanol em vez de amostra a testar.

2.12 Análise estatística

Os resultados apresentados dizem respeito à média dos resultados obtidos. Foi determinado o valor de *t-Student* para cada conjunto de resultados e foram considerados estatisticamente significativos os resultados com valor $p \leq 0,05$.

3 Resultados obtidos e discussão

- 3.1 Efeito anti-proliferativo e citotóxico de diferentes compostos fenólicos
 - 3.2 Estabilidade do xanto-humol no meio de cultura
 - 3.3 Viabilidade das células *TPC-1* pelo método de exclusão por azul de tripano
 - 3.4 Análise em gel de agarose do perfil de fragmentação de ADN
 - 3.5 Apoptose celular por TUNEL
 - 3.6 Determinação do poder anti-radicalar para diferentes compostos fenólicos pelo método DPPH
 - 3.7 Determinação do poder anti-radicalar para diferentes compostos fenólicos pelo método da desoxirribose
 - 3.8 Relação entre a actividade anti-proliferativa e a actividade anti-radicalar
-

3 RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito anti-proliferativo e citotóxico de diferentes compostos fenólicos

3.1.1 Marcação celular com CFSE

Numa etapa inicial foi estudado o efeito da naringenina sobre uma linha celular *Jurkat E6.1* e em células primárias PBL, por citometria de fluxo. Para a determinação do tamanho e morte celular foram analisados os parâmetros FSC/SSC, e avaliadas as percentagens de células nas regiões correspondentes às células viáveis e não-viáveis. Os resultados obtidos por citometria aparecem, inicialmente, sob a forma representada na figura 3.1 A. Cada ponto representado diz respeito a uma célula, que são distribuídas no gráfico em função do seu tamanho (FSC) e complexidade (SSC). Após selecção de uma subpopulação representativa das células viáveis, procedeu-se à avaliação do efeito dos compostos fenólicos (figura 3.1). O eixo dos xx diz respeito à intensidade de fluorescência, e o eixo dos yy ao número de células. Como o objectivo do trabalho foi verificar o efeito inibitório da naringenina na divisão celular, seria de esperar um deslocamento dos picos para a direita no caso em que a divisão celular tenha sido afectada pela adição de naringenina.

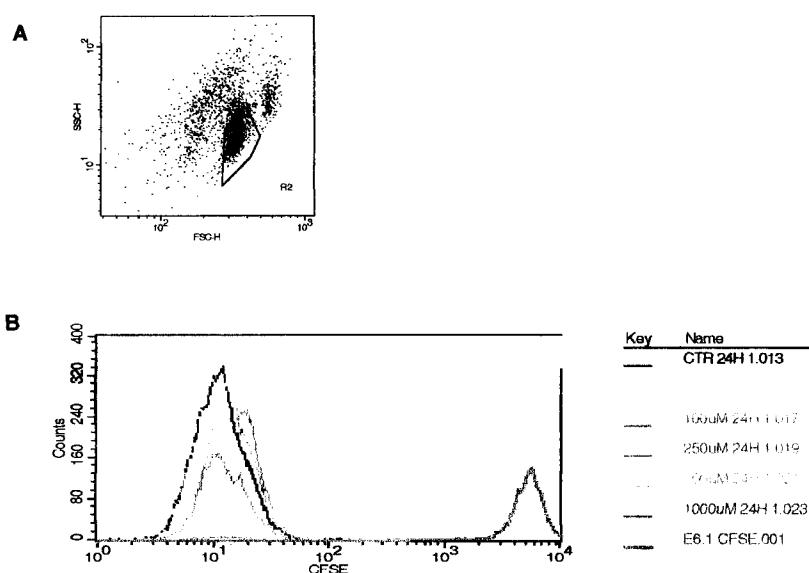


Figura 3.1 - Resultados obtidos por citometria de fluxo, após incubação de linfócitos T (linha celular Jurkat) com diferentes concentrações de naringenina, durante 24 horas e 6 dias de incubação. A – Distribuição das células em função do seu tamanho (FSC) e complexidade (SSC), em que se definiu uma região contendo as células vivas; B – Intensidade de fluorescência, reflectindo o teor em CFSE em função do número de células, para cada ensaio realizado, na região definida em A (n=2).

Relativamente à figura 3.1-B, podemos observar que relativamente ao dia 0 (início da experiência – roxo) todas as células se dividiram, e que o DMSO não exerceu qualquer efeito sobre as células (verde), quando comparado com o controlo (preto). É de notar que as células incubadas com 100 μM de naringenina apresentaram um desvio do pico muito ligeiro em relação ao controlo, o que indica uma menor divisão destas células (maior fluorescência). As células em contacto com 250, 500 e 1000 μM de naringenina são em número muito reduzido (figura 3.2), uma vez que a naringenina provocou a morte das mesmas (efeito citotóxico), também verificado em células observadas ao microscópio (figura A.1 em anexo). Este efeito já tinha sido verificado por Kanno e seus colaboradores (2005) nesta mesma linha celular, sugerindo que a naringenina é similar a outras drogas anti-tumorais. Apesar da morte verificada nestas três condições, seria de esperar que, se as células não se dividissem, o seu conteúdo em CFSE fosse superior. Contudo a sua intensidade de fluorescência é igual ao controlo, uma vez que a morte celular é acompanhada de lise celular e conseqüente perda de CFSE presente no citoplasma.

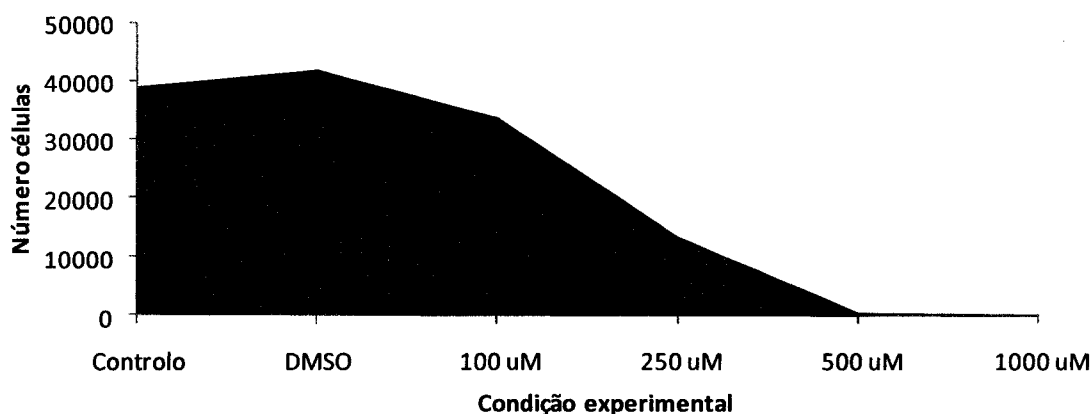


Figura 3.2 - Número de células viáveis final em cada condição experimental estudada, de modo a estimar a morte celular durante 24 horas de incubação com naringenina em diferentes concentrações.

A partir dos resultados obtidos, após incubação das células com naringenina durante 48 horas conclui-se que o efeito ao nível da morte celular é bastante mais acentuado, no caso de concentrações mais elevadas (figura 3.4). A capacidade anti-proliferativa também foi superior para tempos de incubação superiores (figura 3.3).

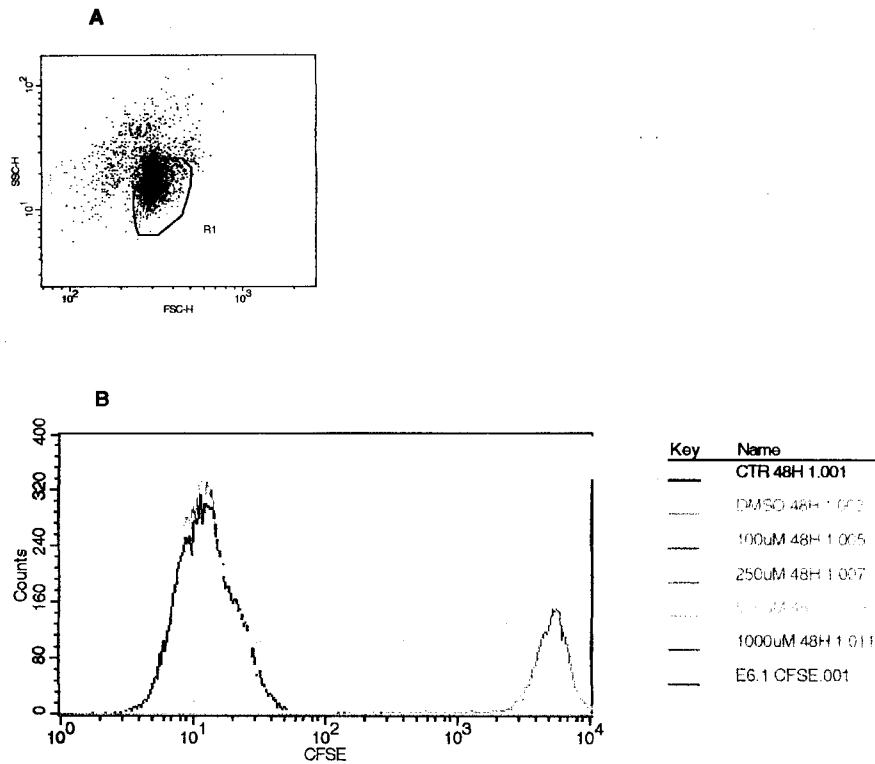


Figura 3.3 - Resultados obtidos por citometria de fluxo, após incubação de linfócitos T (linha celular Jurkat) com diferentes concentrações de naringenina, durante 48 horas e mantidas em cultura durante 6 dias antes da aquisição com CFSE. A – Distribuição das células em função do seu tamanho (FCS) e complexidade (SSC), em que se definiu uma região contendo as células vivas; B – Intensidade de fluorescência, reflectindo o teor em CFSE em função do número de células, para cada ensaio realizado, na região definida em A (n=2).

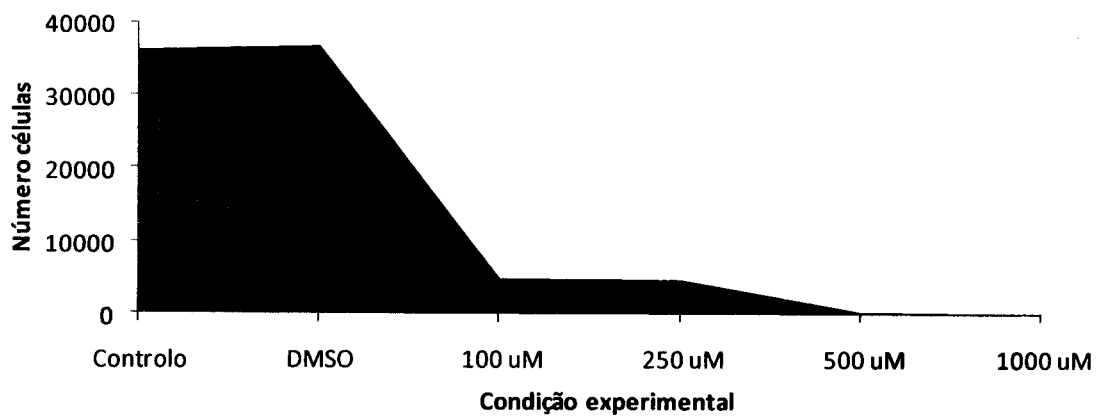


Figura 3.4 - Número de células final em cada condição experimental estudada, de modo a estimar a morte celular durante 48 horas de incubação com naringenina.

Com base nestes resultados partiu-se para um novo estudo, utilizando as mesmas linhas celulares, mas menores concentrações de naringenina (10, 25, 50 e 100 μM) durante 48 horas, e tempos de incubação inferiores (3 dias).

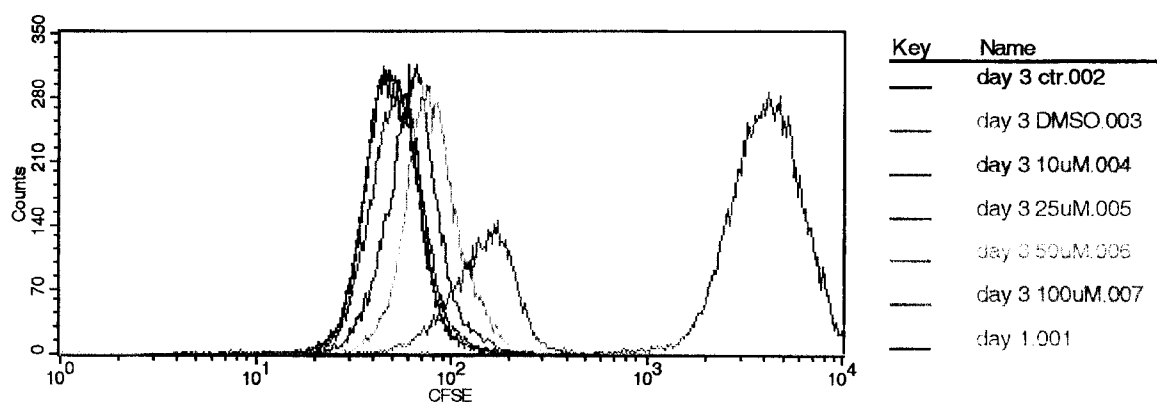


Figura 3.5 - Histograma representativo da análise por citometria de fluxo do teor em CFSE, após incubação da linha de linfócitos T Jurkat com diferentes concentrações de naringenina, durante 48 horas e 3 dias de incubação (n=2).

De acordo com o histograma representado na figura anterior verifica-se um efeito na divisão celular na linha de linfócitos T estudada, quando em contacto com a naringenina. Este efeito é proporcional à quantidade de naringenina, não se observando neste caso morte celular evidente como nos casos anteriores, com a excepção da condição em que as células foram mantidas em contacto com 100 μM de composto.

Com o intuito de verificar se este tipo de composto tem o mesmo efeito sobre células humanas, a metodologia foi aplicada a PBLs, com concentrações de naringenina entre 25 e 75 μM . Foram seleccionadas estas concentrações dado o número limitado de PBLs e os resultados obtidos anteriormente. Ao contrário das linhas celulares transformadas, estas células necessitam de um activador que estimula a sua divisão (PHA).

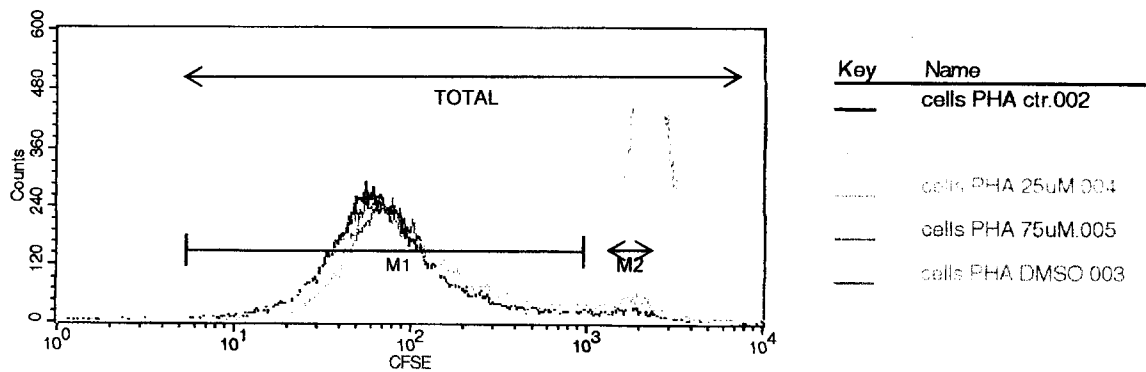


Figura 3.6 - Histograma obtido por citometria de fluxo, após incubação de PBLs com diferentes concentrações de naringenina, durante 48h e 3 dias de incubação (n=2).

De acordo com o histograma (figura 3.6) verifica-se maior percentagem de divisão celular na presença de PHA (amarelo). Verifica-se uma menor percentagem de divisão celular para células expostas a 75 μ M de naringenina quando comparando com a condição de 25 μ M, na região M1. Fora desta região existe um conjunto de células em todas as condições que se dividiu menos que as restantes (região M2), visto que esta população tem maior heterogeneidade do que a encontrada nas células *Jurkat*. Nesta região o número de células é superior para 75 μ M de naringenina (azul) do que para 25 μ M (verde), o que indica que um maior número de células foi afectado nestas condições.

Seguidamente, procedeu-se à quantificação do efeito na divisão celular na região M1 e no total (engloba os 2 picos). Foi calculada a média para cada uma das condições, sendo que quanto maior este valor, maior o efeito na inibição da divisão celular (tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Média de fluorescência para cada condição analisada

Condição	Média	
	Total	M1
Controlo sem PHA	2572,07	622,42
Controlo	205,91	108,60
DMSO	235,44	118,47
25 μ M naringenina	276,05	133,62
75 μ M naringenina	334,99	143,80

Com base no número de células vivas e de células mortas (R3) foi elaborado um gráfico de modo a averiguar efeitos citotóxicos da naringenina sobre as células, tendo-se concluído que o efeito citotóxico sobre a linha celular de PBL, é pouco significativo para as concentrações testadas (cerca de 20% para a concentração de 75 μ M).

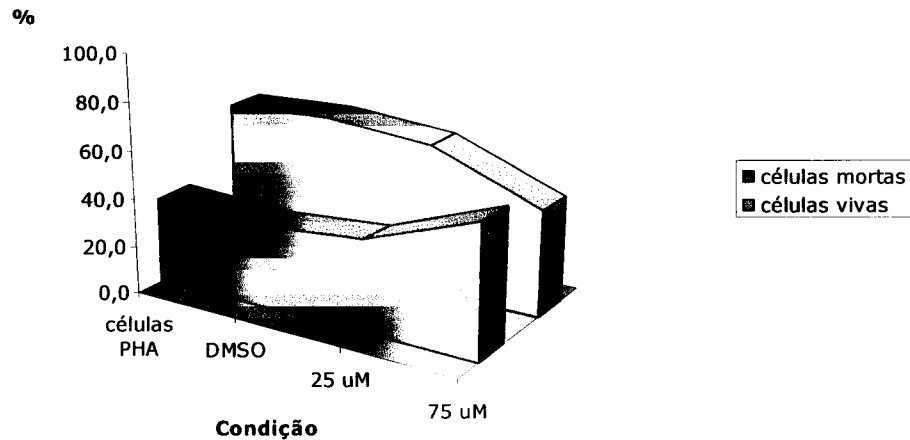


Figura 3.7 - Percentagem de células vivas e mortas em cada situação estudada, de modo a estimar a morte celular durante 48 horas de incubação com naringenina.

Este estudo foi também desenvolvido para o xanto-humol, como técnica complementar ao método SRB, em células *Jurkat*.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo são fornecidos num gráfico onde são representadas todas as células analisadas pelo citómetro, em função do seu tamanho (FSC) e complexidade (SSC). Depois de seleccionada a região correspondente às células vivas, é possível obter um histograma como o representado na figura 3.8.

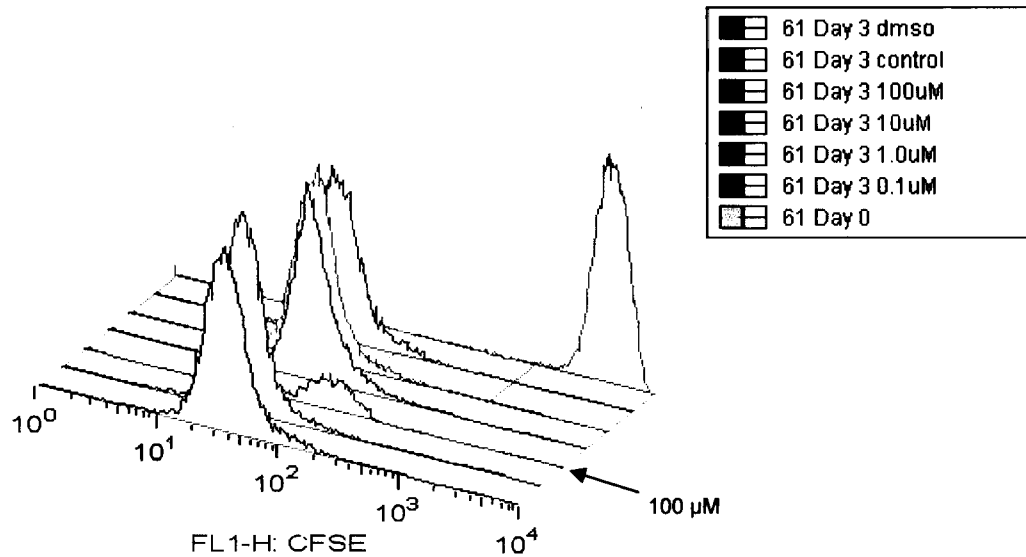


Figura 3.8 - Resultados obtidos por citometria de fluxo, após incubação de linfócitos T (linha celular Jurkat) com diferentes concentrações de xanto-humol, durante 48 horas e 3 dias de incubação. O gráfico traduz a intensidade de fluorescência, de acordo com teor de CFSE em função do número de células, para cada ensaio realizado (n=2).

Na figura 3.8 podemos observar que relativamente ao dia 0 (início da experiência) todas as células se dividiram, e que o DMSO não exerceu efeito significativo sobre as células, quando comparado com o controlo. De notar um efeito anti-proliferativo proporcional à concentração de polifenol, onde as células sujeitas a 100 μM de xanto-humol já apresenta uma acentuada morte celular.

O efeito anti-proliferativo foi quantificado por determinação da média de fluorescência em cada situação analisada (tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Mediana de fluorescência para cada condição analisada

Condição	Mediana de fluorescência
Dia 0	4478,0
Controlo	34,0
Controlo com DMSO	37,0
0,1 μM xanto-humol	36,3
1,0 μM xanto-humol	37,7
10 μM xanto-humol	52,4
100 μM xanto-humol	120,0

Os resultados obtidos estão de acordo com os obtidos por Miranda e seus colaboradores (Miranda *et al.*, 1999). Os autores estudaram o efeito anti-proliferativo de

polifenóis presentes no lúpulo, noutras linhas celulares de cancro, recorrendo ao método da SRB, tal como realizado neste trabalho e cujos resultados também se mostraram concordantes. Chegaram à conclusão que uma concentração de 100 μM de polifenóis conduz a morte celular, tal como verificado nos resultados obtidos por citometria para o xanto-humul. O xanto-humul apresentou um efeito máximo a uma concentração de 10 μM .

As células *TPC-1* não foram estudadas por este método por falta de oportunidade, mas verifica-se que o efeito dos compostos fenólicos (nomeadamente o xanto-humul e a naringenina) é semelhante nas duas linhas celulares estudadas. Contudo, a naringenina induziu a morte nas células *Jurkat* para uma concentração de 100 μM (citometria de fluxo), o que não aconteceu nas *TPC-1* (método SRB).

3.1.2 Método colorimétrico SRB

O passo de fixação no método SRB tem sido realizado adicionando o fixador (ácido tricloroacético 50%) gentilmente sobre o meio de cultura. Contudo, algumas referências bibliográficas (Pauwels *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 1999) indicam a remoção do meio de cultura previamente à fixação. De modo a estudar alterações nos resultados finais, foi realizado um estudo onde o passo de fixação foi conduzido na presença e na ausência de meio de cultura, tendo sido também estudado o efeito do etanol na concentração final adicionada às células nos estudos com os polifenóis.

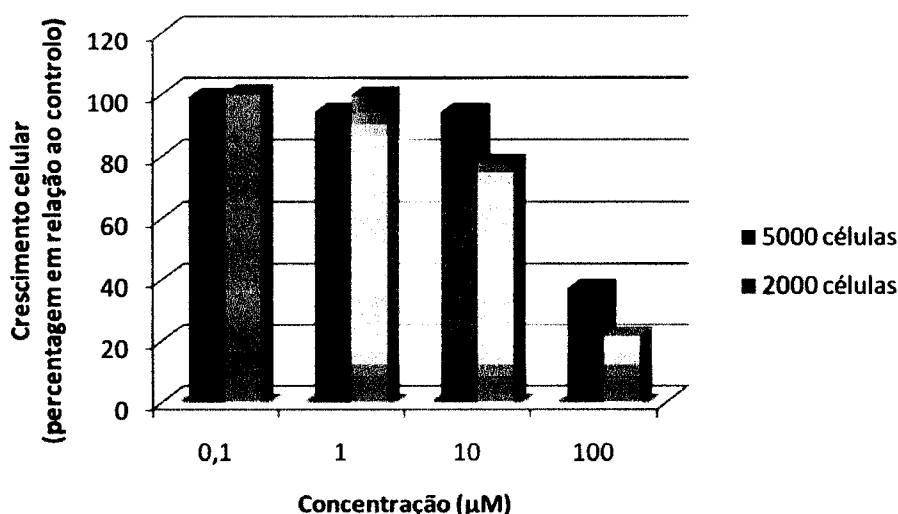


Figura 3.9 - Efeito do número de células na acção do xanto-humul sobre as *TPC-1* (n=2).

Os elevados valores de absorvância obtidos nos primeiros ensaios realizados levaram à diminuição do número de células inicial de 5×10^3 para 2×10^3 células por poço (figura 3.9). Contudo, a diminuição do número de células demonstrou um aumento no efeito dos polifenóis, que pode ser devido a uma diminuição do efeito depurativo do composto por parte das células, tal como indicado mais à frente neste capítulo. Este efeito baseia-se na capacidade das células em diminuir a actividade de um composto, neste caso em diminuir a capacidade anti-proliferativa do xanto-humol. Este tipo de acção pode estar relacionado com o aumento do tempo de exposição, bem como com o número de células e a concentração de composto.

Foi também estudado o efeito do tempo de incubação nos resultados finais, tendo-se verificado que a adição de composto após 24 ou 48 horas do plaqueamento das células não influencia o efeito do xanto-humol, pelo que o método foi realizado com o menor tempo de incubação (resultados não mostrados).

Uma vez que os polifenóis estudados tiveram que ser dissolvidos em solventes diferentes, foi analisado o efeito de cada um desses solventes nos resultados obtidos. O estudo realizado indica que a fixação na presença e na ausência de meio não implica alterações nos resultados finais, facto comprovado pelos resultados obtidos (figura 3.10). Assim, nos ensaios posteriores, o passo de fixação foi desenvolvido adicionando o fixador gentilmente sobre o meio de cultura.

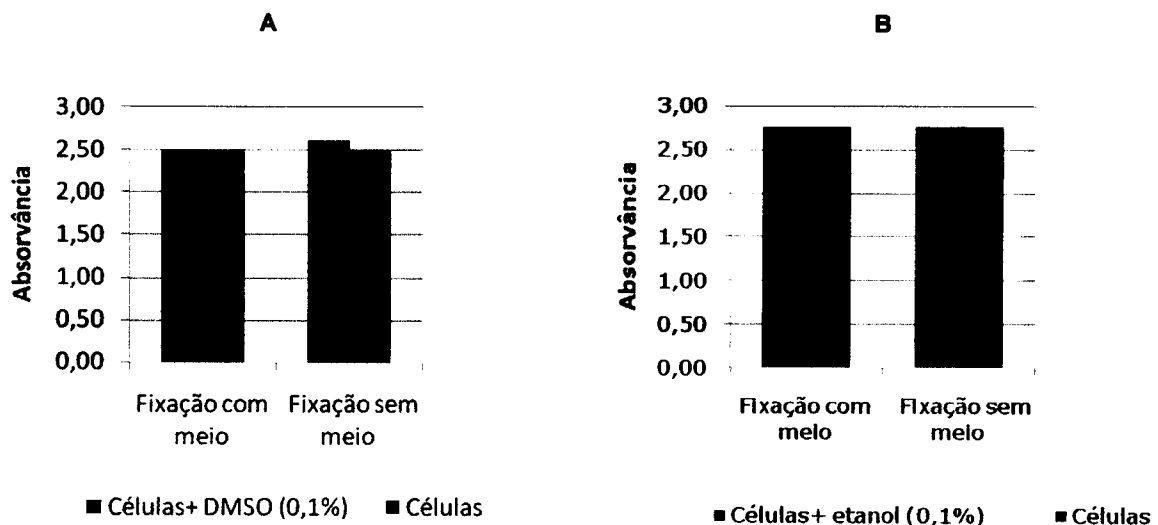


Figura 3.10 - Valores de absorvância obtidos pelo método SRB, para células fixadas na presença e na ausência de meio de cultura. São também apresentados os resultados para as células em contacto com 0,1% de DMSO (A) e etanol (B) (n=3).

A adição de etanol ou DMSO numa concentração final de 0,1% não produziu qualquer efeito significativo nas células (figura 3.10), pelo que os solventes a esta concentração podem ser utilizados como veículo para os estudos com polifenóis, com resultados mais precisos.

Em vários trabalhos onde é utilizada a técnica SRB, esta é sempre aplicada em células aderentes, facto que pode ser explicado devido ao elevado número de lavagens existentes no método e que poderia conduzir a erros, dada a possível perda de células. Contudo, neste trabalho, pretendia-se aplicar o método também às células *Jurkat*. Como tal, a empresa que fornece o *kit* de marcação celular com SRB foi contactada acerca da possível aplicação do mesmo em células em suspensão. A resposta da Sigma foi positiva, indicando que o método poderia ser aplicado nestas células incluindo um passo de centrifugação em cada etapa de lavagem.

Após aplicação do método, concluiu-se que mesmo com centrifugação das células, dado que estas não aderem à placa, a variância dos resultados finais era enorme e conseqüentemente não foram testadas estas células através deste método.

A proliferação celular foi avaliada numa linha celular de cancro da tiróide (*TPC-1*), através do método colorimétrico da sulforodamina B (SRB).

Foram testados vários compostos fenólicos existentes em alimentos e bebidas, apresentando-se os resultados no gráfico seguinte (figura 3.11).

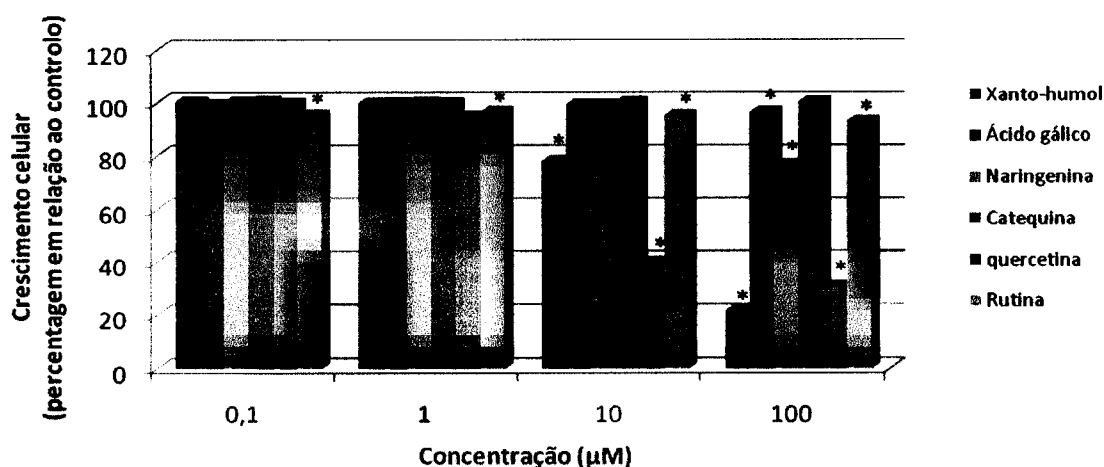


Figura 3.11 - Efeito de diferentes polifenóis no crescimento de uma linha celular de cancro da tiróide (*TPC-1*), após 48 horas de exposição. Os dados dizem respeito à média de 3 triplicados, com excepção da quercetina e da rutina (n=6). * Estatisticamente significativo, $p \leq 0,05$.

Os resultados obtidos mostram um efeito anti-proliferativo mais significativo do xanto-humol para uma concentração de 100 μM (figura 3.11), tal como verificado por Miranda e seus colaboradores (1999). Contudo, a quercetina demonstrou possuir um efeito anti-proliferativo superior ao xanto-humol a 10 μM , mas que acaba por ser inferior ao do xanto-humol a 100 μM . O elevado efeito da quercetina também é referenciado por Conforti e seus colaboradores (2007).

Inesperadamente, a rutina foi eficaz nas quatro concentrações testadas, mesmo que ligeiramente, sendo que o seu efeito não aumentou significativamente com o aumento da concentração.

A catequina não exerceu nenhum efeito na gama de concentrações testada, ao passo que os restantes polifenóis (ácido gálico, naringenina, xanto-humol, quercetina e rutina) foram todos efectivos na concentração máxima testada (100 μM), sendo que o xanto-humol e a quercetina também demonstraram capacidade anti-proliferativa a 10 μM (figura 3.11).

Os resultados mostram elevadas capacidades anti-proliferativas para polifenóis com grupos metoxi na posição C-8 e grupos hidroxilo na posição C-3, nomeadamente o xanto-humol e a quercetina respectivamente, tal como já referenciado por Kawaii e seus colaboradores (1999).

Para saber se o efeito observado pela análise dos diferentes compostos estudados se deve a uma diminuição da divisão celular (anti-proliferativo) ou morte celular (citotoxicidade), foi medida a absorvância no momento de incubação das células com os polifenóis ($t=0$), que foi depois comparada com o valor no final da experiência.

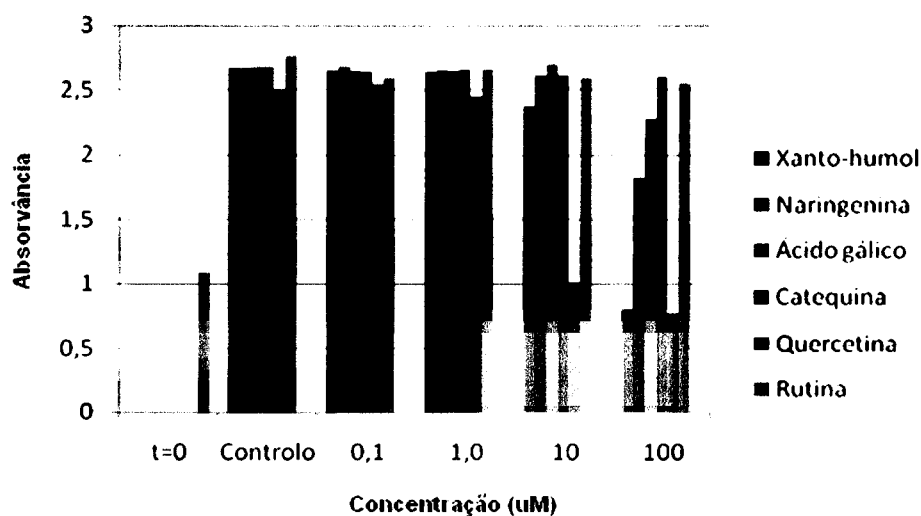


Figura 3.12 - Valores de absorvância obtidos para as diferentes condições estudadas, com referência ao valor de absorvância no momento da adição dos polifenóis ($t=0$) ($n=9$, com excepção da quercetina e da rutina ($n=6$)).

Um valor de absorvância em t=0 superior ao valor no final da experiência significa que houve uma diminuição do número de células devido à sua morte, e um valor de t=0 inferior ao valor no final poderá significar efeito anti-proliferativo, caso o número de células seja inferior às do controlo no final do tempo de exposição.

Os resultados apresentados na figura 3.12 mostram que o xanto-humol e a quercetina apresentam efeito citotóxico a 100 μM , sendo que a quercetina demonstra já citotoxicidade a 10 μM . A naringenina, a rutina e o ácido gálico provocam uma diminuição do número de células por inibição da sua divisão, bem como o xanto-humol a 10 μM , também visíveis em imagens obtidas por microscopia (figura A.2 – em anexo).

De notar que os valores de absorvância são elevados, facto que podia ter sido alterado diminuindo o número de células por poço ou diminuindo a quantidade de corante adicionado no método. O número de células foi reduzido para 2×10^3 ao contrário do indicado em outros trabalhos (no trabalho realizado por Miranda e seus colaboradores foram utilizadas 5×10^3 células por poço). A quantidade de corante não foi alterada, dado que era a indicada no *kit*, podendo ser um factor importante na coloração das proteínas celulares.

Com o objectivo de estudar o efeito do tempo de incubação das células com o efeito produzido pelos polifenóis, estas foram colocadas em contacto com 0,1, 1,0, 2,5, 5, 10, 20, 40, 60 e 100 μM de xanto-humol durante 24, 48 e 72 horas.

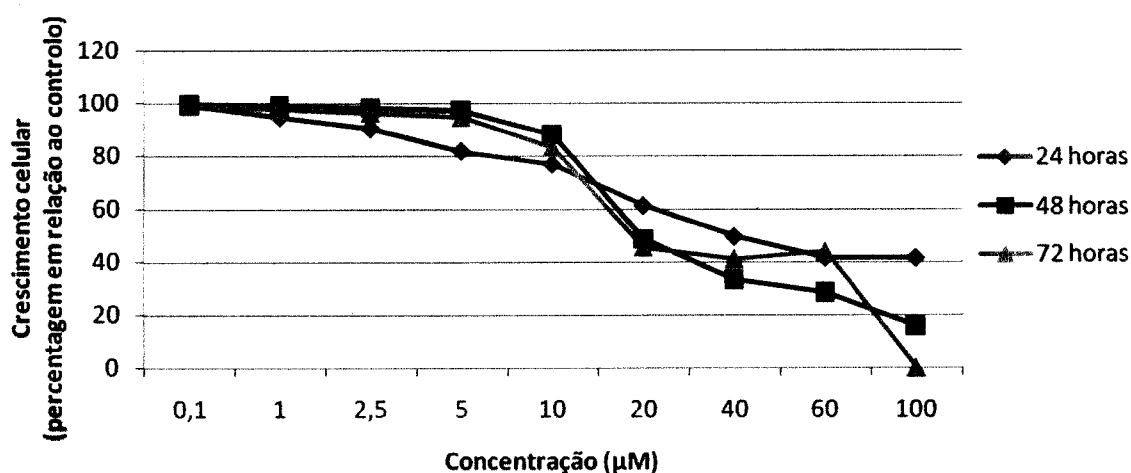


Figura 3.13 - Efeito do xanto-humol no crescimento de uma linha celular de cancro da tiróide (TPC-1), após 24, 48 e 72 horas de exposição (n=2).

Os resultados expostos na figura 3.13 revelam que, para concentrações inferiores a 10 μM , o xanto-humol não apresenta efeito sobre as células para tempos de exposição de 48 e 72 horas. Contudo, para 24 horas de exposição o xanto-humol apresenta um pequeno efeito, dependente da concentração. Para concentrações de xanto-humol superiores a 10 μM existe um aumento acentuado do efeito do polifenol sobre as células para 48 e 72 horas de exposição, sendo que para 72 horas e 100 μM de xanto-humol ocorreu a morte de praticamente todas as células (figura 3.13).

O maior efeito do xanto-humol para 24 horas de exposição e concentrações inferiores a 10 μM pode ser explicado com base no efeito destoxicante das células que provoca a perda de actividade do composto para tempos de exposição superiores (48 e 72 horas). O meio de cultura não foi substituído por meio fresco contendo flavonóide, pelo que a concentração de xanto-humol diminuiu com o passar do tempo devido a destoxificação ou degradação não-enzimática. Este efeito já tinha sido demonstrado por Miranda e seus colaboradores (Miranda *et al.*, 1999).

A determinação da absorvância no momento da adição dos polifenóis ($t=0$) quando comparada com a absorvância no final da incubação revela que o xanto-humol apresenta efeito citotóxico para concentrações iguais ou superiores a 20 μM (valores de absorvância inferiores relativamente à absorvância em $t=0$), para os diferentes tempos de incubação. Como tal, a utilização do xanto-humol como agente anti-tumoral deve compreender concentrações inferiores a 20 μM , para as quais um tempo de exposição inferior revelou ser mais efectivo (figura 3.13).

Os valores de EC_{50} determinados com base no gráfico acima, de acordo com os tempos de exposição e concentrações testadas, estão indicados na tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Valores de EC_{50} determinados com base nos diferentes tempos de exposição com xanto-humol, e em diferentes gamas de concentração

Tempo de exposição (horas)	EC_{50}		
	0,1-100 μM	0,1-10 μM	10-100 μM
24	62,0	21,1	48,9
48	45,4	44,7	7,2
72	44,1	32,2	18,3

Os resultados vão de encontro ao já discutido anteriormente. Na gama de concentrações testada (0,1-100 μM), durante 24 horas de contacto com as células o xanto-humol possui menor efeito anti-proliferativo (indicado pelo elevado valor de EC_{50}),

ao passo que os restantes são praticamente iguais e revelam maior capacidade anti-proliferativa (menores valores de EC_{50}).

Analisando apenas o intervalo inicial de concentrações (0,1-10 μ M), o xanto-humol revela-se mais efectivo para 24 horas de exposição, o que pode estar relacionado com a capacidade destoxicante da linha celular discutida anteriormente, o que revela que a estas concentrações o factor tempo pode ser importante. Para as concentrações mais elevadas (10-100 μ M), os dois dias de exposição revelaram elevado efeito do xanto-humol para inibir o crescimento das *TPC-1*. Um tempo de exposição de 72 horas revela menor efeito que a 48 horas de exposição, o que se pode dever à diminuição da quantidade de polifenol por degradação (figura 3.14). Uma exposição de 24 horas para elevadas concentrações revelou menor efectividade do composto fenólico, o que significa que o factor tempo também é importante a estas concentrações. Face ao exposto, um tempo de exposição de 48 horas parece ser o ideal para aplicar esta metodologia a outros polifenóis.

Comparando os valores da tabela 3.3 com os apresentados por Miranda e seus colaboradores (1999), verifica-se que os valores de EC_{50} obtidos neste trabalho para 48 horas de exposição na gama de concentrações testada são bastante superiores aos obtidos por estes investigadores, possivelmente devido às diferentes linhas celulares estudadas. Essa diferença também está evidente no trabalho de Miranda (1999), onde para duas linhas celulares diferentes o valor de EC_{50} para o xanto-humol é bastante divergente, sendo muito baixo para a linha celular de cancro dos ovários, o que demonstra que o xanto-humol é mais efectivo sobre estas células, sendo muito menos efectivo sobre a linha celular aqui estudada.

Foi realizado um estudo para determinar a degradação do xanto-humol no meio de cultura, dado que a diminuição do efeito na divisão da linha celular de cancro da tiróide pode ser devido a uma degradação do polifenol e, por conseguinte, a uma diminuição da sua concentração efectiva no meio de cultura, e não à sua destoxificação, tal como referenciado noutros trabalhos.

3.2 Estabilidade do xanto-humol no meio de cultura

A análise dos meios de cultura com diferentes concentrações de xanto-humol e diferentes tempos de incubação, por CLAE, revela que o xanto-humol não sofre degradação significativa no meio de cultura, existindo uma pequena diminuição da sua concentração a 72 horas a 10 e 100 μM (figura 3.14). Como tal, a diminuição do efeito deste composto na divisão das *TPC-1* para concentrações inferiores a 10 μM pode ser realmente devido ao efeito depurativo das células e não devido à diminuição da sua concentração por degradação, uma vez que a sua concentração se mantém constante ao longo do tempo de incubação, sem formação de isoxanto-humol (produto da sua isomerização). Contudo, o xanto-humol foi menos efectivo com 72 horas de exposição comparado com 48 horas de exposição, para concentrações superiores a 10 μM , o que pode ser devido à degradação do xanto-humol verificada neste ensaio.

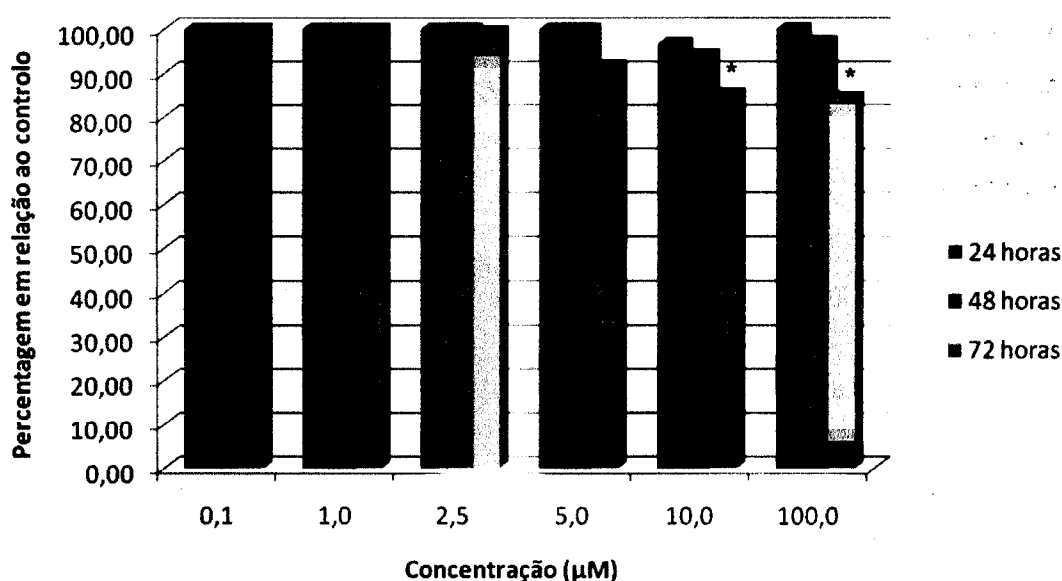


Figura 3.14 - Quantidade de xanto-humol no meio de cultura ao fim de 24, 48 e 72 horas, e a diferentes concentrações. * Estatisticamente significativo, $p \leq 0,05$ ($n=3$).

3.3 Efeito dos polifenóis na viabilidade das células *TPC-1* pelo método de exclusão por azul de tripano

O número de células vivas e de células mortas foi determinado para células expostas a xanto-humol e a naringenina, durante 48 horas. Com base nestes valores foi determinada a actividade antioxidante e a citotoxicidade dos polifenóis testados, como método complementar aos resultados observados pelo método SRB.

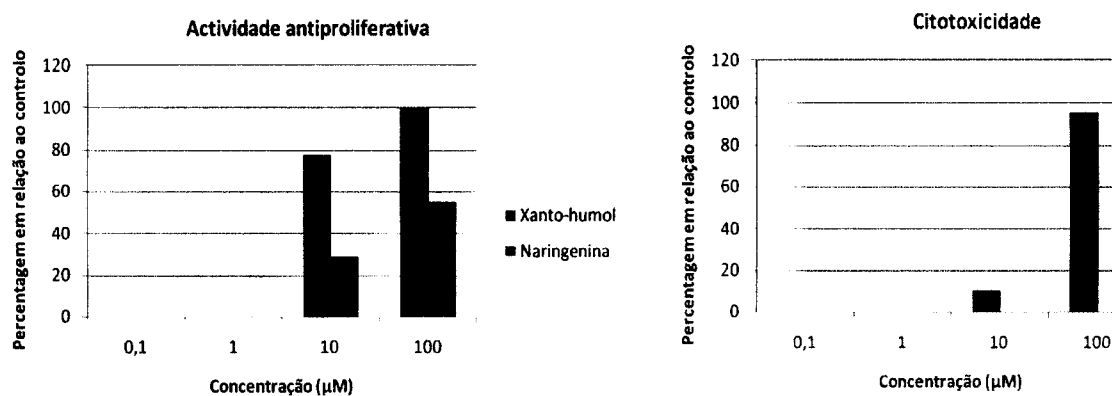


Figura 3.15 - Determinação da actividade anti-proliferativa e do efeito citotóxico do xanto-humol e da naringenina, com base no método de contagem celular com azul de tripano (n=2).

Os valores obtidos demonstram que o xanto-humol apresenta capacidade anti-proliferativa elevada a partir de 10 µM, mas um efeito citotóxico evidente a 100 µM (figura 3.15), pelo que o seu efeito se fica a dever a morte celular e não a inibição da divisão das *TPC-1*. A naringenina apresentou uma ligeira actividade anti-proliferativa a 10 µM e a 100 µM, inferior à do xanto-humol, não apresentando efeito citotóxico em nenhuma das concentrações (figura 3.15). De notar que estes resultados vão de encontro aos obtidos pelo método SRB (figura 3.11 e 3.12).

3.4 Análise em gel de agarose do perfil de fragmentação de ADN

Pretendeu-se verificar a pretensão do xanto-humol em induzir a apoptose, mas os resultados apresentados na figura 3.16 não permitem retirar qualquer conclusão. O mesmo estudo aplicado à quercetina revela que este polifenol não é capaz de induzir a fragmentação de ADN nas *TPC-1* (figura 3.16).

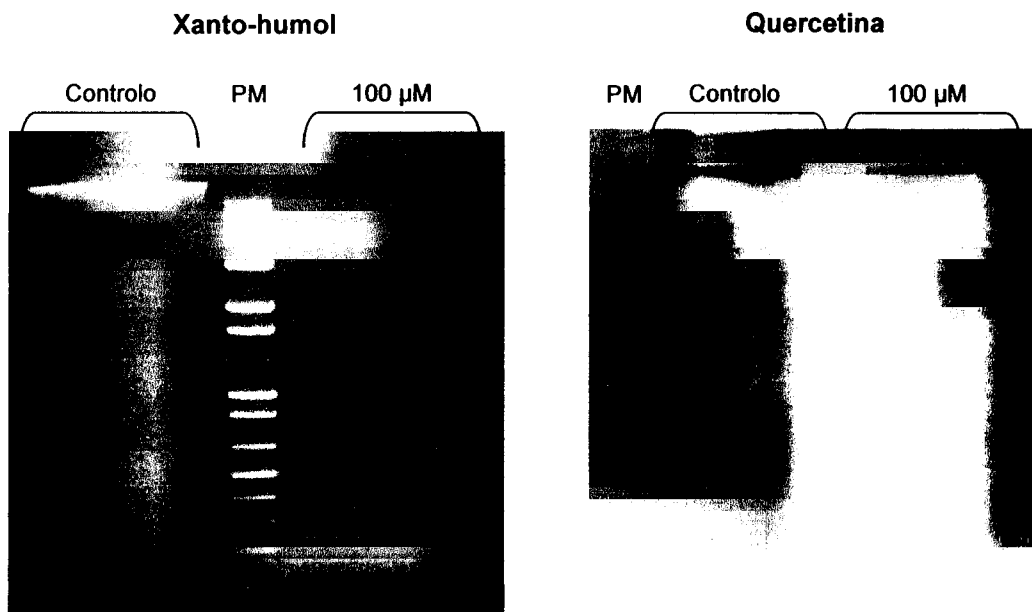


Figura 3.16 - Gel de electroforese do ADN isolado das TPC-1 tratadas com etanol (controlo), xanto-humol e quercetina (100 μM), durante 24 horas. O marcador de peso molecular está assinalado como PM (1 Kb).

3.5 Apoptose celular por TUNEL

Foi testado o efeito do xanto-humol e da quercetina na apoptose das *TPC-1* pela técnica de TUNEL. Tal como ilustrado na figura 3.17, a apoptose aumenta após incubação das células com os dois compostos (100 μM), durante 24 horas. Contudo, o xanto-humol é muito efectivo quando comparado com a quercetina, provocando a apoptose em todas as células, o que vai de encontro ao verificado na análise da fragmentação de ADN em gel de electroforese. A quercetina apenas provocou um aumento da apoptose em cerca de 15% quando comparando com o controlo (figura 3.17), ao passo que no gel de electroforese não foi possível observar qualquer alteração.

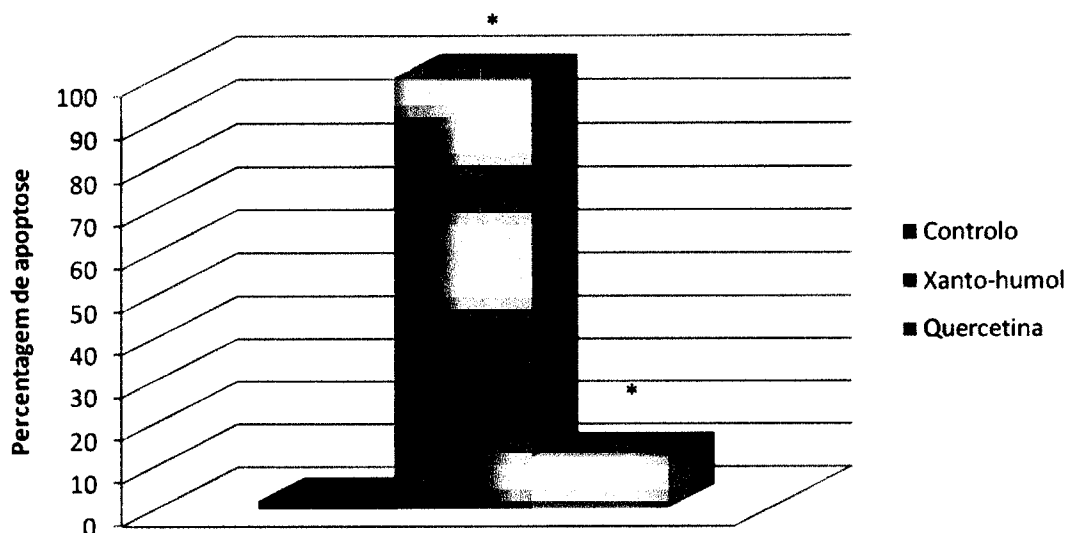


Figura 3.17 - Efeito do xanto-humol e da quercetina na percentagem apoptótica das *TPC-1*, pela análise de TUNEL. O gráfico representa a percentagem de células apoptóticas por comparação com todos os núcleos corados com DAPI. O tratamento com os compostos fenólicos provocou um aumento significativo da morte celular por apoptose, na concentração testada. *Estatisticamente significativo, $p \leq 0,05$ ($n=3$).

3.6 Determinação do poder anti-radicalar para diferentes compostos fenólicos pelo método DPPH

Seguidamente, aplicou-se a reacção de vários compostos fenólicos com o radical DPPH, de modo a estimar o poder anti-radicalar de cada um deles.

Inicialmente foi estudada uma gama de concentrações igual à aplicada para os ensaios biológicos. Contudo, o método deve ser optimizado de modo a que a concentração intermédia da gama de concentrações testada coincida com a diminuição de 50% do DPPH (EC_{50}). Concentrações muito baixas não provocam qualquer efeito, ao passo que concentrações demasiado elevadas provocam a redução praticamente completa do DPPH. Assim, tal como descrito no ponto 2.8.1, foi determinado uma gama de concentrações para cada composto, de modo a aplicar o método estático do DPPH. Foi também aplicado o método dinâmico, usando os polifenóis a 10 μM , dado que é o valor mais próximo do valor de EC_{50} encontrado para os compostos com efeito radicalar pelo método estático.

Na figura 3.18 ilustram-se as curvas de calibração obtidas para os compostos analisados (rutina, xanto-humol, quercetina, catequina, ácido gálico e naringenina).

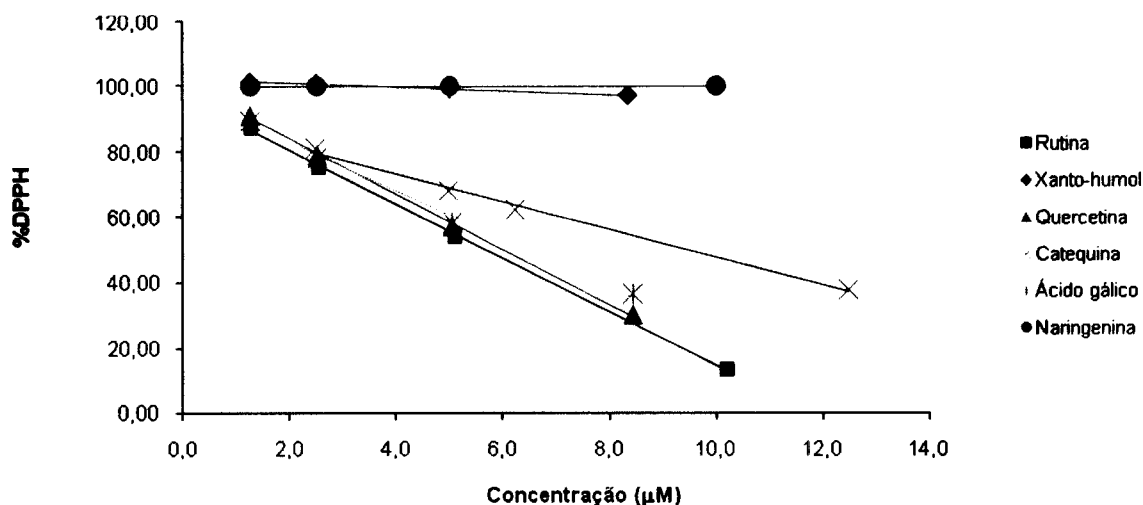


Figura 3.17 - Representação gráfica da percentagem de DPPH existente no meio reaccional em função da concentração de composto estudado.

Os parâmetros das curvas de calibração dos diversos compostos fenólicos, os valores de EC_{50} , bem como os valores encontrados para o poder anti-radicalar, encontram-se resumidos na Tabela 3.4.

Na Figura 3.19, encontra-se uma comparação das percentagens de PAR, permitindo a identificação rápida do composto fenólico com maior capacidade anti-radicalar.

Tabela 3.4 - Parâmetros das regressões lineares e valores de EC_{50} e PAR para os compostos fenólicos analisados

Composto fenólico	Declive (m)	O. Origem (b)	R^2	EC_{50} (µM)	PAR (%)
Ácido gálico	-7,37	97,5	0,996	6,45	15,5
Xanto-humol	-0,58	102,0	0,996	89,30	1,12
Rutina	-8,25	97,1	1,000	5,71	17,5
Quercetina	-8,47	101,0	0,999	6,01	16,6
Catequina	-4,26	90,1	0,995	9,43	10,6
Naringenina	-0,02	100,0	0,970	2405,29	0,0

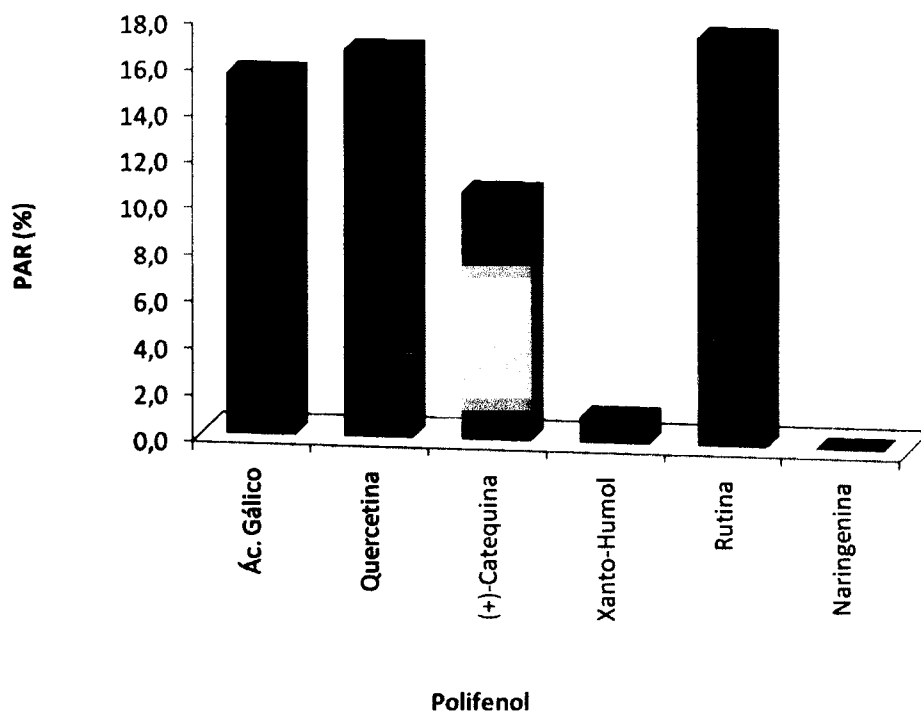


Figura 3.18 - Comparação das percentagens de PAR para os compostos fenólicos analisados (n=2).

O método DPPH é um dos métodos mais utilizados em investigação, como sendo um método fiável para a determinação da actividade antioxidante em amostras contendo compostos fenólicos (Goupy *et al.*, 1999; Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Brand-Williams *et al.*, 1995).

O método do DPPH aqui descrito, permite uma fácil e rápida avaliação do poder anti-radicalar de compostos antioxidantes (Bondet *et al.*, 1997; Brand-Williams *et al.*, 1995), mas é necessário ter alguma atenção na aplicação e na interpretação dos resultados. De acordo com indicações de bibliografia (Bondet *et al.*, 1997; Stratil *et al.*, 2006), o poder antioxidante depende da estrutura química do composto fenólico. Alguns compostos reagem de forma tão rápida com o DPPH[•], que o número de radicais reduzidos chega a ser igual ao número de grupos hidroxilo disponíveis.

Dos vários polifenóis analisados, a rutina, pertencente à classe dos flavonóis, é aquele que possui maior poder anti-radicalar (17,5%). Este facto pode ser explicado pela presença de vários grupos hidroxilo na sua estrutura química. Por sua vez, a quercetina, pertencente à mesma classe de compostos, possui igualmente um poder anti-radicalar elevado (16,6%) que é relativamente próximo do valor do composto anterior. Esta ordem de eficiência também foi obtida no estudo efectuado por Brand-williams *et al.* (1995), embora no de Sánchez-Moreno *et al.* (1998) se tenha obtido o inverso. Através da análise

das estruturas químicas dos dois compostos, verifica-se que a rutina é um flavonol em que o hidrogénio do grupo hidroxilo é substituído por uma molécula de açúcar, a rutinose, havendo por isso mais grupos OH disponíveis para reduzir o DPPH do que no caso da quercetina. Como tinha sido referido anteriormente a capacidade antioxidante dos compostos depende da sua estrutura, concluindo-se que os dados por nós obtidos sejam mais coerentes.

Entre os ácidos fenólicos, destaca-se o ácido gálico (15,5%). Pensa-se que o efeito indutivo, causado pela presença de três grupos hidroxilo na sua estrutura, esteja a realçar a sua actividade antioxidante. Esta evidência também foi referida por Sánchez-Moreno *et al.* (1998).

Tal como o ácido gálico, o xanto-humol possui três grupos hidroxilo na sua estrutura química. Por essa razão esperava-se que o valor de PAR fosse superior ao obtido (1,12%). A presença do grupo metoxi, que tal como se viu anteriormente pode estar a proteger os grupos hidroxilo, o que poderá estar a influenciar o valor obtido.

É possível afirmar que a naringenina não apresenta actividade anti-radicalar, tal como verificado por Silva e seus colaboradores (2002), possivelmente devido à inexistência da ligação dupla conjugada com a função 4-oxo no anel B, assim como um menor número de grupos hidroxilo quando comparado com a quercetina.

Da análise dos dados obtidos para este estudo, ficou claro que a interacção do composto com o DPPH depende da sua estrutura química, conclusão suportada por vários estudos anteriores (Bondet *et al.*, 1997; Stratil *et al.*, 2006).

3.7 Determinação do poder anti-radicalar para diferentes compostos fenólicos pelo método da desoxirribose

Neste ensaio foram testadas soluções de 100 μM de polifenóis, uma vez que foi a concentração que mostrou maiores efeitos anti-proliferativos sobre as linhas celulares testadas, pretendendo-se encontrar uma relação entre esta actividade e a actividade anti-radicalar de cada um dos compostos.

Com base nos resultados apresentados no gráfico da figura 3.20 observa-se que o ácido gálico é o composto fenólico com maior capacidade anti-radicalar (32,65%), seguido da quercetina (30,61%), da rutina (22,45%) e da catequina (18,37%). O xanto-humol apresentou uma actividade anti-radicalar muito baixo (8,16%), ao passo que a naringenina não apresentou qualquer capacidade como composto anti-radicalar.

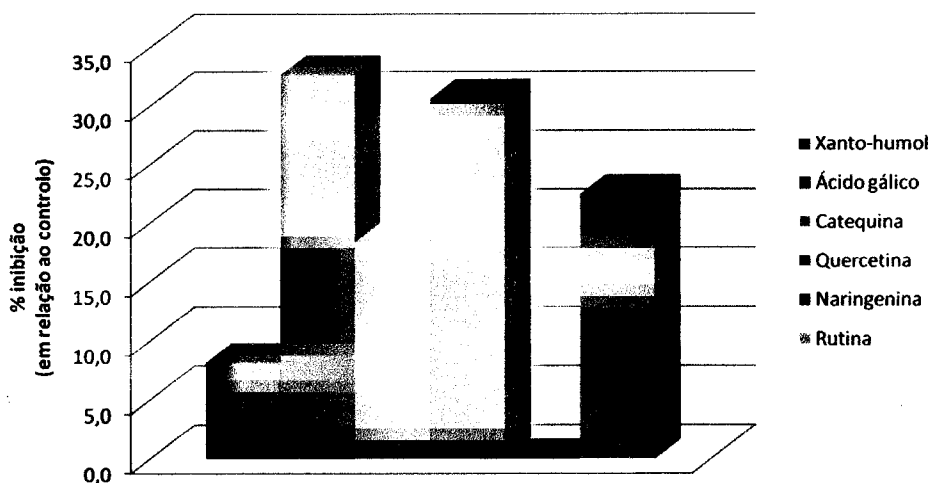


Figura 3.19 - Representação da percentagem de inibição de radicais livres por diferentes polifenóis, pelo método da desoxirribose (n=2).

A percentagem de inibição de radicais livres pelo método da desoxirribose indica que o poder anti-radicalar dos compostos analisados (figura 3.20) é semelhante ao obtido pelo método do DPPH (figura 3.19), com excepção da rutina que apresentou menor capacidade no método da desoxirribose quando comparando com os restantes compostos fenólicos. Como tal, estes métodos podem ser utilizados como ensaios complementares para a determinação do poder anti-radical de amostras, tendo em atenção que como se tratam de metodologias baseadas em princípios diferentes podem existir diferentes interferências, pelo que os resultados não devem ser analisados isoladamente.

Durante a optimização deste método por Moreira (2007) é indicado que o solvente tem um grande efeito nas percentagens de inibição, sendo estas superiores em água, comparando com metanol. Assim, os valores obtidos, inferiores a 35%, podem ser explicados devido aos polifenóis terem sido dissolvidos em metanol, dada a insolubilidade de alguns compostos fenólicos estudados em água (nomeadamente o xanto-humol).

3.8 Relação entre a actividade anti-proliferativa e a actividade anti-radicalar

Com base nos resultados apresentados acerca da capacidade anti-proliferativa e o efeito anti-radicalar dos vários polifenóis testados, pode-se afirmar que não foi encontrada correlação entre os dois efeitos, apesar de algumas concordâncias entre os resultados.

A nível da capacidade anti-proliferativa, o xanto-humol e a quercetina foram os mais eficazes, seguidos da naringenina (figura 3.11). O ácido gálico e a rutina foram muito pouco efectivos. Comparando estes resultados com os efeitos anti-radicalares verifica-se que não estão de acordo, dado que o xanto-humol e a naringenina apresentam baixa actividade anti-radicalar pelo método do DPPH e da desoxirribose (figura 3.19 e 3.20). No entanto foram capazes de inibir o crescimento das *TPC-1*. A rutina apresenta a maior capacidade de redução de DPPH observada, e uma percentagem significativa de inibição de radicais pelo método da desoxirribose quando comparando com os outros polifenóis, tendo sido muito pouco efectiva sobre a linha celular estudada, efeito semelhante observado para o ácido gálico. A catequina não foi capaz de inibir o crescimento das *TPC-1*, mas apresenta um poder anti-radicalar significativo pelos dois métodos. A quercetina e o ácido gálico foram muito efectivos na inibição de radicais livres, sendo que a quercetina foi igualmente muito efectiva na inibição da proliferação celular das *TPC-1*.

A ausência de uma relação entre as duas actividades está referenciada noutros trabalhos, onde foi estudado o efeito antioxidante de uma mistura de polifenóis e comparado com a actividade anti-proliferativa da mesma mistura (Meyers, 2003; Liu, 2002).

4 Conclusões e perspectivas futuras

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho envolveu o estudo da actividade anti-tumoral de polifenóis presentes em bebidas, através do método da sulforodamina B e marcação celular com CFSE e posterior análise por citometria de fluxo. Foi demonstrada a capacidade de alguns polifenóis em inibir a divisão de duas linhas celulares de cancro humano da tiróide (*TPC-1*) e de leucemia (*Jurkat E6.1*), e efeito citotóxico em alguns casos.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo revelam que o xanto-humol e a naringenina são capazes de inibir a proliferação celular da linha celular de linfócitos T de leucemia (*Jurkat E6.1*). A naringenina revelou efeito citotóxico para concentrações elevadas testadas (superiores a 100 μM), ao passo que, para concentrações inferiores, verificou-se um efeito dependente da concentração, sem efeito citotóxico evidente, com capacidade anti-proliferativa superior a 50 μM . O seu efeito sobre PBLs revelou efeitos similares, o que significa que o seu efeito sobre células humanas é igual ao verificado sobre a linha celular estudada. O xanto-humol foi efectivo sobre a linha celular *Jurkat* numa concentração entre 10 e 100 μM , verificando-se um efeito citotóxico significativo na concentração mais alta. Este polifenol, quando comparado com a naringenina, apresentou efeitos antiproliferativo e citotóxico superiores.

No que diz respeito ao método da sulforodamina B, aplicado sobre a linha celular *TPC-1*, o xanto-humol e a quercetina foram os mais efectivos na inibição da proliferação destas células, com efeito visível a 10 e 100 μM . A rutina foi muito pouco efectiva na gama de concentrações testada (entre 0,1 e 100 μM), ao passo que a catequina não exerceu qualquer efeito. Todos os outros foram efectivos na máxima concentração estudada (100 μM).

O xanto-humol e a quercetina apresentaram efeito citotóxico a 100 μM , sendo que a quercetina demonstra já citotoxicidade a 10 μM . A naringenina, a rutina e o ácido gálico provocam uma diminuição do número de células por inibição da sua divisão, bem como o xanto-humol a 10 μM . Estes resultados foram também verificados por contagem celular com azul de tripano e imagens obtidos por microscopia.

O método SRB foi aplicado de modo mais exaustivo ao xanto-humol, onde foram estudadas uma gama maior de concentrações e diferentes tempos de exposição. Neste estudo verificaram-se menores valores de EC_{50} para menores concentrações e menores tempos de exposição, possivelmente devido à destoxificação do xanto-humol para tempos de exposição superiores. O aumento da concentração e do tempo de exposição leva a uma diminuição da efectividade do composto na inibição do crescimento das *TPC-1* (valores de EC_{50} superiores) devido à capacidade destoxicante da linha celular, dado

que o composto não sofre degradação no meio de cultura. Este facto também pode explicar o maior efeito antiproliferativo do xanto-humol para concentrações mais baixas e tempos de exposição menores. Foi também verificado que o xanto-humol é citotóxico para as células em concentrações superiores a 20 μM . A sua utilização sob o ponto de vista anti-tumoral deverá ter em conta concentrações inferiores, dado que poderá ser também tóxico para células normais, mas produz efeito a concentrações inferiores e menores tempos de exposição.

De modo a verificar se os polifenóis com efeito citotóxico são capazes de induzir a apoptose nas *TPC-1* foi estudado o perfil de fragmentação de ADN em gel de agarose. Os resultados para o xanto-humol foram inconclusivos, ao passo que a quercetina não foi capaz de induzir a fragmentação internucleosomal de ADN nas células *TPC-1* após 24 horas de exposição. A técnica TUNEL revelou que o xanto-humol possui uma grande capacidade em induzir a apoptose nas *TPC-1*, e a quercetina foi capaz de induzir a apoptose em muito poucas células.

A actividade anti-tumoral discutida anteriormente foi comparada com a actividade anti-radicalar determinada pelo método do DPPH e da desoxirribose, não se verificando qualquer relação entre os dois tipos de actividade.

Como propostas de trabalho futuro seria interessante analisar se compostos fenólicos com capacidade anti-proliferativa exercem o seu efeito a nível da síntese de ADN, bem como estudar o seu efeito *in vivo* a diferentes concentrações. Como tal, seria necessário encontrar um modo plausível de ingestão de polifenol e relacionar a quantidade ingerida com a biodisponível. Seria também de especial interesse aplicar estes estudos a outras classes de polifenóis, já que o ácido gálico também foi capaz de exercer efeito sobre as *TPC-1*, embora ligeiro, bem como ensaios a longo termo. O efeito deste tipo de compostos é maioritariamente estudado recorrendo a soluções padrão, pelo que o estudo de sumos, vinhos e cervejas directamente sobre linhas celulares tumorais poderia revelar-se interessante, dado que a complexidade da matriz pode exercer efeito a nível da sua actuação. A título de exemplo, seria do maior interesse aplicar este estudo a uma cerveja enriquecida em xanto-humol, já produzida durante o projecto de doutoramento do Mestre Paulo Magalhães.

5 Referências Bibliográficas

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ameer, B., Weintraub, R. A.; Johnson, J. V., Yost, R. A.; Rouseff, R. L. (1996) Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clin. Pharmacol. Ther.* 60: 34-40

Andrade, J. E.; Burgess, J. R. (2007) Effect of the Citrus Flavanone Naringenin on Oxidative Stress in Rats. *J. Agric. Food Chem.* 55: 2142-2148

Arends, M. J. & Wyllie, A. H. (1991) Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *International Review of Experimental Pathology.* 32: 223-254.

Aruoma *et al.* (1993) Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *J. Agric. Food. Chem.* 41:1880-1885

Bazzano, L. A.; He, J.; Ogden, L. G.; Loria, C. M.; Vupputuri, S.; Myers, L. *et al.* (2002) Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first national health and nutrition examination survey epidemiologic follow-up study. *American Journal of Clinical Nutrition* 76: 93-99

Benavente-García, O.; Castillo, J.; Del Rio, J. A. (1995) Characterization of a S-adenosyl-L-methionine: eriodictyol 4'-O-methyltransferase from *Citrus aurantium*. *Plant Physiology Biochemistry* 33(3): 263-271

Benavente-García, O.; Castillo, J.; Alcaraz, M. *et al.* (2007) Beneficial action of Citrus flavonoids on multiple cancer-related biological pathways. *Curr. Cancer Drug Targets* 7(8): 795-809

Bilbao, M. L. M.; Andrés-Lacueva, C.; Jáuregui, O.; Lamuela-Raventós, R. M. (2007) Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS. *Food Chemistry*, 101 (4): 1742-1747

Bondet *et al.* (1997) Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 30:609-615

Brand-Williams *et al.* (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 28:25-30

Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* 56: 317-333

Carvalho, D. (2007) Desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de naringenina em frutos e seus derivados. *Estágio em bioquímica*

Castillo, J.; Benavente, O.; Del Rio, J. A. (1992) Naringin and neohesperidin levels during development of leaves, flower buds, and fruits of *Citrus aurantium*. *Plant Physiology* 99: 66-67

Cheng *et al.* (2003) Kinetic deoxyribose degradation assay and its application in assessing the antioxidant activities of phenolic compounds in a Fenton-type reaction system. *Analytica Chimica Acta* 478:129-137

Conforti, F.; Loizzo, M. R.; Statti, A. G.; Menichini, F. (2005) Cytotoxic activity of antioxidant constituents from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Natural Product Research* 21 (1): 42-46

Cristobal, L. *et al.* (2000) Antioxidant and Prooxidant Actions of Prenylated and Nonprenylated Chalcones and Flavanones *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 48:3876-3884

Gao, K.; Henning, S. M.; Niu, Y.; Youssefian, A. A.; Seeram, N.; Xu, A.; Heber, D. (2006) The citrus flavonoid naringenin stimulates ADN repair in prostate cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 17: 89-95

Gerhäuser, C.; Frank, N. (2005) Xanthohumol, a new all-rounder? *Mol. Nutr. Food Res.* 49 (9): 821-823

Gião *et al.* (2005) Caracterização de antioxidantes durante o processo de fabrico da cerveja: análise qualitativa e quantitativa. IBESA

Goupy *et al.* (1999) Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 79: 1625-1634

Gorinstein, S.; Yamamoto, K.; Katrich, E.; Leontowicz, H.; Lojek, A.; Leontowicz, M. *et al.* (2003) Antioxidative Properties of Jaffa Sweeties and Grapefruit and Their Influence on Lipid Metabolism and Plasma Antioxidative Potential in Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(4): 907-910

Gorinstein, S.; Leontowicz, H.; Leontowicz, M.; Krzeminski, R.; Gralak, M.; Martin-Belloso, O. *et al.* (2004) Fresh Israeli Jaffa Blond (Shamouti) Orange and Israeli Jaffa Red Star Ruby (Sunrise) Grapefruits Juices Affect Plasma Lipid Metabolism and Antioxidant Capacity in Rats Fed Added Cholesterol. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4853-4859

Gross, K. C.; Seybold, P. G. (2001) Substituent effects on the physical properties and pKa of phenol. *Int. J. Quantum Chem.* 85 (4-5): 569-579

Guido, L. F.; Rodrigues, P. G.; Rodrigues, J. A.; Gonçalves, C. R.; Barros, A. A. (2004) The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability, an industrial approach. *Food Chem.* 87 (2): 187-193

Gülçin, I. (2002) Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 217: 213-220

Halliwell, B. (1995) Antioxidant characterization: methodology and mechanism, *Biochemical Pharmacology*, 49 (10): 1341-1348

Harborne, J.B. (1989) *Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics.* Academic Press, London

Harnly, J. M.; Doherty, R. F.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Bhagwat, S.; Gebhardt, S. (2006) Flavonoid Content of U.S. Fruits, Vegetables, and Nuts. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9966-9977

Havsteen, B. (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32 (7): 1141-1148

Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (10): 572-584

Hertog, M. (1993) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruits juices. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1242-1246

Kanaze, F. I.; Kokkalou, E.; Georganakis, M.; Niopas, I. (2004) A validated solid-phase extraction HPLC method for the simultaneous determination of the citrus flavanone aglycones hesperidin and naringenin in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36: 175-181

Kanno, S.; Tomizawa, A.; Hiura, T.; Osanai, Y.; Shouji, A.; Ujibe, M.; Ohtake, T.; Kimura, K.; Ishikawa, M. (2005) Inhibitory Effect of Naringenin on Tumor Growth in Human Cancer Cell Lines and Sarcoma S-180-Implanted Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 28(3): 527-530

Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M. (1999) Anti-proliferative Activity of Flavonoids on Several Cancer Cell Lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (5): 896-899

Karawita *et al.* (2005) Reactive oxygen species scavenging, metal chelation, reducing power and lipid peroxidation inhibition properties of different solvent fractions from *Hizikia fusiformis*. *Eur. Food Res. Technol.* 220: 363-371

Knekt, P.; Järvinen, R.; Seppänen, R.; Hellövaara, M.; Teppo, L.; Pukkala, E.; Aromaa, A. (1997) Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.* 146 (3): 223-230

Korantzopoulos, P.; Galaris, D.; Papaioannides, D.; Siogas, K. (2003) The possible role of oxidative stress in heart failure and the potential of antioxidant intervention. *Med. Sci. Monit.* 9 (6): RA120-125

Kris-Etherton, P. M.; Hecker, K. D.; Bonanome, A.; Coval, S. M.; Bonkoski, A. E.; Hilpert, K. F. *et al.* (2002) Bioactive compound in food: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine* 113(9): 71-88

Landrault, N.; Larronde, F.; Delaunay, J. C.; Castagnino, C.; Vercauteren, J.; Mérillon, J. M. *et al.* (2002) Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *J. Agric. Food Chem.* 50 (7): 2046-2052

Le Marchand, L.; Murphy, S. P.; Hankin, J. H.; Wilkens, L. R.; Kolonel, L. N. (2000) Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Nat. Cancer Inst.* 92 (2): 154-160

Liu, M.; Li, X. Q.; Weber, C.; Lee, C. Y. *et al.* (2002) Antioxidant and anti-proliferative activities of raspberries. *J. Agric. Food. Chem.* 50(10):2926-2930

Liu, Q. & Yao, H. (2006) Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chemistry*

Lyons, A. B. (1999) Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol. Cell. Biol.* 77(6): 509-515

Lyons, A. B. (2000) Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of Immunological Methods.* 24: 147-154

Lyons, A. B.; Parish, C. R. (1994) Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 171(1), 131-137

Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J. M.; Tuñón, M. J. (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* 17: 271-278

MERCK S.A. Industrias Químicas. (2000) Bioflavonoides: Quercetina e Rutina. Informe a Profesionales

Meyers, K. J.; Watkins, C. B.; Pritts, M. P.; Liu, R. H. (2003) Antioxidant and Anti-proliferative Activities of Strawberries. *J. Agric. Food Chem.* 51(23): 6887-6892

Miranda, C. L.; Stevens, J. F.; Helmrich, A.; Henderson, M. C.; Rodriguez, R. J.; Yang, Y. H.; Deinzer, M. L.; Barnes, D. W.; Buhler, D. R. (1999) Anti-proliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol.* 37 (4): 271-285

Molecular Probes™ - invitrogen detection technologies. (2005) CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (C34554). Product Information

Moreira, M. (2007) Determinação de antioxidantes em bebidas e alimentos. Seminário em Química Analítica

Nacz, M.; Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chrom. A* 1054: 95-11

Nogata, Y.; Sakamoto, K.; Shiratsuchi, H.; Ishii, T.; Yano, M.; Ohta, H. (2006) *Journal of Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70 (1): 178-192

Papazisis, K. T.; Geromichalos, G. D.; Dimitriadis, K. A.; Kortsaris, A. H. (1997) Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *J. Immunol. Methods.* 208(2): 151-158

Pietta, P. G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63 (7): 1035-1042

PROMEGA Corporation. Maxwell™ 16 ADN Purification Kits. Technical Manual

Roche (2006) In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein. Technical Manual

Rodríguez, G. (1999) Flavonoids and related Polyphenolic Compounds in Forage Legumes. University of Wisconsin-Madison

Sánchez-Moreno *et al.* (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76: 270-276

Scalbert, A. & Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130: 2073-2085

Sendra *et al.* (2006) Reduction kinetics of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *Eur. Food Res. Technol.* 223: 615-624

Silva, M. M.; Santos, M. R.; Caroço, G.; Rocha, R.; Justino, G.L.; Mira, L. (2002) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Radical Research* 36 (11): 1219-1227

Silva, T. L.; Reis, A.; Hewitt, C.; Roseiro, J. C. (2002) Citometria de fluxo – Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Métodos em Biotecnologia – Citometria de Fluxo II. Boletim de Biotecnologia*: 32-40

Silva, S.; Calhau, C.; Azevedo, I. (2004) Phenolic compounds in the control of breast cancer cell growth. *FASEB Journal, Experimental Biology* 18: Abstract 15.1

Sorg, O. (2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies* 327 (7): 649-662

Skehan, P. *et al.* (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82(13): 1107-1112

Stevens, J. F.; Taylor, A. W.; Clawson, J. E.; Deinzer, M. L. (1999) Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. *J. Agric. Food Chem.* 47 (6): 2421-2428

Stevens, J. F.; Taylor, A. W.; Deinzer, M. L. (1999) Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 832 (1): 97-107

Stevens, J. F.; Page, J. E. (2004) Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health. *Phytochem* 65 (10): 1317-1330

Stratil *et al.* (2006) Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – Evaluation of spectrophotometric methods. *J. Agric. Food Chem.* 54: 607-616

Urso, M. L.; Clarkson, P. M. (2003) Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189 (1-2): 41-54

Vanicha, V. & Kanyawim, K. (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* 1: 1112-1116

Wang, H. *et al.* (2007) Studies on anti-proliferative effect of flavones compounds isolated from Yao herb medicines.

Yáñez, J. A.; Davies, N. M. (2005) Stereospecific high-performance liquid chromatographic analysis of naringenin in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 39: 164-169

Yen, G-C. & Chen, H-Y. (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43: 27-32

Yilmaz, Y.; Toledo, R. T. (2004) Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology* 15 (9): 422-433

Yu *et al.* (2002) Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1619-1624

Yuan *et al.* (2005) Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmate*) extract evaluated *in vitro*. *Food Chemistry* 91: 485-494

Zhang, J.; Brodbelt, J. S. (2004) Screening flavonoid metabolites of naringin and narirutin in urine after human consumption of grapefruit juice by LC-MS and LC-MS/MS. *The Analyst* 219 (12): 1227-33

<http://www.nature.com>

<http://www.roche-applied-science.com>

6 ANEXOS

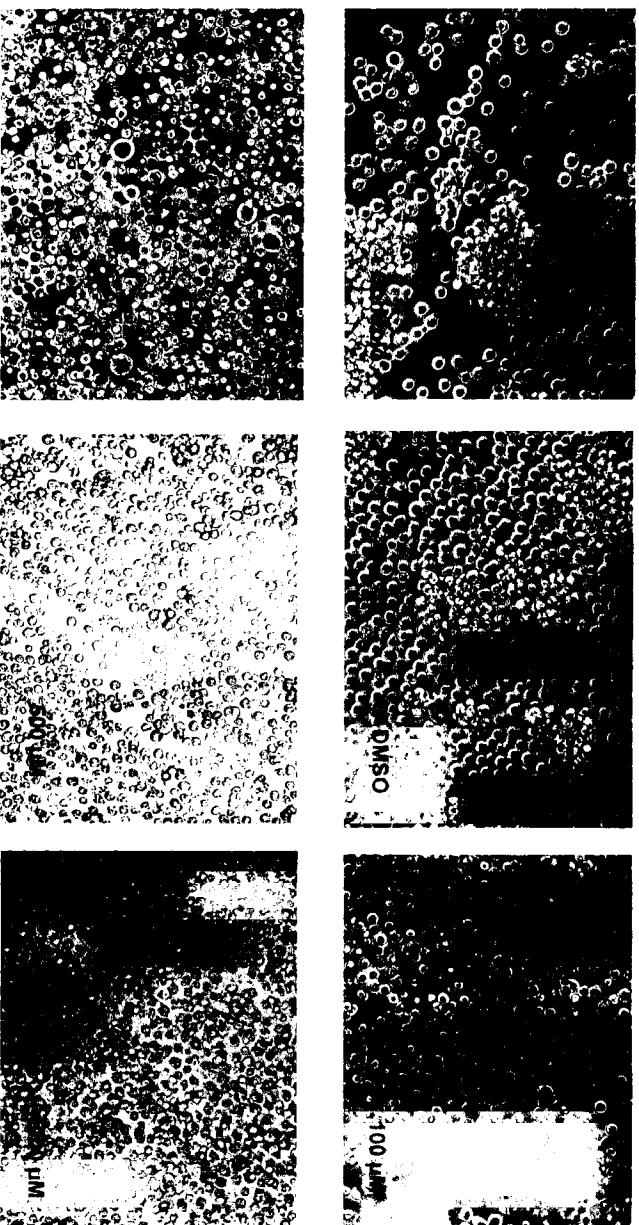


Figura A.1 - Imagens de contraste de fase das células nas diferentes condições estudadas, com ampliação de 20x. Verifica-se, com o aumento da concentração de naringenina, um aumento da morte celular, por alteração da forma das células quando comparando com o controle. Neste último as células apresentam forma esférica, com evidência nítida do núcleo e citoplasma (brilhante), adquirindo um aspecto irregular e sem brilho com a morte.

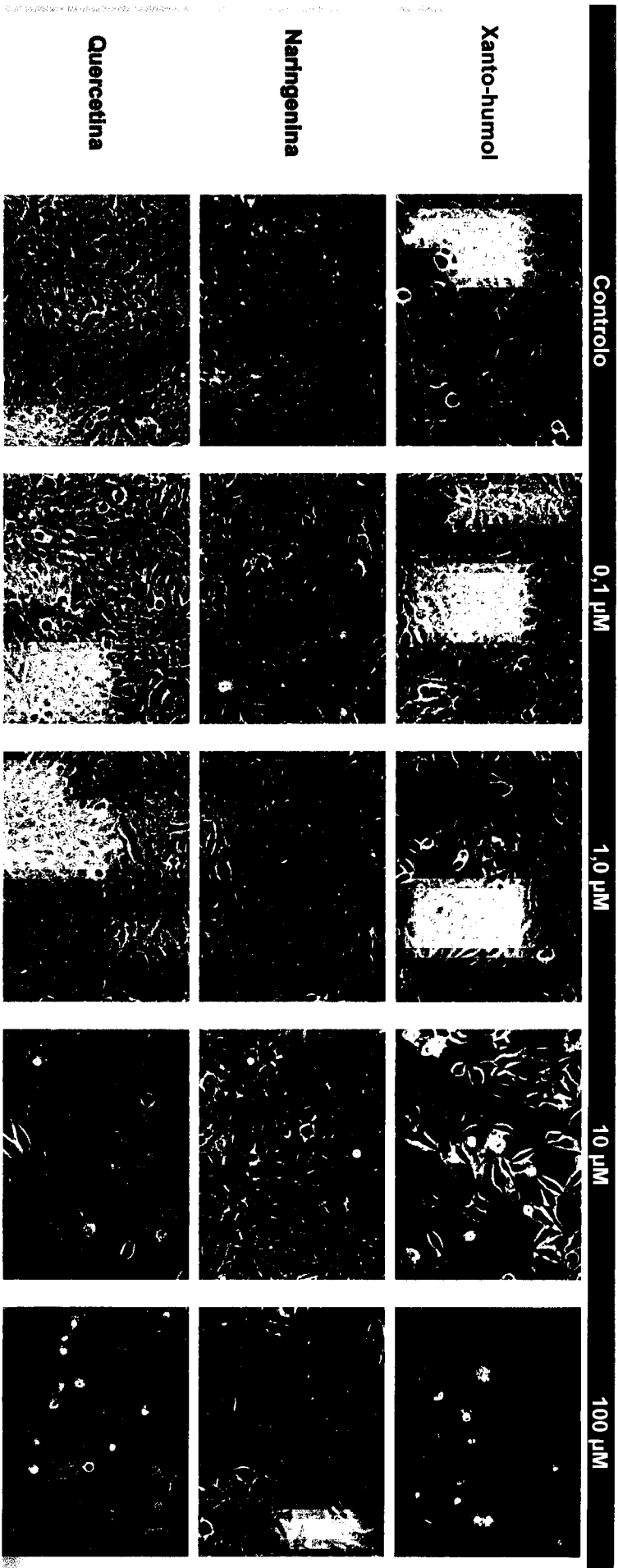


Figura A.2 - Imagens de contraste de fase das células *TPC-1* em contacto com diferentes concentrações de compostos fenólicos, com ampliação de 20x. Verifica-se, com o aumento da concentração de polifenol, uma diminuição do número de células, e em alguns casos (xanto-humulol e quercetina) morte celular. Neste último caso as células são praticamente inexistentes, e perdem a forma que as caracteriza quando estão confluentes. Verifica-se que o xanto-humulol foi mais eficaz a 100 μM , com um efeito também evidente mas mais fraco a 10 μM . A naringenina apenas inibiu ligeiramente a divisão e crescimento das *TPC-1* a 100 μM .