



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ACTIVIDADE
BIOLÓGICA *IN VITRO* DE UM EXTRACTO
ENRIQUECIDO EM ANTOCIANINAS DE
VACCINIUM CORYMBOSUM L.**

Joana Cristina de Jesus Viegas

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Potencial Antioxidante e Actividade
Biológica *In Vitro* de um Extracto
Enriquecido em Antocianinas de
Vaccinium corymbosum L.**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. O trabalho foi realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Teresa Dinis (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra).

Joana Cristina de Jesus Viegas

2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Doutora Teresa Dinis pela orientação e todo o apoio ao longo deste ano e pela disponibilidade que sempre demonstrou.

Professora Doutora Leonor Almeida por me ter dado a oportunidade de integrar o seu grupo de trabalho.

À Professora Doutora Sónia Silva e à Joana Francisco pela simpatia e ajuda durante os meus “primeiros passos” nos ensaios da motilidade intestinal.

Aos meus colegas de laboratório, a Sónia, a Mariana, a Diana, a Joana, a Carla e o Miguel, quero aqui deixar o meu agradecimento pela ajuda prestada e pela amabilidade que sempre tiveram comigo.

A todos os meus amigos de Coimbra e de Aveiro, em especial à Milene Gonçalves pela ajuda e pelo carinho demonstrado durante estas últimas semanas em que tudo girou à volta desta tese. À Maria Tavares e à Raquel Morais pela amizade de muitos anos.

A toda a minha família, em especial à minha mãe, ao meu irmão e ao meu pai por todo o apoio e amor incondicional, pela paciência e pelo encorajamento em todos os momentos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABELAS	III
ABREVIATURAS	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VII
CAPÍTULO1 - Introdução	- 1 -
1.1 Antocianinas	1
1.1.1..... Características	2
1.1.2..... Estrutura	3
1.1.3 Estabilidade das Antocianinas.....	4
1.1.3.1 pH	5
1.1.3.2 Temperatura.....	7
1.1.3.3 Luz	7
1.1.3.4 Co-pigmentação.....	7
1.1.3.5 Metais	9
1.1.3.6 Oxigénio.....	9
1.1.3.7 Outros Factores	10
1.2 Actividade Biológica.....	10
1.2.1 Actividade Antioxidante	11
1.2.2 Actividade Anti-inflamatória	14
1.2.2.1 Doenças Inflamatórias Intestinais	15
1.3 Objectivos Gerais.....	19
CAPÍTULO 2 - MATERIAL E MÉTODOS	2
2.1 Reagentes e Soluções.....	20
2.2 Obtenção de um Extracto Enriquecido em Antocianinas	20
2.3 Caracterização Química do Extracto Enriquecido em Antocianinas	22
2.3.1 Quantificação dos Fenóis Totais.....	22

2.3.2	Quantificação	das	Antocianinas	22
2.3.3	Separação e Identificação das Antocianinas do Extracto por HPLC			23
2.3.3.1	Hidrólise Ácida do Extracto Enriquecido em Antocianinas			24
2.4	Avaliação da Actividade Antioxidante			24
2.4.1	Ensaio	da	Capacidade Antioxidante Total	24
2.4.2	Ensaio da Oxidação da Dihidrorodamina Induzida pelo Peroxinitrito			25
2.5	Culturas Celulares			25
2.5.1	Viabilidade Celular			26
2.5.2	Produção de Espécies Reactivas de Oxigénio			26
2.5.3	Produção de Óxido Nítrico			27
2.5.4	Proliferação Celular			28
2.6	Avaliação da Motilidade Intestinal			28
2.6.1	Preparação de Segmentos de Íleo de Rato			28
2.6.2	Avaliação	da	Contração Intestinal	29
2.7	Análise Estatística			30
CAPÍTULO 3 - Resultados e Discussão				32
3.1	Mirtilos			31
3.2	Caracterização Química do Extracto Enriquecido em Antocianinas			33
3.2.1	Quantificação dos Fenóis Totais			33
3.2.2	Quantificação das Antocianinas			34
3.2.3	Separação e Identificação do Conteúdo de Antocianinas Presente no Extracto Enriquecido em Antocianinas por HPLC			35
3.3	Potencial Antioxidante do Extracto Enriquecido em Antocianinas			40
3.3.1	Capacidade Antioxidante Total			40
3.3.2	Actividade Scavenging do Peroxinitrito			42

3.4 Efeito do Extracto Enriquecido em Antocianinas na Viabilidade Celular	44
3.5 Efeito Protector do Extracto Enriquecido em Antocianinas Contra a Produção de Espécies Reactivas por Células Activadas	46
3.5.1 Produção de Espécies Reactivas de Oxigénio	46
3.5.2 Produção de Óxido Nítrico.....	49
3.6 Efeito do Extracto Enriquecido em Antocianinas na Proliferação Celular.....	51
3.7 Efeito do Extracto Enriquecido em Antocianinas na Motilidade Intestinal	53
CAPÍTULO 4 - Conclusões Gerais	540
Literatura Citada.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas de (A) antocianinas e (B) de antocianidinas.	3
Figura 2: Influência do pH na estabilidade das antocianinas em solução. (a) Reacções de transformação da estrutura das antocianinas (variando o pH entre 1 e 6), em que R1 = H ou glucose, R2 e R3 = H, hidroxilo ou metilo. (b) Reacção de degradação das antocianinas.	6
Figura 3: Interação de antocianinas com (A) outras antocianinas, (B) co-pigmentação intramoleculares, (C) metais e (D) co-pigmentação intermoleculares.....	8
Figura 4: Alterações da homeostase conduzem ao stresse oxidativo.....	13
Figura 5: Efeitos bioactivos (antioxidante e anti-inflamatório) de compostos fitoquímicos provenientes da dieta na prevenção de inúmeras patologias	14
Figura 6: O movimento peristáltico é produzido por reflexos locais que envolvem o SNE e este consiste em neurónios, interneurónios e neurónios sensoriais. Os neurotransmissores que estimulam a contracção do músculo liso estão representados com (+) enquanto que aqueles que induzem o relaxamento do músculo liso estão representados com (-). Legenda: ON – óxido nítrico, ACh – acetilcolina	17
Figura 7: A alteração da homeostase intestinal é induzida por um desequilíbrio entre a produção de citocinas anti- e pró-inflamatórias em resultado da sobreactivação do sistema imune e de factores de crescimento, conduzindo à inflamação no intestino.....	18
Figura 8: Purificação de antocianinas por extracção de fase sólida. Os componentes da amostra, representado pelos diferentes tons de círculos, foram eluídos como indicado A ultima eluição, com metanol acidificado, eluiu as antocianinas.....	21
Figura 9: Mirtilos	31

Figura 10: Curva padrão de ácido gálico (5 mg.mL ⁻¹).	33
Figura 11: Espectro característico de antocianinas a diferentes valores de pH (1,0 e 4,5).	34
Figura 12: Perfil do cromatograma relativo ao extracto em DMSO a 520 nm e respectivos espectros. Os números nos espectros correspondem ao número do pico no perfil cromatográfico	37
Figura 13: Perfil do cromatograma relativo ao extracto em DMSO hidrolisado a 520 nm e respectivos espectros. Os números nos espectros correspondem ao número do pico no perfil cromatográfico	39
Figura 15: Efeito do Trolox, a diferentes concentrações (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 µM), na redução do catião radicalar ABTS. ⁺ , medido a 734 nm. A seta indica a adição do Trolox.	41
Figura 14: Oxidação do ABTS a catião radicalar ABTS. ⁺	41
Figura 16: Capacidade antioxidante total de (A) Trolox e do (B) extracto enriquecido em antocianinas Efeito do Trolox (0,63; 1,25; 1,88; 2,50; 3,13; 3,75 µg.mL ⁻¹) e do extracto (0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8 µg antocianinas.mL ⁻¹) na redução do catião radicalar ABTS. ⁺ , a 734 nm. Os resultados estão expressos em percentagem de inibição e representam a média ± EPM (n = 4 ou 5).....	42
Figura 17: Oxidação da dihidrorodamina a catião fluorescente, rodamina.....	43
Figura 18: Ensaio típico de oxidação da dihidrorodamina mediada pelo peroxinitrito A reacção de oxidação foi iniciada com a adição de ONOO ⁻ 1,2 µM em NaOH 0,1 M. O ensaio controlo corresponde à oxidação máxima da sonda, ou seja a 100% de fluorescência. A seta indica a adição de ONOO ⁻	43

- Figura 19:** Efeito do extracto enriquecido em antocianinas contra a oxidação da dihidrorodamina pelo peroxinitrito. Os resultados são apresentados em % de fluorescência do controlo – % controlo (reacção na ausência do extracto) e representam a média \pm EPM (n = 3 ou 4). A delfinidina é utilizada como composto de referência. **44**
- Figura 20:** Efeito citotóxico do extracto enriquecido em antocianinas na linha celular RAW 264.7. Viabilidade de macrófagos incubados, durante 24 (barra preta) e 48 (barra branca) horas, com diferentes concentrações de extracto (0,38; 3,0; 15,0; 20,0; 30,0; 50,0 $\mu\text{g antocianinas.mL}^{-1}$), foi avaliada através do ensaio de MTT. Os resultados estão expressos em percentagem do controlo e representam a média \pm EPM de quatro ensaios independentes. ** p < 0,01; *** p < 0,001 significativamente diferente do controlo, determinado através de ANOVA seguida do teste de *Bonferroni's post-hoc*. **45**
- Figura 21:** Mecanismo de hidrólise, pela acção de esterases, da sonda não fluorescente DCFHDA a DCFH, seguida da sua oxidação a DCF, sonda fluorescente, por espécies reactivas de oxigénio (Gomes et al., 2005). ... **47**
- Figura 22:** Efeito protector do extracto enriquecido em antocianinas na produção de espécies reactivas de oxigénio por macrófagos. (A) As células foram incubadas com o extracto (0,5; 2,5; 10,0; 20,0; 30,0 $\mu\text{g antocianinas.mL}^{-1}$) seguido da estimulação com $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ LPS. Após um período de 24 h, a sonda DCFHDA ($10\mu\text{M}$) foi adicionada e incubada durante 15 minutos a 37 °C no escuro. De seguida, as espécies reactivas de oxigénio foram avaliadas através da medida da intensidade de fluorescência da DCF. (B) Posteriormente, obtiveram-se, através de microscopia de fluorescência, imagens representativas destas células. Os resultados estão expressos em percentagem do controlo e representam a média \pm EPM de seis ensaios independentes. * p < 0,05 e *** p < 0,001 significativamente diferente do controlo, determinado através ANOVA seguida do teste de *Bonferroni's post-hoc*. **48**

- Figura 23:** Medição do óxido nítrico através do método de Griess em células (A) Formação de nitrito, NO_2^- , a partir de NO após estimulação pró-inflamatória pelo LPS. (B) De seguida o nitrito reage com a sulfanilamida dando origem a um intermediário que ao reagir com a N-1-naftiletilenodiamida forma um azo composto corado que absorve a 530 nm (adaptado de Ghafourifar *et al.*, 2008) **49**
- Figura 24:** Efeito protector do extracto enriquecido em antocianinas na produção de óxido nítrico por macrófagos As células foram incubadas com extracto (0,5; 2,5; 10,0; 20,0; 30,0 $\mu\text{g antocianinas.mL}^{-1}$) seguido ou não da estimulação com 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ LPS e após 16 horas a concentração de nitrito foi medida. Os resultados foram expressos em percentagem controlo e representam a média \pm EPM de seis ensaios independentes. *** $p < 0,01$ significativamente diferente do controlo, determinado através ANOVA seguida do teste de Bonferroni's post-hoc. **50**
- Figura 25:** Efeito do extracto enriquecido em antocianinas na proliferação das linhas celulares (A) AsPC-1 e (B) HT-29. As células foram incubadas com o extracto (0,38; 3,0; 15,0; 20,0; 30,0; 50,0 $\mu\text{g antocianinas.mL}^{-1}$), durante 24 (barra preta) e 48 (barra branca) horas, e ao fim desse tempo a proliferação celular foi avaliada através do ensaio de sulforodamina B. Os resultados estão expressos em percentagem de proliferação relativamente ao controlo, isto é, células que não foram pré-incubadas com o extracto e representam a média \pm EPM de três ou quatro ensaios independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ significativamente diferente do controlo, determinado através de ANOVA seguida do teste de Bonferroni's post-hoc. **52**
- Figura 26:** Ensaio tipo do extracto enriquecido em antocianinas em DMSO na motilidade intestinal (A) Efeito do extracto enriquecido em antocianinas em DMSO (12, 24, 48, 96 e 192 μM) e (B) do solvente DMSO na contracção do músculo liso longitudinal do íleo (intestino delgado). A concentração foi calculada a partir da massa molecular da delfinidna-3-glucósido. **54**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura básica das antocianidinas predominantes nos frutos e vegetais.....	4
Tabela 2: Gradiente de eluição para a separação e identificação do extracto enriquecido em antocianinas por HPLC.....	23
Tabela 3: Conteúdo em antocianinas de algumas frutas e vegetais.....	32

ABREVIATURAS

AsPC-1	linha celular cancerígena pancreática (adenocarcinoma)
Ci3glc	cianidina-3-O-glucósido
DAD	<i>diode array detector</i> – detector <i>diode array</i>
DCFHDA	diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína
Df3glc	delfinidina-3-O- glucósido
DHR	dihidrorodamina 123
EPM	erro padrão da média (<i>standard error mean</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (E.U.A.)
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> – cromatografia líquida de alta precisão
HT-29	linha celular cancerígena intestinal (adenocarcinoma cólon)
L-Arg	L-arginina
LPS	lipopolissacarídeo bacteriano
Mv3glc	malvidina-3-O- glucósido
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-B</i> –factor nuclear <i>kappa</i> de células B
Pg3glc	pelargonidina-3-O- glucósido
RH	rodamina
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alfa</i> – factor de necrose tumoral alfa
u.a.	unidades arbitrárias
UV	ultravioleta

RESUMO

As antocianinas são compostos flavonóides e são os responsáveis pelas cores, vermelha, roxa e azul de diversos frutos e legumes. Quimicamente, as antocianinas, são derivados glicosídicos, polihidroxilados ou polimetoxilados do 2-fenil-benzopirílio e apresentam uma absorção máxima na gama do visível entre os 520 e os 540 nm. As antocianinas são compostos que estão envolvidos numa vasta gama de actividades biológicas, nomeadamente antioxidante e anti-inflamatória, e estas estão associadas à manutenção da homeostasia do organismo, prevenindo o aparecimento e desenvolvimento de diversas patologias, nomeadamente as doenças inflamatórias intestinais. As suas actividades e propriedades são influenciadas pelo pH, temperatura, luz, oxigénio e outros factores. De entre uma vasta variedade de frutos e de vegetais, os mirtilos destacam-se pelo seu elevado teor em antocianinas.

Assim, o ponto de partida deste estudo foi a obtenção e caracterização química – através da quantificação dos fenóis totais (método *Folin-Ciocalteu*) e das antocianinas (método a diferentes pH), seguida da análise por HPLC – de um extracto enriquecido em antocianinas a partir de mirtilos (*Vaccinium corymbosum* L.) provenientes de Sever do Vouga, Portugal. Posteriormente foi avaliado o seu potencial antioxidante, através da capacidade antioxidante total (método de ABTS) e da actividade *scavenging* (ensaio da oxidação da dihidro-rodamina pelo peroxinitrito). De seguida, avaliou-se o potencial citotóxico do extracto numa linha celular de macrófagos de murganhos (RAW 264.7) e em duas linhas celulares cancerígenas (HT-29 e AsPC-1), através da medida da viabilidade celular pelo ensaio do MTT e do efeito anti-proliferativo pelo ensaio da sulforodamina B, respectivamente. Por fim, explorou-se o potencial efeito deste extracto na motilidade intestinal de ratos *Wistar*.

O extracto obtido apresentou um teor de fenóis totais, expresso em termos de ácido gálico, e de antocianinas expresso em delphinidina 3-glucósido, idêntico ao encontrado por outros autores em extractos similares. Também a análise por HPLC revelou a presença de formas glicosiladas e aciladas de cinco antocianidinas (delphinidina, malvidina, petunidina, cianidina e peonidina) tal como descrito por outros, para a mesma espécie. Relativamente à capacidade

antioxidante total do extracto e à capacidade de protecção à agressão induzida pelo peroxinitrito verificou-se uma actividade superior à do Trolox, no primeiro caso, e superior à da delfinidina-3-glucósido no segundo. No que respeita à actividade biológica e atendendo a que o extracto só apresentou toxicidade nos macrófagos para valores relativamente elevados de concentração, pudemos averiguar ainda, uma inibição na produção de espécies reactivas de oxigénio e óxido nítrico por macrófagos activados, assim como um efeito anti-proliferativo, em células cancerígenas. Quanto ao efeito do extracto na motilidade intestinal os resultados obtidos são apenas preliminares, necessitando por isso de confirmação.

Em conclusão, os resultados obtidos foram complementares ao de outros estudos e bastante promissores, corroborando dados da literatura que apontam as antocianinas como compostos da dieta com um papel importante na saúde humana.

Palavras-chave: mirtilos (*Vaccinium corymbosum* L.); antocianinas; actividade antioxidante; actividade anti-inflamatória; motilidade intestinal.

ABSTRACT

Anthocyanins belong to the class of flavonoids responsible for the red, purple, and blue pigmentation detected in many fruits and vegetables. These flavonoid compounds are glycosylated, polyhydroxy or polymethoxy derivatives of 2-phenylbenzopyrylium with a maximum absorption at 520 to 540nm. Anthocyanins are involved in a wide range of biological activities including antioxidant, anti-inflammatory and anti-carcinogenic activities. Thus, these compounds positively induce the maintenance of cellular homeostasis which in turn prevent the formation and development of several disorders, including the intestinal inflammatory disease. Their activities and properties are influenced by pH, temperature, light, oxygen and other factors. Among several fruits and vegetables expressing these compounds, blueberries stand out due to its high content in anthocyanins.

*The starting point of this study was to obtain an anthocyanin-rich extract from highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), from Sever do Vouga, Portugal. This procedure was followed by the chemical characterization of anthocyanins through the total phenolic (Folin-Ciocalteu method) and anthocyanins (pH-differential method) measurements, as well as, HPLC analysis. Afterward, we evaluate the anthocyanin-rich extract antioxidant potential, by the total antioxidant capacity (ABTS method) and by the peroxynitrite scavenging capacity (peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 assay). Then, the cytotoxicity of the extract was analyzed on a mouse macrophages cell line (RAW 264.7) by the MTT test and on human colon and pancreas adenocarcinoma cell lines (HT-29 and AsPC-1) by the sulforhodamine B assay. Finally, the potential effect of the extract on intestinal motility of Wistar rats was explored.*

*The extract showed a total phenol content expressed in galic acid, and a content of anthocyanins expressed in delphinidin-3-glucose, which is in line with other studies using similar extracts. Moreover, HPLC analysis showed the presence of glycosylated and acylated forms from five anthocyanidins (delphinidin, malvidin, petunidin, cyanidin, and peonidin), as referred by others for the same specie (*Vaccinium Corymbosum* L.). Concerning the total antioxidant capacity of the extract and the ability to inhibit the peroxynitrite-mediated dihydrorhoda-*

mine 123 oxidation, the effectiveness of the extract was higher than that of Tox and than that of delphinidin-3-glucoside, respectively. Relatively to the biological activity, the extract reduced LPS-induced reactive oxygen species and nitric oxide release in macrophages, in nontoxic concentrations, and presented an anti-proliferative effect in cancer cell lines. About the effect of the extract on the motility of rat ileum the results obtained are only preliminary, so that they need confirmation.

In conclusion, the results from this study were complementary to those of other studies and they appeared quite promising regarding the global knowledge on this subject, which suggest that anthocyanins are compounds from diet with a very important role in human health.

Key words: *Highbush blueberry (Vaccinium corymbosum L.); anthocyanins, antioxidant activity; anti-inflammatory activity; intestinal motility.*

CAPÍTULO 1

Introdução

Frutas e vegetais contêm uma variedade de moléculas que captam radicais livres, como os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides), compostos azotados (alcalóides, aminas), vitaminas, terpenóides (que incluem os carotenóides) e outros metabolitos endógenos, que têm uma elevada actividade antioxidante. Estudos epidemiológicos demonstram que estes compostos também possuem várias actividades biológicas, nomeadamente anti-inflamatória, anti-cancerígena, anti-tumoral, anti-mutagénica, antibacteriana ou anti-viral e possuem, ainda, a capacidade de inibir ou activar determinadas enzimas assim como funcionar como agentes quelantes. A ingestão de antioxidantes está associada à diminuição do risco de incidência de cancro, de doenças cardiovasculares, de diabetes e de outras doenças relacionadas com a inflamação e o envelhecimento. Estes estudos referem ainda que, antioxidantes com capacidade *scavenger* têm uma maior relevância na prevenção dos stresses oxidativo e nitrosativo, que são responsáveis pela maioria das doenças (Muanda et al., 2011).

É sabido que níveis elevados de espécies reactivas de oxigénio e de espécies reactivas de azoto alteram a estrutura e a função celular. A dieta humana é a principal fonte de antioxidantes que protegem o organismo da exposição a compostos oxidantes e nitrosantes. Uma alimentação rica em antioxidantes – em consequência do elevado consumo de frutas, vegetais, cereais – tem estado associada à redução da incidência de inúmeras doenças, como as doenças inflamatórias intestinais que afectam cerca de 3,6 milhões de pessoas na Europa e nos E.U.A. (Lakhan et al., 2010).

1.1 ANTOCIANINAS

As antocianinas são compostos flavonóides encontrados em plantas superiores e são responsáveis pelas cores, vermelha, roxa, azul, laranja das folhas, caules, raízes, flores e frutos. Nas plantas, estes compostos actuam como um escudo contra os raios UV, bactérias, fungos, vírus e reacções oxidativas. Em humanos apresentam actividades variadas, como a antioxidante, e propriedades biológicas diversas. Ainda actuam como agentes anti-

inflamatórios, anti-mutagénicos, inibem a adesão de bactérias à membrana da mucosa dos tractos gastro-intestinal e urinário e proporcionam protecção cardíaca, ao manter a permeabilidade vascular. Esta capacidade para regular a permeabilidade dos vasos capilares tem sido a base para a sua definição como vitamina P. Apresentam, também, protecção contra as hepatites A e B e contra a hepatotoxicidade do paracetamol. Extractos ricos em antocianinas estão associados a efeitos protectores que incluem a modelação da disfunção neuronal relacionada com o avanço da idade e o aumento da resistência dos eritrócitos ao stresse oxidativo (demonstrado *in vitro*) (Svarcova *et al.*, 2007).

Desde 1981 que a *FDA* aprovou a utilização de antocianinas como corantes naturais com a designação E163 ^[1].

1.1.1 Características

Quimicamente, as antocianinas são derivados de polihidroxiados ou polimetoxilados glicosídicos do 2-fenil-benzopirílio e absorvem luz de comprimento de onda entre os 500-530 nm (Wang *et al.*, 2008).

Representam o grupo mais importante de pigmentos pouco solúveis em água, responsáveis pelas cores azul, roxa, laranja, preta e vermelha de muitos frutos (mirtilos, uvas), vegetais (tomate, cenoura) e flores; este variado leque de cores deve-se (i) à capacidade de glicosilação, (ii) ao grau e natureza de esterificação dos açúcares com ácidos alifáticos ou aromáticos das antocianinas, (iii) ao pH, (iv) à temperatura, (v) ao tipo de solvente e (vi) à presença de co-pigmentos no meio onde estes compostos se encontram (Dreiseitel *et al.*, 2009).

As características das antocianinas variam significativamente com os locais de produção e deve-se, em parte, aos diferentes estados de maturação aquando das colheitas e do local. Outros factores inerentes à produção ou ambiente também podem influenciar estas diferenças (Johnson *et al.*, 2011).

1.1.2 Estrutura

Estruturalmente, as antocianinas são constituídas por três anéis aromáticos: A, B e C (Figura 1A). Conjugados no C3 do anel C aparecem um ou mais açúcares, como a glucose, a galactose, a ramanose, a xilose e a arabinose. Contudo, se não existir nenhum açúcar conjugado neste anel, estes compostos passam a ser designados por antocianidinas (Figura 1B). Ao contrário de outros flavonóides, as antocianinas têm uma carga positiva em solução ácida, a sua estrutura depende do pH e são mais estáveis em condições ácidas (Takikawa *et al.*, 2009).

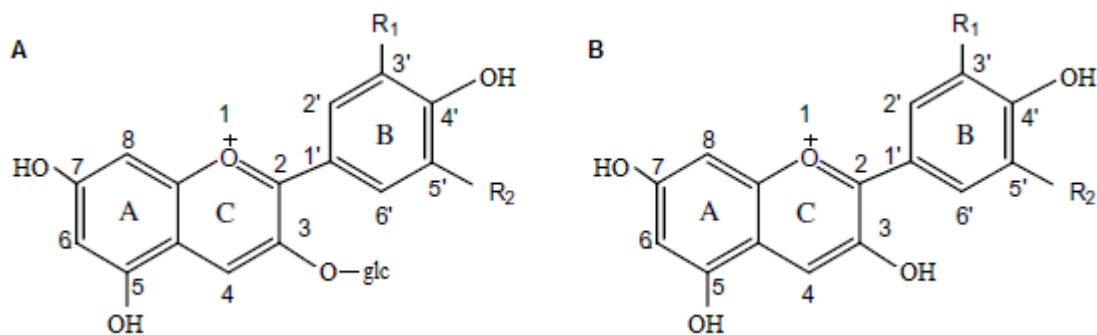


Figura 1: Estruturas químicas de (A) antocianinas e (B) de antocianidinas (adaptado de Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Pelo facto do hidrogénio nas posições R_1 e R_2 do anel B poder ser substituído por grupos hidroxilo ou grupos metoxilo, é possível existirem seis antocianidinas (Tabela 1) mas se acrescentarmos a natureza e extensão da cadeia glicosídica simples ou acilada o número de antocianinas aumenta para as centenas. As principais diferenças entre estas baseiam-se (i) no número de grupos hidroxilo na molécula; (ii) no grau de metilação destes grupos hidroxilo; (iii) na natureza, número e localização de açúcares ligados à molécula e (iv) no número e natureza dos ácidos alifáticos e aromáticos ligados aos açúcares na molécula. Todas estas variáveis contam para o enorme número de compostos que pertencem à família de antocianinas e que funcionam para os investigadores como “impressões digitais” de muitas espécies de vegetais, permitindo assim a sua identificação (Galvano *et al.*, 2009).

Tabela 1: Estrutura básica das antocianidinas predominantes nos frutos e vegetais (Pascual-Teresa *et al.*, 2010).

ANTOCIANIDINAS	R ₁	R ₂
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Muitas antocianinas estão na forma acilada, através de ácidos aromáticos e alifáticos e os mais comuns são os ácidos cafeíco, ferrúlico, acético, succínico, oxálico, málico, *p*-hidroxi benzóico e malónico (Welch *et al.*, 2008). A estrutura química (posição, número e tipo de substituintes) das antocianinas determina o grau das suas propriedades bioactivas (Lila, 2004).

1.1.3 Estabilidade das Antocianinas

Actualmente, a cor que os alimentos apresentam é considerada um dos factores cruciais na aprovação destes, uma vez que a intensidade de cor está directamente relacionada com a qualidade do produto. Apesar de serem excelentes corantes naturais, o que as torna uma boa alternativa aos corantes sintéticos, as antocianinas apresentam uma estabilidade muito reduzida quando presentes em solução.

A intensidade e a estabilidade das antocianinas dependem de inúmeros factores, designadamente da concentração, do pH, da temperatura, da intensidade da luz, da qualidade e presença de outros pigmentos, de metais, do oxigénio, de iões, entre outros (Roobha *et al.*, 2011). Estes factores têm como consequência a alteração da estrutura química, da cor e da concentração das antocianinas nos frutos e plantas influenciando as suas propriedades e actividades. A alteração de factores ambientais como a temperatura, a luz e o pró-

prio pH aceleram a destruição das antocianinas. E esta destabilização está associada ao aumento da hidrólise do anel B (Woodward *et al.*, 2009)

1.1.3.1 pH

Em solução aquosa, as antocianinas podem apresentar quatro estruturas distintas dependendo do pH: catião flavílico, base quinoidal, pseudo-base carbinol e calcona (Figura 2 a). A pH 1, todas as moléculas de antocianinas em solução estão na forma de catião flavílico e apresentam cor vermelha, que se deve à carga positiva no anel C da molécula e esta é a estrutura mais estável das antocianinas [Figura 2 a (A)]. Quando o pH aumenta para valores entre 2 e 4 a espécie predominante é a base quinoidal que apresenta cor azul [Figuras 2 a (B-D)]. Para valores de pH entre 5 e 6 apenas duas espécies, incolores, podem ser observadas, a pseudo-base carbinol [Figura 2 a (E)] e a calcona [Figura 2 a (F)].

A estabilidade das antocianinas depende dos grupos substituintes presentes no anel B e a presença de grupos metoxilo ou hidroxilo adicionais diminuem a estabilidade destes compostos a pH neutro, assim a pelargonidina é a mais estável. Ao contrário das antocianidinas, os mono-glucósidos e a maioria dos derivados di-glucósidos são mais estáveis a pH neutro, uma vez que as moléculas de açúcar evitam a degradação das antocianinas em compostos aldeídicos e ácido fenólico, Figura 2 b.

Todas as reacções que conduzem à alteração da estrutura das antocianinas são reversíveis e a cor vermelha pode ser restabelecida através do reajustamento do pH. Desta forma um valor baixo de pH pode prevenir a oxidação das antocianinas permitindo que estas mantenham as suas propriedades e características intactas (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Roobha *et al.*, 2011; Wrolstad *et al.*, 2012).

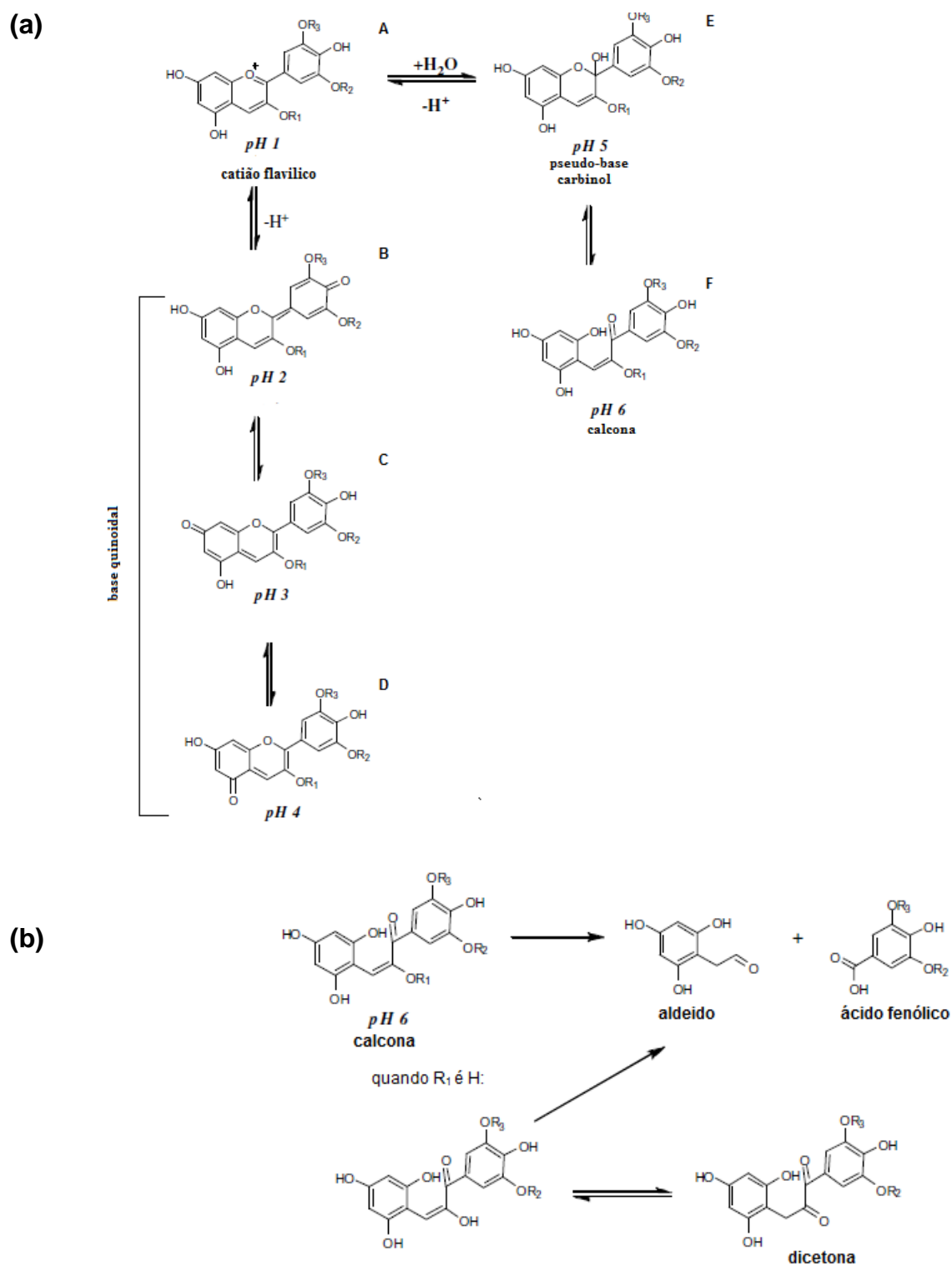


Figura 2: Influência do pH na estabilidade das antocianinas em solução. (a) Reações de transformação da estrutura das antocianinas (variando o pH entre 1 e 6), em que $R_1 = H$ ou glucose, R_2 e $R_3 = H$, hidroxilo ou metilo. (b) Reação de degradação das antocianinas (Castañeda-Ovando et al., 2009).

1.1.3.2 Temperatura

A temperatura apresenta um papel destabilizador na estrutura das antocianinas. O aumento da temperatura é directamente proporcional ao grau de destruição observado nestes compostos, ou seja, quando a exposição a uma temperatura elevada é longa há alterações na antocianina e no complexo de co-pigmentação resultando num aumento da intensidade de absorção de luz visível (efeito hipercrómico) e num deslocamento do máximo de absorção (deslocamento batocrómico) nos picos principais (Abyari. *et al.*, 2006).

Roobha e colaboradores (2011) sugerem que a rápida destruição das antocianinas a temperaturas elevadas pode dever-se à hidrólise da estrutura 3-glucósido que tem um efeito protector na antocianina instável. Sugerem ainda – tal como Laleh e colaboradores (2006) – que a hidrólise do anel C resulta na produção da calcona, que é responsável pelo aparecimento da cor castanha nos alimentos que contêm antocianinas.

O manuseamento de extractos enriquecidos em antocianinas a baixas temperaturas pode preservar a estabilidade dos compostos em questão.

1.1.3.3 Luz

A presença de luz reduz, significativamente, o tempo de meia vida das antocianinas (Lima *et al.*, 2005), uma vez que destrói os seus pigmentos e, assim, há uma aceleração da destruição destas (Laleh *et al.*, 2006).

1.1.3.4 Co-pigmentação

A presença de co-pigmentos permite aumentar a estabilidade das antocianinas em solução, visto que estabiliza tanto a sua cor como a sua estrutura (Figura 3). O mecanismo de co-pigmentação consiste na interacção entre o co-pigmento (molécula incolor planar, rica em electrões π) e o pigmento (cromóforo da antocianina com estrutura planar) originando uma associação molecular ou um complexo com cor. O complexo resultante desta interacção causa efeito

hipercrômico e deslocamento batocrômico. Os fenóis livres nas plantas podem ser considerados potenciais co-pigmentos; por exemplo nos mirtilos são o ácido ferúlico, o ácido cumárico e o ácido clorogénico (Abyari *et al.*, 2006). No entanto, interações entre compostos fenólicos e antocianinas são transitórias, devido à falta de ligações químicas; sendo este fenómeno designado por formação de complexo de transferência de carga ou interações π - π . Contudo, os co-pigmentos podem ser outros compostos, tais como flavonóides, alcalóides, aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleótidos, polissacarídeos, metais ou até mesmo outras antocianinas (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009)

A interacção entre as antocianinas e os co-pigmentos depende das espécies intervenientes e pode resultar da “auto-associação” ou da formação de uma co-pigmentação intramolecular, no caso de o co-pigmento ser outra antocianina (Figura 2 A e B); da complexação, se a interacção se der com um metal (Figura 2 C) ou da co-pigmentação intermolecular, se o co-pigmento tiver pares de electrões livres (Figura 2 D).

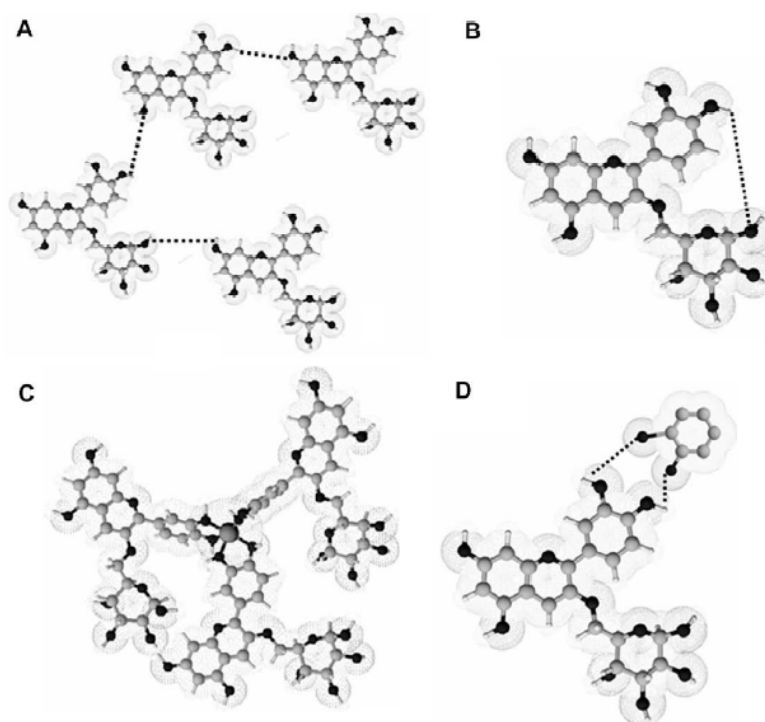


Figura 3: Interação de antocianinas com (A) outras antocianinas, (B) co-pigmentação intramoleculares, (C) metais e (D) co-pigmentação intermoleculares (Castañeda-Ovando *et al.*, 2007).

Apesar da presença de co-pigmentos ser uma vantagem na estabilidade das antocianinas, estes não asseguram, necessariamente, um aumento da

estabilidade destes compostos aquando da presença de temperaturas elevadas e de luz, ou seja, apesar da estrutura molecular em questão apresentar uma velocidade de degradação mais baixa do que as antocianinas sem copigmentos, esta quando sujeita a factores tais como os referidos (temperatura e luz) durante um período longo de tempo começa a degradar-se ocorrendo a degradação do ião flavilico originando a forma calcona (Abyari *et al.*, 2006; Welch *et al.*, 2008).

1.1.3.5 Metais

Graças à presença de um grupo hidroxilo no anel C na estrutura das antocianinas, é possível que estes compostos quelatem iões metálicos como o ferro e o cobre conduzindo a um aumento da intensidade da cor das antocianinas (Kowalczyk *et al.*, 2003) e estas passam a ser designadas por metaloantocianinas.

Na presença de iões (ferro, alumínio, cobre, magnésio, cálcio, molibdénio, estanho) as antocianinas formam produtos insolúveis que apresentam uma maior estabilidade perante factores destabilizadores como o pH, a temperatura e o oxigénio, relativamente às antocianinas livres (Lopes *et al.*, 2007; Castañeda-Ovando *et al.*, 2007). E, conseqüentemente, são uma boa alternativa para a estabilização da cor – isto claro, se os metais envolvidos não implicarem nenhum risco para a saúde.

1.1.3.6 Oxigénio

A presença de oxigénio no meio também é um factor significativo na degradação de antocianinas, mesmo na ausência de luz e em toda a gama de pH. Esta degradação deve-se à oxidação, directa ou indirecta, dos constituintes do meio que vão, por sua vez, reagir com as antocianinas alterando a sua estrutura química. Em consequência há a formação de precipitados e a solução

torna-se turva e isto pode ser o resultado da oxidação directa da base carbinol das antocianinas (Lopes *et al.* 2007).

1.1.3.7 Outros Factores

A metilação e a acilação das antocianinas são dois processos que afectam positivamente a cor e a estabilidade, ao afectar os pigmentos e, consequentemente, o mecanismo de co-pigmentação. A metilação conduz ao aumento de grupos metoxilos na estrutura das antocianinas, tornando-as mais estáveis, enquanto que a glicosilação afecta a quantidade de açúcares presentes nas antocianinas. As consequências directas da acilação são uma menor sensibilidade à variação do pH e uma protecção contra a degradação dos açúcares pelas glucosidases. A utilização de ácidos aromáticos contribui para o processo de acilação.

Com o intuito de inibir o crescimento microbiano, o dióxido de enxofre é frequentemente adicionado às frutas e vegetais, no entanto este também actuar como nucleófilo e atacar o catião flavílico, conduzindo à deterioração dos pigmentos.

Por si só, o ácido ascórbico (vitamina C) pode ter um efeito na degradação das antocianinas ao desempenhar uma clivagem oxidativa no ião flavílico de forma semelhante ao ataque pelo dióxido de enxofre (Welch *et al.*, 2008)

1.2 ACTIVIDADE BIOLÓGICA

Nos últimos anos inúmeros estudos comprovaram que as antocianinas desempenham um amplo leque de actividades biológicas, nomeadamente actividades antioxidantes (*scavenging* de radicais livres, quelatação de iões), anti-inflamatórias, anti-microbianas e anti-carcinogénicas; melhoram a visão, induzem a apoptose e têm efeitos neuroprotectores. As propriedades mencionadas são benéficas no tratamento de inúmeras patologias, nomeadamente a retinopatia diabética, a aterosclerose, doenças microvasculares, cancro e doenças inflamatórias.

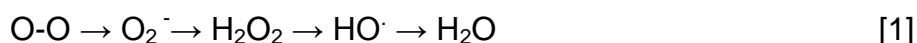
Dada a diversidade grande de actividades biológicas e porque a actividade antioxidante e anti-inflamatória se reflectem no benefício para a saúde em muitos estados patológicos irei referir estas duas mais detalhadamente.

1.2.1 Actividade Antioxidante

Todos os processos biológicos essenciais, como o metabolismo celular, não ocorrem sem a formação de espécies reactivas de oxigénio e/ou espécies reactivas de azoto. No entanto, o aumento descontrolado destas espécies está fortemente associado com a etiologia e patofisiologia de um número de doenças humanas, designadamente doenças inflamatórias, infecções virais, cancros, doenças auto-imunes, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e envelhecimento prematuro.

Do oxigénio total consumido nos tecidos, 95% deste é utilizado em processos metabólicos enquanto que os restantes 0,1-5% são transformados em espécies reactivas na mitocôndria.

As espécies reactivas de oxigénio formam-se a partir da redução da molécula de oxigénio, originando o anião superóxido, peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo [1].



O óxido nítrico (NO) é uma molécula paramagnética lipofílica formada por um átomo de azoto e por outro de oxigénio, de tamanho reduzido que ocorre naturalmente em dezenas de tipos de células em várias parte do corpo, com um tempo de meia vida de apenas alguns milisegundos e é produzido a partir do aminoácido L-Arginina (L-Arg) – sendo o único substrato fisiológico nas células eucariótas – pela acção da óxido nítrico sintase (ONS) [2] (Wiesinger, 2000).



É sabido que o NO é um potente agente vasodilatador com propriedades anti-hipertensoras, anti-trombóticas, anti-aterogénicas e anti-proliferativas do músculo liso. No entanto, o óxido nítrico pode reagir espontaneamente com o anião superóxido originando o peroxinitrito, ONOO⁻, [3], um intermediário altamente reactivo capaz de iniciar uma variedade de processos patológicos. O ONOO⁻ pode destruir o ADN, provocar uma diminuição dos níveis intracelulares de glutathione, iniciar a peroxidação lipídica e inactivar enzimas através da oxidação de proteínas. Para além disso, o ONOO⁻ modifica a tirosina presente em proteínas formando resíduos nitrotirosínicos e isto pode levar à inactivação de muitas proteínas e dano de constituintes celulares, características da presença de stresse nitrosativo (Gemma *et al.*, 2007).



A toxicidade das espécies reactivas de oxigénio e de azoto deve-se ao facto destas reagirem com a maioria das biomoléculas – ADN, proteínas e lípidos – alterando, deste modo, as suas propriedades. Estas espécies podem provocar (i) danos na mitocôndria em resultado da diminuição da produção de ATP, (ii) oxidação de aminoácidos, como cisteína, metionina e histidina levando a alterações estruturais das proteínas, (iii) peroxidação lipídica, que leva à formação de produtos reactivos que podem reagir com proteínas e com o ADN, danificando-os, (iv) alterações no ADN e, subsequentemente, nos nucleótidos que o constituem conduzindo à quebra da dupla hélice e, consequentemente, a mutações (Wu *et al.*, 2003). Assim, é fulcral que a produção de espécies reactivas de oxigénio e de azoto seja bem regulada, de modo a garantir a homeostasia do organismo.

Uma vez que tanto a produção de espécies reactivas de oxigénio como a de espécies reactivas de azoto são processos que ocorrem naturalmente no organismo, existem mecanismos de desintoxicação – antioxidantes – envolvidos na protecção celular contra estas espécies reactivas.

Com efeito, em condições normais, o organismo dispõe de um sofisticado sistema de defesa antioxidante enzimático, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidases, e não enzimático, como a vitamina E, vitamina C e carotenóides que actuam como *scavengers* de oxidantes e radicais

livres com o intuito de eliminar o excesso de espécies reactivas. No entanto, em condições patológicas estes mecanismos de defesa tornam-se ineficazes, pois não eliminam as espécies reactivas, conduzindo a um excesso de produção destas – e, assim, há formação de stresse oxidativo/nitrosativo, isto é, desequilíbrio entre a produção de espécies reactivas de oxigénio/espécies reactivas de azoto – Figura 4 – (Muanda *et al.*, 2010)



Figura 4: Alterações da homeostase conduzem ao stresse oxidativo (adaptado de Gemma *et al.*, 2004)

Estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que o consumo de alimentos ricos em compostos fitoquímicos está associado à prevenção de inúmeras doenças. Estes compostos juntamente com agentes redutores presentes na dieta (carotenóides e vitaminas C e E) protegem os tecidos do organismo contra o stresse oxidativo. Geralmente referidos como antioxidantes, estes compostos podem prevenir inúmeras patologias associadas ao stresse oxidativo, nomeadamente cancro, doenças cardiovasculares e inflamatórias. Estes compostos bioactivos podem ser encontrados em diversos legumes e frutos, nomeadamente no aipo, limão (flavonas), brócolos, morango, maçã (flavonóis), chás preto e verde (flavanóis), casca de laranja (flavanonas), soja (isoflavonas), mirtilos, cerejas (antocianinas) – Figura 5 – (Scalbert *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2010; Jakešević *et al.*, 2011).

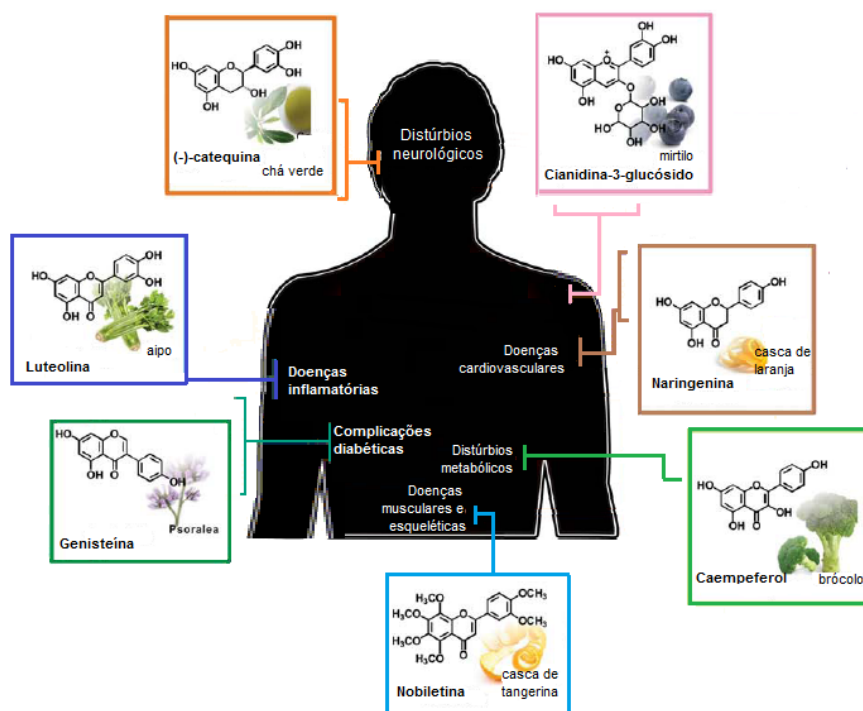


Figura 5: Efeitos bioativos (antioxidante e anti-inflamatório) de compostos fitoquímicos provenientes da dieta na prevenção de inúmeras patologias (adaptado de Pan et al., 2010)

Existem estudos que demonstram que os mecanismos de metabolismo/absorção destes compostos podem afectar a eficácia da capacidade antioxidante de frutos e vegetais (Prior, 2003).

1.2.2 Actividade Anti-inflamatória

A inflamação é um processo biológico que pode resultar, por exemplo, do dano nos tecidos e inicia-se pela activação do sistema imune inato, o qual desempenha um papel crucial na indução de sinalizadores, estabelecendo o início deste processo. A principal função da inflamação é reparar o dano, de forma a repor o equilíbrio homeostático. A grande importância em manter este equilíbrio está relacionada com o aumento do possível dano causado pela resposta inflamatória no organismo. Assim, a resposta inflamatória ideal é rápida, destrutiva e específica. O processo inflamatório e o sistema imune estão fortemente relacionados, pois uma sobreactivação da resposta do sistema imune pode causar inflamação crónica devido a uma regulação ou resolução ineficaz desta resposta (García-Lafuente *et al.*, 2009).

A inflamação crónica está associada a um aumento de diversas espécies oxidativas e nitrosativas produzidas pelas células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos, linfócitos), podendo, também, activar moléculas sinalizadoras (citocinas), enzimas (ONS) e conduzir à expressão de genes inflamatórios (NF- κ B). As espécies inflamatórias produzidas por células imunes podem também atacar tecidos normais que rodeiam o local onde se dá a inflamação, causando-lhes dano oxidativo e, conseqüentemente, há um aumento da extensão do local de inflamação (Pan *et al.*, 2010).

Nestas condições, o excesso de oxidantes e de mediadores inflamatórios têm um efeito prejudicial no tecido normal, nomeadamente toxicidade, proliferação celular anormal, inibição das funções normais dos tecidos e órgãos, conduzindo a distúrbios sistémicos. Em situações em que as células produzem níveis de espécies reactivas acima dos valores normais, pode ocorrer uma de duas situações: (i) se os níveis das defesas antioxidantes forem semelhantes aos níveis das espécies pró-oxidantes, há indução de mecanismos reguladores que conferem protecção e, portanto, os níveis de citocinas anti-inflamatórias também são semelhantes aos das citocinas pró-inflamatórias, havendo protecção de inflamação e, assim, a homeostase é mantida; (ii) por outro lado, se na presença de stresses oxidativo/nitrosativo os níveis das defesas antioxidantes forem, significativamente, inferiores às das espécies pró-oxidantes há a indução de respostas imunitárias e estas conduzem a um desequilíbrio entre citocinas anti- e pró-inflamatórias, havendo um agravamento da inflamação e o organismo pode desenvolver diversas patologias, nomeadamente as doenças inflamatórias intestinais.

1.2.2.1 Doenças Inflamatórias Intestinais

O intestino constitui a parte final do tubo digestivo e, nos primatas, é dividido em delgado e grosso. O intestino delgado está compreendido entre o estômago e o intestino grosso e inclui o duodeno, o jejuno e o íleo. Este órgão é assim designado pois o diâmetro do seu lúmen é mais pequeno do que o do intestino grosso, no entanto o seu comprimento é maior. Outra diferença que os intestinos delgado e grosso apresentam é a presença de mesentério no delga-

do (excepto na região do duodeno). O mesentério está ligado à parede abdominal posterior, estendendo-se oblíqua e perifericamente ao longo de 15 cm e 4-6 m, respectivamente, cobrindo por inteiro o jejunum e o íleo. O íleo é constituído por uma parede fina, possui um lúmen pequeno (comparativamente ao jejunum) e ocupa principalmente a região central e direita do abdómen e da pélvis (*In Human Physiology*, 2003).

Em condições normais as células epiteliais, as células de *Paneth*, os enterócitos e as células imunitárias presentes no intestino constituem uma barreira contra as citocinas e metabolitos provenientes dos micróbios ou hospedeiros de modo a manter a homeostase intestinal e combater os agentes patogénicos. No entanto, uma alteração deste equilíbrio pode conduzir à inflamação intestinal. Esta patologia resulta de uma resposta imune exagerada e pouco controlada, mediada pelos linfócitos T, conduzindo a uma alteração do estado redox nas células epiteliais do intestino. Esta modificação da homeostasia induz alterações na motilidade intestinal (Monteleone *et al.*, 2010); é caracterizada pelo movimento do conteúdo proveniente do estômago, *bolus* alimentar, através dos intestinos delgado e grosso por um processo designado por peristaltase. Este processo consiste em contracções rítmicas e ondulatórias que permitem ao *bolus* deslocar-se ao longo do tracto intestinal. Este movimento é controlado pelo sistema nervoso entérico (SNE), uma rede com mais de 100 milhões de neurónios presentes na linha do tracto gastrointestinal. Apesar dos neurónios no SNE comunicarem através de neurotransmissores encontrados no cérebro, as suas funções locais no tracto gastrointestinal apenas regulam a actividade do músculo liso (*In Human Physiology*, 2003). O *bolus* do quimo ao estimular os neurónios entéricos, que por sua vez estimulam os intrínsecos aferentes, acaba por estimular os neurónios motores e estes ao enervarem as células do músculo liso, tanto longitudinal como circular, e as células intersticiais de *Cajal*, induzem a libertação de neurotransmissores tanto excitatórios como inibitórios. A contracção e o relaxamento do músculo liso devem-se à estimulação do neurotransmissor acetilcolina na parte superior e à estimulação do NO na zona inferior do *bolus*, respectivamente – Figura 6– (*In Human Physiology*, 2003; Lin *et al.*, 2011).

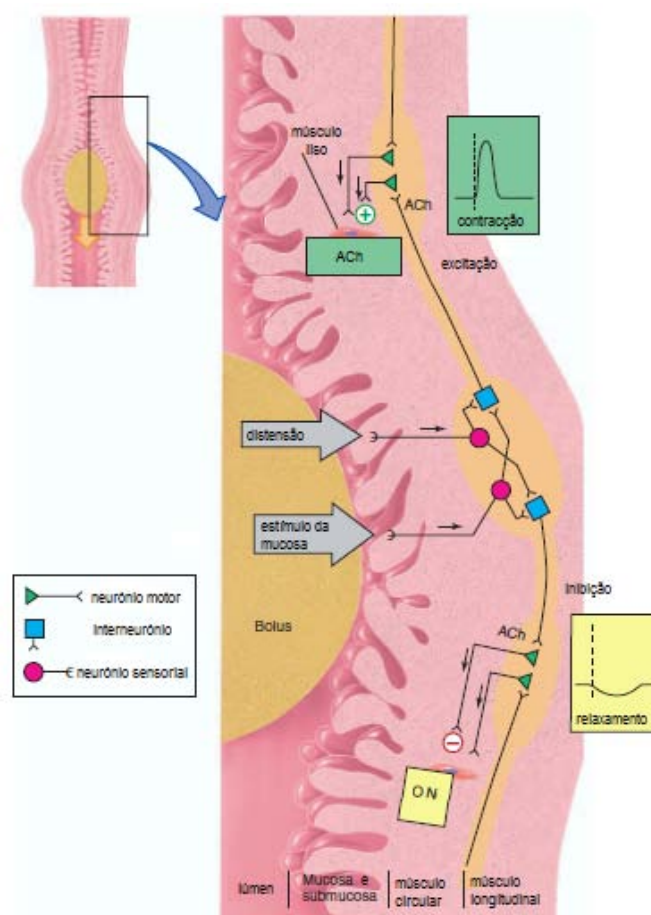


Figura 6: O movimento peristáltico é produzido por reflexos locais que envolvem o SNE e este consiste em neurónios, interneurónios e neurónios sensoriais. Os neurotransmissores que estimulam a contração do músculo liso estão representados com (+) enquanto que aqueles que induzem o relaxamento do músculo liso estão representados com (-). Legenda: ON – óxido nítrico, ACh – acetilcolina (adaptado In *Human Physiology*, 2003).

Contudo, em ambientes pró-inflamatórios, ocorre alteração da motilidade que é iniciada quando as células produzem níveis elevados de espécies reactivas de oxigénio e de azoto e os mecanismos de defesa não actuam eficazmente. Estas espécies são capazes de iniciar os mecanismos de morte celular. A produção destas espécies oxidativas pela mitocôndria em elevadas concentrações acelera o dano celular (Baregamian et al., 2006), levando à quebra da barreira intestinal, ou seja, à destruição das células epiteliais do intestino induzindo a activação do sistema imune. A actividade das células imunitárias é alterada e, portanto, há um aumento da reactividade, provocando um excesso de produção de células T, resultado da proliferação descontrolada e da resistência a estímulos apoptóticos (Monteleone et al., 2010) e um enfraquecimento da regulação, ou seja, o enfraquecimento das citocinas anti-inflamatórias (Figura 7).

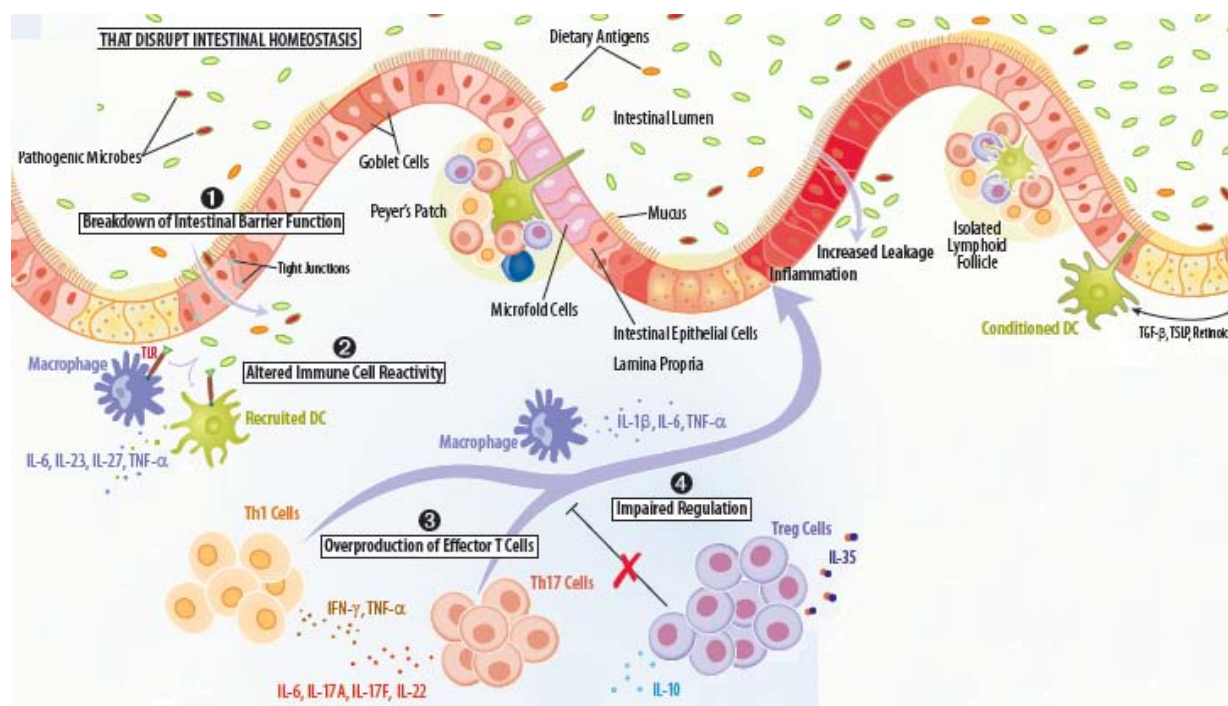


Figura 7: A alteração da homeostase intestinal é induzida por um desequilíbrio entre a produção de citocinas anti- e pró-inflamatórias em resultado da sobreactivação do sistema imune e de factores de crescimento, conduzindo à inflamação no intestino [2].

Deste modo, com a sobreactivação do sistema imune, há a libertação excessiva de citocinas inflamatórias (interleucinas, interferões, factor de necrose tumoral-alfa) e de factores de crescimento que conduzem à activação de mais células T; paralelamente, os níveis de citocinas anti-inflamatórias diminuem. Por sua vez, a activação continuada de células T potencia a inflamação, uma vez que estas libertam espécies reactivas de oxigénio e de azoto, havendo, assim, um contínuo aumento dos níveis de radicais livres que levam a um aumento do dano oxidativo no intestino potenciando a inflamação. Este ciclo vicioso conduz à infiltração de agentes patogénicos, à redução das bactérias da flora intestinal e à alteração da motilidade intestinal caracterizada pela perda de elasticidade, pelo espessamento da parede intestinal e num estado mais avançado pelo enrijecimento do músculo liso intestinal, não ocorrendo contracção e relaxamento deste. Em resultado disto a motilidade do intestino fica debilitada e, assim, a absorção de nutrientes e a excreção de resíduos fica comprometida.

1.3 OBJECTIVOS GERAIS

O interesse pelas antocianinas tem aumentado significativamente ao longo do tempo em diversas áreas (designadamente nas indústrias alimentar e farmacêutica) e prova disso são os inúmeros estudos farmacológicos que confirmam a eficiência destes compostos presentes em diversos frutos, em consequência dos seus diversos benefícios na saúde.

Com efeito as antocianinas da dieta têm sido consideradas como responsáveis pela diminuição do risco de doenças associadas às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Atendendo a que a doença inflamatória intestinal se enquadra dentro desse perfil de doenças e que a ingestão média diária de antocianinas parece ultrapassar a de qualquer outro flavonóide decidimos explorar algumas propriedades biológicas que possam contribuir para o efeito benéfico destes compostos no contexto da doença inflamatória intestinal. De entre os frutos e vegetais com conteúdo elevado em antocianinas escolhemos os mirtilos pelo impacto que pode ter, inclusive a nível económico, uma vez que se trata de uma cultura em expansão em Portugal numa zona bem delimitada do centro do País.

Assim, os objectivos propostos para este estudo foram:

- Obtenção de um extracto enriquecido em antocianinas – a partir de mirtilos (*Vaccinium corymbosum* L.) – adquiridos no concelho de Sever do Vouga;
- Caracterização química do extracto quer em termos de fenóis totais, quer em termos de antocianinas;
- Avaliação do potencial antioxidante do extracto em termos de capacidade antioxidante total e capacidade *scavenging* do peroxinitrito;
- Avaliação da eventual toxicidade celular quer em termos de viabilidade celular quer de efeito anti-proliferativo;
- Avaliação do efeito protector contra a produção de espécies reactivas por células activadas;
- Exploração do efeito na motilidade intestinal.

CAPÍTULO 2

Material e Métodos

2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os mirtilos (*Vaccinium corymbosum* L.) utilizados neste estudo foram adquiridos à BioGrêso, Sever do Vouga, Portugal.

Os reagentes de laboratório foram todos de pureza adequada aos ensaios a realizar. O 2,2' – azinobis[3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato] (ABTS), a acetilcolina, a dihidrorodamina 123 (DHR), o dimetilsulfóxido (DMSO), o diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFHDA), o lipopossacarídeo (LPS), o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)2,5-difenilterazolio (MTT), o Trolox e a sulforodamina B (SRB) foram obtidos da *Sigma-Adrich Co.* O reagente *Folin-Ciocalteu* foi adquirido da *Merck*.

Para a cultura celular, o meio de cultura *Dulbeco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) foi adquirido da *Gibco-Invitrogen*, enquanto que a tripsina, o soro fetal bovino e a mistura de antibióticos streptomicina/penicilina foram obtidos da *Biochrom*. As linhas celulares (RAW 264.7, HT-29 e AsPC-1) foram obtidas da *European Collection of Cell Culture* (ECACC).

As antocianinas utilizadas como referência ou padrão foram obtidas da *Extrasynthèse* (Genay, França) e utilizadas em solução em DMSO.

Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura MiliQ.

2.2 OBTENÇÃO DE UM EXTRACTO ENRIQUECIDO EM ANTOCIANINAS

Os mirtilos provenientes de Sever do Vouga foram adquiridos em Julho de 2011, época apropriada à colheita, em condições adequadas, repartidos por alíquotas e congeladas a - 20°C.

Para a obtenção do extracto enriquecido em antocianinas, os mirtilos foram homogeneizados com uma solução acetona/metanol/água/ácido fórmico (40/20/20/0,1) na proporção de 100 g de fruto para 300 mL de solução de homogeneização num homogeneizador tipo *Waring-Blender* durante 30 s a baixa velocidade e 2x 15 s a alta velocidade (Youdim *et al.*, 2002). O homogeneizado foi filtrado por gaze e posteriormente centrifugado a 1000g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi transferido para um balão de fundo redondo e evaporado num evaporador rotatório a 37°C e a pressão reduzida. A

pressão foi restabelecida com azoto para minimizar a degradação das antocianinas. O resíduo foi solubilizado em água e designado por extracto bruto. Posteriormente procedeu-se à purificação do extracto bruto por extracção de fase sólida, utilizando para o efeito uma coluna de fase reversa *Sep-Pak C₁₈* (35 cc, 10 g) adquirida à *Waters*. Esta etapa do processo é de grande importância para a remoção de alguns compostos presentes no extracto bruto, nomeadamente açúcares e outros compostos fenólicos, que não as antocianinas, permitindo assim a obtenção de um extracto com maior teor relativo de antocianinas. Antes de aplicar a amostra, a matriz da coluna foi previamente activada com metanol (50 mL) e lavada com água acidificada (75 mL HCl 0,01%) Esta matriz retém os compostos orgânicos hidrofóbicos (antocianinas e fenólicos), enquanto que açúcares e ácidos são prontamente eluídos com água acidificada (0,01% HCl). Para a remoção dos compostos fenólicos, não antocianinas retidas na matriz, procedeu-se à eluição com acetato de etilo. Finalmente as antocianinas foram eluídas com metanol acidificado (0,01% HCl) (Figura 8) (Rodríguez-Saona *et al.*, 2001). Esta técnica de purificação apresenta diversas vantagens, nomeadamente elevada selectividade, extracção rápida e baixa quantidade de solventes envolvidos (Miniati, 2007).

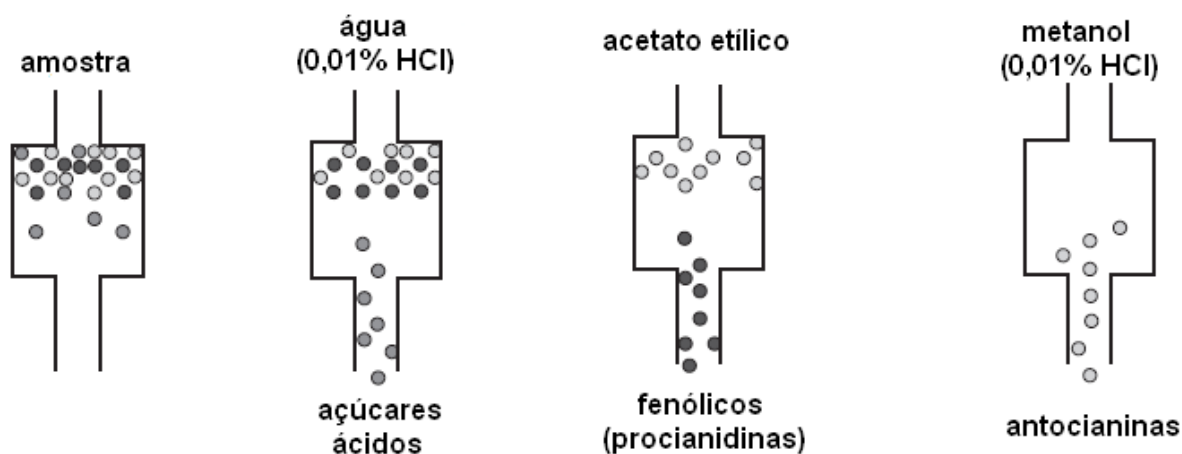


Figura 8: Purificação de antocianinas por extracção de fase sólida. Os componentes da amostra, representado pelos diferentes tons de círculos, foram eluídos como indicado. A última eluição, com metanol acidificado, eluiu as antocianinas (adaptado de Rodríguez-Saona *et al.*, 2001).

A fracção metanólica foi seca num evaporador rotativo a 37°C a pressão reduzida. O resíduo seco foi solubilizado num volume exacto de DMSO [extracto 1] ou numa mistura metanol/água (1/1) suplementado com HCl (0,5% con-

centração final) [extracto 2], repartido em alíquotas, saturado com azoto e congelado a -20°C para os estudos posteriores.

O extracto em DMSO foi utilizado em todos os estudos à excepção dos estudos de motilidade intestinal em que também foi utilizado o extracto aquoso.

2.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRACTO ENRIQUECIDO EM ANTOCIANINAS

2.3.1 Quantificação dos Fenóis Totais

O conteúdo fenólico total do extracto foi avliado espectrofotometricamente usando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu que se baseia na utilização do reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura de óxidos fosfotungsténio e fosfomolibdico, que é reduzida pelos fenóis a ácidos de tungsténio e de molibdénio de cor azul proporcional à concentração de fenóis. Sucintamente, adicionaram-se 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água miliQ (1/10) a um pequeno volume extracto, normalmente na ordem dos 30 μL . A mistura foi incubada durante 2 minutos à temperatura ambiente e de seguida foram adicionados 2,0 mL de uma solução de carbonato de sódio (75 g.L^{-1}). A mistura foi vigorosamente agitada em *vortéx* e aquecida durante 15 minutos, a 50°C , e de seguida foi arrefecida num banho com gelo e a absorvância foi lida a 760 nm. As amostras foram analisadas em triplicado.

Os resultados obtidos com o extracto foram comparados com os valores obtidos com uma solução padrão de ácido gálgico (5 mg.mL^{-1}) e foram expressos em $\text{g ácido gálgico.L}^{-1}$ extracto.

2.3.2 Quantificação das Antocianinas

O conteúdo monomérico das antocianinas do extracto foi determinado espectrofotometricamente usando um espectrofotómetro UV/Visível (*Perkin Elmer Lambda 45*) a diferentes valores de pH (Giusti *et al.*, 2001). Para tal foram usadas duas soluções tampão: uma de cloreto de sódio (0,025M) pH 1,0

e outra de acetato de sódio (0,4M) pH 4,5. O extracto foi previamente diluído em cada uma das soluções tampão e as leituras espectrofotométricas foram feitas após 15 minutos e até 1 hora da diluição para permitir um equilíbrio, mas sem alterar a antocianina. A absorvância da amostra diluída foi calculada da seguinte forma: $A = (A_{\lambda \text{ vis máx}} - A_{700})_{\text{pH}1,0} - (A_{\lambda \text{ vis máx}} - A_{700})_{\text{pH}4,5}$, de acordo com Rodriguez-Saona *et al.*, 2001. O valor de absorvância foi convertido em concentração de antocianina e expresso em g.L^{-1} , a partir da absorvidade molar e respectiva massa molecular da delphinidina.

2.3.3 Separação e Identificação das Antocianinas do Extracto por HPLC

Através de Cromatografia Líquida de Alta Precisão ou *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC, foi possível separar e identificar algumas das antocianinas presentes no extracto.

Utilizou-se uma coluna de fase reversa (Lichocart C18 da *Merck* com 125 mm de comprimento, 4 mm de diâmetro interno e partículas de 5 μm) e a detecção foi feita por *photodiode array* (*Beckman Gold 168 detector*) a 520 nm (Durst *et al.*, 2001). A fase móvel utilizada foi constituída pela seguinte mistura de solventes (previamente filtrados num sistema de filtração sob vácuo): solvente A água/ácido fórmico (95/5) e solvente B água/acetonitrilo/ácido fórmico (65/30/5) e de acordo com o gradiente de eluição representado na Tabela 2 e com um fluxo de 1 mL.min^{-1} .

Tabela 2: Gradiente de eluição para a separação e identificação do extracto enriquecido em antocianinas por HPLC.

TEMPO (MIN.)	SOLVENTE A (%)	SOLVENTE B (%)
0	80	20
1	20	80
45	0	100
50	0	100

2.3.3.1 Hidrólise Ácida do Extracto Enriquecido em Antocianinas

A hidrólise de antocianinas consiste na quebra das ligações entre o anel C e os açúcares presentes, dando origem às antocianidinas.

Assim, a 1 mL de extracto foram adicionados 9 mL de uma solução de 50% CH₃OH + 2 N HCl. Esta mistura foi feita em tubo de vidro de tampa rosca-da, borbulhou-se azoto e depois devidamente fechado o tubo foi colocado num banho seco a 90°C durante uma hora (Durst *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2005).

2.4 AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

De forma a avaliar a actividade antioxidante do extracto enriquecido em antocianinas, avaliou-se a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox e a capacidade de proteger a oxidação da dihidrorodamina 123 (DHR) induzida pelo peroxinitrito

2.4.1 Ensaio da Capacidade Antioxidante Total

A capacidade antioxidante total do extracto foi determinada cineticamente num espectrofotómetro *Perkin-Elmer (Lambda 45)* essencialmente como descrito por Re *et al.* (1999).

Brevemente, o catião radical ABTS^{•+} foi gerado por reacção do ABTS (7mM) com o persulfato de amónio 2,45 mM à temperatura ambiente e no escuro durante pelo menos 16 horas. Para o ensaio a solução de ABTS^{•+} foi diluída com etanol até um valor de absorvância de 0,70 (\pm 0,02) a 734 nm. Inicialmente, o ensaio foi realizado com Trolox (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 μ M), um análogo solúvel em água do α -tocoferol (vitamina E). Quer o Trolox quer o extracto foram diluídos em etanol e a absorvância foi medida a 734 nm durante sete minutos a 30°C. Os resultados foram expressos em equivalente de Trolox, a partir de uma curva padrão construída com base na percentagem de inibição

da absorvância do branco (absorvância do radical ABTS^{•+}) pelo Trolox *versus* a concentração de Trolox.

2.4.2 Ensaio da Oxidação da Dihidrorodamina Induzida pelo Peroxinitrito

Para avaliar a actividade *scavenging* de peroxinitrito procedeu-se à realização do ensaio de oxidação da dihidrorodamina. Este método permite avaliar a capacidade de captação do peroxinitrito recorrendo à monitorização fluorimétrica da diminuição da oxidação da dihidrorodamina induzida pelo peroxinitrito.

As misturas de reacção, com volume final de 2,0 mL, foram preparadas directamente na *cuvette* do fluorímetro. Assim, à solução tampão fosfato salino (K₂HPO₄ 50 mM; NaCl 90 mM; KCl 90mM) a pH 7,4 foi adicionada dihidrorodamina com uma concentração de 15 µM de e a fluorescência foi monitorizada num fluorímetro (*Perkin-Elmer*) com comprimentos de excitação e de emissão de 500 e 536 nm e larguras de fenda de 5,0 e de 5,0, respectivamente. Após 2 minutos do início da monitorização a reacção de oxidação foi iniciada pela adição de ONOO⁻ 1,2 µM em NaOH 0,1M e o aumento da fluorescência registado. Nos ensaios com o extracto ou a delfinidina estes foram adicionados imediatamente antes do peroxinitrito. A delfinidina foi utilizada como um composto referência. Os ensaios decorreram à temperatura ambiente e sob agitação. O ensaio controlo corresponde à oxidação máxima da sonda, ou seja, a 100% fluorescência. Os resultados foram apresentados em percentagem do controlo – % controlo (Santos *et al.*, 2004).

2.5 CULTURAS CELULARES

Foram utilizadas neste estudo três linhas celulares: uma de macrófagos de murganho, RAW 264.7, outra de adenocarcinoma de cólon humano, HT-29, e outra de adenocarcinoma de pâncreas humano, AsPC-1.

A linha celular de macrófagos foi utilizada para avaliar eventual efeito tóxico do extracto assim como eventual efeito protector em células activadas

com estímulo pró-inflamatório. As duas linhas celulares de cancro humano foram usadas para testar eventual efeito do extracto na proliferação celular.

Todas as células foram mantidas em frascos de cultura de 75 cm² com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e com 1% de antibiótico (streptomicina/penicilina) numa incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e 80% de humidade até confluência adequada. De seguida as células foram removidas com raspador (no caso dos macrófagos) ou após adição de tripsina (0,25%) e semeadas em caixas de 12 ou 24 poços, e com uma densidade celular adequada ao ensaio em questão.

2.5.1 Viabilidade Celular

As células RAW 264.7 foram semeadas em caixas de 12 poços com uma densidade de 2×10^5 células/poço. Após 24 horas o meio foi removido e substituído por outro ao qual foram adicionados volumes diferentes do extracto enriquecido em antocianinas. As células foram incubadas durante 24 e 48 horas e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT.

Para tal aspirou-se o meio de cada poço, as células foram lavadas com PBS (37°C) e incubadas com 50 µL MTT (5 mg.mL^{-1}) em PBS durante uma hora, a 37°C, no escuro. Após esse período, o meio foi cuidadosamente removido, os cristais de formazana foram dissolvidos em DMSO (500 µL) e de seguida procedeu-se à sua quantificação através da medição da densidade óptica a 530 nm num leitor de placas *Synergy HT (Bio Tek Instruments)*. Os resultados foram expressos em percentagem de controlo, isto é, células a que não foi adicionado extracto.

2.5.2 Produção de Espécies Reactivas de Oxigénio

Para quantificar a produção intracelular de espécies reativas de oxigénio foi usada uma sonda fluorescente, a diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFHDA).

Brevemente, os macrófagos foram semeados em placas de 12 poços e com uma densidade de cerca de 3×10^5 célula/poço. Após 16 horas o meio foi removido e substituído por novo meio de cultura ao qual foi adicionado o extracto em concentrações diversas. As células foram incubadas durante 15 minutos e de seguida estimuladas com LPS $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Uma vez activadas foram incubadas durante 24 horas. Após esse período de tempo as células foram incubadas durante 15 minutos com DCFHDA ($5 \mu\text{M}$) e posteriormente lavadas duas vezes com PBS a 37°C para remover a sonda que não internalizou nas células. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de PBS a cada poço e mediu-se a fluorescência num leitor de placas *Synergy HT* (*Bio Tek Instruments*) tendo como comprimentos de onda de excitação e de emissão 485 e 530 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos em percentagem de controlo, isto é, células activadas mas que não foram pré-incubadas com o extracto. Paralelamente, as células foram visualizadas por microscopia de fluorescência (Microscópio *Zeiss, Axiovert 40*).

2.5.3 Produção de Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico pelos macrófagos activados, em condições idênticas às descritas no ensaio da produção de espécies reactivas de oxigénio, foi determinada como nitrito acumulado no sobrenadante das células de acordo com a reacção de *Griess* (Granger *et al.*, 1996)

No fim de 16 horas de incubação adicionou-se ao sobrenadante removido de cada poço 100 μL de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% e após cinco minutos adicionou-se o mesmo volume de N-1-naftiletildenodiamida 0,1% em água. A absorvância foi medida a 530 nm num leitor de placas *Synergy HT* (*Bio Tek Instruments*) e a concentração de nitrito foi calculada por comparação com os valores obtidos com curva padrão de NaNO_2 0,1 M, preparado em meio de cultura. Os resultados obtidos foram expressos em nmol nitrito/ 6×10^6 células.

2.5.4 Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada nas células HT-29 e AsPC-1 recorrendo ao ensaio da sulforodamina B. Para este ensaio as células foram semeadas em caixas de 24 poços com uma densidade de 50×10^3 células/poço. Após 24 horas de incubação nas condições referidas anteriormente na secção “ 2.5 Culturas Celulares”, o meio de cultura foi removido e substituído por novo meio de cultura ao qual foi adicionado o extracto em DMSO. As células foram incubadas por 24 e 48 horas e a proliferação celular avaliada ao fim desse tempo. Para tal é necessário, em primeiro lugar, proceder à fixação das células. Após remoção do meio de cultura e lavagem com PBS a pH 7, adicionou-se 1 mL de ácido acético a 1% em metanol e de seguida as células foram refrigeradas a -20°C . Após um período de, pelo menos, 24 horas a -20°C realizou-se o ensaio propriamente dito. Este iniciou-se com a remoção do ácido acético em metanol seguido de secagem à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se 300 μL da solução de sulforodamina B (sulforodamina B 0,05% em ácido acético a 1% em água) e incubou-se durante uma hora a 37°C . Após este período, as células foram lavadas com ácido acético a 1% para remover a sulforodamina B que não ligou às proteínas celulares e deixou-se secar à temperatura ambiente. Com o intuito de lisar as células, foi adicionado 1 mL de Tris-HCl 10 mM a pH 10,0 e depois de agitação adequada foi medida a densidade óptica a 540 nm recorrendo a um leitor de placas *Synergy HT (Bio Tek Instruments)*. Os resultados foram expressos em percentagem de controlo, isto é, células que não foram incubadas com o extracto (adaptado de Holy *et al.*, 2006).

2.6 AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL

2.6.1 Preparação de Segmentos de Íleo de Rato

O fragmento do intestino delgado, íleo, foi isolado de ratos *Wistar* machos com 8 semanas logo após sacrificar o animal por deslocamento cervical e de imediato colocado numa solução fisiológica de *Krebs-Henseleit* (NaCl

118,67 mM; KCl 5,36 mM; MgSO₄.7H₂O 0,57 mM; CaCl₂ 1,90 mM; KH₂PO₄.2H₂O 0,90 mM; NaHCO₃ 25,00 mM; glicose 11,1 mM; pH 7,4) preparada diariamente e seguida de oxigenação durante, pelo menos 15 minutos com carbogénio (95% O₂ e 5% CO₂) de modo a promover a oxigenação do tecido e manter o pH do meio constante. De seguida, procedeu-se à limpeza do interior do intestino com a solução em questão. Por fim o fragmento intestinal foi cortado em pequenos segmentos com cerca de 1,0 – 1,5 cm de comprimento. Não foram utilizados quaisquer segmentos com lesões visíveis macroscopicamente. Toda esta operação de limpeza foi levada a cabo em caixas de *Petri* sobre gelo.

Os segmentos foram sujeitos a uma tensão óptima basal – determinada em experiências realizadas anteriormente – de 3 g, em banhos de órgãos imersos em 10 mL de solução de *Krebs-Henseleit* a 37°C (Santos, 2005).

2.6.2 Avaliação da Contração Intestinal

Durante duas horas, com lavagens periódicas, os segmentos foram deixados em repouso de modo a que o potencial membranar fosse recuperado. Seguidamente a este período de equilíbrio, registaram-se as contrações isométricas, após adições independentes do extracto enriquecido em antocianinas (12, 24, 48, 96 e 192 µM), com transdutores de força (*Letica Scientific Instruments*), num oscilógrafo de quatro canais (*Polygraph 4006 – Letica Scientific Instruments*).

No início e no final de cada ensaio foi adicionada acetilcolina 100 µM como controlo externo, de forma a testar a funcionalidade do músculo liso do intestino.

Em todas as experiências efectuaram-se ensaios controlo com o solvente do extracto enriquecido em antocianinas (DMSO ou metanol:água) para garantir que este não interferia com a contração muscular do intestino.

2.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como valores médios \pm erro padrão da média (EPM) do número de experiências (n) indicado. A análise estatística foi realizada usando a análise *one-way* ou *two-way* de variância, conforme apropriado, seguida do teste *Bonferroni's post-hoc* e para tal foi utilizado o *Software Prism 5.0 (Software GraphPad)*. Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

CAPÍTULO 3

Resultados e Discussão

3.1 MIRTILOS

Na natureza existem diversos frutos e vegetais que são muito benéficos para o bom funcionamento do organismo, devido à presença de, por exemplo, antocianinas na sua constituição. Os frutos que contêm um maior teor de antocianinas (Tabela 3) são os mirtilos (*Vaccinium corymbosum* L.) e os *chokeberries* pretos. Deste modo e por Portugal, nomeadamente nos concelhos de Oliveira de Frades, Sever do Vouga, Águeda e Albergaria-a-Velha, possuírem as condições ideais para o seu cultivo, os mirtilos (Figura 9) foram escolhidos para obter o extracto enriquecido em antocianinas. O fruto fresco do mirtilo (baga azul-escura ou preta, globulosa, com cerca de 0,5 e 1,5 cm de diâmetro ^[3]) é conhecido pelo seu elevado valor nutritivo desde o século XVI.



Figura 9: Mirtilos [4]

Além disso, os mirtilos possuem a grande vantagem de serem consideradas uma estratégia segura e não tóxica, no que diz respeito ao seu manuseamento como em relação ao seu consumo, pois não foram observados efeitos mutagénicos nem carcinogénicos e nem foram encontradas reacções adversas (*WHO monographs*).

Tabela 3: Conteúdo em antocianinas de algumas frutas e vegetais (retirado de Rodriguez-Saona *et al.*, 2001)

Fonte	Conteúdo de Antocianinas (mg/100 g de fruto fresco)	Referência
Maçã	10	Mazza e Miniati, 1993
Mirtilos (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	300 – 320	Mazza e Miniati, 1993
Amora	83 – 326	Mazza e Miniati, 1993
Groselha	130 – 400	Timberlake, 1988
Mirtilos (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	25 – 495	Mazza e Miniati, 1993
Repolho roxo	25	Timberlake, 1988
<i>Chokeberries</i> pretos	560	Kraemer-Schafhalter <i>et al.</i> , 1996
Cereja	4 – 450	Kraemer-Schafhalter <i>et al.</i> , 1996
Mirtilos (<i>Vaccinium macrocarpon</i>)	60 – 200	Timberlake, 1988
<i>Eldenberry</i>	450	Kraemer-Schafhalter <i>et al.</i> , 1996
Uvas	6 – 600	Mazza e Miniati, 1993
Kiwi	100	Kraemer-Schafhalter <i>et al.</i> , 1996
Cebolas vermelhas	7 – 21	Mazza e Miniati, 1993
Ameixa	2 – 25	Timberlake, 1988
Rabanetes vermelhos	11 – 60	Giusti <i>et al.</i> , 1998
Framboesas pretas	300 – 400	Timberlake, 1988
Framboesas vermelhas	20 – 60	Mazza e Miniati, 1993
Morangos	15 – 35	Timberlake, 1988
<i>Tradescantia pallida</i> (folhas)	120	Shi <i>et al.</i> , 1992

3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRACTO ENRIQUECIDO EM ANTOCIANINAS

3.2.1 Quantificação dos Fenóis Totais

Atendendo a que as antocianinas são polifenóis começámos por quantificar o conteúdo em fenóis totais do extracto obtido. Para tal, utilizámos o método colorimétrico *Folin-Ciocalteu*, adaptado por Georgé *et al.* (2005).

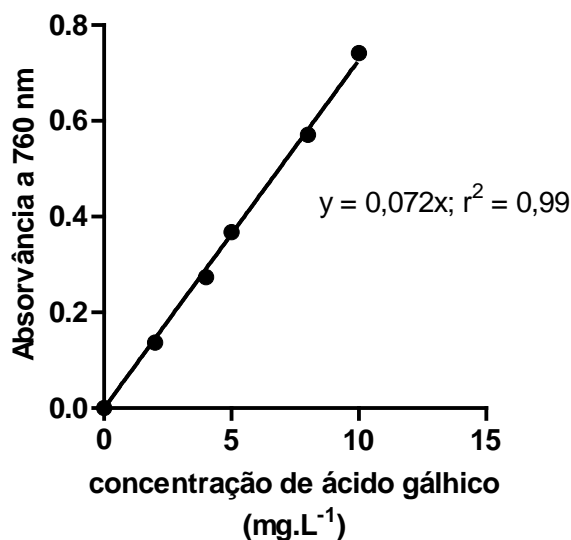


Figura 10: Curva padrão de ácido gálgico (5 mg.mL⁻¹).

Como o ácido gálgico é normalmente o fenol mais abundante na maioria das espécies vegetais, começámos por construir uma curva padrão de ácido gálgico. Assim, através da comparação dos resultados obtidos, referentes ao extracto enriquecido em antocianinas, com os valores obtidos da solução padrão de ácido gálgico (5 mg.mL⁻¹), Figura 10, foi possível determinar a quantidade de fenóis no extracto em DMSO (extracto 1) e no extracto em metanol/água acidificada (extracto 2) e expressá-la em equivalentes de ácido gálgico.L⁻¹ e em mg/100 g de fruto fresco. Os resultados obtidos foram de 5,32 ± 0,31 g.L⁻¹ e de 283 mg/100 g de fruto fresco para o extracto 1 e de 8,94 ± 0,07 g.L⁻¹ e de 198,47 mg/100 g de fruto fresco para o extracto 2. O valor apresentado é um valor médio ± EPM de um número de ensaios (n) igual a 4.

3.2.2 Quantificação das Antocianinas

A estrutura das antocianinas sofre transformações reversíveis com a alteração do pH. As formas predominantes a pH 1,0 e a pH 4,5 são o catião flavílico (vermelho) e a pseudo-base carbinol (incolor), respectivamente. Estas transformações reflectem-se de forma notória no espectro de absorção destes compostos. O método que utilizámos para quantificar as antocianinas baseia-se nesta reacção reversível de acordo com o pH (Giusti *et al.*, 2001). A Figura 11 representa um ensaio típico evidenciando os espectros obtidos quer a pH 1,0 (correspondente à forma do catião) quer a pH 4,5 (correspondente à forma carbinol). A diferença é notável na gama do visível e foi através da diferença entre os valores de absorvância no comprimento de onda a que corresponde uma absorvância máxima na zona do visível a pH 1,0 e a pH 4,5 que se quantificaram as antocianinas dos extractos

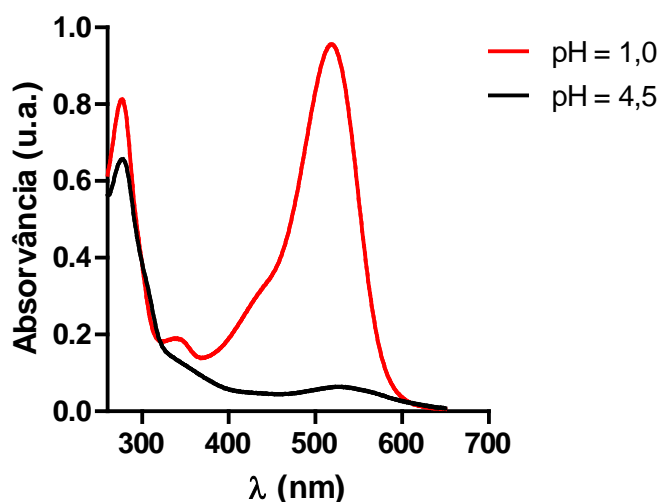


Figura 11: Espectro característico de antocianinas a diferentes valores de pH (1,0 e 4,5).

Os resultados obtidos da quantificação do teor de antocianinas foram expressos em equivalentes de ácido gálglico.L⁻¹ e em mg/100 g de fruto fresco. O extracto 1 apresenta um teor de antocianinas de 3,04 g.L⁻¹ ± 0,10, que equivale a 162,13 mg/100 g de fruto fresco e o extracto 2 de 2,85 g.L⁻¹ ± 0,10, que corresponde a 63,33 mg/100g de fruto fresco. Estes resultados estão em concordância com os valores da Tabela 3. Os valores apresentados são referentes a um valor médio ± EPM de um número de ensaios (n) igual a 4.

As diferenças observadas no conteúdo de antocianinas nos dois extractos podem dever-se ao período de tempo desde que o fruto foi colhido (Julho) até à obtenção dos extractos 1 e 2 (Setembro e Abril, respectivamente). Em relação à diferença entre o teor de fenóis e o de antocianinas, em ambos os extractos, esta pode ser explicada pela baixa especificidade que o método Folin-Ciocalteu apresenta em distinguir as diferentes classes dos fenóis (flavonóides, taninas) – uma vez que as antocianinas são compostos flavonóides estas são também quantificadas como teor de fenóis – e pela baixa eficiência do processo de purificação, permitindo a retenção de outros fenóis, que não as antocianinas, na coluna aquando da sua eluição.

3.2.3 Separação e Identificação do Conteúdo de Antocianinas Presente no Extracto Enriquecido em Antocianinas por HPLC

A Cromatografia Líquida de Alta Precisão ou *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC, tem sido o método de eleição para a análise qualitativa e quantitativa de antocianinas. Esta técnica é igualmente usada na identificação de compostos individuais, sendo usado, para tal, várias técnicas acopladas como por exemplo HPLC com detecção espectrofotométrica UV/Visível, com detecção de espectrometria de massa ou detecção por ressonância magnética nuclear. A espectrofotometria UV/Vis sofreu um grande incremento com a introdução da tecnologia de detecção *diodide array*. Esta detecção acoplada ao HPLC permite explorar uma espectrofotometria completa de cada pico (estrutura, pureza e comprimento de onda de absorção máxima), enquanto ocorre a eluição, e fornece um espectro único de cada antocianina que pode ser comparado a outro composto e ser usado em identificações. Uma vez que as antocianinas possuem um máximo de absorção a 520 nm, é possível evitar interferências com outros flavonóides. (Welch *et al.*, 2008).

A fase móvel é, por norma, um sistema binário constituído por um solvente polar (ácido acético, ácido fosfórico, ácido fórmico ou ácido trifluoroacético em água) e por outro menos polar (metanol ou acetonitrilo). As fases móveis acídicas são usadas na separação das antocianinas com o objectivo de melhorar a resolução dos seus picos. A utilização de um gradiente de eluição das

fases móveis permite uma separação mais eficiente e é normalmente utilizada na separação de misturas de plantas (Kim *et al.*, 2002).

Normalmente as colunas podem variar no comprimento, podendo ou não ser mantidas à temperatura ambiente. A ordem de eluição numa cromatografia de fase reversa está relacionada com a polaridade das estruturas a separar. Assim nas antocianidinas é ditada pelo número de substituintes no anel B, diminuindo o tempo de retenção para os mais hidrofílicos (hidroxilos) e aumentando à medida que o número de metoxilos aumenta. Substituições com açúcares aumenta a polaridade eluindo as antocianinas primeiro que as homólogas antocianidinas e ainda os di-glucósidos eluem normalmente primeiro que os mono-glucósidos. No entanto, nem sempre é assim tão linear, pois o tipo de açúcar ligado e a posição de ligação pode alterar a ordem de eluição. Também a acilação dos açúcares diminui a polaridade, mas dependendo do ácido ligado, o que torna a identificação das antocianinas de extractos uma tarefa complexa. A detecção por *diodide array* é uma ajuda importante e interessante, uma vez que para além de permitir obter cromatogramas a diversos comprimentos de onda permite a acumulação dos dados espectrais de cada pico obtido que pode ser uma ajuda bastante importante.

A Figura 12 representa um cromatograma tipo do extracto obtido em DMSO a 520 nm, demonstrando um perfil de nove picos bem definidos correspondendo a cada um deles um espectro de absorção característico de uma antocianina, tal como evidenciado também na figura.

Uma das formas mais simples de identificar os picos é recorrendo a padrões, mas para isso necessitamos de ter um leque variado, para além de que muitos nem sequer estão disponíveis comercialmente. Outra forma é através da análise espectral, mas também aqui a tarefa é mais fácil com as antocianidinas do que com as antocianinas.

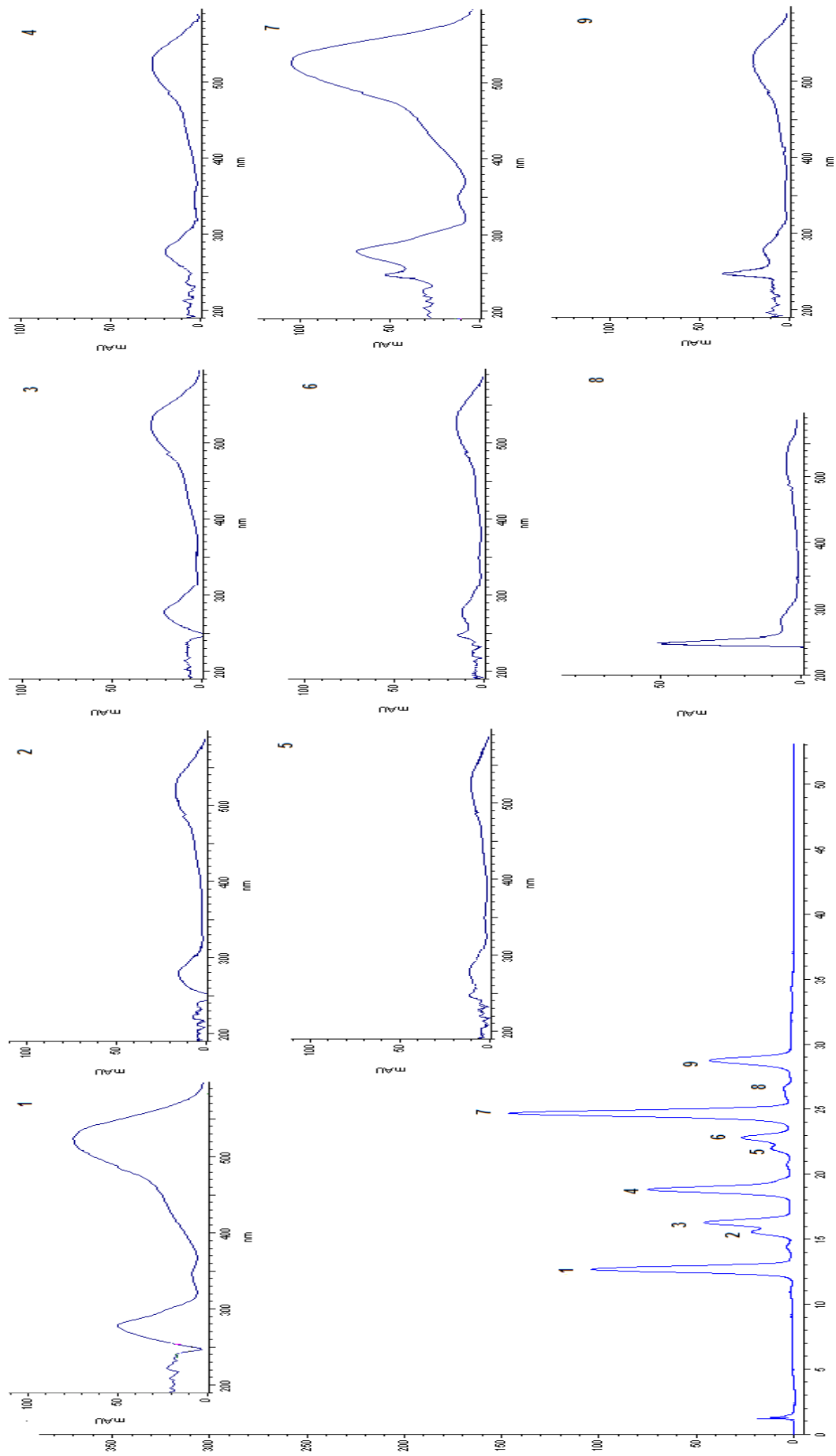


Figura 12: Perfil do cromatograma relativo ao extracto em DMSO a 520 nm e respectivos espectros. Os números nos espectros correspondem ao número do pico no perfil cromatográfico

Como dispúnhamos apenas de quatro antocianinas de referência (cianidina-, delphinidina-, malvidina- e pelargonidina-3-glucósido) não foram de grande ajuda na identificação. No sentido de ultrapassar essa falha procedemos à hidrólise ácida do extracto, com o intuito de remover os açúcares e os grupos acilo a eles ligados, de modo a obter a antocianidina ou aglicona. Como apenas seis antocianidinas existem largamente distribuídas nas plantas superiores o cromatograma pode desta forma ser simplificado.

No caso do extracto em estudo, o perfil cromatográfico obtido está representado na Figura 13 e embora numa primeira análise possamos identificar seis picos, a verdade é que por análise espectral (Figura 13 espectro 2), neste espectro não se verifica absorvância na zona do azul, o que nos leva a concluir que temos ausência de uma antocianidina no nosso extracto.

Sendo assim e considerando que a ordem de eluição é da antocianidina mais polar para a menos polar como referido anteriormente a ordem é da delphinidina → cianidina → petunidina → pelargonidina → peonidina → malvidina. Comparando agora com dados da bibliografia da análise de extractos de mirtilos (*Vaccinium corymbosum* L.) em que se verifica a ausência da pelargonidina (Philpott *et al.*, 2009; Rodriguez-Mateos *et al.*, 2012). A ordem de eluição é a representada na figura.

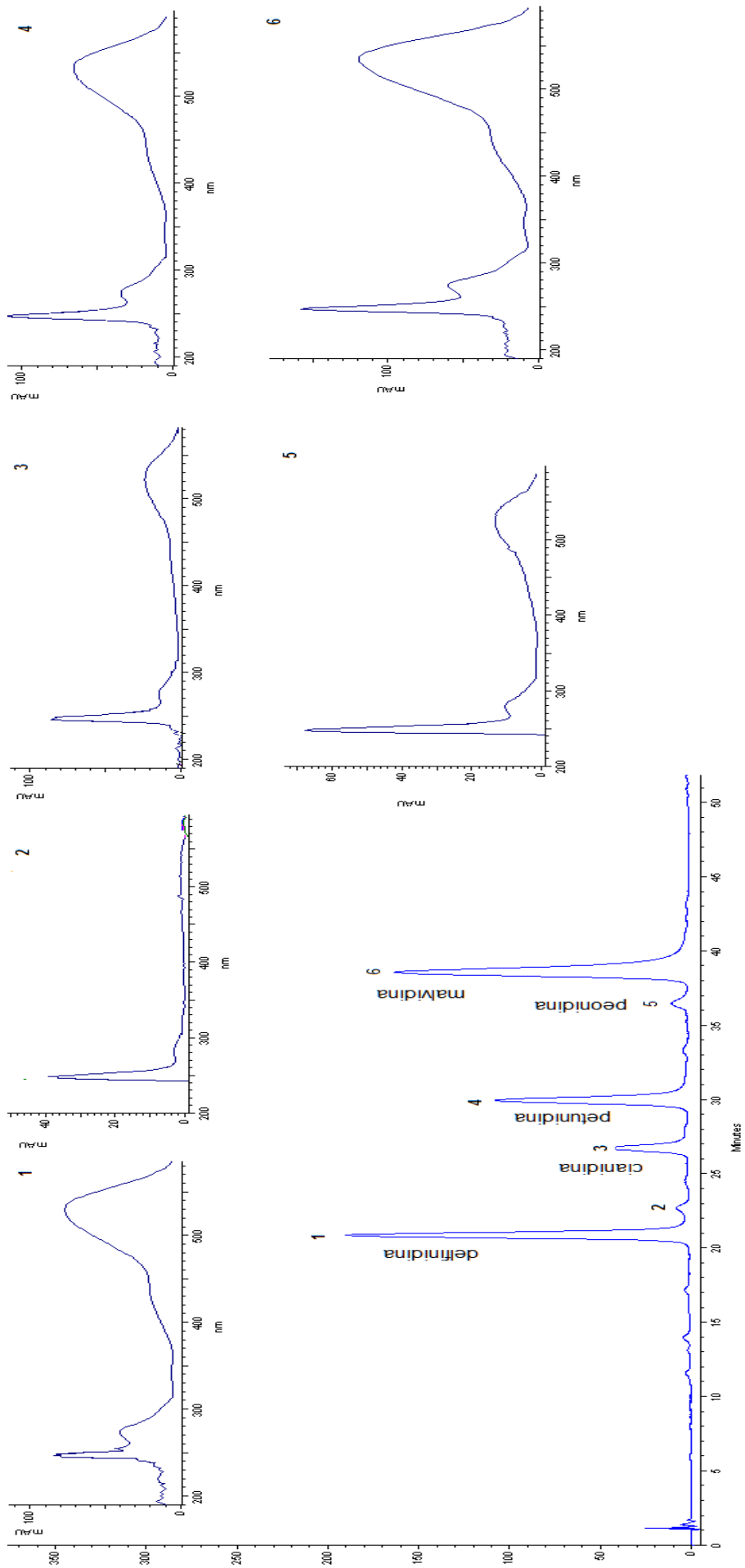


Figura 13: Perfil do cromatograma relativo ao extracto em DMSO hidrolisado a 520 nm e respectivos espectros. Os números nos espectros corres-

Isto permite-nos concluir que no extracto por nós obtido teremos formas glicosiladas e aciladas destas antocianidinas. Com efeito e comparando com resultados de outros (Gavrillon *et al.*, 2011) em *Vaccinium corymbosum* L. o perfil por nós obtido é praticamente sobreponível ao obtido por eles.

De acordo com a identificação dos autores e que só foi possível por técnicas mais específicas como a espectrometria de massa é possível que tenhamos no extracto delphinidina glicosilada com glicose, galactose e arabinose, cianidina com galactose e glicose, petunidina com galactose, glicose e arabinose, peonidina com galactose e uma pentose e malvidina com galactose, glicose, arabinose e xilose e ainda formas aciladas na malvidina.

3.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRACTO ENRIQUECIDO EM ANTOCIANINAS

3.3.1 Capacidade Antioxidante Total

Vários ensaios têm sido introduzidos e podem ser utilizados para avaliar a actividade antioxidante de compostos puros, extractos e até amostras biológicas. Normalmente a actividade antioxidante é avaliada através de ensaios de inibição, isto é, ensaios em que a extensão de captação ou anulação de um radical pré-formado é a marca da actividade antioxidante. Seguindo este protocolo, a capacidade antioxidante total do extracto enriquecido em antocianinas foi avaliada através da capacidade de captação do radical ABTS^{•+}, numa primeira etapa a obtenção por meio de uma reacção de oxidação tal como representa a Figura 14. Este radical tem absorvância máxima a 734 nm e a grande maioria dos extractos de frutos não absorve a este comprimento de onda, apesar de possuírem cores intensas, pelo que não há possibilidade de ocorrerem “falsos positivos”. Outra vantagem deste método é o facto de ser viável tanto em meio aquoso como lipofílico (Dai *et al.*, 2009).

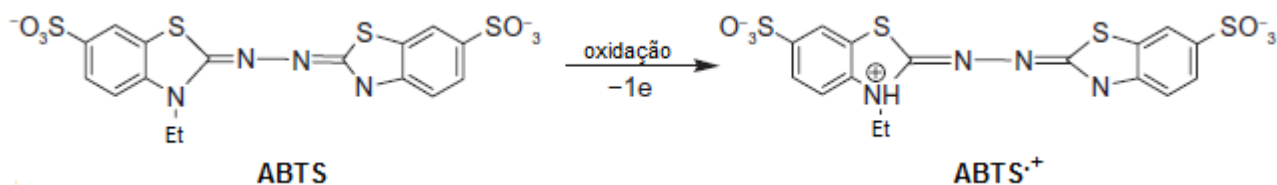


Figura 14: Oxidação do ABTS a catião radicalar ABTS.+ (adaptado de Salem et al., 2011).

A capacidade antioxidante do extracto enriquecido em antocianinas é proporcional à capacidade que este possui em doar electrões reduzindo o radical ABTS^{•+} a ABTS, com conseqüente diminuição da absorvância a 734 nm, a qual se for seguida espectrofotometricamente, nos permite uma quantificação dessa actividade (Kim *et al.*, 2011).

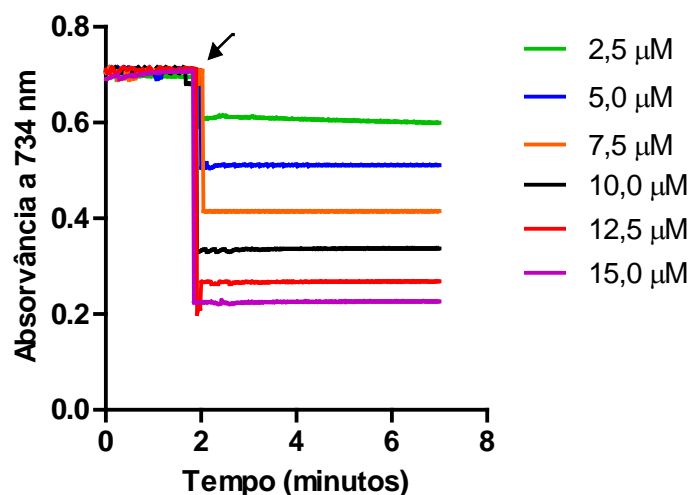


Figura 15: Efeito do Trolox, a diferentes concentrações (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 μM), na redução do catião radicalar ABTS.+ , medido a 734 nm. A seta indica a adição do Trolox.

A Figura 15 representa um ensaio tipo. O radical ABTS^{•+} apresenta uma absorvância elevada, mas quando a solução é adicionada a um composto ou extracto com capacidade antioxidante essa absorvância baixa e é proporcional à concentração do composto adicionado tal como evidenciado na Figura 16 A para o Trolox. Também no caso do extracto enriquecido em antocianinas se verificou uma boa linearidade entre a quantidade de extracto e a percentagem de inibição do radical ($r^2 = 0,99$) – Figura 16 B.

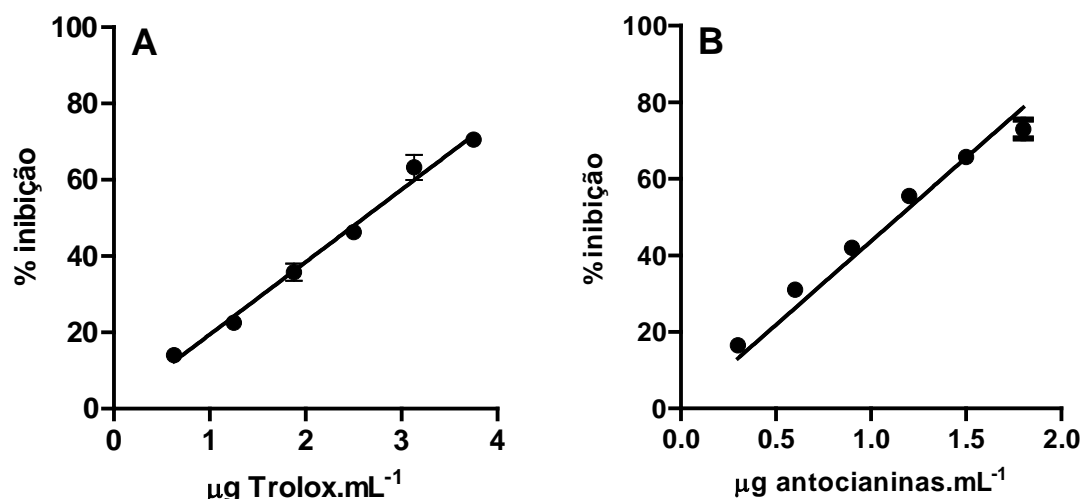


Figura 16: Capacidade antioxidante total de (A) Trolox e do (B) extracto enriquecido em antocianinas. Efeito do Trolox (0,63; 1,25; 1,88; 2,50; 3,13; 3,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e do extracto (0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8 $\mu\text{g antocianinas.mL}^{-1}$) na redução do catião radicalar $\text{ABTS}^{\cdot+}$, a 734 nm. Os resultados estão expressos em percentagem de inibição e representam a média \pm EPM ($n = 4$ ou 5)

Se compararmos o efeito do extracto com o do Trolox podemos expressar a actividade antioxidante total do extracto em equivalentes de Trolox e atendendo a que o valor obtido para 1 μg de antocianinas do extracto foi de 2,4 μg de Trolox, podemos dizer que 1 μmol de extracto em termos de antocianinas é equivalente a 4,8 μmol de Trolox.

3.3.2 Actividade Scavenging do Peroxinitrito

O peroxinitrito é uma espécie altamente oxidante e nitrosante, capaz de oxidar e modificar uma variedade grande de moléculas biológicas e daí contribuir para a patogénese de várias doenças. Assim, parece ser de primordial importância a procura de compostos que possam reagir com o peroxinitrito e prevenir a destruição que ele pode induzir nas biomoléculas. Neste contexto avaliámos a capacidade do extracto em inibir a oxidação da dihidrorodamina mediada pelo peroxinitrito (Figura 17). A dihidrorodamina é uma molécula pouco fluorescente e quando é oxidada perde um electrão transformando-se num catião fluorescente estável e, como tal a sua fluorescência mantém-se constante ao longo do tempo, podendo ser monitorizada.

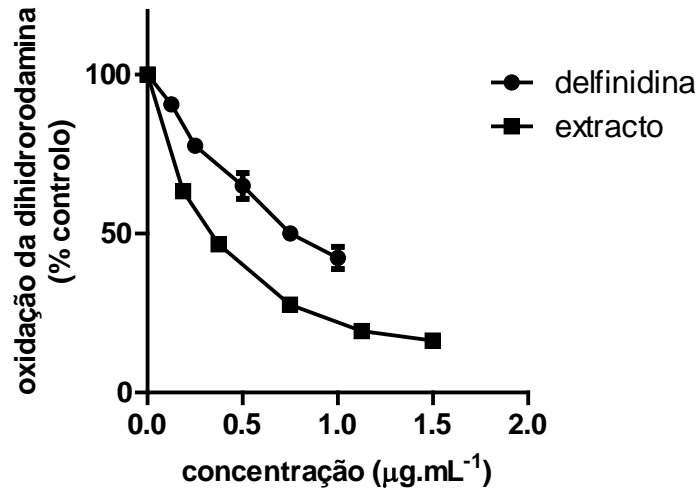


Figura 19: Efeito do extracto enriquecido em antocianinas contra a oxidação da dihidrorodamina pelo peroxinitrito Os resultados são apresentados em % de fluorescência do controlo – % controlo (reação na ausência do extracto) e representam a média \pm EPM ($n = 3$ ou 4). A delfinidina é utilizada como composto de referência.

Da observação da figura realça que o extracto é mais efectivo na protecção da oxidação da DHR 123 pelo peroxinitrito do que a delfinidina, o que nos permite concluir que o extracto contém outras antocianinas mais eficientes na capacidade *scavenging* do peroxinitrito que a delfinidina. Se compararmos as concentrações de delfinidina e do extracto enriquecido em antocianinas necessárias para inibir 50% da oxidação da dihidrorodamina mediada pelo ONOO^- verificamos que o valor é de $0,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,40 \mu\text{g antocianinas.mL}^{-1}$, respectivamente, evidenciando a maior capacidade de protecção do extracto relativamente à delfinidina no que respeita à agressão induzida pelo peroxinitrito.

3.4 EFEITO DO EXTRACTO ENRIQUECIDO EM ANTOCIANINAS NA VIABILIDADE CELULAR

O eventual efeito tóxico do extracto enriquecido em antocianinas foi avaliado em macrófagos de murganho, RAW 264.7, após incubação destas com várias concentrações de extracto, a diferentes tempos, por redução do MTT. A redução do MTT só é possível em células activas pelo que diminuições na redução do MTT são indicativas de perda de viabilidade celular.

Ao avaliar o efeito tóxico do extracto em macrógrafos, observou-se uma diminuição em cerca de 37% da viabilidade destas células após 24 horas de incubação com o extracto para uma concentração de $50\mu\text{g antocianinas.mL}^{-1}$, relativamente ao controlo (células que não foram incubadas com o extracto). Contudo, para tempos de incubação mais longos (48 horas), verificou-se um efeito citotóxico a partir da concentração de $30\mu\text{g antocianinas.mL}^{-1}$ (em cerca de 23 % da viabilidade célula) e uma diminuição ainda mais evidente da viabilidade celular de, aproximadamente, 84% quando as células foram incubadas com $50\mu\text{g antocianinas.mL}^{-1}$ de extracto (Figura 20).

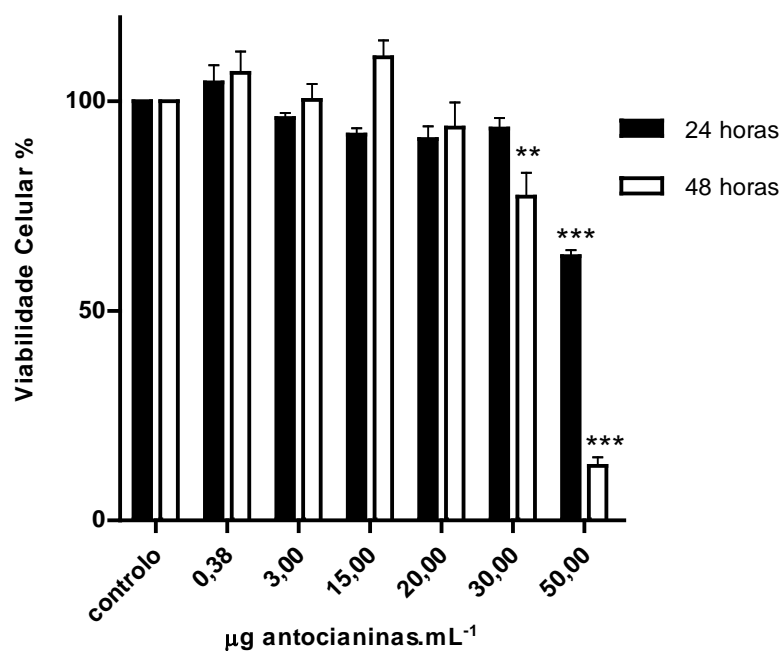


Figura 20: Efeito citotóxico do extracto enriquecido em antocianinas na linha celular RAW 264.7 Viabilidade de macrófagos incubados, durante 24 (barra preta) e 48 (barra branca) horas, com diferentes concentrações de extracto (0,38; 3,0; 15,0; 20,0; 30,0; 50,0 $\mu\text{g antocianinas.mL}^{-1}$), foi avaliada através do ensaio de MTT. Os resultados estão expressos em percentagem do controlo e representam a média \pm EPM de quatro ensaios independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ significativamente diferente do controlo, determinado através de ANOVA seguida do teste de *Bonferroni's post-hoc*.

Resultados similares foram obtidos por outros (Wang *et al.*, 2002). Num estudo realizado com a mesma linha celular também verificaram uma diminuição da viabilidade das células (face ao controlo) pré-incubadas com extracto de mirtilos, tanto em células activadas com LPS/INF- γ como em células que não foram activadas e segundo esse estudo a diminuição da viabilidade celular deveu-se ao aumento de TNF- α . O mesmo foi verificado quando as células

foram incubadas apenas com cianidina. Apesar de não se ter procedido à quantificação desta citocina, a produção desta pelos macrófagos pode explicar o efeito citotóxico do extracto enriquecido em antocianinas observado, ou seja, o abaixamento da viabilidade pode dever-se a uma estimulação, pelas antocianinas, da produção de citocinas pelos macrófagos. Este possível aumento de TNF- α pode estar relacionado com as propriedades anti-cancerígenas das antocianinas.

Apesar de se verificar uma diminuição da viabilidade celular esta só ocorre para concentrações relativamente elevadas pelo que de seguida fomos avaliar o eventual efeito protector contra espécies reactivas.

3.5 EFEITO PROTECTOR DO EXTRACTO ENRIQUECIDO EM ANTOCIANINAS CONTRA A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REACTIVAS POR CÉLULAS ACTIVADAS

3.5.1 Produção de Espécies Reactivas de Oxigénio

A diacetato 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFHA) é uma sonda não fluorescente que, por ser permeável, atravessa a membrana lipídica e quando se encontra no interior da célula é hidrolisada por esterases celulares a 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), sendo de seguida oxidada por espécies reactivas de oxigénio originando a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que é fluorescente (Figura 21). Esta sonda é considerada um bom indicador oxidativo em macrófagos e neutrófilos (Tarpey et al., 2004; Gomes *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2006).

Para avaliar o efeito protector do extracto, as células foram estimuladas com LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) como referido em “Material e Métodos”. O LPS é uma endotoxina capaz de estimular processos inflamatórios pelo que é muito utilizado quando se pretende activar as vias que levam à produção de mediadores de inflamação.

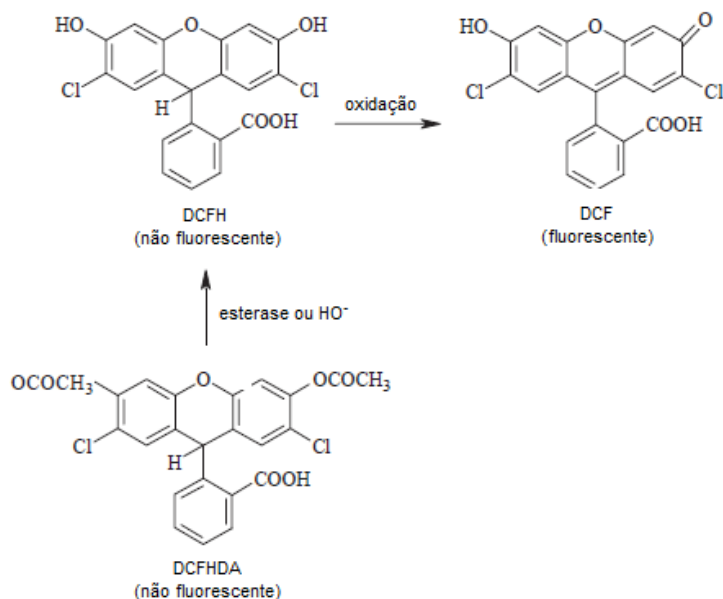


Figura 21: Mecanismo de hidrólise, pela acção de esterases, da sonda não fluorescente DCFHDA a DCFH, seguida da sua oxidação a DCF, sonda fluorescente, por espécies reactivas de oxigénio (Gomes et al., 2005).

Após a incubação das células com LPS, houve um aumento significativo na produção de espécies reactivas de oxigénio (cerca de cinco vezes) relativamente às células que não foram incubadas com este indutor (controlo) tal como avaliado pela medida da intensidade de fluorescência (Figura 22 A). No entanto, esta intensidade de fluorescência foi atenuada em células pré-incubadas com uma concentração de extracto enriquecido em antocianinas igual ou superior a $2,5 \mu\text{g antocianinas.mL}^{-1}$ antes da adição do LPS. Estes resultados foram corroborados pelas imagens visualizadas ao microscópio, tal como representado na Figura 22 B.

Ainda é possível constatar que nas células que não foram activadas com LPS, mas que foram incubadas com o extracto (5 e $30 \mu\text{g antocianinas.mL}^{-1}$), apresenta uma produção de espécies reactivas de oxigénio inferior ao controlo, isto é, células que não foram pré-incubadas com o extracto nem estimuladas.

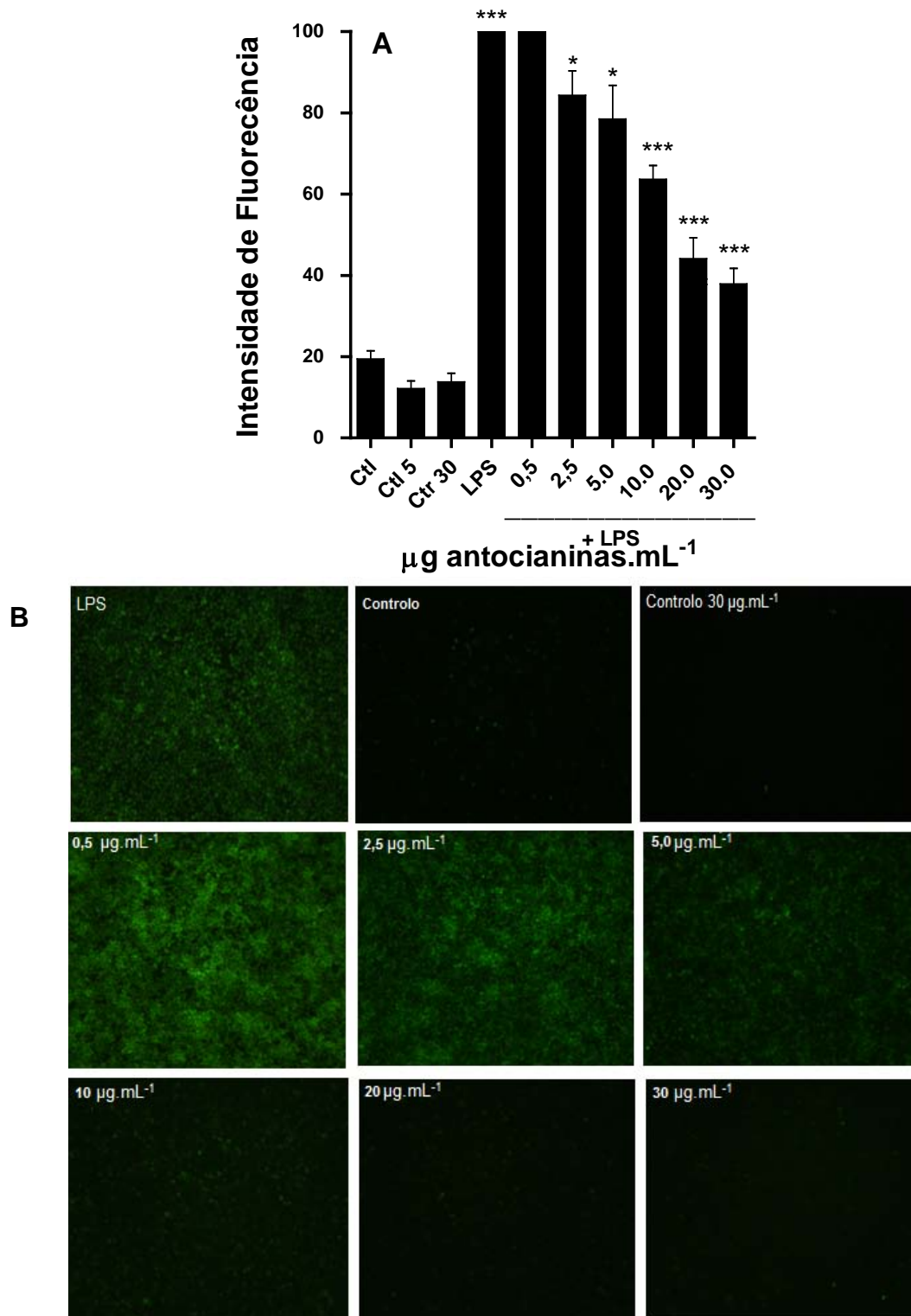


Figura 22: Efeito protector do extracto enriquecido em antocianinas na produção de espécies reactivas de oxigénio por macrófagos. (A) As células foram incubadas com o extracto (0,5; 2,5; 10,0; 20,0; 30,0 $\mu\text{g antocianinas.mL}^{-1}$) seguido da estimulação com $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ LPS. Após um período de 24 h, a sonda DCFHDA (βM) foi adicionada e incubada durante 15 minutos a 37°C no escuro. De seguida, as espécies reactivas de oxigénio foram avaliadas através da medida da intensidade de fluorescência da DCF. **(B)** Posteriormente, obtiveram-se, através de microscopia de fluorescência, imagens representativas destas células. Os resultados estão expressos em percentagem do controlo e representam a média \pm EPM de seis ensaios independentes. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ significativamente diferente do controlo, determinado através ANOVA seguida do teste de Bonferroni's post-hoc.

3.5.2 Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico é um mensageiro intercelular omnipresente em todos os vertebrados modelando diversas actividades biológicas. No entanto, evidências múltiplas indicam que uma produção aumentada de NO devido a uma expressão aumentada da óxido nítrico sintase indutível estimulada por citoninas pró-inflamatórias é relevante na patofisiologia da inflamação (Pacher *et al.*, 2007). Para avaliar a produção de óxido nítrico produzido pelas células recorreremos ao método de *Griess*. A reacção de *Griess* assenta na reacção entre o nitrito e o ácido sulfanílico e α -naftilamina em meio ácido originando um azo composto corado que absorve a 530 nm e que pode ser usado como um indicador indirecto da concentração de NO nas células (Figura 23).

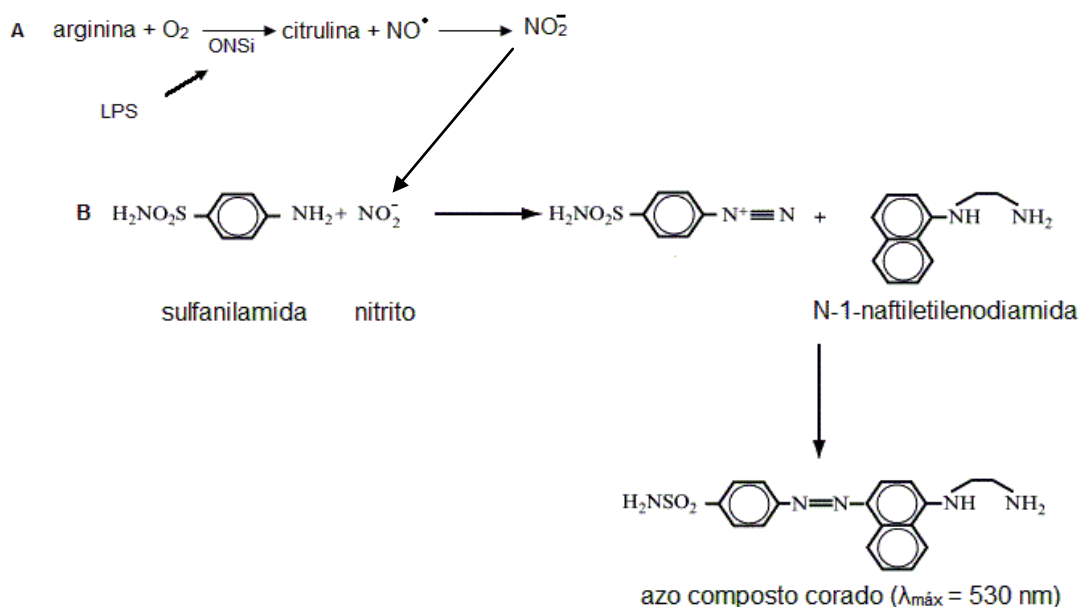


Figura 23: Medição do óxido nítrico através do método de Griess em células (A) Formação de nitrito, NO_2^- , a partir de NO após estimulação pró-inflamatória pelo LPS. **(B)** De seguida o nitrito reage com a sulfanilamida dando origem a um intermediário que ao reagir com a N-1-naftiletlenodiamida forma um azo composto corado que absorve a 530 nm (adaptado de Ghafourifar *et al.*, 2008)

A Figura 24 representa a produção de óxido nítrico pelos macrófagos incubados com o extracto e sujeitos ou não a activação com LPS. Verificou-se um aumento colossal de nitrito (quase 30 vezes) nas células activadas com LPS, face ao controlo, isto é, aquelas que não foram activadas nem incubadas com o extracto. Nas células activadas que foram pré-incubadas com o extracto

enriquecido em antocianinas verifica-se que o efeito protector deste, face ao LPS, só começa a ser significativo a partir da concentração de 5,0 μg antocianinas. mL^{-1} de extracto. Todavia, a incubação das células com concentrações superiores a 10,0 μg antocianinas. mL^{-1} de extracto induz forte diminuição da produção de nitrito e, conseqüentemente, de NO, pelas células activadas. Para uma concentração de 30 μg antocianinas. mL^{-1} de extracto, há uma diminuição no efeito, que não é de estranhar, na medida em que só o extracto nesta concentração leva à estimulação da produção de NO como evidenciado no gráfico.

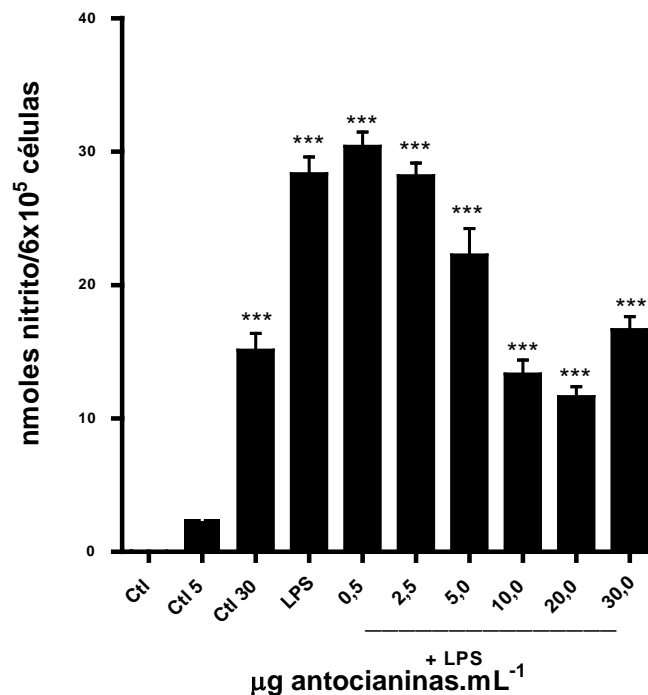


Figura 24: Efeito protector do extracto enriquecido em antocianinas na produção de óxido nítrico por macrófagos As células foram incubadas com extracto (0,5; 2,5; 10,0; 20,0; 30,0 μg antocianinas. mL^{-1}) seguido ou não da estimulação com $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ LPS e após 16 horas a concentração de nitrito foi medida. Os resultados foram expressos em percentagem controlo e representam a média \pm EPM de seis ensaios independentes. *** $p < 0,01$ significativamente diferente do controlo, determinado através ANOVA seguida do teste de Bonferroni's post-hoc.

Este efeito directo na produção de NO pode ser um dos mecanismos de toxicidade do extracto observado no ensaio da viabilidade celular (Figura 20), isto é, pode tratar-se não de um efeito directo do extracto, mas sim da produção do NO induzida pelo extracto, visto que estas ao serem células do sistema imune estão programadas para libertar citocinas de modo a reduzir um possível dano nos tecido e órgãos. Este aumento da produção de NO em macrófagos activados e não activados com LPS foi também observado por Park *et al.*,

2000. Este estudo sugere que as alterações observadas na produção de NO se devem ao aumento de secreção de TNF- α , em consequência da activação de NF-kB.

Com os resultados obtidos, verifica-se que este extracto apresenta um efeito protector contra espécies reactivas, tanto de oxigénio como de azoto. Ao diminuir os níveis destes oxidantes e isto pode dever-se à redução destas espécies pelas antocianinas ou à inibição da sua formação ao manter outros sistemas antioxidantes endógenos das células, activos. Igualmente, dados da literatura evidenciam a capacidade de inibição da libertação de factores pró-inflamatórios por antocianinas, tendo como consequência a inibição da adesão e da reacção de células inflamatórias e uma regulação da função celular (Pan *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2010).

3.6 EFEITO DO EXTRACTO ENRIQUECIDO EM ANTOCIANINAS NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Com o intuito de avaliar o efeito do extracto enriquecido em antocianinas na actividade proliferativa de células cancerígenas recorreu-se ao ensaio da sulforodamina B. Este baseia-se na capacidade da sulforodamina B se ligar, electrostaticamente, aos aminoácidos básicos das proteínas das células, fornecendo uma estimativa da proteína total, a qual está relacionada com o número de células. Este ensaio apresenta inúmeras vantagens relativamente a outros (nomeadamente o do MTT), uma vez que é um ensaio rápido, de elevada sensibilidade, de baixo custo e estável por um período infinito (Papazisis *et al.*, 1997).

A Figura 25 apresenta os resultados referentes ao efeito do extracto na proliferação de duas linhas celulares cancerígenas: intestinal (HT-29) e pancreática (AsPC-1) durante 24 e 48 horas. De acordo com os dados da Figura 25 A e relativamente à linha celular AsPC-1 verifica-se que o extracto incubado durante 24 horas apresenta um efeito inibitório significativo na proliferação destas células a partir da concentração 20 μ g antocianinas.mL⁻¹ de extracto, pois há uma redução de ~17%, face ao controlo (sem extracto), mas este efeito é ainda mais significativo nas concentrações 30 e 50 μ g antocianinas.mL⁻¹ de

extracto, tendo ocorrido uma diminuição do número de células de cerca de 41 e 50%, respectivamente. Quando o período de incubação duplica o efeito anti-proliferativo do extracto também aumenta verificando-se uma redução de 29, 50 e 70% para concentrações de 20, 30 e 50 μg antocianinas. mL^{-1} de extracto, respectivamente. Ao examinar a Figura 25 B que apresenta os resultados obtidos na mesmas condições, mas com a linha celular HT-29. Os resultados no geral não são muitos diferentes, embora menos drásticos para as concentrações mais elevadas 30 e 50 μg antocianinas. mL^{-1} .

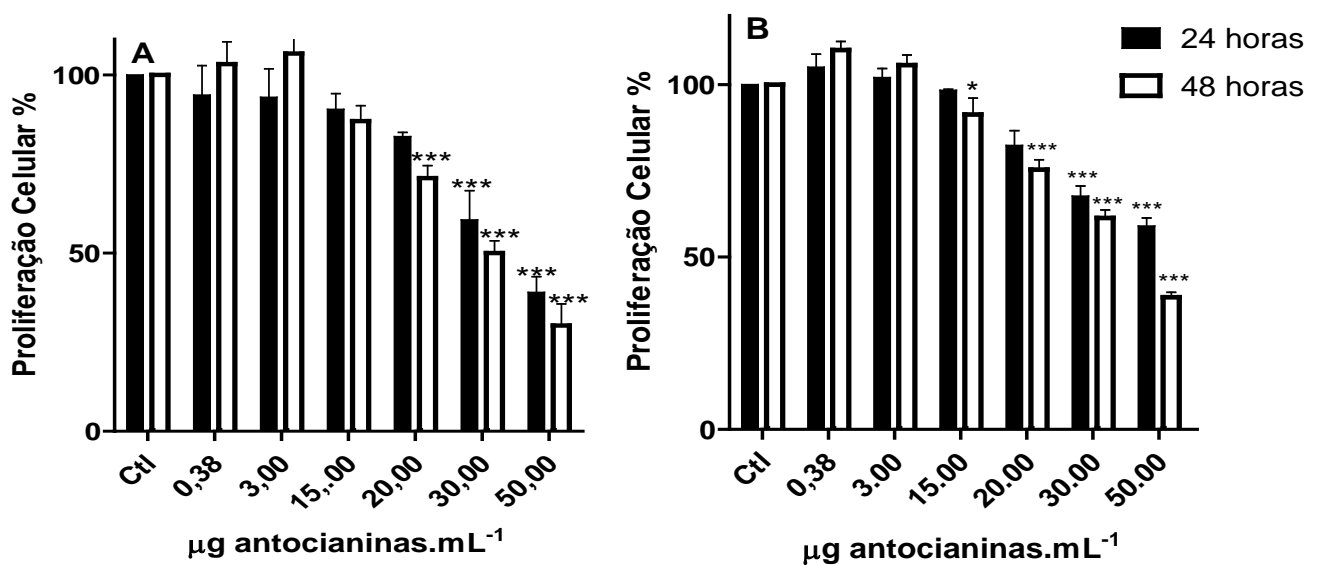


Figura 25: Efeito do extracto enriquecido em antocianinas na proliferação das linhas celulares (A) AsPC-1 e (B) HT-29. As células foram incubadas com o extracto (0,38; 3,0; 15,0; 20,0; 30,0; 50,0 μg antocianinas. mL^{-1}), durante 24 (barra preta) e 48 (barra branca) horas, e ao fim desse tempo a proliferação celular foi avaliada através do ensaio de sulforodamina B. Os resultados estão expressos em percentagem de proliferação relativamente ao controlo, isto é, células que não foram pré-incubadas com o extracto e representam a média \pm EPM de três ou quatro ensaios independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ significativamente diferente do controlo, determinado através de ANOVA seguida do teste de Bonferroni's post-hoc.

As células cancerígenas são caracterizadas pela elevada resistência à apoptose e, conseqüentemente, há um aumento continuado do número deste tipo de células, podendo conduzir ao aparecimento de metástases, afectando outros tecidos e órgãos. Os resultados obtidos demonstram que o extracto enriquecido em antocianinas possui um efeito anti-proliferativo em células cancerígenas, designadamente nas células cancerígenas intestinais (adenocarcinoma colorectal) e pancreáticas (adenocarcinoma) humanas que pode ser

resultado de um efeito pró-apoptótico, mas outros estudos têm de ser realizados para evidenciar esse efeito (Prior *et al.*, 2006).

3.7 EFEITO DO EXTRACTO ENRIQUECIDO EM ANTOCIANINAS NA MOTILIDADE INTESTINAL

Como é do conhecimento geral o stresse oxidativo tem um papel importante no desenvolvimento de várias patologias entre as a quais a doença inflamatória intestinal, podendo alterar a motilidade intestinal (Peluso *et al.*, 2002) Por outro lado sabe-se que a inflamação altera a contractilidade intestinal e tanto aumentos como diminuições da contractilidade das células do músculo liso têm sido observadas na inflamação intestinal. Dado o impacto que estas alterações podem ter na manifestação da doença tentámos explorar o potencial efeito das antocianinas na motilidade intestinal (Ohama *et al.*, 2007).

O íleo foi o fragmento do intestino delgado escolhido para o estudo.

Como foi referido no “Capítulo 1 – Introdução” a acetilcolina, ACh, é um neurotransmissor do sistema nervoso entérico e quando é libertada induz contracção do músculo liso do intestino delgado, designadamente no íleo. Deste modo, a ACh foi usada como controlo externo com o intuito de garantir a viabilidade do íleo durante o tempo em que o ensaio decorreu e, portanto, foi adicionada na mesma concentração (100 μ M) no início e no final de cada ensaio.

Começámos por utilizar o extracto solubilizada em DMSO (extracto 1) e os resultados são os representados na Figura 26 A. Tal como referido acima o ensaio começou com a adição da acetilcolina que provocou uma contracção muscular como verificado pelo aumento da tensão registada. Adições sucessivas e crescentes do extracto evidenciaram um pequeno efeito de relaxamento muscular como verificado pela variação do registo para baixo da linha basal. Em B estão representados os registos obtidos com o volume equivalente do solvente, ou seja, o DMSO. Como o efeito do DMSO se revelou idêntico ao do extracto resolvemos preparar novo extracto mas solubilizado em metanol/água acidificada (1/1) (extracto 2). Como a concentração em antocianinas do extracto 1 é 2,5 vezes superior à do extracto 2 implicou a utilização de volumes relativamente grandes que não foram favoráveis à obtenção de resultados fidedig-

nos pelo que não podemos concluir acerca do seu efeito na motilidade intestinal.

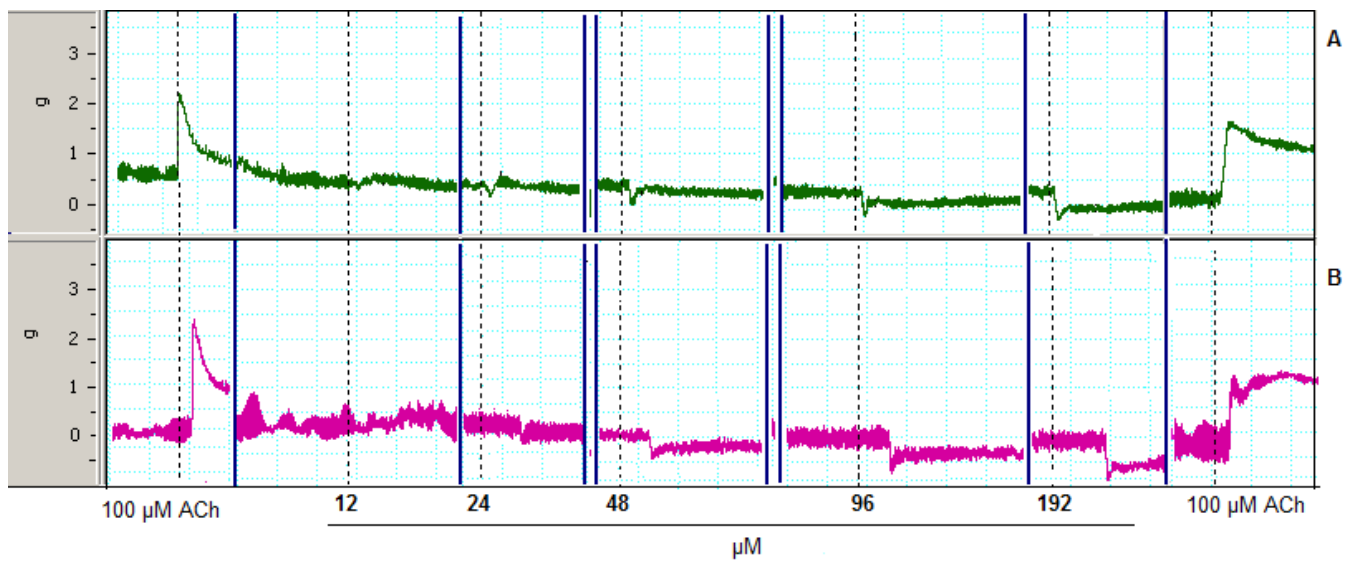


Figura 26: Ensaio tipo do extracto enriquecido em antocianinas em DMSO na motilidade intestinal (A) Efeito do extracto enriquecido em antocianinas em DMSO (12, 24, 48, 96 e 192 μM) e **(B)** do solvente DMSO na contracção do músculo liso longitudinal do íleo (intestino delgado). A concentração foi calculada a partir da massa molecular da delfinidna-3-glucósido.

CAPÍTULO 4

Conclusões Gerais

Nas últimas décadas, as antocianinas têm sido alvo de muita atenção, devido ao seu variado leque de acções nas funções fisiológicas. É sabido que estes compostos possuem características biologicamente activas, nomeadamente uma elevada actividade antioxidante. Estes compostos estão presentes em diversos frutos e legumes, e, assim, o seu consumo está associado a um aumento de antioxidantes no organismo. Os compostos antioxidantes são essenciais para a anulação de espécies reactivas (de oxigénio e/ou de azoto) que, em condições normais, são uma consequência de processos metabólicos que ocorrem no organismo. Contudo, por vezes os níveis destas espécies excedem o normal, resultado de um aumento na sua produção ou de uma diminuição dos compostos antioxidantes presentes, conduzindo a um desequilíbrio da homeostase associado à etiologia e patofisiologia de inúmeras doenças, nomeadamente as doenças inflamatórias intestinais.

No sentido de contribuir para o esclarecimento do efeito benéfico das antocianinas propusemo-nos preparar, caracterizar quimicamente e estudar algumas propriedades biológicas de um extracto de mirtilos Nacionais, cultura em expansão no nosso país.

Assim, com base nos resultados obtidos, os objectivos foram alcançados podendo apontar-se as seguintes conclusões:

A metodologia utilizada para a extracção das antocianinas de mirtilos permitiu obter um extracto rico em antocianinas com um teor de fenóis totais expresso em ácido gálico por 100 g de fruto e de antocianinas expresso em delphinidina-3-glucósido por 100 g de fruto de 283,7 mg e 162,1 mg, respectivamente. Estes valores são muito idênticos aos encontrados na bibliografia para a mesma espécie (*Vaccinium corymbosium* L.).

A separação por HPLC/DAD permitiu identificar formas glicosiladas e aciladas de cinco antocianinas (delphinidina, malvidina, petunidina, cianidina e peonidina).

Esta mistura de antocianinas revelou-se altamente antioxidante, uma vez que apresentou uma capacidade antioxidante total cerca de cinco vezes superior à do Trolox e uma actividade *scavenging* do peroxinitrito também elevada.

Quando comparada com a delfinidina-3-glucósido a mistura revelou uma actividade *scavenging* cerca de 1,5 vezes superior.

O extracto não apresentou toxicidade significativa para macrófagos a não ser para concentrações relativamente elevadas (50 µg antocianinas.mL⁻¹ ao fim de 24 horas), mas concentrações inferiores mostraram-se significativamente efectivas em proteger os macrófagos de estimulação induzida por LPS, protecção essa avaliada em termos de produção de espécies reactivas de oxigénio e de óxido nítrico.

Contrariamente ao verificado em macrófagos, o extracto apresentou citotoxicidade em linhas celulares cancerígenas (HT-29 e AsPC-1) ao inibir a proliferação celular.

Relativamente ao efeito na motilidade do intestino de rato, os resultados obtidos são preliminares pelo que necessitam de exploração e confirmação.

Em conclusão, os resultados obtidos indicam que as antocianinas presentes nos mirtilos podem influenciar significativamente a sua actividade biológica. É facto que, estes resultados foram obtidos a partir de um estudo *in vitro* e o seu impacto *in vivo* pode ser questionável, desde logo, pela baixa biodisponibilidade normalmente referida para estes compostos. Na verdade vários estudos realizados *in vivo*, em ratos, sugerem que a biodisponibilidade das antocianinas é baixa, mas este facto pode dever-se ao desconhecimento de importantes metabolitos destes compostos por um lado, e por outro, aos métodos utilizados que não são os mais adequados, para a análise desses metabolitos (Manach *et al.*, 2005; Kay, 2006).

Literatura Citada

- [1] – <http://www.fda.com> (acedido em 30 de Junho de 2011)
- [2] – “*The IL-12 Family of Citokines Regulates T-Cell-Mediated Pro- & Anti-Inflammatory Imune Responses*”
In http://www.rndsystems.com/BioBrief_2010i2.aspx
- [3] – <http://www.jardimbotanico.up.pt/> (acedido em 11 de Junho de 2012)
- [4] – <http://www.quintadaremolha.com> (acedido em 3 de Junho de 2011)
- Abyari, M. Heidari, R. Jamei, R. (2006) “*The Effects of Heating, UV Irradiation and pH on Stability of Siae Sardasht Grape Anthocyanin-copigment Complex*” *Journal of Biological Sciences*. 6(4): 638-45
- Baregamian, N. Song, J. Jeschke, M .G. Evers, B. M. Chung, D. H. (2006) “*IGF-1 Protects Intestinal Epithelial Cells from Oxidative Stress-Induced Apoptosis*” *Journal of Surg Res* 136(1): 31-37
- Castañeda-Ovando, A. Pacheco-Hernández, M. L. Páez-Hernández, M. E. Rodríguez, J. A. Galán-Vidal, C. A. (2008) “*Chemical Studies of Anthocyanins: A Review*” *Food Chemistry* 113:859-71
- Dai, J. Gupte, A. Gates, L. Mumper, R. J. (2009) “*A Comprehensive Study of Anthocyanin-Containing Extracts from Selected Blackberry Cultivars: Extraction Methods, Stability, Anticancer Properties and Mechanisms*” *Food and Chemical Toxicology* 47: 837-47
- Del Rio, D. Borges, G. Crozier, A. (2010) “*Berry Flavonoids and Phenolics: Bio-availability and Evidence of Protective Effects*” *British Journal of Nutrition* 104: S67-S90
- Durst, W. R. Wrolstad, R. E. (2001) “*Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC*” *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F1.3.1-F1.3.13

- Dreiseitel, A. Oosterhuis, B. Vukman, K. V. Schreier, P. Oehme, A. Locher, S. Hajak, G. Sand, P. G. (2009) "*Berry Anthocyanins and Anthocyanidins Exhibit Distinct Affinities for the Efflux Transporters BCRP and MDR1*" *British Journal of Pharmacology* 158: 1942-50
- Foster, K. A. Galeffi, F. Gerich, F. J. Turner, D. A. Muller, M. (2006) "*Optical and Pharmacological Tools to Investigate the Role of Mitochondria During Oxidative Stress and Neurodegeneration*" *Prog Neurobiology* 79(6): 136-171
- Freimoser, F. M. Jakob, C. A. Aebi, M. Tuor, U. (1999) "*The MTT [3,(4,5)-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities*" *Applicaion Environment Microbiology* 65(8): 3727-29
- Galvano, F. Fauci, L. L. Vitaglione, P. Fogliano, V. Vanella, L. Felgines, C. (2009) "*Bioavailability, Antioxidant and Biological Properties of the Natural Free-Radical Scavengers Cyanidin and Related Glycosides*" *Ann Ist Super Sanità* 43(4): 382-93
- García-Lafuente, A. Guillamón, E. Villares, A. Rostagno, M. A. Martínez J. A. (2009) "*Flavonoids as Anti-Inflammatory Agents: Implications in Cancer and Cardiovascular Disease*" *Inflammation Research* 58:537-552
- Gemma, C. Vila, J. Bachstetter, A. Bickford, P. C. (2007) "*Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*" *Capítulo* 15
- Georgé, S. Brat, P. Alter, P. Amiot, M. J. (2005) "*Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products*" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1370-73

- Ghafourifar, P. Parihar, M. S. Nazarewicz, R. Zenebe, W. J. Parihar, A. (2008) "*Detection Assays for Determinations of Mitochondrial Nitric Oxide Synthase Activity; Advantages and Limitations*" *Methods in Enzymology* 440: 317-34
- Giusti, M. M. Wrolstad, R. E. (2001) "*Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy*" *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F1.2.1-F1.2.13
- Gomes, A. Fernandes, E. Lima, J. L. F.C (2005) "*Fluorescence Probes Used for Detection of Reactive Oxygen Species*" *Journal of biochemical and Biophysical Methods* 65: 45-80
- Granger, D. L. Taintor, R. R. Boockvar, K. S. Hibbs, J. B. Jr. (1996) "*Measurement of Nitrate and Nitrite in Biological Samples Using Nitrate Reductase and Griess Reaction*" *Methods of Enzymology* 268: 142-51
- Gavrilon, V. Kajdzanoska, Gjamovski, V. Stefanova, M. (2011) "*Separation, Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Blueberries and Red and Black Currants by HPLC-DAD-ESI-MS*" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 4009-18
- Holy, J. Lamont, G. Perkins, E. (2006) "*Disruption of Nucleocytoplasmic Trafficking of Cyclin D1 and Topoisomerase II by Sanguinarine*" *BMC Cell Biology* 7:13
- Jakesevic, M. Aaby, K. Borge, G. A. Jeppsson, B. Ahrné, S. Molin, G. (2011) "*Antioxidative Protection of Dietary Bilberry, Chokeberry and Lactobacillus plantarum HEAL19 in Mice Subjected to Intestinal Oxidative Stress by Ischemia-Reperfusion*" *BCM Complementary & Alternative Medicine* 11:8

- Johnson, J. L. Bomser, J. A. Scheerens, J. C. Giusti, M. M. (2011) "*Effect of Black Raspberry ("Rubus occidentalis L.") Extract Variation Conditioned by Cultivar, Production Site, and Fruit Maturity Stage on Colon Cancer Cell Proliferation*" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 1638-45
- Kay, C. D. (2006) "*Aspects of Anthocyanin Absorption, Metabolism and Pharmacokinetics in Humans*" *Nutrition Research Reviews* 19:137-46
- Kim, D. Lee, C. Y. (2002) "*HPLC Separation of Polyphenolics*" *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 11.3.1-1.1.3.16
- Kim, S. M. Um, B (2011) "*Evaluation of the Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Among Blueberry Cultivars by HPLC-ESI-MS and On-line HPLC-ABTS System*" *Journal of Medicinal Plants Research* 5(20): 5008-16
- Kowalczyk, E. Krzesinski, P. Kura, M. Szmigiel, B. Blaszczyk, J. (2003) "*Anthocyanins in Medicine*" *Polish Journal of Pharmacology* 55(5): 699-702
- Laleh, G. H. Frydoonfar, H. Heidary, R. Jameei, R. Zare, S. (2006) "*The Effect of Light, Temperature, pH and Species on Stability of Anthocyanin Pigments in Four Berberis Species*" *Pakistan Journal of Nutrition* 5(1): 90-92
- Lakhan, S. E. Kichgessner, A. (2010) "*Neuroinflammation in Inflammatory Bowel Disease*" *Journal of Neuroinflammation* 7:37
- Lila, M. A. (2004) "*Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach*" *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 5: 306-13
- Lima, V. Mélo, E. Lima, D. (2005) "*The Effects of Light and Freezing Temperature Upon The Stability of Purple Surinam Cherry's Anthocyanins*" *Ciências Tecnologia Alimentar* 25(1): 92-94

- Lin, Z. Liu, Y. Zheng, Q. Hu, Q. (2011) "*Increased Proportion of Nitric Oxide Synthase Immunoreactive Neurons in Rat Ileal Myenteric Ganglia After Severe Acute Pancreatitis*" BMC Gastroenterology 11:127
- Lopes, T. J. Xavier, M. F. Quadri, M. G. N. Quadri, M. B. (2007) "*Anthocyanins: A Brief Review of Structural Characteristics and Stability*" Revista Brasileira Agrocência 13(3): 291-97
- Manach, C. Williamson, G. Morand, C. Scalbert, A. Rémésy C. (2005) "*Bioavailability and Bioefficay of Polyphenols in Humans. I. Review of 97 Bioavailability Studies*" The American Journal of Clinical Nutririon 81:230S-43S
- Miniati, E. (2007) "*Assessment of Phenolic Compounds in Biological Samples*" Ann Ist Super Sanità 43(4): 342-368
- Monteleone, G. Caprioli, F. (2010) "*T-cell-directed Therapies in Inflammatory Bowel Diseases*" Clinical Science 118:707-15
- Muanda, F. N. Bouayed, J.Djilani, A. Yao, C. Soulimani, R. Dicko, A. (2010) "*Chemical Composition and, Cellular Evaluation of the Antioxidant Activity of Desmodium adscendens Leaves*" volume 2011, 9 páginas
- Ohama, T. Hori, M. Ozaki, H. (2007) "*Mechanism of Abnormal Intestinal Motility in Inflammatory Bowel Disease: How Smooth Muscle Contraction is Reduced?*" Journal of Smooth Muscle Research 43(2): 43-54:
- Pacher P., Beckman, J. S. Liaudet, L. (2007) "*Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease*" Physiology Review 87: 315-424
- Pan, M. Lai, C. Ho, C. (2010) "*Anti-inflammatory Activity of Natural Dietary Flavonoids*" Food & Function 1: 15-31

- Papazisis, K. T. Geromichalos, G. D. Dimitriadis, K. A. Kortsaris, A. H. (1997) "*Optimization of the Sulforhodamine B Colorimetric Assay*" *Journal of Immunological Methods* 208: 151-58
- Park, Y. C. Rimbach, G. Saliou, C. Valacchi, G. Parker, L. (2000) "*Activity of Monomeric, dimeric, and Trimeric Flavonoids on NO Production, TNF- α Secretion, and NF- κ B –dependent Gene Expressions in RAW 264.7 Macrophages*" *FEBS* 93-97
- Pascual-Teresa, S. Moreno, D. A. García-Viguera, C. (2010) "*Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence*" *International Journal of Molecular Sciences* 11: 1679-1703
- Peluso, I. Campolongo, P. Valeri, P. Romanelli, L. Palmery, M. (2002) "*Intestinal Motility Disorder Induced by Free Radicals; A New Model Mimicking Oxidative Stress in Gut*" *Pharmacological Research* 46(6): 533-38
- Philpott, M. Lim, C. C. Ferguson, L. R. (2009) "*Dietary Protection Against Free Radicals: A Case for Multiple Testing to Establish Structure-activity Relationships for Antioxidant Potential of Anthocyanic Plant Species*" *International Journal of Molecular Sciences* 10:1081-1103
- Prior, R. L. (2003) "*Fruits and Vegetables in the Prevention of Cellular Oxidative Damage*" *American Journal Clinical Nutrition* 78:570S-578S
- Prior, R. L. Wu, X. (2006) "*Anthocyanins: Structural Characteristics that Result in Unique Metabolic Patterns and Biological Activities*" *Free Radical Research* 40(10): 1014-28
- Re, R. Pellegrini, N. Proteggente, A. Pannala, A. Yang, M. Rice-Evans, C. (1999) "*Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay*" *Free Radical Biology & Medicine* 26:1231-37

- Rodriguez-Saona, Wrosstad, R. E. (2001) "*Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins*" Current Protocols in Food Analytical Chemistry F1.1.1-F1.1.1.
- Roobha, J. Saravanakumar, M. Aravindhan, K. M. Sunganya devi, P. (2011) "*The Effect of Light, Temperature, pH on Stability of Anthocyanin Pigments in Musa acuminata Bract*" Research in Plant Biology 1(5): 5-12
- Santos, M. R. Mira, L. (2004) "*Protection by Flavonoids Against the Peroxynitrite-mediated Oxidation of Dihydrorhodamine*" Free Radical Research 38(9): 1011-18
- Santos, S. A. P. R. S. (2005) "*Efeitos Adversos dos Triptanos: Suas Bases Farmacológicas*" Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Tese de Doutorado.
- Salem, A. A. Soliman, A. A. El-Haty, I. A. (2011) "*New Spectrophotometric Method for Determining Nitrogen Dioxide in Air Using 2,2-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline)-6-Sulfonic Acid-Diammonium Salt and Passive Sampling*" Analytical Chemistry Insights 6:37-44
- Scalbert, A. Williamson, G. (2000) "*Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols*" The Journal of Nutrition 130: 2073S-85S
- Suart Ira Fox "*Cap. 18 The Digest System*" Human Physiology, 8ª edição. McGraw-Hill (2003) ISBN: 0072919280
- Svarcova, I. Heinrich, J. Valentova, K. (2007) "*Berry Fruits as a Source of Biologically Active Compounds: The Case of Lonicera caerulea*" Biomed 151(2): 163-74

- Takikawa, M. Inoue, S. Horio, F. Tsuda, T. (2009) "*Dietary Anthocyanin-Rich Bilberry Extract Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diabetic Mice*" *The Journal of Nutrition* 527-33
- Tarpey, M. M. Wink, D. A. Grisham, M. B. (2004) "*Methods for Detection of Reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen: in vitro and in vivo Considerations*" *American Journal of Physiology* 286: R431-R444
- Wang, J. Mazza, G (2002) "*Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on The Production of Tumor Factor α in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages*"
- Wang, L. Stoner, G. (2008) "*Anthocyanins and Their Role in Cancer Prevention*" *Cancer Lett.* 269(2): 281-90
- Welch, C. R. Wu, Q. Simon, J. E. (2008) "*Recent Advances in Anthocyanins Analysis and Characterization*" *Current Analytical Chemistry* 4(2): 75-101
- WHO monographs on selected Medicinal Plants, Ed. World Health Organization, Palermo - Paestum, volume 4, 2005, 213 - 225 ISBN 978 92 4 154705 5
- Wiesinger, H. (2000) "*Arginine Metabolism and The Synthesis of Nitric Oxide in The Nervous System*" *Progress in Neurobiology* 64: 365-91
- Woodward, G. Kroon, P. Cassidy, A. et al (2009) "*Anthocyanin Stability and Recovery: Implications for the Analysis of Clinical and Experimental Samples*" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 5271-78
- Wrolstad, R. E. Culver, C. A. (2012) "*Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants*" *The Annual Review of Food Science and Technology* 3:59-77

- Wu, D. Cederbaum, A. I. (2003) "*Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage*" 27(4): 277-84
- Xia, E. Xia, E. Deng, G. Guo, Y. Li, H. (2010) "*Biological Activities of Polyphenols from Grapes*" International Journal of Molecular Sciences 11: 622-46
- Yi, W. Fischer, J. Krewer, G. Akoh, C. C. (2005) "*Phenolic Compounds from Blubberies Can Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation and Induce Apoptosis*" Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(18): 7320-29
- Youdim, K. A. McDonald, J. Kalt, W. Joseph, J. A. (2002) "*Potential Role of Dietary Flavonoids in Reducing Microvascular Endothelium Vulnerability to Oxidative and Inflammatory Insults*" The Journal of Nutritional Biochemistry 13:282-88

