

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos
Área de Bromatologia

Atividade antioxidante de alimentos vegetais.

Estrutura e estudo de biodisponibilidade de antocianinas de
amora silvestre (*Morus* sp.)

Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Franco Maria Lajolo

São Paulo
2005

Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

Atividade antioxidante de alimentos vegetais.
Estrutura e estudo de biodisponibilidade de antocianinas de
amora silvestre (*Morus* sp.)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dr. Franco Maria Lajolo
orientador/presidente

Antonio Salatino
1º. examinador

Maria Lúcia Zaidan Dagli
2º. examinador

Adriana Zerlotti Mercadante
3º. examinador

Maria Inés Genovese
3º. examinador

São Paulo, 11 de agosto de 2005.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

H355a Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto
Atividade antioxidante de alimentos vegetais. Estrutura e
estudo de biodisponibilidade de antocianinas de amora si Ivestre
(*Morus* sp.). ! Neuza Mariko Aymoto Hassimotto. -- São
Paulo, 2005.
159p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos
e Nutrição Experimental

Orientador: Lajolo, Franco Maria

1. Alimento: Composto fenólico : Ciência dos alimentos
2. Bioquímica dos alimentos 3. Antioxidante : Nutrição
- T. 11, Lajolo, Franco Maria, orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiro, meu eterno amor, gratidão e respeito ao meu marido Carlos, que com sua infinita paciência sempre está ao meu lado e me apoia em todos os momentos.

Agradeço ao Professor Franco Maria Lajolo pela inestimável orientação e por compartilhar seu conhecimento e experiência. Também agradeço a oportunidade que me deu em poder participar do laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos e de conhecer todas essas pessoas maravilhosas.

Agradeço à Professora Maria Inés Genovese pelos conselhos e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos Professores Eduardo Purgatto e Beatriz Cordenunsi pela amizade.

Fiz grandes amigos no laboratório, e um carinho especial a Ana Cristina e Lúcia pelo companheirismo, amizade, horas e horas de conversa, sem atrapalhar o trabalho obviamente, e aprendizado sobre a vida. Também a minha grande amiga Márcia que sempre viabilizava os materiais de que necessitava e por tornar o laboratório um ambiente único de alegria. Cobrarei dela a promessa de que cuidaria de meus filhos até completarem 1 aninho, porque depois disso eles se tornam chatos ☺. A Malu.

Um especial agradecimento a minha amiga Aderuza, que sempre apressada mas sempre presente, me ajudou nos experimentos com os “ratinhos”.

Ao amigo Adair que muito me ajudou a entender o complicado instrumento que é o computador e a Vanessa Purgatto pela ajuda com os experimentos no Butantã.

Não poderia deixar de citar os amigos e amigas, Marcinha, Eliana, Ricardo, Paola, Adriana, Janaína, Renato, João Paulo, Amanda, Maurício, Fernanda (s) e Rogério.

Ao pessoal da Secretaria de Alimentos e Nutrição Experimental, Mônica e Tânia, e da Secretaria de Pós-graduação, Jorge e Eliane, sempre solícitos.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo e a FAPESP pelo auxílio financeiro.

Dedico este trabalho ao Carlos, meu marido
minha vida, meu amor.

Aos meus pais, Mitsuyo e Kioshi Aymoto
que me deram a oportunidade de querer e poder algo mais.

Não se encontra senão
folhas,
Quando não é tempo de
frutos.
Cabe esperar o momento
certo.
(Provérbio oriental)

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. Flavonóides	03
2.1.1. Características estruturais	03
2.1.2. Biossíntese	08
2.2. Propriedades dos flavonóides	10
2.2.1. Atividade antioxidante	10
2.2.2. Moduladores de enzimas	13
2.2.3. Modulador de alterações gênicas	16
2.3. Atividade antioxidante de alimentos vegetais	17
2.3.1. Evidências epidemiológicas	17
2.3.2. Atividade antioxidante de extratos vegetais	17
2.4. Biodisponibilidade de flavonóides	20
2.5. Métodos para a avaliação da atividade antioxidante	26
3. OBJETIVOS	31
4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ALIMENTOS VEGETAIS	
4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	32
4.2. MATERIAS E MÉTODOS	33
4.2.1. REAGENTES QUÍMICOS	33
4.2.2. MATERIAS	33
4.2.2.1. Amostras vegetais	33
4.2.2.2. Preparo da amostra	33
4.2.3. MÉTODOS	33
4.2.3.1. Extração	33
4.2.3.2. Extração em fase sólida	34
4.2.3.3. Determinação de ácido ascórbico	34
4.2.3.4. Determinação de fenólicos totais	35
4.2.3.5. Determinação da atividade antioxidante total	35

4.2.3.5.1. Atividade antioxidante no sistema lipossomo	35
4.2.3.5.2. Atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoléico	36
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.3.1. Atividade antioxidante de frutas	37
4.3.2. Atividade antioxidante de polpas congeladas de frutas	45
4.3.3. Atividade antioxidante de hortaliças	53
4.3.4. Atividade antioxidante de feijão preto	60
4.3.5. Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante	61
4.3.6. Conteúdo de ácido ascórbico e atividade antioxidante	64
4.4. CONCLUSÃO	66
5. IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS DE AMORA SILVESTRE (<i>Morus sp.</i>)	
5.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	67
5.2. MATERIAS E MÉTODOS	70
5.2.1. REAGENTES QUÍMICOS	70
5.2.2. MATERIAL	70
5.2.3. MÉTODOS	70
5.2.3.1. Extração de flavonóides	70
5.2.3.2. Extração em fase sólida	70
5.2.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência	71
5.2.3.4. Purificação de antocianinas de amora silvestre	72
5.2.3.5. Hidrólise de glicosídeos e identificação de açúcares	72
5.2.3.5.1. Hidrólise ácida	72
5.2.3.5.2. Cromatografia gasosa de carboidratos	73
5.2.3.5.3. Hidrólise alcalina	73
5.2.3.6. Identificação espectrofotométrica UV/Visível de antocianinas	73
5.2.3.7. Identificação das antocianinas por MS-MS	74
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.3.1. Identificação e quantificação de flavonóides da amora silvestre	75
5.3.2. Isolamento de antocianinas de amora silvestre	77

5.3.3. Caracterização espectrofotométrica de antocianinas	79
5.3.4. Análise de carboidratos	84
5.3.5. Identificação de antocianinas por Espectrômetro de massa	87
5.4. CONCLUSÃO	93
6. ESTUDOS PRELIMINARES DE BIODISPONIBILIDADE DE ANTOCIANINAS DE AMORA SILVESTRE (<i>MORUS</i> sp.)	
6.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	93
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS	95
6.2.1. REAGENTES QUÍMICOS	95
6.2.2. MATERIAL	95
6.2.3. MÉTODOS	95
6.2.3.1. Extração de antocianinas de amora silvestre	95
6.2.3.2. Extração em fase sólida (SPE)	95
6.2.3.3. Estudo de biodisponibilidade de antocianinas em animais	96
6.2.3.3.1. Animais.	96
6.2.3.3.2. Desenho experimental	96
6.2.3.3.3. Preparação e determinação de antocianinas no material biológico	97
6.2.3.4. Fermentação de antocianinas de amora em sistema <i>in vitro</i>	98
6.2.3.4.1. Preparo do meio de cultura	98
6.2.3.4.2. Preparo do inóculo	99
6.2.3.4.3. Fermentação de antocianinas <i>in vitro</i>	99
6.2.3.5. Absorção de antocianinas em sistema <i>in vitro</i> , com segmentos intestinais evertidos.	100
6.2.3.5.1. Animais	100
6.2.3.5.2. Desenho experimental	100
6.2.3.6. Determinação de glicose	103
6.2.3.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	103
6.2.3.8. Determinação do coeficiente de partição	103
6.2.3.9. Atividade antioxidante do plasma	104
6.2.3.9.1. Método β -caroteno/ácido linoléico	104
6.2.3.9.2. Método DPPH	104

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
6.3.1. Absorção de antocianinas de amora silvestre em ratos	105
6.3.2. Distribuição de cianidina no sistema digestório de ratos	110
6.3.3. Fermentação in vitro de Cianidina-3-glucosídeo e Cianidina-3-glucoramnosídeo de amora (<i>Morus</i> sp.).	117
6.3.4. Absorção de antocianinas em sistema in vitro, com segmentos intestinais evertidos	121
6.3.5. Atividade antioxidante do plasma	132
6.4. CONCLUSÃO	135
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato
ABTS ^{•+}	Radical 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfônico
AcOH	Ácido acético
AG	Ácido gálico
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Butilhidroxi tolueno
bs	Base seca
bu	Base úmida
CGCG	Epigallocatequina-3-galato
CG-EI-MS	Cromatografia gasosa-impacto de elétrons-detector de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX	Ciclo-oxigenase
cp	Coeficiente de partição
CP	Cromatografia em papel
Cu	Cobre
Cu SO ₄	Sulfato de cobre
cyn	Cianidina
DAD	Detector com arranjo de diodo
DCV	Doença cardiovascular
DHA	Ácido desidroascórbico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DPPH	Radical α,α -difetil- β -picrilhidrazina
DPH-PA	3[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienilfenil] ácido propiônico
EMB	Extrato metanólico bruto
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FA	Flavonóides ácidos
FeCl ₂	Cloreto férrico
FeSO ₄	Sulfato férrico
FN	Flavonóides neutros
g	Gramas

HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC ₅₀	Concentração necessária para inibição de 50% da oxidação
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPH	Lactase floridzina hidrolase
LPS	lipopolissacarídeo
M ⁺	Íon molecular
MeOH	Metanol
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NO [•]	Óxido nítrico
NO ₂ [•]	Dióxido de nitrogênio
MDA	Malonaldeído
m/z	Relação massa/carga
ORAC	Oxygen radical assay capacity
P1	Pigmento 1
P2	Pigmento 2
PC	Polpa congelada
PLA2	Fosfolipase A ₂
PPO	Polifenoloxidase
REA	Relação estrutura-atividade
Se	Selênio
SGLT1	transportador de glicose sódio dependente
SPE	Extração em fase sólida
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Compostos reativos com o ácido tiobarbitúrico
TEAC	Atividade antioxidante equivalente em Trolox
TLC	Cromatografia em camada delgada
T _{máx.}	Tempo máximo
TOSC	Total antiradical scavenging assay
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
UV	Ultra violeta
μL	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA DE TABELAS

Tabela 01:	Atividade antioxidante de extrato metanólico bruto de frutas analisada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico	38
Tabela 02:	Atividade antioxidante de flavonóides neutros e ácidos de frutas analisadas pelos sistemas β -caroteno/ácido linoléico e lipossomo	39
Tabela 03:	Atividade antioxidante de extrato metanólico bruto de polpas congeladas de fruta analisada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico	46
Tabela 04:	Atividade antioxidante de flavonóides neutros e ácidos de polpas congeladas de fruta analisadas pelos sistemas β -caroteno/ácido linoléico e lipossomo	49
Tabela 05:	Atividade antioxidante de extrato metanólico bruto de hortaliças analisadas pelos sistemas β -caroteno/ácido linoléico e lipossomo	53
Tabela 06:	Atividade antioxidante de flavonóides neutros e ácidos de hortaliças analisadas pelos sistemas β -caroteno/ácido linoléico e lipossomo	55
Tabela 07:	Atividade antioxidante de flavonóides neutros e ácidos de feijões analisadas pelos sistemas β -caroteno/ácido linoléico e lipossomo	60
Tabela 08:	Concentração de fenólicos totais em extrato metanólico bruto e porcentagem de recuperação de flavonóides e ácidos fenólicos após separação em fase sólida	63
Tabela 09:	Conteúdo de ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico e ácido ascórbico total em frutas, polpa de fruta congelada e hortaliças	65
Tabela 10:	Gradiente linear das fases móveis utilizado para cromatografia líquida de alta eficiência de flavonóides neutros e ácidos	71
Tabela 11:	Caracterização espectrofotométrica UV/visível da antocianina de amora silvestre correspondente ao Pigmento 1 isolado por cromatografia em papel	80
Tabela 12:	Caracterização espectrofotométrica UV/visível da antocianina de amora silvestre correspondente ao Pigmento 2 isolado por cromatografia em papel	81
Tabela 13:	Composição da solução tampão para a fermentação in vitro.	99
Tabela 14:	Porcentagem de recuperação de cianidina total de amora nos tecidos e órgãos de ratos após administração por gavagem.	116
Tabela 15:	Relação entre cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-glucoramosídeo distribuído no trato gastro intestinal	116

	após administração oral a rato Wistar macho	
Tabela 16	Relação entre cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-glucorarnnosídeo durante fermentação em sistema <i>in vitro</i> .	119
Tabela 17	Coeficiente de partição de flavonóides em n-octanol/água.	125

LISTA DE QUADROS

Quadro 01:	Característica estrutural dos flavonóides	04
Quadro 02:	Métodos de avaliação da atividade antioxidante de flavonóides em extratos vegetais e purificados	28
Quadro 03:	Métodos de avaliação da atividade biológica de flavonóides	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 01:	Estrutura básica de flavonóides	03
Figura 02:	Relação da biossíntese de flavonóides	09
Figura 03:	Esquema demonstrando os sítios de ligação da quercetina com metais.	13
Figura 04:	Sítio de ligação do ATP no receptor tirosina quinase e proposta de ligação da genisteína como inibidor competitivo do ATP	14
Figura 05	Possíveis rotas de transporte de drogas através do epitélio intestinal	21
Figura 06:	Atividade antioxidante de flavonóides neutros e ácidos de amora silvestre eluídos em coluna de poliamida e analisadas pelos sistemas β -caroteno/ácido linoléico e lipossomo	42
Figura 07:	Atividade antioxidante de flavonóides neutros e ácidos de frutas analisadas pelos sistemas lipossomo e β -caroteno/ácido linoléico	43
Figura 08:	Oxidação do ácido ascórbico em sistema β -caroteno/ácido linoléico	47
Figura 09:	Oxidação de extrato metanólico bruto de polpa congelada de acerola em sistema β -caroteno/ácido linoléico	48
Figura 10:	Oxidação de flavonóides neutros e ácidos de polpa congelada de acerola em sistema β -caroteno/ácido linoléico	48
Figura 11:	Atividade antioxidante de flavonóides neutros e ácidos de polpa congelada de açaí eluídos em coluna de poliamida e analisadas pelos sistemas lipossomo e β -caroteno/ácido linoléico	50
Figura 12:	Atividade antioxidante de flavonóides neutros e ácidos de polpa congelada de amora eluídos em coluna de poliamida e analisadas pelos sistemas lipossomo e β -caroteno/ácido linoléico	50
Figura 13:	Atividade antioxidante de flavonóides neutros e ácidos de polpas congeladas de fruta analisadas pelos sistemas β -caroteno/ácido linoléico e lipossomo	51
Figura 14:	Oxidação da rutina e quercetina em sistema β -caroteno/ácido linoléico	57
Figura 15:	Atividade antioxidante de flavonóides neutros e ácidos de hortaliças analisadas pelos sistemas β -caroteno/ácido linoléico e lipossomo	59

Figura 16:	Estrutura fundamental das antocianidinas	67
Figura 17:	Cromatograma de flavonóides de amora silvestre analisada por cromatografia líquida de alta eficiência	75
Figura 18:	Concentração de flavonóides em amora silvestre no ano de 2002 e 2003	76
Figura 19:	Cromatograma obtido por CLAE de amora silvestre	78
Figura 20:	Espectro de absorção do pigmento 1 isolado a partir de cromatografia em papel	80
Figura 21:	Espectro de absorção do pigmento 2 isolado a partir de cromatografia em papel	81
Figura 22	Cromatograma de carboidratos separado por CG-EI-MS o pigmento 1 após hidrólise ácida	85
Figura 23:	Cromatograma de carboidratos separado por CG-EI-MS o pigmento 2 após hidrólise ácida	86
Figura 24:	Espectro de massa ESI-MS-MS de cianidina-3-glucosídeo.	88
Figura 25:	<i>Tanden</i> espectro dos produtos gerados por colisão com argônio, centrado em m/z 449.	88
Figura 26:	Espectro de massa ESI-MS-MS de cianidina-3-glucoramnosídeo.	89
Figura 27:	<i>Tanden</i> espectro dos produtos gerados por colisão com argônio, centrado em m/z 595.	89
Figura 28:	<i>Tanden</i> espectro dos produtos gerados por colisão com argônio do interferente presente na banda 1 e 2 de m/z 453.	90
Figura 29	Estrutura de cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-glucoramnosídeo, floridizina e rutina utilizadas no experimento de intestino evertido.	101
Figura 30	Sistema modelo <i>in vitro</i> para absorção de antocianinas.	102
Figura 31	Cromatogramas obtido por CLAE/DAD, detectada a 525 nm, de plasma e rim de ratos Wistar macho após administração de extrato de antocianina.	107
Figura 32	Plasma de rato Wistar macho obtido após administração oral de cianidina de amora silvestre em diferentes tempo de coleta.	108
Figura 33	Curva de cianidina total plasmática de amora silvestre administrado a rato Wistar macho, analisada por CLAE/DAD.	109
Figura 34	Curva de cianidina total de amora silvestre no rim administrado a rato Wistar macho analisada por CLAE/DAD.	109
Figura 35	Cromatograma obtido por CLAE/DAD de estômago,	111

	intestino delgado e intestino grosso de ratos após administração oral com extrato de antocianina.	
Figura 36	Concentração de derivados de cianidina no estômago de rato Wistar macho após administração de extrato de antocianina.	113
Figura 37	Concentração de derivados de cianidina no intestino delgado de rato Wistar macho após administração de extrato de antocianina.	113
Figura 38	Concentração de derivados de cianidina no intestino grosso de rato Wistar macho após administração de extrato de antocianina.	114
Figura 39	Degradação de derivados de cianidina durante fermentação <i>in vitro</i> .	118
Figura 40	Absorção de glicose na solução serosal em sistema modelo <i>in vitro</i> , com segmentos de intestino evertido.	122
Figura 41	Absorção de cianidina total de amora silvestre na solução serosal em sistema modelo <i>in vitro</i> , com segmentos de intestino evertido.	123
Figura 42	Cromatograma obtido por CLAE/DAD da solução serosal e do tecido intestinal em modelo de intestino evertido de rato Wistar incubado com extrato de antocianina.	124
Figura 43	Absorção de glicose e cianidina total na solução serosal em sistema modelo <i>in vitro</i> , com segmentos intestinal evertido.	127
Figura 44	Absorção de glicose e rutina na solução serosal em sistema modelo <i>in vitro</i> , com segmentos de intestino evertido.	128
Figura 45	Conteúdo de cianidina e rutina na solução serosal e no tecido intestinal.	129
Figura 46	Atividade antioxidante de plasma de ratos wistar que receberam extrato de amora silvestre, em sistema β -caroteno/ácido linoléico.	133
Figura 47	Atividade sequestrante de radicais livres de plasma de rato Wistar que receberam extrato de amora silvestre, em sistema DPPH.	133

RESUMO

Os flavonóides são de grande interesse na nutrição e medicina devido ao seu potencial antioxidante e possível efeito protetor à saúde, reduzindo doenças crônico-degenerativas tais como doenças cardiovasculares e câncer. Entretanto, para produzir o efeito biológico *in vivo*, é essencial que suficiente quantidade do composto alcance a célula alvo, ou seja, que apresente uma boa biodisponibilidade. Este trabalho teve como objetivo inicial realizar um screening de alimentos vegetais para avaliar seu potencial antioxidante na dieta alimentar e permitir a seleção de um alimento mais interessante para o estudo do mecanismo de absorção e metabolização de flavonóides, a fim de estabelecer sua biodisponibilidade.

As frutas, hortaliças e polpas congeladas de frutas foram analisadas quanto à atividade antioxidante pelo método de co-oxidação do ácido linoléico/ β -caroteno e pela inibição da peroxidação do lipossomo catalisada pelo íon cobre. Dentre as amostras analisadas, aquelas contendo antocianinas em sua composição apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante. As frações de flavonóides neutros e ácidos de repolho roxo, alface roxa, jambolão, amora silvestre, casca de maçã gala e polpa congelada de açaí, amora e acerola, a 10 e 50 μ M equivalente em ácido gálico, apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante em ambos os sistemas.

Dentro desse grupo, os principais flavonóides de amora silvestre (*Morus* sp.) foram identificados por espectrometria UV/Vis e MS/MS como cianidina-3-glucosídeo (cyn-3-glu) e cianidina-3-glucoramnosídeo (cyn-3-glurha). As duas cianidinas glicosiladas apresentaram pico máximo de absorção em 15 min quando um extrato concentrado foi administrado a ratos Wistar por via oral. A cyn-3-glu e cyn-3-glurha foram encontradas inalteradas no sangue e em pequena quantidade na forma metabolizada. A área abaixo da curva de concentração vs tempo (AAC_{0-8h}) foi de $2,76 \pm 0,88 \mu\text{g.h/mL}$ e $9,74 \pm 0,75 \mu\text{g.h/g}$ (b.u.) para plasma e rim, respectivamente. Assim, estimou-se que somente 0,11% da concentração inicial administrada de cianidina total foi absorvida em 8h. Apesar da baixa absorção, a elevação da concentração de

antocianinas no sangue resultou em significativa elevação da atividade antioxidante do plasma.

No trato gastrointestinal (estômago, intestino delgado e intestino grosso), cyn-3-glu e cyn-3-glurha foram encontradas na sua maioria nas formas glicosiladas, mas pequena quantidade da forma aglicona também foi encontrada no porção do intestino, provavelmente resultado de hidrólise pelas β -glicosidases endógenas ou da microflora colônica. Ainda, estudos de fermentação *in vitro* mostraram que as cianidinas glicosiladas são completamente metabolizadas pela microflora colônica. Como demonstrado pelo sistema de intestino evertido, o transporte das antocianinas da amora silvestre (*Morus* sp.) parece envolver o transportador de glicose sódio dependente, através da interação dos glicosídeos com este. Esta conclusão é reforçada pelo efeito inibitório da absorção das duas cianidinas glicosiladas pela adição de D-glicose e floridzina e pela remoção do íon sódio do meio de incubação no segmento de intestino evertido.

ABSTRACT

Flavonoids are of great interest in nutrition and medicine because of their potent antioxidant activity and possible protective effects on human health, reducing the risk of chronic diseases such as cardiovascular diseases and cancer. To produce a biological effects *in vivo*, it is essential that sufficient quantities reach the target tissue. The initial objective of the present study was to make a screening of dietetic vegetable to evaluate their antioxidant potential in the diet and select one of the most promising to study the bioavailability of flavonoid.

Fruits, vegetables and commercial frozen pulps (FP) consumed in the diet, were analyzed for antioxidant activities using two different methods, one that determines the inhibition of copper-induced peroxidation of liposome, and other based on the inhibition of the co-oxidation of linoleic acid and β -carotene. The anthocyanin-rich samples showed the highest concentration dependent antioxidant activities in both systems. At both 10 and 50 μ M gallic acid equivalent addition level, the neutral and acidic flavonoids of red cabbage, red lettuce, black bean, mulberry, Gala apple peel, jambolao, acai frozen pulp (FP), blackberry FP and the acidic flavonoids of acerola FP showed the highest antioxidant activities in both systems.

The major flavonoids from wild mulberry (*Morus* sp.) were identified by UV/Vis e MS/MS spectrometric methods as cyanidin-3-glucoside (cyn-3-glu) and cyanidin-3-glucorhamnoside (cyn-3-glurha). The two glycosilated forms showed maximum concentration at 15 min after oral administration for rats Wistar. Te cyn-3-glu and cyn-3-glurha were found unchanged in plasma but a little amount was found in the metabolized form. The area under the curve of concentration vs time (AAC_{0-8h}) was $2.76 \pm 0.88 \mu\text{g.h/mL}$ and $9.74 \pm 0.75 \mu\text{g.h/g}$ (b.u.) for plasma and kidney, respectively. Then, the estimated uptake of total cyanidin was 0.11% of the initial concentration. In spite of the low absorption, the increase in its anthocyanin content in plasma resulted in significant increase in antioxidant activity ($p < 0.5$).

Cyn-3-glu e cyn-3-glurha were found unchanged at gastrointestinal tract (stomach, small and large intestine), but a low amount of the aglycone form was

presented, probably due to the endogen or microbial β -glycosidases hydrolyses. Moreover, *in vitro* fermentation showed that the two glycosylated cyanidins were totally metabolized by the rat colonic microflora. As showed by everted sacs system, anthocyanins from wild mulberry (*Morus* sp.) were transported across the enterocyte by sodium dependent glucose transporter (SGLT1). This conclusion was evidenced because cyn-3-glu and cyn-3-glurha absorption were inhibited by the addition of D-glucose, phloridzin (a potent inhibitor of SGLT1) and removal of sodium ion from the incubation medium.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o papel dos radicais livres em sistemas biológicos recebe grande atenção por sua relação direta com diversas patologias crônico-degenerativas, tais como arterosclerose, câncer, catarata e artrite (NIKI, 2000).

Sabe-se que a ocorrência de espécies reativas de oxigênio (ERO) e reativas de nitrogênio (ERN) é um atributo do processo metabólico aeróbio normal. Contudo, um desequilíbrio no sistema oxidativo da célula pode levar ao chamado “stress oxidativo”. Entende-se por stress oxidativo, o distúrbio no estado de equilíbrio do sistema pró-oxidante/antioxidante que funciona continuamente para gerar e para detoxificar oxidantes durante o metabolismo aeróbio normal (THOMAS, 1994).

O ânion superóxido está entre as espécies mais comuns responsáveis pelo stress oxidativo, formado principalmente durante o transporte de elétrons mitocondrial e microssomal, bem como a partir do sistema xantina/xantina oxidase e outras oxidases celulares (THOMAS, 1994). Outras EOR incluem o radical hidroxila, o radical peroxila e o peróxido de hidrogênio. As ENR incluem o óxido nítrico (NO^\bullet) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet). O NO^\bullet é formado a partir do aminoácido L-arginina enquanto que o NO_2^\bullet é formado quando o NO^\bullet reage com o oxigênio (CAO; PRIOR, 2000).

Apesar de nosso organismo gerar constantemente espécies reativas, ele também possui um sistema de defesa antioxidante. Este sistema é constituído por uma complexa rede de compostos e enzimas, tais como a superóxido dismutase, Se- glutatona peroxidase, glutatona redutase, catalase e componentes antioxidantes tais como a glutatona, vitamina E, carotenóides e vitamina C. No plasma ainda encontramos compostos que auxiliam na atividade antioxidante, entre eles o ácido úrico, a ceruloplasmina, a albumina, a transferrina e a hemopexina (PIETTA, 2000).

Os constituintes dietéticos estão relacionados com ambos, como agentes causadores do stress oxidativo e agentes protetores como defesa antioxidante (CAO; PRIOR, 2000).

Estudos do mecanismo de quimioprevenção têm focalizado a atividade biológica de vários compostos encontrados em frutas e vegetais consumidos na dieta normal. Dentre os mais importantes compostos antioxidantes encontram-se a

vitamina C, vitamina E e β -caroteno (WANG; CAO; PRIOR, 1996). Outros compostos tais como os ácidos fenólicos, flavonóides, terpenos e glucosinolatos (DREWNOWSKI; GOMEZ-CARNERO, 2000) também são alvos de recentes pesquisas.

Os compostos fenólicos, apesar de não apresentarem importância nutricional direta, têm recebido muita atenção devido a sua atividade biológica. Uma atraente hipótese sugere que os alimentos vegetais contenham compostos metabólicos secundários, que quando ingeridos freqüentemente através da dieta, apresentam efeitos benéficos à saúde, entre os quais os de anti-inflamatório e antioxidante (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; HOLLMAN; KATAN, 1999).

Vários estudos demonstram a atividade antioxidante exercida pelos flavonóides, principalmente o de seqüestrar várias espécies oxidantes, tais como ânion superóxido, radical hidroxila e radical peroxila (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Os flavonóides são caracterizados estruturalmente como difenilpropanos ($C_6-C_3-C_6$) que ocorrem naturalmente nos vegetais (BRAVO, 1998).

Considerando que os flavonóides podem atuar como agentes antioxidantes, auxiliando no sistema antioxidante do organismo (SMITH; YANG, 1994), é interessante identificar fontes alimentares com potencial ação quimiopreventiva e principalmente estudar seu efeito *in vivo*.

Assim, este trabalho é parte de um projeto mais amplo que visa avaliar o potencial antioxidante dos flavonóides de alimentos vegetais na sua forma *in natura* e processada, e contribuir para o conhecimento da sua estrutura e biodisponibilidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FLAVONÓIDES

2.1.1. Características estruturais

Estruturalmente, os flavonóides são caracterizados por apresentarem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído por dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia de três átomos de carbono que pode ou não formar um terceiro anel ($C_6-C_3-C_6$). Nos compostos tricíclicos, os anéis são denominados de A, B e C (Figura 1) (BRAVO, 1998).

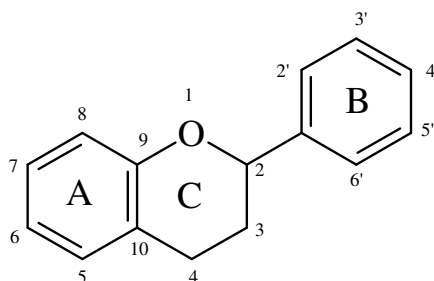
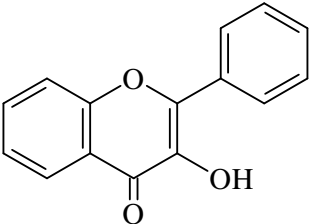
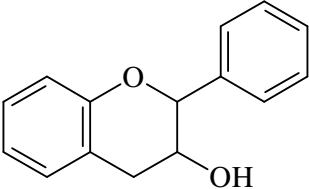
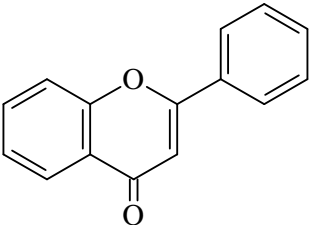


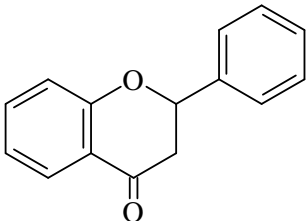
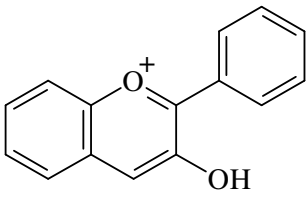
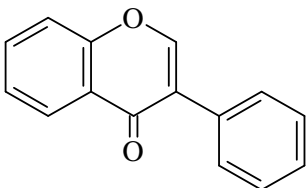
Figura 1: Estrutura geral de flavonóides (BRAVO, 1998).

As classes de flavonóides podem ser diferenciadas com base na oxidação do anel pirano central e também pela posição da ligação do anel B. Desta maneira, os flavonóides podem ser divididos em seis classes: flavonas, flavonóis, antocianidinas, flavanonas, isoflavonas e flavan-3-ol. Outras classes também incluem auronas e chalconas (PETERSON; DWYER, 1998). No Quadro 1 estão descritas as características estruturais de cada classe, juntamente com sua estrutura fundamental.

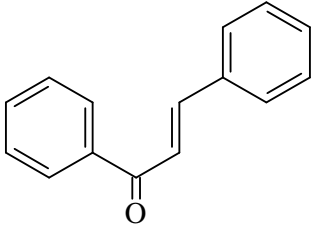
Quadro 1: Característica estrutural dos flavonóides.

Classes de flavonóides	Característica estrutural	<i>Estrutura geral</i>	Exemplos	Obs.
Flavonol	Caracterizado por ligação dupla entre C ₂ -C ₃ , presença de 3-OH e um grupo ceto em C ₄		Quercetina Caempferol Miricetina	Geralmente de cor amarela. É o flavonóide mais freqüente nos vegetais
Flavan-3-ol	Caracteriza-se por C ₃ saturado, presença de 3-OH e ausência do grupo ceto em C ₄		Catequina Epicatequina Epigallocatequina	Geralmente incolor. Está presente em frutas (maçã) e chás (verde e preto)
Flavona	Ligação dupla entre C ₂ -C ₃ , presença grupo ceto em C ₄ e ausência de 3-OH		Apigenina Luteolina	Geralmente de cor amarela. Encontrada principalmente em cereais e ervas.

Continuação da Quadro 1

Classes de flavonóides	Característica estrutural	<i>Estrutura geral</i>	Ocorrência	Obs.
Flavanona	Caracteriza-se por C ₃ saturado e grupo ceto em C ₄		Naringenina Hesperitina	Geralmente incolor ou ligeiramente amarelo. Encontrado quase que exclusivamente em cítricos
Antocianidinas	Caracteriza-se por íon flavílio e 3-OH		Cianidina Delfinidina Peonidina	Apresenta-se nas cores azul, vermelha ou violeta. Encontrado em flores e frutas
Isoflavonas	Difere estruturalmente dos demais flavonóides pela orientação do anel B ligado em C ₃		Genisteína Daidzeína	Apresenta-se incolor. Encontrado quase que exclusivamente em leguminosas

Continuação da Quadro 1

<i>Chalcona e dihidro-chalconas</i>	Esqueleto C15 com abertura no anel C	 <chem>O=C/C=C/c1ccccc1</chem>	Floretina	Encontrada em frutas (p.ex. maçã)
--	--------------------------------------	---	-----------	-----------------------------------

Os compostos individuais dentro de cada classe são diferenciados principalmente pelo número e posição de hidroxilas e metoxilas presentes nos dois anéis aromáticos (COOK; SAMMAN, 1996).

Os flavonóides ocorrem como agliconas ou ligados a moléculas de carboidratos (forma glicosilada). Os glicosilados mais comuns ocorrem como *O*-glicosídeos nos quais um ou mais grupos hidroxílicos são ligados a um ou mais açúcares por uma ligação hemiacetal. O efeito da glicosilação proporciona ao flavonóide menor reatividade e maior solubilidade em água (STAFFORD, 1990).

Embora todos os grupos hidroxila possam ser glicosilados, há maior probabilidade nas posições 3, 5 e 7 pois correspondem às hidroxilas mais ácidas. Os açúcares mais comumente encontrados ligados aos flavonóides são glicose, ramnose, galactose, xilose e arabinose. Outros açúcares ocasionalmente podem ser encontrados, entre eles manose, frutose, ácido glucurônico e ácido galacturônico (COOK; SAMMAN, 1996; DREWNOWSKI; GOMEZ-CARNERO, 2000).

A função dos flavonóides na planta tem sido relacionada à proteção da planta à luz UV-B, atividade antimicrobiana e proteção contra alguns tipos de insetos. Os flavonóides geralmente absorvem na região do comprimento de onda de 230-370 nm, atuando como filtros de UV, protegendo os tecidos fotossintetizantes. Outra indiscutível função dos flavonóides e polifenóis relacionados é a de proteger a planta contra a invasão microbiana. As isoflavonas, flavanas e flavanonas são conhecidas por possuírem atividade antifúngica. Além da atividade antimicrobiana, os flavonóides também possuem um papel importante na proteção contra insetos e herbívoros (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

No arroz, observa-se um aumento na concentração da flavanona sakuranetina e do ácido clorogênico nas folhas da planta em resposta à infecção causada pelo nematóide *Ditylenchus angustus* (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

2.1.2. Biossíntese

Os flavonóides são sintetizados como parte da rota metabólica de fenilpropanóides. Os flavonóides são formados por compostos aromáticos derivados do aminoácido fenilalanina e do malonil-CoA que, por ação da chalcona sintase, formam o precursor comum aos flavonóides, a chalcona. Sua biossíntese é considerada mista devido ao envolvimento das vias do ácido chiquímico e do acetato-malonato (STAFFORD, 1990).

De maneira geral, a chalcona é formada a partir da condensação de 3 unidades de acetato que formam o anel A (via do acetato-malonato), enquanto que o anel B e os três carbonos do anel central são derivados do ácido *p*-cumárico (via do ácido chiquímico) (VICKERY; VICKERY, 1981).

O ácido *p*-cumárico é formado a partir do aminoácido fenilalanina que é sintetizado a partir da via do ácido chiquímico. Nesta via, o ácido corísmico pode ser considerado o metabólito primário que, em presença da corismato mutase, é convertido em ácido prefênico, do qual se formam os aminoácidos fenilalanina e tirosina (VICKERY; VICKERY, 1981).

A partir da chalcona formam-se os seis maiores subgrupos de flavonóides encontrados na maioria das plantas superiores: chalconas, flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianinas e catequinas. Algumas espécies de plantas também sintetizam as isoflavonas que são encontradas em leguminosas (Figura 2).

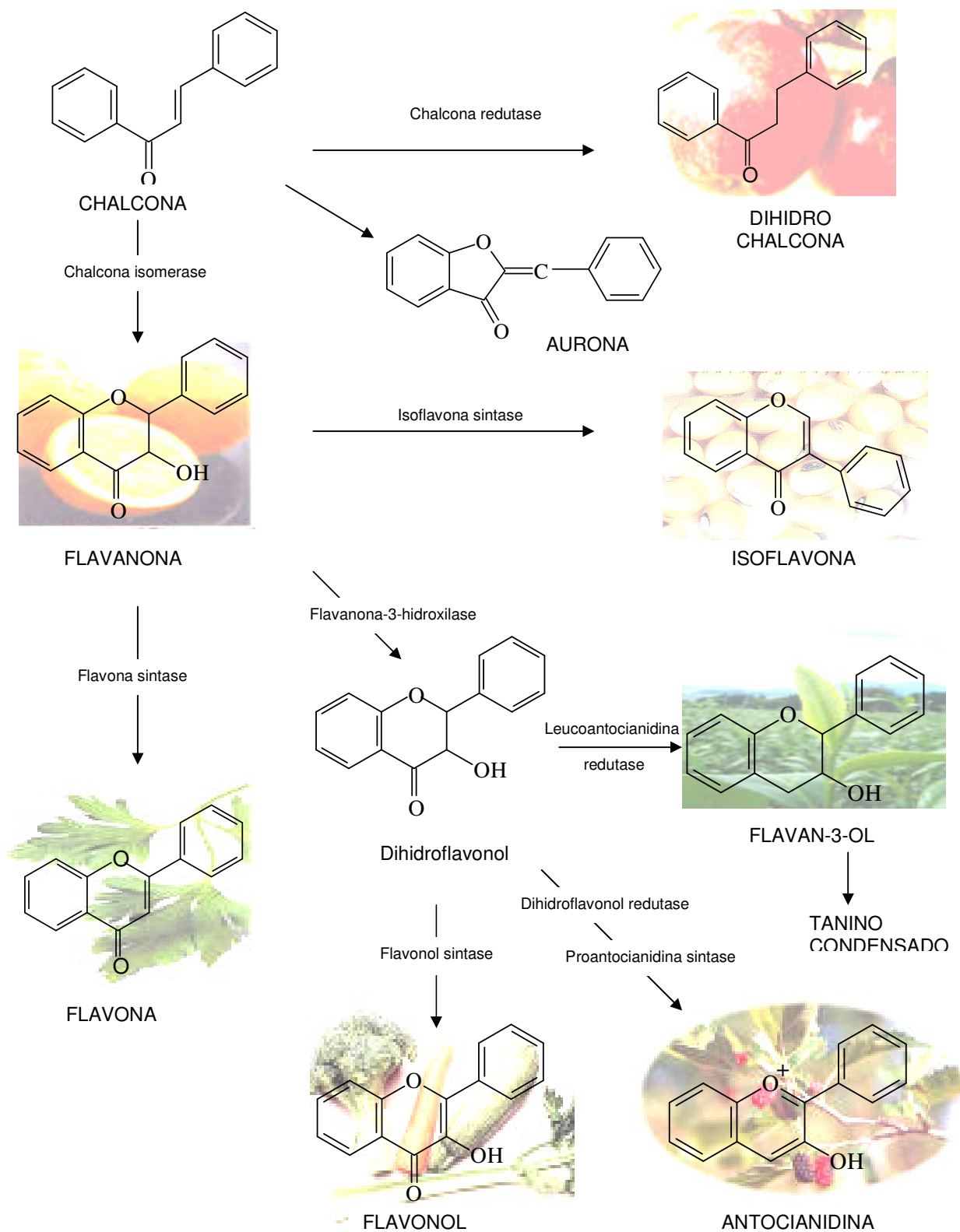


Figura 2: Relações biossintéticas entre classes de flavonóides (adaptado de WINKEL-SHIRLEY, 2001).

2.2. PROPRIEDADES DOS FLAVONÓIDES

Diversos estudos epidemiológicos indicam o efeito protetor do consumo de frutas e hortaliças contra o câncer e doenças cardiovasculares. O efeito protetor observado em estudos epidemiológicos geralmente se deve a uma variedade de constituintes que incluem minerais, fibras e numerosos compostos metabólitos secundários, como os flavonóides. Entretanto, evidências em humanos ainda são escassas e algumas vezes controversas (PIETTA, 2000).

2.2.1. Atividade antioxidante

Diversas propriedades são atribuídas aos flavonóides tais como antioxidante, moduladores da atividade enzimática, redução da proliferação celular, entre outros, e relacionadas à atividade biológica, principalmente na prevenção do câncer e doenças cardiovasculares, como anti-inflamatórios e anti-virais. De maneira geral, a propriedade mais descrita é a sua capacidade antioxidante (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Devido ao seu baixo potencial redox ($0.23 < E^{\circ} < 0.75$) (JOVANOVIĆ *et al.*, 1994), flavonóides são termodinamicamente capazes de reduzir radicais livres com potencial redox entre 2,13-1,0 V, tais como ânion superóxido, radicais hidroxila, alcóxila e peróxila (BUETTNER, 1993). O radical aroxila formado pode reagir com um segundo radical, adquirindo uma estrutura estável de quinona.

A inibição da peroxidação é influenciada por diversas características da estrutura do flavonóide. Estudos de relação estrutura-atividade (REA) indicam algumas características estruturais importantes para a atividade antioxidante dos flavonóides, entre elas (COOK; SAMMAN, 1996; PIETTA, 2000; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996):

- (1) Estrutura *o*-dihidroxi no anel B, que confere alta estabilidade ao radical formado e participa na deslocalização do elétron;
- (2) Presença do grupo 3-hidroxi ligado a ligação dupla entre C₂-C₃ e adjacente a função 4-oxo no anel C, responsável pela deslocalização do elétron a partir do radical aroxila formado no anel B para o anel A;
- (3) Padrão de hidroxilação, principalmente C₅ e C₇ no anel A com função 4-oxo do anel C.

A ausência ou a substituição de algumas das características estruturais citadas acima, reduzem ou levam à perda da atividade antioxidante.

De acordo com Rice-Evans, Miller e Paganga (1996), os flavonóides que apresentam os maiores valores de TEAC (atividade antioxidante Trolox equivalente) em sistema ABTS^{•+} são: o flavonol quercetina por apresentar todas as características estruturais citadas acima ($4,72 \pm 0,10$ mM); as antocianidinas cianidina e delphinidina por apresentarem o mesmo arranjo de hidroxilas vicinais da quercetina ($4,4 \pm 0,1$ mM); e as catequinas esterificadas ao ácido gálico (epicatequina galato e epigallocatequina galato), onde neste caso o alto valor de TEAC é reflexo da contribuição do ácido gálico ($4,93 \pm 0,02$ e $4,75 \pm 0,06$ mM, respectivamente).

Nos vegetais, os flavonóides geralmente se encontram na forma glicosilada. Desta maneira, pode-se esperar alterações na capacidade antioxidante em relação à sua forma aglicona.

O TEAC em sistema lipossomo/Fe-ascorbato da quercetina monoglicosídeo e diglicosídeo foi de aproximadamente metade em relação à aglicona. O mesmo sendo observado para os glicosídeos do caempferol (PLUMB; PRICE; WILLIAMSON, 1999).

Além das características estruturais, outro fator a ser considerado para a avaliação da atividade antioxidante é o coeficiente de partição dos compostos que modula a sua interação ou incorporação com a biomembrana.

Liao e Yin (2000) em oxidação de membrana de eritrócito e de lipossomo catalisada pelo ferro, verificaram uma correlação negativa entre a atividade antioxidante e o coeficiente de partição octanol/H₂O (cp) na ordem: catequina (cp 0,60)>epicatequina (cp 0,94)>rutina (cp 1,27)>quercetina (cp 3,84)>miricetina (cp 5,27). Assim, os flavonóides que apresentaram uma maior interação com a membrana mostraram uma menor interação com os oxidantes presentes na fase aquosa, o que explicaria a melhor eficiência da rutina em relação à quercetina. Estes resultados também estão de acordo com Saija *et al.* (1995) uma vez que a maior hidrofiliabilidade da rutina em relação à quercetina foi mais efetiva em inibir a peroxidação do linoleato induzida pelo ferro.

Por outro lado, a maior afinidade da quercetina pela membrana cerebral de rato promoveu um efeito protetor maior do que a rutina contra a auto-oxidação, uma

vez que os açúcares da rutina provavelmente dificultariam a penetração deste na membrana biológica devido a sua baixa lipossolubilidade (SAIJA *et al.*, 1995).

Resultados semelhantes foram observados por Satué-Gracia, Heinonen e Frankel (1997) que atribuíram a maior eficiência da malvidina em relação à delphinidina e cianidina, em sistemas de oxidação de lipossomo e LDL catalisada pelo cobre, devido à maior afinidade da antocianidina pela interface da partícula conferida pela baixa polaridade dos grupos metoxila do anel B.

Diante disso, verifica-se que a diversidade de métodos para avaliar a capacidade antioxidante e as características intrínsecas do antioxidante dificultam uma análise conclusiva da atividade antioxidante de flavonóides.

Ainda, o mecanismo de atuação dos flavonóides como antioxidantes, não necessariamente envolve a reação direta com o oxidado, podendo ocorrer por um mecanismo indireto. Viana *et al.* (1996) demonstraram, em sistema *in vitro*, que os flavonóides previnem a oxidação do LDL (lipoproteína de baixa densidade), catalisada pelo cobre, pela diminuição do consumo de vitamina E presente na partícula, aumentando assim a fase lag do processo oxidativo e a fase lag do decaimento da vitamina, aumentando desta forma a resistência do LDL à oxidação. Contudo, uma vez que a vitamina E do LDL era totalmente consumida, a adição dos flavonóides durante o processo de oxidação não paralisou ou diminuiu a reação de oxidação.

A oxidação do LDL é assumida com evento-chave na iniciação e progressão da arterosclerose. A arterogenicidade do LDL deve-se à sua alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, altamente susceptíveis à oxidação pelos radicais livres (FRANKEL *et al.*, 1998).

O efeito protetor dos flavonóides à oxidação do LDL induzida pelo cobre também é observado para os flavonóides do chá, especificamente as catequinas do chá verde e as teoflavinas (dímeros da catequina) de folhas de chá preto. Entre as catequinas, a epigallocatequina galato proveu maior proteção ao LDL, além de apresentar atividade antioxidante superior à da vitamina E na mesma concentração molar (ISHIKAWA *et al.*, 1997). Já em sistema de lipossomos, a catequina e a epigallocatequina foram os melhores antioxidantes (HUANG; FRANKEL, 1997).

Outro mecanismo dos flavonóides como antioxidantes é o de quelar metais. Esta característica é principalmente associada à presença do grupo *o*-dihidroxi

presente no anel B, grupo 3-hidroxi e 4-oxo no anel C, e grupos 4-oxo e 5-hidroxi entre o anel C e A (Figura 3).

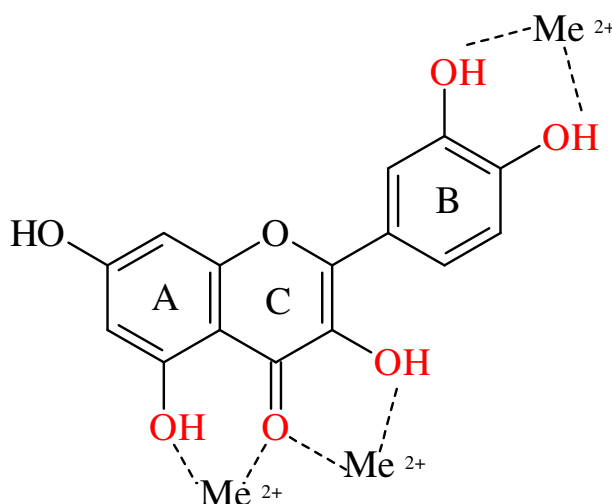


Figura 3: Esquema demonstrando os sítios de ligação da quercetina com metais (Me^{2+}) (PIETTA, 2000).

2.2.2. Moduladores de enzimas

Alguns flavonóides inibem enzimas responsáveis pela produção de ânion superóxido, tais como a xantina oxidase. Também apresentam propriedade de inibir a ciclo-oxigenase, lipoxigenase e tirosina quinase.

O mecanismo proposto para a inibição da tirosina quinase apresentada por alguns flavonóides, como por exemplo, quercetina e genisteína, é a inibição competitiva pelo sítio do ATP (Figura 4). A tirosina quinase é um receptor de membrana com características enzimáticas, onde a acentuada atividade ou o excesso de expressão estão relacionados a diversas doenças proliferativas, como o câncer e a psoríase. As principais características estruturais destes dois flavonóides

necessárias à inibição são: a presença dos grupos 5 e 7-hidroxi necessários para a formação de pontes de hidrogênio semelhantes àsquelas formadas pela molécula da adenina do ATP, nas posições 767 do ác. glutâmico e 769 da metionina, do sítio catalítico; grupo 3-ceto; e o anel B preferentemente em posição 3 para ocupar a região da proteína no qual se liga ao anel da ribose do ATP (cistina 773) (CUSHMAN *et al.*, 1991; TRAXLER *et al.*, 1999).

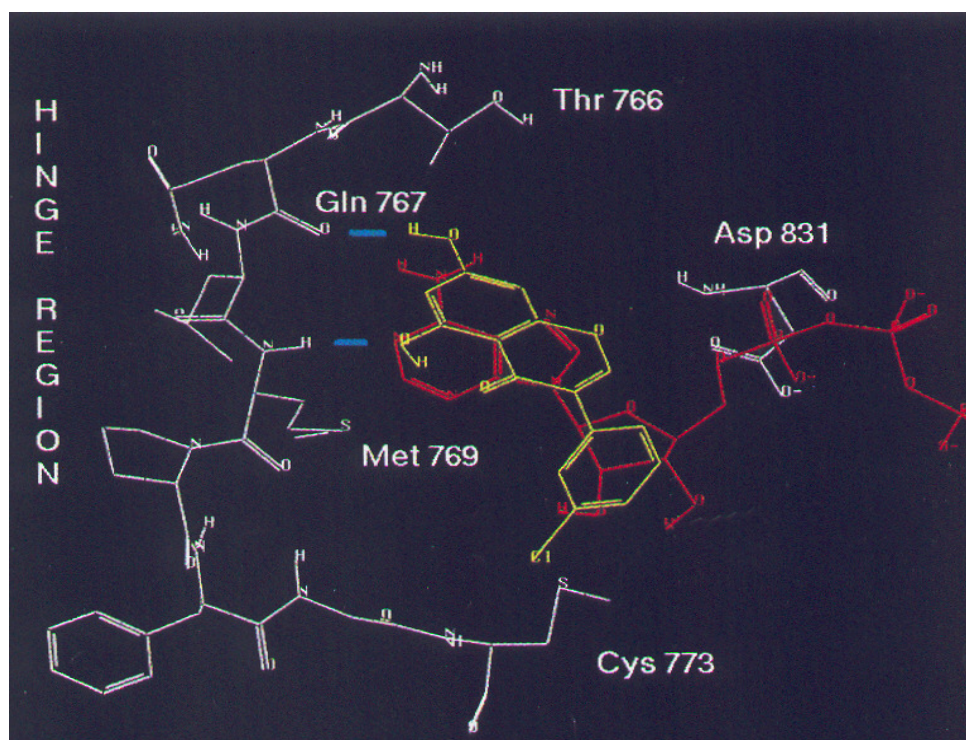


Figura 4: Sítio de ligação do ATP no receptor tirosina quinase e proposta de ligação da genisteína como inibidor competitivo do ATP. (—) ATP; (—) genisteína; (—) ponte de hidrogênio. Fonte: Traxler *et al.*, 1999.

Outras enzimas inibidas pelos flavonóides são a ciclo-oxigenase e a 5-lipoxigenase, enzimas importantes no metabolismo do ácido araquidônico e responsáveis pela resposta inflamatória. A COX é uma enzima responsável pela síntese de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico e é encontrada sob duas isoformas (COX-1 e COX-2). A COX-1 é uma enzima constitutiva, presente em quase todas as células, enquanto que a COX-2 é uma

enzima induzida, sendo altamente expressa em células relacionadas ao processo inflamatório, incluindo macrófagos e leucócitos (KIM *et al.*, 2004). A COX-2 é uma enzima rapidamente induzida por promotores de tumor, fatores de crescimento e citocininas, sendo que seu produto de síntese, a prostaglandina-2, afeta a proliferação celular, crescimento de tumores e suprime a resposta imune às células malignas (EARNEST; HIXSON; ALBERT, 1992).

Em leucócitos de peritônio de rato observou-se que a ciclo-oxigenase (COX) e a 5-lipoxigenase foram inibidas por diversos flavonóides de maneira dose dependente. Dentre os flavonóides estudados, as formas agliconas foram mais eficientes na inibição das enzimas em relação às suas formas glicosiladas. A presença de hidroxilas nas posições 3' e 4' no anel B acentua a atividade inibitória para a 5-lipoxigenase (quercetina, hipoaletina, gossipetina), enquanto que a substituição na posição 2' é detrimental. Observa-se que os flavonóides com poucos substituintes (galangina, crisina, 3-hidroxi-flavona) são mais potentes e apresentam maior seletividade para a ciclo-oxigenase (MORONEY *et al.*, 1988).

Além da COX, os flavonóides também parecem inibir a fosfolipase A₂ (PLA₂), principal enzima responsável pela liberação de ácido araquidônico (precursor dos eicosanóides) a partir da membrana (KIM *et al.*, 2004).

Além da inibição direta dos flavonóides sobre as enzimas do metabolismo do ácido araquidônico, a modulação da expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias também parece ser um dos mecanismos da atividade anti-inflamatória apresentada pelos flavonóides. Liang *et al.* (1999) verificaram que apigenina, genisteína e caempferol são ativos inibidores da ativação transcripcional da ciclo-oxigenase 2, enquanto que a apigenina e caempferol foram inibidores da transcrição da óxido nítrico sintase em macrófago de rato induzido por lipopolissacarídeos (LPS) (IC₅₀ <15 µM). Entretanto, estes mesmos flavonóides não inibem significativamente a COX-2, enquanto epigallocatequina-3-galato e quercetina apresentaram ligeira inibição.

Outra importante evidência foi publicada recentemente por Kao *et al.* (2005) onde flavonóides contidos em extrato da fruta *Crataegus pinnatifida* (principalmente quercetina-3-O-galactosídeo) inibiram a produção de prostaglandina-2 e óxido nítrico em macrófago RAW 264.7 induzida por LPS, além de diminuir a expressão hepática de COX-2 e óxido nítrico sintase induzidos por LPS em ratos.

2.2.3. Moduladores de alterações gênicas

A interação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com as bases de DNA pode resultar na formação de adutos de DNA que durante a replicação pode levar a uma mutação e contribuir para o desenvolvimento de células neoplásicas (LAMPE, 1999).

Em cultura de hepatócito, a adição simultânea da miricetina (25-100 μM) com o agente oxidante nitrilo acetato férrico previniu a oxidação lipídica e o acúmulo de produtos de oxidação do DNA, além de estimular a liberação de bases de DNA oxidadas no meio de cultura. A remoção de altos níveis de produtos de oxidação corresponde à ativação das enzimas reparadoras do DNA (*excision-repair enzyme*) pela miricetina, além de estimular a síntese, ou estabilização do RNAm correspondente (ABALEA *et al.*, 1999).

Além disso, a pré-incubação de linfócitos humanos com quercetina (10-50 μM) e miricetina (100 μM) suprimiram a quebra de DNA induzida pelo H_2O_2 , sendo que o α -tocoferol e β -caroteno não diminuíram esta quebra (DUTHIE *et al.*, 1997).

Apesar dos efeitos antioxidantes descritos para inúmeros flavonóides, em determinadas circunstâncias pode-se também observar atividade pró-oxidante. Nas concentrações superiores a 100 μM , quercetina e epigallocatequina provocaram danos oxidativos ao DNA/ H_2O_2 de linfócitos T (JOHNSON; LOO, 2000), ou mesmo flavonóides tendo um grupo *o*-trihidroxi no anel B (epigallocatequina galato, delphinidina, miricetina) ou anel A (quercetagina) induziram significativamente a quebra do DNA na presença de compostos formadores de óxido nítrico. Contudo, estes mesmos flavonóides ou mesmo o óxido nítrico não causavam quebra do DNA quando aplicados sozinhos. A atividade pró-oxidante dos flavonóides em presença de óxido nítrico pode ser devida à formação de espécies reativas de nitrogênio, tais como peroxinitrito e nitroxila formados pela reação entre o óxido nítrico e derivados quinona/semiquinona (OHSHIMA *et al.*, 1998).

Assim, é difícil traçarmos um padrão de relação estrutura atividade (REA) entre os flavonóides e a atividade antioxidante devido a inúmeros métodos de análise e inúmeros outros fatores, tornando-se muito mais complexo ainda quando envolve biomoléculas complexas como DNA e proteínas. Desta maneira, ainda não é possível traçarmos um mapa geral da REA para a atividade biológica dos flavonóides.

2.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ALIMENTOS VEGETAIS

2.3.1. Evidências epidemiológicas

Vários trabalhos referenciam a atividade antioxidante de extratos de frutas, hortaliças, ervas e vegetais medicinais, analisados por diversos métodos, a fim de correlacionar o consumo de alimentos vegetais e os efeitos benéficos à saúde.

Embora seja difícil analisarmos a relação entre consumo de vegetais a partir da dieta e o risco de mortalidade, estudos realizados por Rissanen *et al.* (2003) verificaram uma relação inversa entre o consumo de alimentos vegetais (>408 g/dia) e a incidência de doenças cardiovasculares (DCV). Esta mesma relação foi observada por Johnsen *et al.* (2003) para a taxa de risco de derrame (54.506 indivíduos, 50-64 anos).

Por outro lado, nenhuma correlação entre o risco de derrame vs dieta vegetal foi observada para o grupo monitorado por Steffen *et al.* (2003) (5.792 indivíduos, 45-64 anos). Já a ingestão de cereais integrais foi inversamente associada à mortalidade por causas diversas e à incidência de DCV. Um dado interessante encontrado nesse trabalho foi a correlação negativa entre a ingestão de frutas e vegetais e as DCV, somente entre os afro-americanos, mas não entre a população branca.

Em algumas regiões da França, a ingestão regular de vinho tinto na dieta, que possui alta concentração de compostos fenólicos, foi relacionada à baixa mortalidade por DCV. Esta relação é conhecida como "paradoxo francês" (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; VIANA *et al.*, 1996). Os principais flavonóides presentes no vinho tinto são as catequinas com concentração de 190 mg/L. Outros flavonóides incluem a epicatequina, malvidina-3-glicosídeo, rutina e outros derivados de quercetina, derivados de miricetina e derivados de cianidina (FRANKEL; WATERHOUSE; KINSELLA, 1993).

Em adição, uma característica das dietas orientais é o alto consumo de chá verde que, além da presença de ácidos fenólicos e taninos, apresenta também flavonóides.

2.3.2. Atividade antioxidante de extratos vegetais

Alguns resultados relatados em literatura apontam grande correlação entre a atividade antioxidante de extratos vegetais com o conteúdo de flavonóides. Vinson *et al.* (1998) observaram que diversas hortaliças apresentavam atividade antioxidante em sistema LDL entre IC₅₀ 0,20 a 1,77 μ M equivalente em ácido gálico, na maioria similares ao da quercetina e rutina (0,224 e 0,512 μ M, respectivamente) e superiores ao da vitamina C, E e β -caroteno (1,45; 2,40; 4,30 μ M, respectivamente).

Kähkönen *et al.* (1999), utilizando a autooxidação do linoleato de metila, na concentração de 500 ppm de 92 extratos metanólicos de vegetais comestíveis e não comestíveis, observaram que todas as frutas denominadas “berries” e a maçã apresentaram os maiores valores de inibição da autooxidação, sendo estas ricas em antocianinas e descritas como potente antioxidante em vários sistemas de oxidação.

Em sistema β -caroteno, Velioglu *et al.* (1998) também verificaram que os vegetais mais ricos em antocianinas apresentaram os maiores valores de inibição na ordem de mirtilo>cebola roxa>cereja>batata roxa. Ainda, a atividade antioxidante do suco de uva roxa foi correlacionada ao conteúdo de antocianinas, enquanto que para o suco de uva branca foi correlacionada aos níveis de flavan-3-ol e hidroxicinamatos (FRANKEL *et al.*, 1998).

Entretanto, dentre oito cultivares de morango, a atividade antioxidante avaliada por TOSC (total oxyradical scavenging capacity assay) apresentou baixa correlação com o conteúdo de fenólicos totais e nenhuma correlação com o conteúdo de flavonóides ou antocianinas (MEYERS *et al.*, 2003). Estes resultados também foram encontrados por Cordenunsi *et al.* (2003) em cultivares de morango avaliados pelo método β -caroteno.

Apesar dos resultados controversos quanto à correlação entre fenólicos totais ou conteúdo de flavonóides com a atividade antioxidante, pouco se sabe sobre a contribuição individual de cada composto na atividade antioxidante total. Em mirtilo (*Vaccinium corymbosum* cv. Sierra), o ácido clorogênico foi o principal contribuidor na atividade antioxidante (~20,9%) analisado por ORAC, enquanto que as 11 antocianinas identificadas contribuíram juntas com 56,3% da atividade antioxidante total. Já em *Vaccinium macrocarpon* cv. Ben Lear, peonidina-3-galactosídeo sozinho foi responsável por 20,8% da ORAC, enquanto cianidina-3-galactosídeo em *Vaccinium vitis-idaea* cv. Amberland respondeu por 43% do total de

ORAC (ZHENG; WANG, 2003), o que demonstra o grande potencial das antocianinas como composto antioxidante.

Outros trabalhos relatam exaustivamente a atividade antioxidante de vegetais. Eles incluem diferentes partes da planta tais como sementes (feijão, trigo) (CHOU *et al.*, 2003; VELIOGLU *et al.*, 1998; VINSON *et al.*, 1998), frutas (goiaba, mirtilo, maçã, groselha, morango, nectarina, uva, abacaxi, banana, laranja, pêra, limão, ameixa) (DONOVAN *et al.*, 1998; FRANKEL *et al.*, 1998; GARCÍA-ALONSO *et al.*, 2003; HEINONEN *et al.*, 1998a e 1998b; KÄHKÖNEN *et al.*, 1999; MEYER *et al.*, 1997; ROBERTS E GORDON, 2003; SUN *et al.*, 2002; VELIOGLU *et al.*, 1998; VINSON *et al.*, 2001; VINSON *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1996), folhas (chá, espinafre, repolho, alface, salsa, brócoli) (CHU; CHANG; HSU, 2000; GAZZANI *et al.*, 1998; LEONG; SHUI, 2002; KÄHKÖNEN *et al.*, 1999; VELIOGLU *et al.*, 1998), entre outros.

De maneira geral, para que os compostos fenólicos sejam considerados antioxidantes e desempenhem seu papel biológico é necessário, portanto, que obedeçam a duas condições básicas: primeiro, quando presentes em baixa concentração, sejam capazes de inibir, retardar e prevenir a autooxidação ou oxidação mediada por radicais livres; e segundo, que o produto formado após o seqüestro do radical seja estável (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

2.4. BIODISPONIBILIDADE DE FLAVONÓIDES

Em geral, estima-se que o consumo de flavonóides e ácidos fenólicos é superior a 1 g/dia, independente do método de análise utilizado (método de Folin ou cromatográfico) (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Deste total, 25% correspondem à ingestão de antocianinas (BRINDLE; TIMBERLAKE, 1997). Por outro lado, Arabbi, Genovese e Lajolo (2004) estimaram a ingestão de flavonóides pela população brasileira, entre 60 a 106 mg/dia, valor este superior ao estimado a população de outros países europeus, como no caso da Finlândia, com 55 mg/dia e da Dinamarca, com 28 mg/dia (LUGÁSI; HÓVARI, 2000).

Contudo, quando analisamos os flavonóides como compostos antioxidantes e como alimento funcional, um importante fator a ser considerado é a forma como são absorvidos e estão presentes no organismo humano. Apesar dos estudos de REA considerarem que as formas agliconas dos flavonóides apresentam melhor atividade antioxidante, quando comparados às suas respectivas formas glicosiladas, geralmente os flavonóides se encontram glicosilados nos vegetais.

A definição do termo biodisponibilidade é controversa. A biodisponibilidade de nutrientes foi definida por O'Dell (1984) como "a proporção do nutriente no alimento que é absorvida e utilizada nos processos de transporte, assimilação e conversão à forma biologicamente ativa".

A principal barreira para a absorção de compostos é formada pelo epitélio intestinal e pelas diversas vias que podem ser seguidas para atravessá-lo (Figura 5). A importância de cada via depende das propriedades físico-químicas do composto em estudo, tais como a lipofilicidade, tamanho da molécula e ionização, além da possível afinidade por proteínas transportadoras (BOHETS *et al.*, 2001).

Dentre os mecanismos de absorção, o transporte passivo frequentemente ocorre através da membrana celular do enterócito (transporte transcelular), via predominante de drogas lipofílicas. Outra via passiva é o transporte através das junções entre os enterócitos (transporte paracelular), geralmente observado para drogas hidrofílicas e finalmente, o transporte carregado por transportadores presentes na membrana do enterócito (BOHETS *et al.*, 2001).

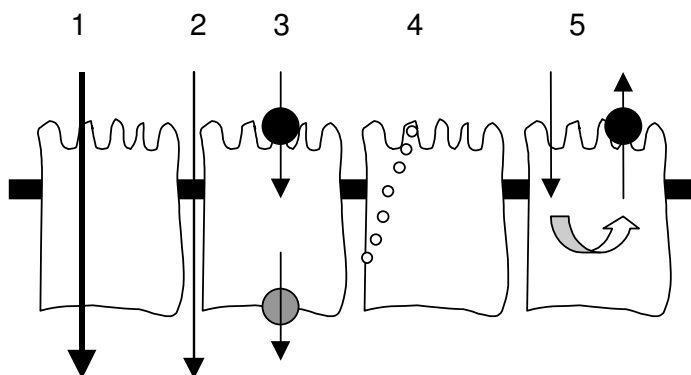


Figura 5: Possíveis rotas de transporte de drogas através do epitélio intestinal. (1) transporte transcelular passivo, (2) transporte paracelular passivo, (3) transporte ativo ou mediado por transportadores, (4) transcitose, (5) efluxo ativo mediado por transportador (BOHETS *et al.*, 2001).

Em humanos, admite-se três mecanismos de absorção de flavonóides. O primeiro envolve a difusão passiva da forma aglicona através da borda em escova da mucosa epitelial. Neste caso, o flavonóide sofre hidrólise da ligação glicosídica por β -glicosidases endógenas (GEE *et al.*, 2000) e a absorção é dependente do coeficiente de partição da forma aglicona e da especificidade da enzima em relação ao açúcar ligado.

Várias β -glicosidases estão presentes no intestino delgado. Dentre elas incluem-se: a glicocerebrosidase (EC 3.2.1.62); a lactase floridzina hidrolase (LPH) (EC 3.2.1.23); e a glicosidase citosólica (EC 3.2.1.21). Todas estas enzimas, com exceção da LPH, atuam intracelularmente e requerem o transporte dos flavonóides glicosilados para o interior das células do epitélio e, neste caso, depende do coeficiente de partição dos compostos em questão (DAY *et al.*, 2000a).

A LPH está presente na parte externa da borda em escova do epitélio e é primariamente responsável pela hidrólise da lactose do leite. Além deste sítio, a LPH possui um segundo sítio capaz de hidrolisar outros componentes do leite, a β -glicosilceramida e uma dihidrochalcona glicosilada, a floridzina (DAY *et al.*, 2000a). A desglicosilação não enzimática dos flavonóides aparentemente não ocorre em

condições estomacais e intestinais, como demonstrado para os conjugados da quercetina (GEE *et al.*, 1998). Entretanto, condições simuladas do suco gástrico demonstraram a degradação da proantocianidina em monômeros de epicatequina ou em dímeros (SPENCER *et al.*; 2000). Contudo, ao contrário desta evidência, uma recente investigação em humanos sugere que nenhuma clivagem de procianidina ocorre no estômago de indivíduos após a ingestão de achocolatados (RIOS *et al.*, 2002).

A hidrólise do flavonóide glicosilado também depende do tipo de açúcar presente na estrutura fundamental do flavonóide. As glicosidases presentes no intestino delgado não atuam sobre os ramnoglicosídeos. Desta maneira, os flavonóides conjugados a estes açúcares não seriam absorvidos no intestino delgado (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

A velocidade de absorção da quercetina-3-*O*-ramnoglicosídeo é menor do que a quercetina-4'-glicosídeo ($T_{\text{máx.}}$ sangue de 6h e < 0,5 h, respectivamente), sendo a biodisponibilidade 20% menor, como seria esperado, já que a quercetina-4'-glicosídeo é absorvida no intestino delgado após hidrólise por LPH ou outra glicosidase e os ramnoglicosídeos somente após hidrólise pela enzimas da flora microbiana do intestino grosso (HOLLMAN *et al.*, 1999). A posição dos açúcares aparentemente não interfere na biodisponibilidade, uma vez que quercetina 3-glicosídeo e 4'-glicosídeo de cebola apresentaram a mesma biodisponibilidade em humanos (Olthof *et al.*, 2000). Entretanto, Day *et al.* (2003) demonstraram que a hidrólise da quercetina-4'-glucosídeo pela LPH foi 10 vezes maior quando comparada a quercetina-3-glucosídeo, sendo assim mais biodisponível.

Além da biodisponibilidade, a desglicosilação pela LPH também afeta a atividade antioxidante total. Em homogenato de intestino de rato submetido a oxidação por $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ e ácido ascórbico, a quercetina-4'-glucosídeo apresentou maior atividade antioxidante em relação à quercetina-3-glucosídeo e comparável à respectiva forma aglicona. A diferença na atividade antioxidante dos dois glicosídeos foi atribuída principalmente à presença da forma aglicona no meio, proveniente da maior desglicosilação da quercetina-4'-glucosídeo pela LPH (MUROTA *et al.*, 2004) e não somente à diferença estrutural entre os dois.

Se a absorção dos flavonóides glicosilados não ocorrer no intestino delgado, estes estão sujeitos ao metabolismo microbiano e à extensiva degradação no cólon, resultando em menor biodisponibilidade.

Além do maior tempo para a absorção dos flavonóides ramnoglicosídeos, a metabolização destes pela flora microbiana também deve ser considerada. Em sistema de fermentação *in vitro*, rutina, hesperidina e naringina, que são os conjugados ramnoglicosídicos da quercetina, hesperetina e naringenina, respectivamente, foram deglicosilados pela flora fecal humana após 72 horas. Entretanto, a quercetina não foi acumulada no meio, sendo provavelmente metabolizada pela flora colônica (JUSTESEN *et al.*, 2000). Desta maneira, quando a flora microbiana é considerada, o processo de absorção frequentemente diminui visto que a flora microbiana degrada a forma aglicona dos flavonóides a vários ácidos aromáticos simples (MANACH *et al.*, 2004).

Em complementação ao mecanismo de difusão passiva, um segundo mecanismo envolve a absorção das formas glicosídicas, sem prévia hidrólise, através da interação do flavonóide glicosilado com o transportador de glicose sódio dependente (SGLT1) presente na borda em escova da mucosa epitelial (GEE *et al.*, 1998). Esse segundo mecanismo foi proposto após a análise de absorção da quercetina-3-glucosídeo em rato perfusado, detectado-se no sangue tanto a forma glicosídica quanto a forma aglicona (SPENCER *et al.*, 1999).

Day *et al.* (2003) observaram que os glicosídeos da quercetina são principalmente desglicosilados pela LPH à sua forma aglicona e esta absorvida por difusão passiva. Entretanto, a forma glicosilada é também transportada pela SGLT1 sendo posteriormente deglicosilada pelas β -glicosidases citosólicas. Day *et al.* (2003) também encontraram que a quercetina-3-glucosídeo parece utilizar predominantemente a rota de hidrólise pela LPH, enquanto que a quercetina-4'-glucosídeo utiliza as duas rotas de absorção. Boyer, Brown e Liu (2004) também encontraram que células Caco-2 quando incubadas com quercetina e quercetina-3-glucosídeo pura ou de cebola, acumulam mais a forma aglicona do que a forma glicosilada. Além disso, a concentração da forma aglicona quando incubada com extrato de cebola foi superior à incubação com quercetina pura, provavelmente devido a hidrólise das formas glucosiladas do extrato de cebola pela LPH.

Ainda, Cao *et al.* (2001) após administração de extrato rico em antocianinas a mulheres idosas, observaram que estas são absorvidas totalmente na forma glicosilada, sendo que o tempo de meia vida no plasma foi calculado em 132,6 min.

Aparentemente, o número de açúcares no flavonóide não restringe o transporte de antocianinas pela SGLT1. Em estudo com humanos, os derivados

glicosilados de delphinidina e cianidina foram absorvidos na forma intacta 1,25 - 1,75 horas após ingestão (MATSUMOTO *et al.*, 2001). Para a maioria dos flavonóides, o pico máximo alcançado no sangue foi verificado de uma a três horas após ingestão, sendo excretados rapidamente.

Embora a ingestão de flavonóides totais seja considerada alta, estudos demonstram que somente 0,002-0,003% do total de antocianinas ingeridas é absorvido, o que corresponde a aproximadamente 0,454 µg/Kg de antocianina absorvida após três horas da ingestão (1,2 g de antocianina) (MAZZA; COTTRELL; HOLUB, 2002).

Embora a absorção dos flavonóides ocorra basicamente através desses três mecanismos, polifenóis do chá verde tais como galato de epicatequina e galato de epigallocatequina marcadamente inibem de maneira competitiva a atividade da SGLT1, como uma molécula antagônica, embora eles não sejam transportados por esta via (KOBAYASHI *et al.*, 2000). Floridzina também inibe a SGLT1 mas não é transportada para o interior da borda em escova do epitélio (HIRAYAMA *et al.*, 1996).

Além do mecanismo e a forma de absorção dos flavonóides, outro fator a ser considerado é a sua metabolização. O fígado é o principal sítio de metabolização dos flavonóides, entretanto, a mucosa intestinal também possui várias enzimas de conjugação metoxilação. A presença de derivados metoxilados dos flavonóides tanto no plasma quanto no intestino pode ser o resultado da ação da catecol-O-metiltransferase intestinal (COMT; EC 2.1.1.6) (CRESPY *et al.*, 1999; DONOVAN *et al.*, 2001). Além da metoxilação, os flavonóides também aparecem na forma conjugada ao ácido glucurônico no intestino delgado (CRESPY *et al.*, 1999; SPENCER *et al.*, 1999). A glucuronidação de flavonóides no intestino é dependente da estrutura como observado em intestino evertido. Flavonóides com um grupo hidroxila substituído no anel B (p.ex. hesperetina) foram menos conjugados ao ácido glucurônico em comparação aos flavonóides com 3,4'-orto-dihidroxila no anel B, os quais foram transferidos predominantemente como glucuronídeos (SPENCER *et al.*, 1999). A conjugação dos polifenóis com o ácido glucurônico é catalisada pela UDP glucuronosil transferase (UDPGT; EC 2.4.1.17), situada no retículo endoplasmático de intestino (principalmente jejuno), fígado e rim.

Após alcançarem a circulação sangüínea, muitos dos flavonóides absorvidos são transportados ao fígado ligados à albumina, enquanto que os flavonóides lipossolúveis são provavelmente absorvidos via circulação linfática. O fígado é o

principal local de conversão enzimática, particularmente a metilação e glucuronidação (TSUDA, HORIO; OSAWA, 1999). No fígado, os flavonóides são metabolizados, sofrendo modificações principalmente metilações (resultando em 3'-e 4'-O-metil éster), hidroxilações nas posições 2', 3' e 4' ou redução do grupo carbonila no anel heterocíclico das flavanonas. No fígado são também formados os conjugados pelo acoplamento com o grupamento sulfato ou ácido glucurônico. Os flavonóides conjugados são excretados pela urina ou bile, dependendo do metabólito formado (MANACH *et al.*, 1996).

Apesar dos inúmeros estudos sobre a biodisponibilidade dos flavonóides, pouco ainda se sabe sobre as possíveis interações com as proteínas plasmáticas, metabolização e forma de excreção.

2.5. MÉTODOS PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

De maneira geral, uma substância antioxidante pode ser definida como uma substância química que inibe a oxidação ou, qualquer substância que quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação do mesmo (ABDALA, 1993). A ação antioxidante não se restringe somente à inibição da oxidação lipídica, mas à oxidação de outras moléculas tais como o DNA e proteínas.

Durante a oxidação lipídica o antioxidante pode atuar de várias maneiras, atuando como quelantes de metais pró-oxidantes, sequestradores de radicais livres e por decomposição de peróxidos. Geralmente, em um sistema complexo, admite-se que mais de um mecanismo esteja envolvido causando o efeito sinérgico (MOURE *et al.*, 2001).

Segundo Silva, Borges e Ferreira (1999) os antioxidantes podem ser classificados em: antioxidantes primários, aqueles que interrompem a cadeia da reação de oxidação lipídica através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, e antioxidantes secundários, aqueles compostos que reduzem a velocidade de iniciação da oxidação.

Existem diferentes compostos antioxidantes presentes em tecidos animais e vegetais, tornando difícil a análise de cada um separadamente. Diversas metodologias têm sido desenvolvidas recentemente para avaliar a atividade antioxidante de amostras biológicas e extratos vegetais. Os mais freqüentes métodos incluem avaliações de danos oxidativos ao DNA e proteínas, avaliações dos níveis de enzimas antioxidantes ou de compostos antioxidantes e a avaliação dos danos oxidativos em lipídeos.

Muitos dos métodos químicos são baseados na habilidade sequestradora dos antioxidantes de diferentes radicais livres, tais como radical superóxido, radical hidroxila, radical alquila e radical peroxila e, portanto, inibindo a oxidação de um substrato alvo. Esta propriedade é monitorada através de um indicador da oxidação que pode ser o desaparecimento do substrato lipídico, aparecimento de produtos de oxidação ou consumo de O₂. O substrato alvo pode ser desde triacilgliceróis puros, óleos comerciais e até o DNA, dependendo da especificidade do estudo. Lipossomos e microsossomos também são utilizados no estudo da oxidação em

sistemas que se assemelham às condições *in vivo*, devido à similaridade entre a composição da membrana lipídica e a membrana biológica.

A inibição da oxidação do LDL *in vitro* também é bastante utilizada para avaliar a atividade antioxidante de compostos, tendo como vantagem simular a oxidação de LDL que está relacionada à arterosclerose.

Além da habilidade de quelar radicais livres, o uso de cátions metálicos (ferro e cobre) também é bastante utilizado para avaliar a capacidade quelante de metais juntamente com a habilidade de antioxidante secundário. Entretanto, dependendo das condições experimentais, metais como o Fe^{3+} podem ser reduzidos pelos compostos antioxidantes a íon Fe^{2+} e, desta maneira, o que anteriormente deveria atuar como antioxidante atua agora como pró-oxidante.

Outros testes utilizam como princípio a redução de radicais livres estáveis tais como o DPPH (radical α,α -difetil- β -picrilhidrazina) e radicais catiônicos ABTS (2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiozolina)-6-sulfônico), onde na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio observa-se redução dos mesmos e perda de suas características cromóforas.

Os quadros 2 e 3 exemplificam os métodos mais freqüentes utilizados para a avaliação da atividade antioxidante, tanto de extratos vegetais quanto de flavonóides purificados.

De qualquer maneira, não existe um método universal para avaliar a atividade antioxidante já que as metodologias geralmente são pontuais ou avaliam uma única propriedade.

Assim, o uso de diferentes métodos é indicado para predizer a efetividade de um antioxidante frente às diferentes reações de oxidação.

Quadro 2: Métodos de avaliação da atividade antioxidante de flavonóides em extratos vegetais e purificados.

Princípio	Substrato	Iniciador	Detector	Método de detecção	Referência
Peroxidação lipídica	Microssomo de fígado	CCl ₄ /NADP/G-6-P	TBARS	Método TBA	Velioglu <i>et al.</i> , 1998
	Lipossomo	Acetato de Cobre	Hexanal Dieno conjugado	CG-headspace Monitoramento 234 nm	Heinonen <i>et al.</i> , 1998a Satué-Gracia <i>et al.</i> , 1997 Huang e Frankel, 1997
		FeCl ₂	Decaimento na fluorescência de DPH-PA	Monitoramento 384 nm	Seeram e Nair, 2002 Arora <i>et al.</i> , 1998
		FeSO ₄ AAPH	TBARS Dieno conjugado	Método TBA Monitoramento 234 nm	Liao e Yin, 2000 Roberts e Gordon, 2003
	Óleo de milho	Acetato de cobre	Hexanal Dieno conjugado	CG-headspace Monitoramento 234 nm	Huang e Frankel, 1997
	Emulsão O/A	Acetato de cobre	Hexanal Dieno conjugado	CG-headspace Monitoramento 234 nm	Huang e Frankel, 1997
	LDL	CuSO ₄	Hexanal Dieno conjugado TBARS	CG-headspace Monitoramento 234 nm Método TBA	Heinonen <i>et al.</i> , 1998a Satué-Gracia <i>et al.</i> , 1997 Frankel <i>et al.</i> , 1998 Vinson <i>et al.</i> , 2001
	Metil linoleato	40°C	Dieno conjugado	Monitoramento 234 nm	Heinonen <i>et al.</i> , 1998b Chu, Chang, Hsu, 2000 Kähkönen <i>et al.</i> , 1999
	Células pancreáticas β	H ₂ O ₂	TBARS	Eletron spin resonance Método TBA	Pedrielli e Skibsted, 2002 Lapidot, Walker, Kanner 2002
	Membrana de eritrócito	FeSO ₄	TBARS	Método TBA	Liao e Yin, 2000
	β-caroteno	Ácido linoléico	Descoramento	Monitoramento 470 nm	Gazzani <i>et al.</i> , 1998 Velioglu <i>et al.</i> , 1998 Burda e Oleszek, 2001 Cardador-Martínez <i>et al.</i> , 2002

Continuação do Quadro 2.

Princípio	Substrato	Iniciador	Detector	Método de detecção	Referência
Seqüestradores de radicais livres	Radical ABTS		Descoramento	Monitoramento 417 nm	Leong e Shui, 2002
	Radical DPPH		Descoramento	Monitoramento 517 nm	Chu, Chang, Hsu, 2000 Burda e Oleszek, 2001
Sistema superóxido	Azul de tetrazolium	Metosulfato de fenazina	Espectro de redução	Monitoramento 580 nm	Chu, Chang, Hsu, 2000 Haraguchi <i>et al.</i> , 1996 Nakamura <i>et al.</i> , 1998
		Xantina/Xantina oxidase	Espectro de redução	Monitoramento 580 nm	Winterbourn e Sutton, 1986
Oxidação de outros substratos	β -ficoeritrina	AAPH	Decaimento na fluorescência	Monitoramento 540/565 nm	Cao, Sofic, Prior 1997
		H ₂ O ₂ -Cu	Decaimento na fluorescência	Monitoramento 540/565 nm	Wang, Cao, Prior, 1997 Cao, Sofic, Prior 1997
		Cu	Decaimento na fluorescência	Monitoramento 540/565 nm	Cao, Sofic, Prior 1997
	Deoxiribose/H ₂ O ₂	Fe/ácido ascórbico	TBARS	Método TBA	Chu, Chang, Hsu, 2000 Laughton <i>et al.</i> , 1989 Papetti, Daglia, Gazzani, 2002
Poder redutor	TPTZ-Fe ³⁺	Amostra	TPTZ-Fe ²⁺	Colorimétrico 593 nm	Halvorsen <i>et al.</i> , 2002

ABTS- 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
DPPH- 1,1-difenil-2-picril-hidrazina
AAPH- 2,2'-azobis (2-amidinopropano)dihidroclorato
TBARS- compostos tiobarbitúrico reativos
DPH-PA- 3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]fenil ácido propiônico
TPTZ- 2,4,6- tripiridil-s-triazina
TBA- ácido tiobarbitúrico

Quadro 3: Métodos de avaliação da atividade biológica de flavonóides.

Princípio	Substrato	Iniciador	Detector	Método de detecção	Referência
Atividade antiproliferativa	Céls hepáticas cancerosas humanas (HepG ₂)		Crescimento celular	Análise por MTS ^a	Sun <i>et al.</i> , 2002
Inibição enzimática: Ciclo-oxigenase Lipoxigenase			Eicosanóides marcados	Radio-TLC ^b	Moroney <i>et al.</i> , 1988
Oxidação do DNA	Cél hepatócito de rato	Citrato de amônia férrico/ác. nitriloacético	8-oxoguanina	CG-MS ^c	Abalea <i>et al.</i> , 1999
	Linfócito T	H ₂ O ₂	Danos no DNA	Método TBA Método cometa (eletroforese)	Johnson e Loo, 2000 Duthie <i>et al.</i> , 1997
	plasmídio	Oxido nítrico	8-oxo-guanina	CG-MS	Oshima <i>et al.</i> , 1998

^aMTS- MTS based cell titer 96 (nonradioactivity cell proliferation assay)

^bCG-MS- Cromatografia gasosa-espectroscopia de massa

^cTLC- cromatografia em camada delgada

3. OBJETIVOS

Em decorrência da indiscutível relação entre ingestão de alimentos e saúde, o presente trabalho tem como objetivos:

- 3.1. Avaliar a atividade antioxidante de flavonóides de alguns vegetais consumidos no Brasil;
- 3.2. A partir dessas avaliações, identificar as estruturas dos principais componentes da amora silvestre (*Morus* sp.);
- 3.3. Estudar a absorção dos flavonóides identificados da amora silvestre (*Morus* sp.).

4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ALIMENTOS VEGETAIS

4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com o propósito de se fazer uma avaliação, em primeira instância, do potencial antioxidante de flavonóides de frutas, hortaliças e polpas congeladas de fruta comerciais, consumidos na dieta humana, extratos destes vegetais foram testados quanto a sua capacidade em inibir a oxidação do lipossomo e também a oxidação do β -caroteno.

Há um grande número de fatores que influenciam a efetividade de um antioxidante em sistemas biológicos e modelos de oxidação. Entre eles podemos citar as propriedades de partição lipídeo/água, condições de oxidação e estado físico do substrato oxidável. Desta maneira, torna-se difícil avaliar a influência de todos estes parâmetros com uma única metodologia, fazendo-se necessário o uso de mais de um protocolo de análise. Para este trabalho, foram selecionados dois métodos de avaliação da atividade antioxidante dos extratos vegetais: o método de oxidação do lipossomo e o método de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.

O método de oxidação do lipossomo avalia a propriedade de determinadas substâncias em seqüestrar radicais peroxila formados a partir da oxidação de lipídeos catalisada pelo cobre, bem como a capacidade em quelar metais pró-oxidantes (MURAKAMI *et al.*, 2002). Este sistema foi escolhido porque permite investigar a atividade antioxidante em um modelo de membrana biológica. Além disso, permite avaliar concomitantemente antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis sem a presença de um co-solvente (ROBERTS; GORDON, 2003).

O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico também permite avaliar a capacidade de seqüestro de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico (SILVA, BORGES; FERREIRA, 1999). Trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. REAGENTES QUÍMICOS

Os reagentes ácido ascórbico, β -caroteno, ácido linoléico, ácido tricloroacético, butilhidroxitolueno e lecitina de soja (40% de fosfatidilcolina) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, E.U.A.). O ácido tiobarbitúrico foi obtido da Merck Chemical Co. (Darmstadt, Alemanha) e os demais reagentes foram de grau analítico e grau HPLC, quando requerido.

4.2.2. MATERIAIS

4.2.2.1. Amostras vegetais

Para a avaliação da atividade antioxidante total de alimentos vegetais normalmente consumidos na dieta, as amostras de hortaliças, frutas e polpas congeladas de fruta foram obtidas no comércio local ou na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo- CEAGESP no período compreendido entre abril de 2002 a fevereiro de 2003.

4.2.2.2. Preparo da amostra

Após os vegetais serem lavados em água corrente, as porções comestíveis foram cortadas em pedaços pequenos e congeladas em nitrogênio líquido sendo mantidas em ultra-freezer à temperatura de -70°C até sua utilização. As amostras de polpa congelada de fruta foram também estocadas em ultra-freezer à mesma temperatura.

4.2.3. MÉTODOS

4.2.3.1. Extração

Os vegetais ou polpas congeladas de fruta foram triturados em almofariz e pistilo com nitrogênio líquido. Quantidades de 1,0-1,5 g foram homogeneizadas por dois minutos utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça) em metanol (MeOH) 70% ou MeOH/água/ácido acético (AcOH) na proporção de 70:30:5 v/v para as amostras que continham antocianinas. O extrato assim obtido foi posteriormente centrifugado a 10.000 g/10 min/ 4°C e o resíduo foi re-extraído nas mesmas condições. O sobrenadante das duas extrações foi agregado obtendo-se assim o extrato metanólico bruto (EMB). As extrações foram realizadas em duplicata.

4.2.3.2. Extração em fase sólida (SPE).

Para a purificação parcial dos flavonóides, alíquotas do EMB foram concentradas em rotaevaporador (Rotavapor[®]120, Büchi, Flawil, Suíça) à temperatura de 40°C até a remoção do MeOH. A amostra livre de MeOH foi passada em coluna de 1 g de poliamida (CC 6, Macherey-Nagel, Germany), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology) e pré-condicionada pela passagem de 20 mL de MeOH e 60 mL de água destilada. Após aplicação do extrato, a coluna foi lavada com 20 mL de água e a eluição dos flavonóides foi feita com 50 mL de MeOH para flavonóides neutros, seguido de 50 mL de MeOH-amônio (99,5:0,5 v/v) para eluição dos flavonóides ácidos (PRICE *et al.*, 1999). O fluxo através da coluna foi controlado por meio de manifold (Visiprep 24 DL Supelco, Bellefonte, PA).

Os eluatos assim obtidos foram secos completamente em rotaevaporador a 40°C sob vácuo e ressuspendidas em 1 mL de MeOH (grau HPLC) ou MeOH:AcOH (95:5 v/v) para as amostras contendo antocianina.

4.2.3.3. Determinação de ácido ascórbico

O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado após extração com ácido metafosfórico 0,3% e adicionado de ditioneitol para a redução do ácido desidroascórbico (RIZZOLO; FORNI; POLESELO, 1984). A quantificação foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Hewlett-Packard 1100) e detector com arranjo de diodo (DAD), em coluna μ Bondpack C18 (300mm x 3.9 mm i.d., Waters, Milford, MA). A fase móvel foi constituída de tampão acetato 0,2 M pH 4,2 com fluxo de 1,5 mL/min e a detecção realizada em 262 nm. O ácido ascórbico foi identificado a partir do tempo de retenção e identidade de espectro. O ácido desidroascórbico foi calculado pela diferença entre o conteúdo de ácido ascórbico total (extrato tratado com ditioneitol) e o conteúdo de ácido ascórbico.

4.2.3.4. Determinação de fenólicos totais.

A determinação de fenólicos totais foi realizada pelo método de Swain e Hillis (1959), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e o ácido gálico (AG) como padrão. O resultado foi expresso como mg AG/100 g base úmida (b.u.).

4.2.3.5. Determinação da atividade antioxidante total

A atividade antioxidante total dos extratos metanólico bruto (EMB) e eluatos de flavonóides ácidos e flavonóides neutros foi analisada utilizando-se dois métodos: Método de oxidação do lipossomo catalisada pelo cobre e pelo método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.

4.2.3.5.1. Atividade antioxidante no sistema lipossomo

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método descrito por Cao e Zhu (1997), baseado na inibição da oxidação do lipossomo catalisada pelo cobre. Para a preparação da vesícula, alíquota de 4 mL de lecitina de soja (2 g/20 mL em clorofórmio/metanol 20:10 v/v) foi evaporada sob nitrogênio até a formação de uma película seca e dispersa em 40 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M (concentração final de fosfatidilcolina de 4 mg/mL). Após rápida e vigorosa agitação, a solução foi sonicada por 20 minutos sob nitrogênio no escuro para a obtenção da vesícula multilamelar.

Para a determinação da atividade antioxidante, 2,88 mL da solução de lipossomo foram adicionados de 90 μ L de EMB ou eluatos obtidos a partir da SPE (concentração final de 10 e 50 μ M equivalente de AG) e 30 μ L de acetato de cobre 5 mM (concentração final de 50 μ M). A mistura foi mantida em banho-maria a 37°C por duas horas. Duas alíquotas de 0,5 mL foram retiradas antes da incubação e após duas horas de reação de oxidação e adicionadas de 50 μ L de BHT para a análise de compostos reativos com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).

A análise de TBARS foi realizada de acordo com Oteiza e Bechara (1993), onde 0,5 mL do lipossomo oxidado é acrescido da mistura reativa (ácido tiobarbitúrico 0,375% p/v, ácido tricloroacético 15% p/v em 0,25 N HCl) e mantida em banho-maria fervente por 15 minutos. Os cromóforos foram extraídos com 1,4 mL de n-butanol sob forte agitação em vórtex e centrifugado a 4°C por 10 min a 3.000 g. A determinação foi efetuada em espectrofotômetro a 535 nm.

A porcentagem de inibição da oxidação foi calculada pela porcentagem de inibição relativa da amostra em relação ao controle (100% de inibição) no tempo de duas horas de oxidação. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.2.3.5.2. Atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante dos EMB e eluatos de flavonóides ácidos e neutros também foram avaliadas pelo método de descolorimento do β -caroteno, seguindo modificações descritas por Miller (1971).

Para o preparo da solução reativa, alíquota de 20 μ L de uma solução de β -caroteno em clorofórmio (2 mg/mL) foi misturado com 40 μ L de ácido linoléico, 1 mL de clorofórmio e 0,4 mL de Tween 40. Posteriormente, o clorofórmio foi evaporado até completa secagem sob nitrogênio. Após evaporação do clorofórmio, foram adicionados entre 100 e 120 mL de água destilada, tratada com borbulhamento de oxigênio durante 30 minutos. Esta solução deve apresentar densidade ótica entre 0,6 e 0,7 no comprimento de onda de 470 nm.

Para a reação de oxidação, alíquotas (100 μ L) de EMB ou eluatos obtidos a partir da SPE (10 e 50 μ M AG) foram adicionados a 2,9 mL da solução de β -caroteno em cubeta de plástico. As amostras foram então submetidas a autooxidação em banho-maria a 50°C por duas horas. A absorbância da solução foi imediatamente medida a 470 nm e medidas em intervalos de 15 minutos durante 2 horas, usando espectrofotômetro Hewlett Packard 8453.

Todas as determinações foram realizadas em cinco repetições e acompanhadas por um controle sem antioxidante e um outro com antioxidante sintético (BHT).

A porcentagem de inibição da oxidação foi calculada pela diferença entre o decaimento da absorbância da amostra, correlacionado ao decaimento da absorbância do controle e expresso em porcentagem.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antioxidante foi determinada em duas concentrações (10 e 50 μM equivalente de ácido gálico) e avaliadas no extrato metanólico bruto (EMB) e eluatos da separação em fase sólida (SPE) de onde obtivemos flavonóides neutros (FN) e ácidos (FA) (PRICE *et al.*, 1999). Para as amostras que não contêm antocianinas, os FN e FA foram somados.

A atividade antioxidante de frutas e polpas congeladas de fruta não foi analisada pelo sistema lipossomo porque os açúcares reagem com o reagente TBA (CHATTERJEE e AGARWAL, 1988), interferindo nos resultados.

4.3.1. Atividade antioxidante de frutas

A Tabela 1 apresenta a capacidade antioxidante, em sistema β -caroteno/ácido linoléico, de extrato metanólico bruto (EMB) de frutas, expresso em porcentagem de inibição. A atividade antioxidante foi arbitrariamente classificada em alta (>70% de inibição da oxidação), intermediária (40-70% de inibição) e baixa (< 40% de inibição).

A atividade antioxidante de todos os extratos testados dependeu da concentração. A 10 μM , com exceção da casca de maçã Gala e amora silvestre que apresentaram atividade intermediária, porém maior que o BHT, todas as demais frutas tiveram baixa porcentagem de inibição da oxidação do β -caroteno. Já na concentração de 50 μM , casca de maçã Gala e amora silvestre apresentaram alta capacidade antioxidante (inibição > 70%), similar ao antioxidante sintético BHT. Amostras de carambola, abacaxi, jambolão e polpa de goiaba vermelha apresentaram atividade intermediária (inibição entre 40-70%) na concentração de 50 μM e as demais frutas apresentaram baixa atividade antioxidante (inibição < 40%).

O EMB de polpa de goiaba vermelha, na concentração de 10 e 50 μM , foi de duas a três vezes mais efetiva do que a respectiva casca em inibir a oxidação do β -caroteno. Por outro lado, o EMB de casca de goiaba branca apresentou uma inibição de 1,5 vezes maior em relação à polpa, resultado similar ao observado por Jiménez-Scrig *et al.* (2001) em três sistemas de oxidação, sendo correlacionado com o conteúdo de fenólicos totais nas diferentes porções.

Tabela 1: Atividade antioxidante de extrato metanólico bruto de frutas analisada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico.

Amostra	Inibição da oxidação (%)	
	10 μ M*	50 μ M*
Carambola	23 \pm 4	53 \pm 1
Maçã Gala, polpa	9 \pm 2	34 \pm 3
Maçã Gala, casca	68 \pm 3	80 \pm 5
Nêspera	9 \pm 2	34 \pm 4
Abacaxi	41 \pm 3	49 \pm 3
Amora silvestre	53 \pm 2	75 \pm 3
Jambolão	17 \pm 2	42 \pm 2
Goiaba branca, polpa	12 \pm 1	15 \pm 1
Goiaba branca, casca	17 \pm 2	23 \pm 2
Goiaba vermelha, polpa	37 \pm 3	53 \pm 5
Goiaba vermelha, casca	12 \pm 1	30 \pm 2
BHT	33 \pm 3	78 \pm 1

A concentração foi expressa em equivalente de ácido gálico. Resultados expressos como média \pm DP (n=4).

Para a maçã Gala, a atividade antioxidante foi de sete e 2,5 vezes maior para as concentrações de 10 e 50 μ M, respectivamente, para o EMB de casca em relação à polpa. Usando TOSC (“Total antiradical scavenging assay”), Wolfe, Wu e Liu (2003) também encontraram nas variedades de maçã uma atividade inibitória de seis e quatro vezes maior em extrato acetônico bruto da casca em relação à polpa e fruta inteira, respectivamente. A alta atividade antioxidante da casca de maçã foi correlacionada ao conteúdo de fenólicos totais, flavonóides totais e à presença de derivados de quercetina e cianidina, os quais estão presentes em menor quantidade na polpa.

A Tabela 2 exibe a atividade antioxidante em sistemas lipossomo e β -caroteno/ácido linoléico dos flavonóides purificados em coluna de poliamida. A SPE remove do extrato os compostos hidrofílicos tais como açúcares e ácido ascórbico, restando na coluna os flavonóides e alguns ácidos fenólicos.

Tabela 2: Atividade antioxidante de Flavonóides neutros e ácidos de frutas analisadas pelos sistemas β -caroteno/ácido linoléico e lipossomo.

	Sistema β -caroteno/ácido linoléico		Sistema lipossomo	
	Inibição (%)		Inibição (%)	
	10 μ M*	50 μ M*	10 μ M*	50 μ M*
Carambola	15 \pm 4	54 \pm 4	-5 \pm 3	-24 \pm 4
Maçã Gala, polpa	1 \pm 3	24 \pm 2	-13 \pm 1	-21 \pm 2
Maçã Gala, casca (FN)	59 \pm 2	68 \pm 1	87 \pm 1	90 \pm 1
Maçã Gala, casca (FA)	63 \pm 3	76 \pm 3	91 \pm 2	92 \pm 4
Nêspira	1 \pm 4	19 \pm 3	-10 \pm 2	-40 \pm 4
Abacaxi	51 \pm 3	58 \pm 3	12 \pm 2	46 \pm 4
Amora silvestre (FN)	67 \pm 2	78 \pm 3	89 \pm 1	100 \pm 2
Amora silvestre (FA)	69 \pm 3	81 \pm 1	89 \pm 1	88 \pm 1
Jambolão (FN)	60 \pm 2	67 \pm 3	90 \pm 2	97 \pm 3
Jambolão (FA)	69 \pm 5	73 \pm 4	88 \pm 2	90 \pm 2
Goiaba branca, polpa	42 \pm 2	59 \pm 4	26 \pm 2	49 \pm 2
Goiaba branca, casca	44 \pm 3	59 \pm 4	1 \pm 2	17 \pm 1
Goiaba vermelha, polpa	46 \pm 3	68 \pm 3	25 \pm 2	53 \pm 4
Goiaba vermelha, casca	42 \pm 4	69 \pm 4	3 \pm 2	23 \pm 2
BHT	33 \pm 3	78 \pm 1	10 \pm 3	69 \pm 4
Ácido ascórbico	-5 \pm 3	- 12 \pm 2	-6 \pm 2	-18 \pm 3

* A concentração foi expressa como equivalente de ácido gálico. FN- Flavonóides neutros; FA- Flavonóides ácidos. Resultados expressos como média \pm DP (n=4).

No sistema β -caroteno/ácido linoléico, os eluatos contendo flavonóides de frutas mostraram maior atividade antioxidante do que os respectivos EMB, com exceção dos eluatos de polpa de maçã Gala e nêspira. Os EMB de polpa de maçã Gala e nêspira apresentaram valores de atividade antioxidante similares, de aproximadamente 9% a 10 μ M e de 34% de inibição a 50 μ M, com queda para valores de 1 e 20% (10 e 50 μ M, respectivamente) após purificação em SPE. Esta

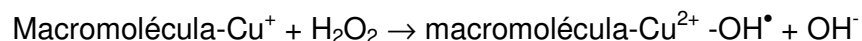
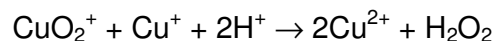
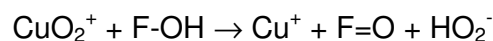
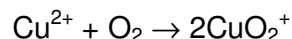
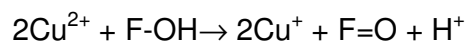
perda na atividade antioxidante pode ser devido a compostos lixiviados na água de lavagem durante SPE.

Os eluatos que apresentaram as maiores porcentagens de inibição, na concentração de 10 e 50 μM , nos dois sistemas de oxidação, foram os FN e FA de casca de maçã Gala, amora silvestre e jambolão. Para estas amostras, a atividade no sistema β -caroteno/ácido linoléico foi intermediária na concentração de 10 μM e alta a 50 μM . Já no sistema lipossomo, foram obtidos valores entre 90 e 100% de inibição, nas duas concentrações testadas.

No sistema lipossomo, os eluatos de carambola, polpa de maçã Gala e nêspira, apresentaram atividade pró-oxidante, em ambas as concentrações. Entretanto, estas mesmas amostras foram antioxidantes no sistema β -caroteno.

O comportamento antioxidante e pró-oxidante dos flavonóides depende muito do sistema de análise utilizado. Cao, Sofic e Prior (1996) observaram atividade pró-oxidante em extrato de chá utilizando ORAC (Total oxygen radical absorbance assay) em presença de cobre, provavelmente devido à reação direta entre os flavonóides, o cobre e o oxigênio, formando espécies mais reativas; enquanto que este mesmo extrato mostrou alta atividade antioxidante quando houve a substituição do Cu pelo oxidante 2,2'-azobis(2-amidinopropano)dihidrocloreto (AAPH).

Desta maneira, Cao, Sofic e Prior (1997) apresentaram uma proposta de geração de espécies reativas a partir da reação entre cobre-flavonóide- O_2 e subsequente dano à macromolécula no sistema.



Sabe-se que o chá é rico em flavan-3-ol, variando em quantidade de acordo com a variedade. Sakakibara *et al.* (2003) encontraram nas folhas de chá verde e

chá preto teores de flavan-3-ol de 22–43 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ e 7,0 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de folha, respectivamente, com pequenas quantidades do flavonol quercetina e caempferol.

A maçã não apresenta teores tão elevados quanto os encontrados nas folhas de chá, contudo flavan-3-ol juntamente com a floridzina são os flavonóides predominantes na polpa, enquanto que na casca, o derivado do flavonol quercetina perfaz quase 60% do total de flavonóides da fruta, seguida por 20% de catequina e 13% de derivados de cianidina (AWAD; JAGER, 2000).

Desta maneira, os resultados de atividade pró-oxidante verificados por Cao, Sofic e Prior (1996) e observados na polpa de maçã deste trabalho poderiam ser causados principalmente pelo sistema de análise envolvendo o cobre e a catequina presentes no chá e na maçã.

A característica pró-oxidante e antioxidante das catequinas em diferentes sistemas foi descrito por Huang e Frankel (1997). Em emulsão O/A, todas as catequinas do chá (catequina, epicatequina, epicatequina galato, epigallocatequina, epigallocatequina galato) apresentaram atividade pró-oxidante em presença do íon cobre. Entretanto, no sistema lipossomo/Cu, catequina e epicatequina apresentaram atividade antioxidante, ou seja, foram capazes de inibir a formação de hexanal e dieno conjugado. Já epigallocatequina e epigallocatequina galato foram pró-oxidantes nesse sistema.

Com relação à variedade de goiabas, ao contrário dos EMB, quando os eluatos de flavonóides são avaliados, no sistema β -caroteno/ácido linoléico não foi observada diferença de atividade entre a polpa e a casca de goiaba. Já no sistema lipossomo, os flavonóides da polpa apresentaram o dobro de inibição em comparação às respectivas cascas, sem diferença de atividade entre as duas variedades.

Apesar de não se observar diferença significativa de atividade antioxidante de flavonóide entre as duas variedades de goiaba aqui analisadas, devemos considerar o alto teor de licopeno presente na goiaba vermelha (5,40 mg/100 g b.u) (HADLEY *et al.*, 2002), o qual não é extraído pelo solvente utilizado para estas análises.

O licopeno é um carotenóide que possui um sistema de ligação dupla conjugada que confere forte atividade antioxidante, incluindo a habilidade em seqüestrar oxigênio singlete e radical peroxila (TAKEOKA *et al.*, 2001; HADLEY *et al.*, 2002). Assim, o conteúdo deste carotenóide juntamente com o conteúdo de

flavonóides devem ser considerados quando a atividade antioxidante total do fruto é avaliada.

De maneira geral, os eluatos de flavonóides de todas as amostras, com exceção de carambola, polpa de maçã Gala e nespera, podem ser considerados bons agentes antioxidantes nos dois sistemas. Contudo, as amostras que contêm antocianinas em sua composição (casca de maçã Gala, amora silvestre e jambolão) apresentaram maior eficiência, já que mesmo em concentrações menores a 10 μM ainda apresentaram elevada capacidade antioxidante nos dois sistemas.

Os FN e FA de amora silvestre mantiveram alta atividade antioxidante em sistema lipossomo diminuindo a concentração até 1 μM , apresentando uma queda somente em 0,1 μM , com inibição de 37 e 36%, respectivamente (Figura 6). Em sistema β -caroteno, a queda na atividade antioxidante foi mais gradual, com inibição de 41 e 8% a 0,1 μM para os FN e FA, respectivamente.

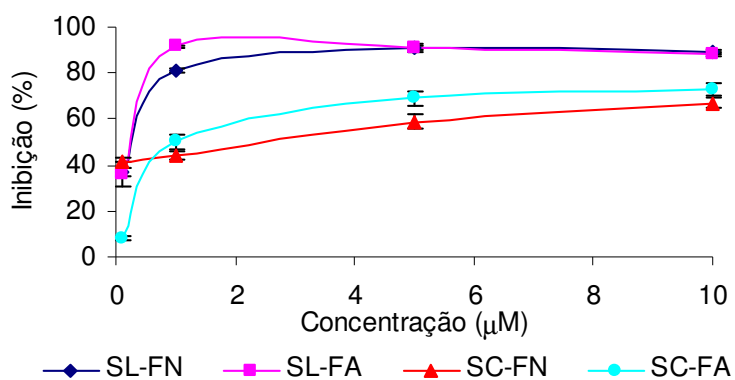


Figura 6: Atividade antioxidante de flavonóides neutros (FN) e ácidos (FA) de amora silvestre, eluídos em coluna de poliamida e analisadas pelo sistema lipossomo (SL) e sistema β -caroteno/ácido linoléico (SC).

A partir da Figura 7, pode-se observar que, além da alta atividade antioxidante apresentada pelos FN e FA de frutas que contêm antocianinas em sua composição, essas frações também são mais eficientes em inibir a peroxidação lipídica em sistema lipossomo em relação ao sistema β -caroteno/ácido linoléico. O inverso também é verificado visto que amostras com menor eficiência em sistema lipossomo apresentam maior eficiência em inibir a peroxidação do β -caroteno.

De maneira geral, os sistemas β -caroteno e lipossomo avaliam a habilidade dos compostos em inibir a peroxidação lipídica. Entretanto, no sistema lipossomo, além desta propriedade, podemos avaliar a capacidade de quelar metais.

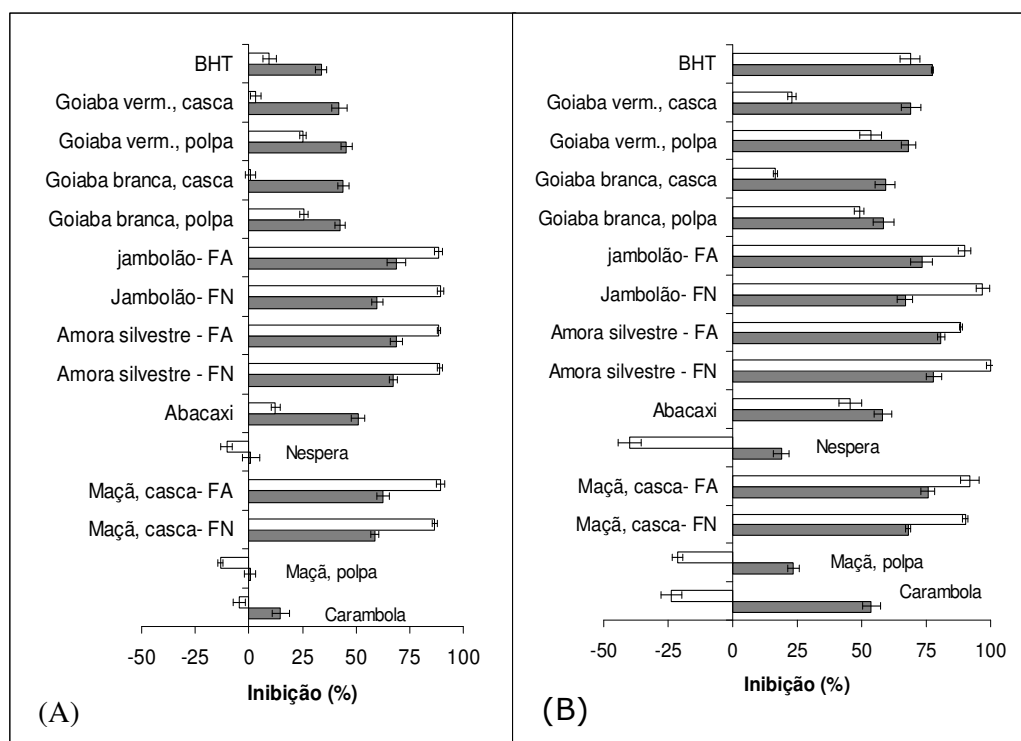


Figura 7: Atividade antioxidante de flavonóides neutros e ácidos de frutas analisada pelos sistemas lipossomo □ e β -caroteno/ácido linoléico ■. Concentrações de (A) 10 μ M e (B) 50 μ M. FN, flavonóides neutros; FA, flavonóides ácidos.

As principais antocianinas presente nessas amostras são os conjugados de cianidina. Resultados de literatura descrevem a presença de cianidina-3-galactosídeo na casca de maçã (AWAD; JAGER, 2000). Em amora (*Morus* sp, cv. Mavromournia), identificou-se cianidina-3-glucorutinosídeo (responsável por aproximadamente 60% da coloração do fruto), juntamente com cianidina-3-soforosídeo e pelargonidina-3-glucosídeo (Gerasoupolos e Stravroulakis, 1997).

A atividade antioxidante das antocianinas deve-se à presença do grupo *o*-difênica no anel B e o sistema de ligação dupla conjugada que favorece a doação de hidrogênio e subsequente estabilização do radical (Seeram; Nair, 2002).

Além disso, antocianinas com pelo menos 3',4'-dihidroxi (anel B) formam um complexo com o Cu. Isto foi demonstrado por Satué-Gracia *et al.* (1997) onde a delphinidina (3',4',5'-trihidroxi) em presença de Cu produz um intermediário evidenciado por um deslocamento batocrômico ($Abs_{máx}$ de 532 para 586 nm). Já a malvidina (4'-OH e 3', 5'-dimetoxi) não leva à formação de nenhum complexo.

A alta atividade antioxidante de extratos vegetais contendo antocianinas, em diferentes modelos, é relatada em literatura. Sun *et al.* (2002) apresentaram a ordem de inibição da oxidação do α -ceto- γ -ácido metilbutírico/AAPH nas frutas coloridas na ordem decrescente de maçã>uva roxa>morango>pêssego>limão>laranja>banana. Os extratos de uva roxa também apresentaram atividade antioxidante em sistema lipossomo/Cu superior às variedades brancas bem como maior conteúdo de fenólicos, principalmente antocianinas. A alta atividade antioxidante das frutas denominadas "berries" também é relatada (KÄHKÖNEN *et al.*, 1999; HEINONNEN; LEHTONEN; HOPIA., 1998; WANG; CAO; PRIOR, 1996; KALT *et al.*, 1999; ROBERTS; GORDON, 2003).

4.3.2. Atividade antioxidante de polpas congeladas de frutas

Atualmente, os consumidores estão mais conscientes da necessidade de ingestão de frutas e vegetais, não somente para suprir suas necessidades nutricionais, mas com o objetivo de obter fitonutrientes que possam auxiliá-los na prevenção de vários tipos de alterações patológicas. Entretanto, os alimentos frescos têm sido progressivamente substituídos por alimentos processados que podem apresentar alterações na composição química durante seu processamento.

Polpa de fruta é o produto obtido pela trituração da parte comestível da fruta, onde as operações básicas compreendem a trituração e o despulpamento. Nesta última etapa, há a separação da casca, fibra, sementes e partes não comestíveis. As polpas são geralmente congeladas a temperaturas de -18°C e podem ou não serem pasteurizadas.

A atividade antioxidante em sistema β -caroteno de EMB de polpas congeladas de fruta disponíveis no comércio estão apresentadas na Tabela 3.

Dentre as polpas congeladas de fruta (PC), a de açaí apresentou a maior porcentagem de atividade antioxidante, com valores de 57 e 73% de inibição (10 e 50 μ M, respectivamente).

As PC de frutas tropicais, tais como goiaba vermelha, caju, graviola, murici e amora apresentaram atividade antioxidante baixa a 10 μ M e intermediária à concentração de 50 μ M.

A PC de amora apresentou atividade 2,5 vezes menor em relação à amora silvestre (30 e 75%, respectivamente) na concentração de 50 μ M. Vale ressaltar que o tipo de amora utilizada para a fabricação da PC (*Rubus* sp.) é diferente da amora silvestre (*Morus* sp.).

Tabela 3: Atividade antioxidante de extrato metanólico bruto de polpas congeladas de fruta analisada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico.

Amostra	Inibição da oxidação (%)	
	10 μ M*	50 μ M*
PC Goiaba vermelha	30 \pm 4	38 \pm 4
PC Caju	25 \pm 3	44 \pm 5
PC Acerola	-5 \pm 1	8 \pm 1
PC Graviola	25 \pm 4	50 \pm 4
PC Murici	14 \pm 1	43 \pm 4
PC Açaí	57 \pm 2	73 \pm 3
PC Amora	12 \pm 1	30 \pm 2
BHT	33 \pm 3	78 \pm 1
Ácido ascórbico	-5 \pm 3	- 12 \pm 2

* A concentração foi expressa como equivalente de ácido gálico. Resultados expressos como média \pm DP (n=4).

A PC de acerola apresentou baixa atividade (-5 e 8 % a 10 e 50 μ M, respectivamente) provavelmente devido ao seu alto conteúdo de ácido ascórbico (884 mg/100 g b.u.).

A vitamina C é considerada como um dos maiores antioxidantes em frutas. Entretanto, uma correlação negativa entre a atividade antioxidante (ORAC) e o teor de ascorbato foi encontrado por Kalt *et al.* (1999) em morango, mirtilo e framboesa, porém correlacionados positivamente com o teor de antocianinas e fenólicos totais.

O ácido ascórbico apresentou atividade pró-oxidante, em ambas as concentrações, nos dois sistemas de oxidação e proporcional à concentração. No sistema β -caroteno, o ácido ascórbico apresentou valores de atividade pró-oxidante de -5 e -12% a 10 e 50 μ M, respectivamente (Tabela 3).

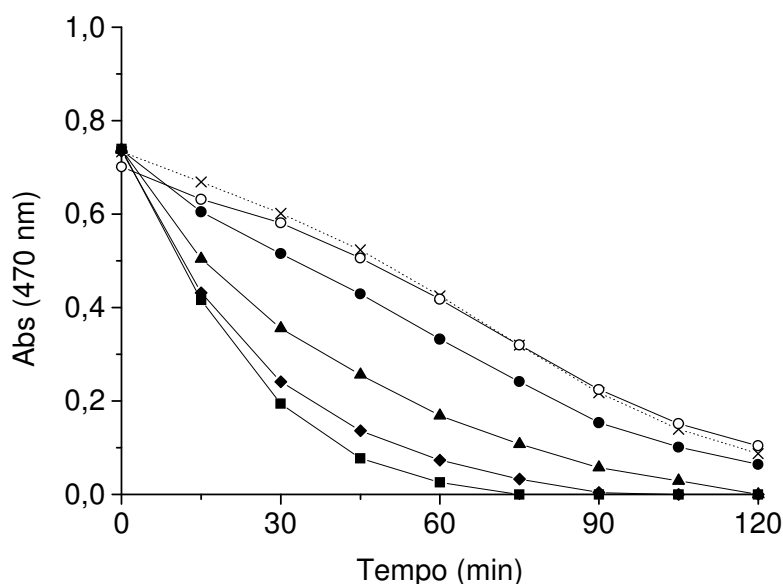


Figura 8: Oxidação do ácido ascórbico em sistema β -caroteno/ácido linoléico. (x) controle de oxidação positivo; concentrações de (○) 1 μ M, (●) 10 μ M, (▲) 50 μ M, (◆) 100 μ M e (■) 200 μ M.

A atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoléico é obtida pela diferença entre absorbância no tempo final de reação e a absorbância no tempo inicial. Para o ácido ascórbico verifica-se que a reação termina nos tempos de 75 e 90 min (10 e 50 μ M, respectivamente) (Figura 8), o que faz com que a vitamina apresente um valor pró-oxidante muito maior ao calculado. A atividade pró-oxidante do ácido ascórbico foi inversamente proporcional à concentração.

A oxidação em sistema β -caroteno para EMB de PC de acerola apresentou uma atividade pró-oxidante nos primeiros 60 minutos de oxidação e atuando como antioxidante até o final da reação (Figura 9). A atividade antioxidante dos flavonóides (FN e FA) da PC de acerola em sistema β -caroteno é consideravelmente maior em relação à respectiva EMB. A atividade antioxidante das FN e FA a 50 μ M foi de 46 e 61 %, respectivamente (Figura 10 e Tabela 4).

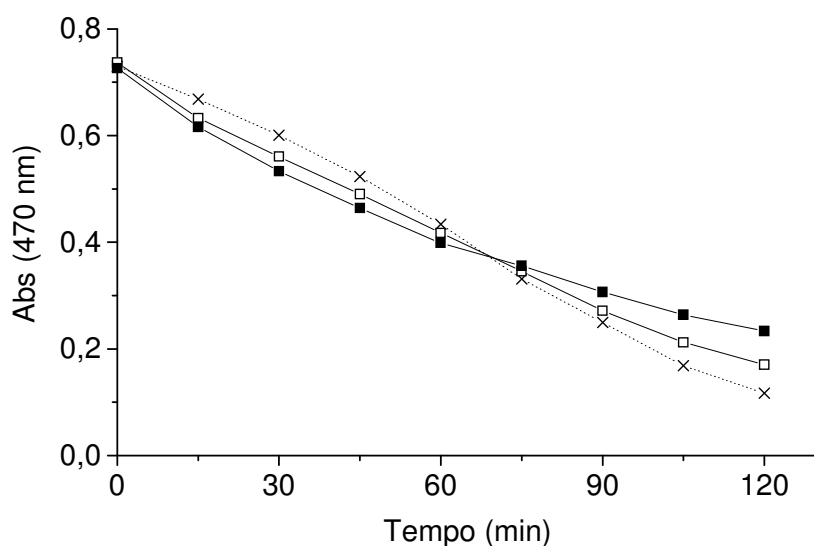


Figura 9: Oxidação de extrato metanólico bruto de polpa congelada de acerola em sistema β -caroteno/ácido linoléico. (x) controle de oxidação positiva; concentrações de () 10 μ M e (■) 50 μ M ácido gálico equivalente.

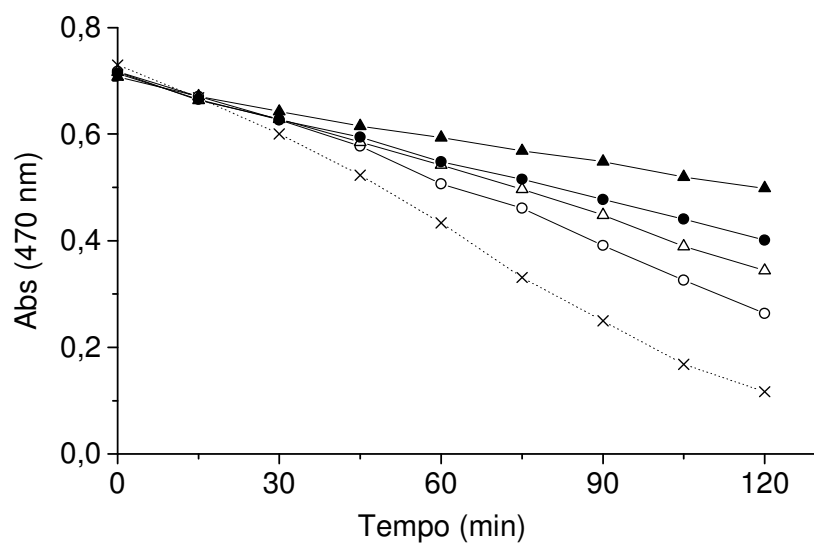


Figura 10: Oxidação de flavonóides neutros (FN) e flavonóides ácidos (FA) de polpa congelada de acerola em sistema β -caroteno/ácido linoléico. (x) controle de oxidação positiva; concentrações de (○,△) 10 μ M e (●,▲) 50 μ M ácido gálico equivalente.

Uma vez que a baixa atividade antioxidante da EMB da acerola seja primariamente devido ao alto teor de vitamina C, sua remoção por SPE pode ter evidenciado a alta atividade antioxidante dos constituintes flavonóides.

A atividade antioxidante em sistema β -caroteno/ácido linoléico de flavonóides extraídos de PC de fruta estão demonstradas na Tabela 4. Nesta tabela verifica-se que a atividade antioxidante de PC de goiaba vermelha foi similar à observada para a fruta fresca.

Tabela 4: Atividade antioxidante de Flavonóides neutros e ácidos de polpas congeladas de fruta analisadas pelos sistemas β -caroteno/ácido linoléico e lipossomo.

Amostra	Sistema β -caroteno/ácido linoléico Inibição (%)		Sistema lipossomo Inibição (%)	
	10 μ M*	50 μ M*	10 μ M*	50 μ M*
Goiaba vermelha	48 \pm 5	64 \pm 6	24 \pm 2	58 \pm 3
Caju	43 \pm 4	59 \pm 2	28 \pm 3	55 \pm 1
Acerola (FN)	17 \pm 2	46 \pm 4	-1 \pm 2	25 \pm 2
Acerola (FA)	31 \pm 2	61 \pm 3	18 \pm 1	89 \pm 2
Graviola	37 \pm 3	55 \pm 5	4 \pm 1	16 \pm 2
Murici	-1 \pm 2	19 \pm 2	-10 \pm 1	-1 \pm 1
Açaí (FN)	66 \pm 3	78 \pm 3	87 \pm 1	94 \pm 1
Açaí (FA)	67 \pm 2	78 \pm 2	86 \pm 2	89 \pm 1
Amora (FN)	66 \pm 2	79 \pm 1	93 \pm 1	100 \pm 3
Amora (FA)	60 \pm 6	72 \pm 4	88 \pm 1	100 \pm 2

* A concentração foi expressa em equivalente de ácido gálico. FN, Flavonóides neutros; FA, Flavonóides ácidos. Resultados expressos como média \pm DP (n=4).

Os FN e FA de polpa de açaí e amora apresentaram os maiores percentuais de inibição (inibição >70%), em ambas as concentrações, e em ambos os sistemas de oxidação. A menor concentração onde estas duas amostras ainda apresentam

atividade antioxidante foi de 5 μM para açaí (Figura 11) e 1 μM para a amora (Figura 12) quando analisados nos dois sistemas de oxidação.

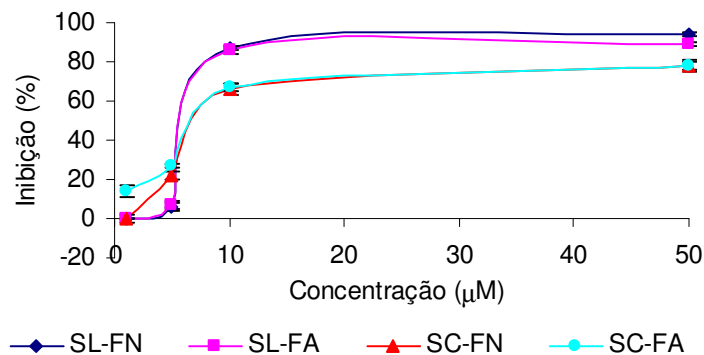


Figura 11: Atividade antioxidante de flavonóides neutros (FN) e ácidos (FA) de polpa congelada de açaí, eluídos em coluna de poliamida e analisadas pelos sistemas lipossomo (SL) e sistema β -caroteno/ác. linoléico (SC).

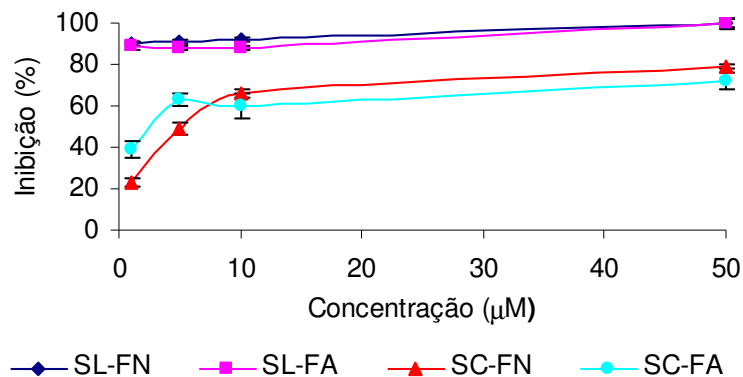


Figura 12: Atividade antioxidante de flavonóides neutros (FN) e ácidos (FA) de polpa congelada de amora, eluídos em coluna de poliamida e analisadas pelos sistemas lipossomo (SL) e sistema β -caroteno/ác. linoléico (SC).

Em concordância com os resultados obtidos na análise da capacidade antioxidante de flavonóides de frutas frescas, as PC contendo antocianinas se destacaram dos demais extratos. Dentre as PC, temos a acerola, açaí e amora. As FN e FA destas amostras também apresentaram maior eficiência em inibir a atividade antioxidante em sistema lipossomo em relação ao sistema β -caroteno (Figura 13), em concordância com os dados obtidos em eluatos de flavonóides em frutas (Figura 7).

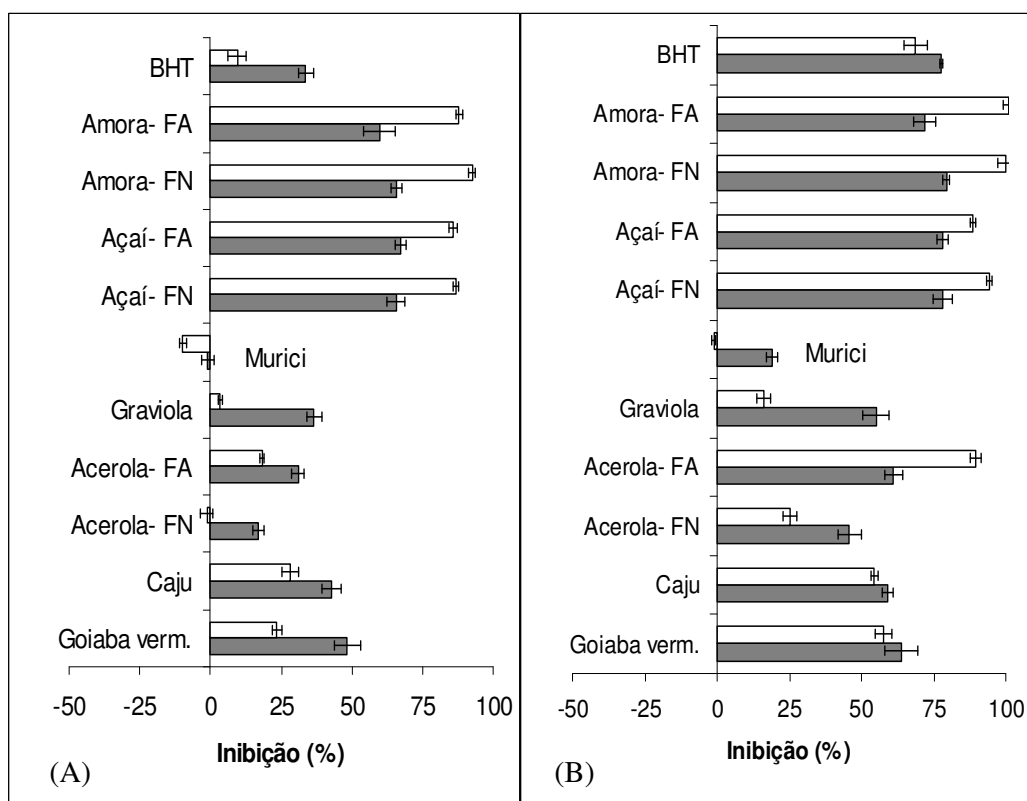


Figura 13: Atividade antioxidante de flavonóides neutros e ácidos de polpas congeladas de fruta analisadas pelos sistemas lipossomo \square e β -caroteno/ácido linoléico \blacksquare . Concentrações de (A) 10 μ M e (B) 50 μ M. FN- flavonóides neutros; FA- flavonóides ácidos.

As antocininas do açaí (*Euterpes oleraceae*) foram identificadas como cianidina-3-O-glucosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo (GALLORI *et al.*, 2004), enquanto que os derivados de cianidina e pelargonidina foram identificados em acerola (ARABBI, 2003).

Atualmente, a comodidade da polpa congelada de fruta possibilita a chegada de frutas exóticas nos grandes centros distantes das área de produção, permitindo ainda a venda em qualquer época do ano. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Frutas (Ibrafr), dos 32 milhões de toneladas que o Brasil produz hoje, 30% correspondem a frutas com características próprias para serem congeladas, como, por exemplo, abacaxi, manga e goiaba. Entretanto, a perda de fitoquímicos torna-se inevitável durante o processamento, ou por oxidação devido principalmente às fenolases, ou perda devido à constituição da matriz do fruto (fibras).

Flavonóides como catequina e floridzina são sensíveis à oxidação e são substratos para a polifenoloxidase (PPO) (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990). Por outro lado, os flavonóis glicosilados não são substrato para esta enzima devido ao impedimento estérico do açúcar em C₃ (VAN BUREN; VOS; PILNIK, 1976). As antocianinas também não são substrato para a PPO, entretanto podem interagir com as quinonas na segunda etapa do escurecimento enzimático através do anel B (CLIFFORD, 2000).

Exemplo de perda no conteúdo de flavonóides totais durante o processamento de maçã foi descrito por Van der Slouis *et al.* (2002). A princípio, na obtenção da polpa de maçã não foi observada perda significativa no conteúdo de flavonóides e na atividade antioxidante em relação à fruta. Contudo, o suco de maçã obtido por simples prensagem ou por tratamento enzimático seguido de prensagem manteve somente 10 e 3% de atividade antioxidante, respectivamente, em relação à fruta fresca. Observou-se redução de 50% no conteúdo de ácido clorogênico e de 97% de catequinas. A maior parte dos flavonóides possivelmente ficou retida no bagaço ou foram oxidados durante o tratamento enzimático.

4.3.3. Atividade antioxidante de hortaliças

A Tabela 5 apresenta a atividade antioxidante de EMB de hortaliças nos sistemas lipossomo e β -caroteno/ácido linoléico. Nas amostras de hortaliças, a atividade antioxidante também dependeu da concentração.

Tabela 5: Atividade antioxidante de extrato metanólico bruto de hortaliças analisadas pelos sistemas β -caroteno/ácido linoléico e lipossomo.

Amostra	Sistema β -caroteno/ácido linoléico. Inibição (%)		Sistema lipossomo Inibição (%)	
	10 μ M*	50 μ M*	10 μ M*	50 μ M*
Alface roxa	27 \pm 2	47 \pm 2	18 \pm 4	93 \pm 2
Alface crespa	35 \pm 3	76 \pm 5	-7 \pm 4	-21 \pm 2
Pimentão verde	18 \pm 5	31 \pm 6	1 \pm 3	15 \pm 2
Pimentão vermelho	30 \pm 3	49 \pm 3	11 \pm 3	17 \pm 2
Agrião	49 \pm 4	74 \pm 6	-2 \pm 4	-1 \pm 4
Almeirão	28 \pm 3	67 \pm 3	-11 \pm 3	-2 \pm 3
Rúcula	41 \pm 5	70 \pm 3	9 \pm 1	21 \pm 2
Repolho	34 \pm 4	66 \pm 2	24 \pm 2	48 \pm 2
Repolho roxo	42 \pm 2	58 \pm 2	89 \pm 1	97 \pm 1
Jiló	28 \pm 3	48 \pm 6	-3 \pm 2	-3 \pm 3

* A concentração foi expressa como equivalente de ácido gálico. Resultados expressos como média \pm DP (n=4).

No sistema lipossomo, a 10 μ M, o EMB de repolho roxo apresentou o maior percentual de inibição (89% de inibição). Na concentração de 50 μ M, o EMB de repolho roxo e alface roxa apresentaram alta atividade (inibição >70%). As amostras de alface crespa, agrião e almeirão apresentaram atividade pró-oxidante em ambas as concentrações e as demais hortaliças apresentaram baixa atividade inibitória da peroxidação do lipossomo.

Já no sistema β -caroteno/ácido linoléico, alface crespa, agrião e rúcula apresentaram atividade antioxidante intermediária (inibição 40-70%) a 10 μ M, e alta a 50 μ M. A ordem decrescente de atividade antioxidante a 50 μ M é de alface crespa= agrião= rúcula >almeirão = repolho branco> repolho roxo> alface roxa= pimentão vermelho= jiló> pimentão verde.

Observa-se um declínio considerável da atividade antioxidante em sistema β -caroteno/ácido linoléico após purificação dos flavonóides em relação aos seus respectivos EMB (Tabela 6). Dentre essas amostras estão alface crespa, agrião, almeirão, rúcula, repolho branco e jiló. Para essas mesmas amostras no sistema lipossomo, observamos aumento da atividade pró-oxidante. Assim, podemos acreditar que grande parte dos compostos antioxidantes presentes nos EMB foram removidos na água de lavagem quando realizada a etapa de SPE para a obtenção dos flavonóides e/ou os flavonóides foram concentrados, acentuando sua atividade pró-oxidante em presença do cobre.

Tabela 6: Atividade antioxidante de Flavonóides neutros e ácidos de hortaliças analisadas pelos sistemas β -caroteno/ácido linoléico e lipossomo.

Amostra	Sistema β -caroteno/ácido linoléico. Inibição (%)		Sistema lipossomo Inibição (%)	
	10 μ M*	50 μ M*	10 μ M*	50 μ M*
Alface roxa (FN)	38 \pm 2	54 \pm 2	89 \pm 2	88 \pm 1
Alface roxa (FA)	26 \pm 4	46 \pm 3	77 \pm 1	70 \pm 3
Alface crespa	7 \pm 2	42 \pm 2	-13 \pm 3	-34 \pm 6
Pimentão verde	42 \pm 3	38 \pm 7	1 \pm 3	20 \pm 1
Pimentão vermelho	50 \pm 3	53 \pm 2	30 \pm 4	52 \pm 3
Agrião	6 \pm 2	46 \pm 4	-19 \pm 3	-39 \pm 3
Almeirão	6 \pm 2	15 \pm 4	-22 \pm 3	-50 \pm 4
Rúcula	11 \pm 2	34 \pm 3	-6 \pm 1	-2 \pm 2
Repolho branco	15 \pm 3	47 \pm 3	-3 \pm 1	9 \pm 2
Repolho roxo (FN)	64 \pm 3	70 \pm 2	92 \pm 1	100 \pm 2
Repolho roxo (FA)	72 \pm 2	80 \pm 2	89 \pm 1	92 \pm 1
Jiló	20 \pm 3	33 \pm 3	-8 \pm 1	-18 \pm 2
Quercetina	22 \pm 3	49 \pm 3	-4 \pm 1	37 \pm 2
Rutina	1 \pm 3	13 \pm 2	-17 \pm 2	-41 \pm 2
Rutina sem Cu	-	-	s.o	s.o.

s.o – sem oxidação; * A concentração foi expressa como equivalente de ácido gálico, com excessão para a quercetina e rutina. FN, Flavonóides neutros; FA, Flavonóides ácidos. Resultados expressos como média \pm DP (n=4).

O conteúdo de flavonóides na família das Crucíferas é baixo. Justesen & Knuthsen (2001) encontraram na amostra de agrião valores de 4 mg quercetina/100g b.u. e de 1 mg caempferol/100g b.u.

Em amostras de repolho branco e roxo, Hertog, Hollman e Katan (1992) obtiveram valores abaixo de 0,5 mg quercetina/100 g b.u. em ambas as variedades e < 0,2 mg caempferol/100 g b.u. Porém, em oposição ao baixo teor de flavonóis, o repolho roxo possui alta concentração de cianidina, de 34 mg/100 g b.u. (ARABBI, GENOVESE; LAJOLO, 2004) e até valores médios de 125 mg/100 g b.u. (PICAGLIA; MAROTTI; BALDONI, 2002).

Apesar da baixa concentração de flavonóides, as Brassicas são conhecidas pelo seu alto conteúdo de glicosinolatos que, por ação da mirosinase, liberam os isotiocianatos que possuem atividade biológica anti-fúngica e nematicida. O sistema glicosinolato-mirosinase faz parte do sistema de defesa da planta e os isotiocianatos são conhecidos por sua atividade de quimioprevenção, uma vez que aumentam a atividade da glutathione-S-transferase e quinona redutase, enzimas de detoxificação da fase II (MUNDAY E MUNDAY, 2002).

Ao contrário das Brassicas, as variedades de alface apresentam altos teores de flavonóides totais, de cerca de 18 a 21 mg/100 g b.u. para a alface crespa e de 67 mg/100 g b.u. para a roxa. O alto conteúdo de flavonóides na alface roxa não se deve apenas à presença de antocianinas, mas também ao alto teor de glicosídeos de quercetina. A antocianina contribui com cerca de 30% do conteúdo total de flavonóides, enquanto que a quercetina com os demais 70% (ARABBI; GENOVESE; LAJOLO, 2004).

Nas amostras de repolho roxo e alface roxa, a alta atividade antioxidante dos FA e FN pode ser consequência da presença de alta quantidade de cianidina.

Por outro lado, a atividade pró-oxidante observada nas variedades de repolho branco e alface crespa pode ser pela presença dos flavonóis, uma vez que esses são os flavonóides presentes nesses vegetais. Assim, testou-se a atividade antioxidante da quercetina e seu derivado glicosilado, a rutina (quercetina-3-rutinosídeo) para tentar explicar a atividade pró-oxidante no sistema lipossomo e a baixa atividade no sistema β -caroteno/ácido linoléico nessas duas hortaliças.

Em sistema β -caroteno/ácido linoléico, o flavonol quercetina (Figura 14B) apresentou atividade antioxidante baixa, contudo, superior (22 e 49 % de inibição,

10 e 50 μM , respectivamente) ao derivado glicosilado rutina de 1 e 13 % de inibição nas mesmas concentrações (Figura 14A). Esta diferença na atividade antioxidante é esperada visto que o 3-OH é uma das funções que atribuem propriedade antioxidante ao flavonol, e na rutina está substituído pelo açúcar.

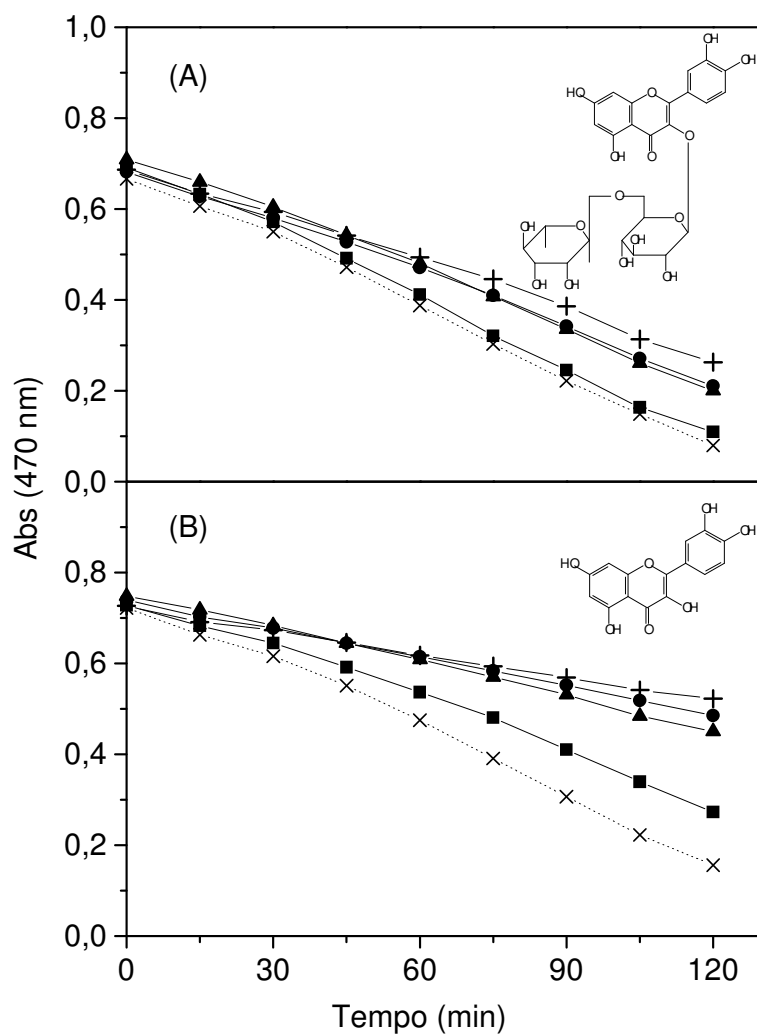


Figura 14: Oxidação da (A) rutina e (B) quercetina em sistema β -caroteno/ácido linoléico. (x) controle de oxidação positiva; concentrações de (■) 10 μM , (▲) 50 μM , (●) 100 μM e (+) 200 μM .

Em sistema lipossomo, a quercetina apresenta baixa atividade antioxidante em ambas as concentrações. Entretanto, a rutina demonstrou alta atividade pró-oxidante neste sistema (Tabela 6). Com a glicosilação em 3-OH da rutina, além da perda da função importante como doador de hidrogênio, perde-se também a característica quelante de metais entre as funções 3-OH e 4-ceto do anel C (PIETTA, 2000).

Além da perda de parte das características estruturais como antioxidante, aparentemente a rutina reage com o cobre formando espécies reativas que aceleram a reação de peroxidação do lipossomo, visto que a rutina sem a presença do cobre não interfere na oxidação (Tabela 6).

Assim sendo, supõe-se que a atividade pró-oxidante do eluato de FN do repolho branco e alface crespa deve-se principalmente ao método de avaliação utilizada.

A atividade pró-oxidante também já foi observada para outros flavonóides. As classes de flavonóis, isoflavonas e flavanonas também atuaram como pró-oxidantes em ORAC em presença do íon cobre, e ao mesmo tempo como antioxidantes contra radical peroxila e hidroxila. Ambos, tanto a atividade antioxidante e pró-oxidante destes flavonóides foi diretamente proporcional ao número de hidroxilas (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997).

Em concordância com os demais resultados de capacidade antioxidante de frutas e polpas congeladas de fruta, as hortaliças que apresentaram antocianinas em sua composição mostraram maior atividade antioxidante em sistema lipossomo em relação ao sistema β -caroteno, o que é melhor evidenciado na Figura 15. Entre as hortaliças podemos citar o repolho roxo e alface roxa.

As antocianinas descritas na literatura para o repolho roxo são cianidina-3,5-diglicosídeo e cianidina-3-soforosídeo, o último encontrado em diversas formas aciladas (DYRBY; WESTERGAARD; STAPELFELDT, 2001). Na alface roxa, foi encontrada derivados de cianidina (ARABBI, GENOVESI; LAJOLO, 2004).

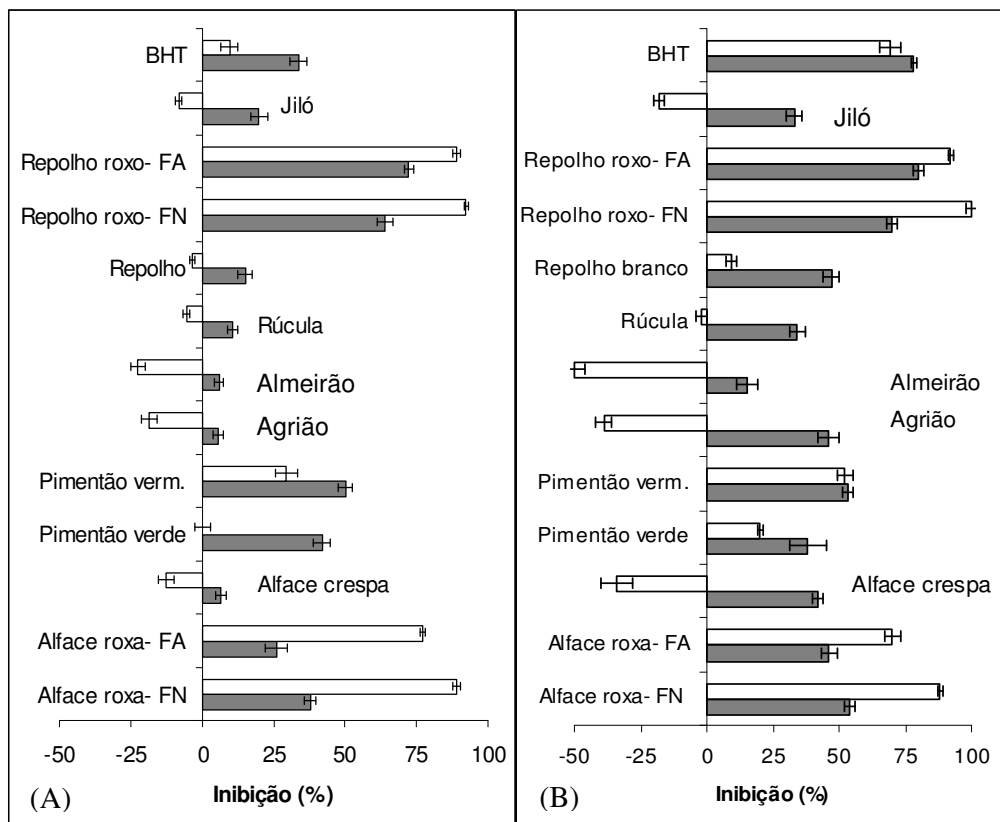


Figura 15: Atividade antioxidante de Flavonóides neutros e ácidos de hortaliças analisadas pelos sistemas lipossomo □ e β-caroteno/ác.linoléico ■. Concentrações de (A) 10 µM e (B) 50 µM. FN, flavonóides neutros; FA, flavonóides ácidos.

4.3.4. Atividade antioxidante de feijão preto

A atividade antioxidante dos FN e FA de feijão inteiro e tegumento foram altas para ambos os sistemas de oxidação e em ambas as concentrações (Tabela 7). O mesmo resultado foi observado por Tsuda *et al.* (1994 e 1996) que atribuiu a alta atividade antioxidante do feijão preto ao pigmento pelargonidina 3-O- β -glucosídeo presente no tegumento do grão.

Tabela 7: Atividade antioxidante de Flavonóides neutros e ácidos de feijões analisada pelos sistemas β -caroteno/ácido linoléico e lipossomo.

Amostra	Sistema β -caroteno/ácido linoléico Inibição (%)		Sistema lipossomo Inibição (%)	
	10 μ M*	50 μ M*	10 μ M*	50 μ M*
Feijão preto, cotilédone				
FN	18 \pm 5	32 \pm 3	14 \pm 1	25 \pm 1
FA	27 \pm 5	36 \pm 6	2 \pm 4	12 \pm 1
Feijão preto, tegumento				
FN	59 \pm 6	68 \pm 7	88 \pm 1	82 \pm 1
FA	71 \pm 2	73 \pm 1	91 \pm 1	84 \pm 2
Feijão preto, inteiro				
FN	49 \pm 2	60 \pm 2	92 \pm 2	86 \pm 1
FA	73 \pm 1	74 \pm 2	94 \pm 2	93 \pm 2

* A concentração foi expressa em equivalente de ácido gálico. FN, Flavonóides neutros; FA, Flavonóides ácidos. Resultados expressos como média \pm DP (n=4).

4.3.5. Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante

O conteúdo de fenólicos totais, bem como a porcentagem de recuperação de fenólicos em coluna de poliamida das amostras variou de 40 a 861 mg GAE/100 g b.u. (Tabela 8) e não foi correlacionado com a atividade antioxidante.

Embora alguns trabalhos (SUN *et al.*, 2002; KALT *et al.*, 1999) apresentem alta correlação entre a atividade antioxidante o conteúdo de fenólicos, outros (HEINONEN; LEHTONEN; HOPIA, 1998) também apresentam baixa correlação. No presente estudo, nenhuma correlação linear foi observada entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante ($R^2 < 0.1$). Com base nos dados de Arabbi, Genovesi e Lajolo (2004), a correlação linear entre o conteúdo de flavonóides e a atividade antioxidante foi menor do que 0,1. Esta resposta pode ter ocorrido principalmente devido a diferenças na composição de fenólicos entre os extratos vegetais e a diferença na resposta dos diferentes compostos fenólicos ao reagente de Folin-Ciocalteu (KÄHKÖNEN *et al.*, 1999). Além, disso, os valores absolutos de atividade antioxidante podem variar de acordo com a metodologia utilizada.

Em frutas, o conteúdo de fenólicos totais decresce na ordem de: jambolão> casca de goiaba branca e vermelha> amora silvestre> casca de maçã Gala> polpa de goiaba branca e vermelha> carambola> nêspera> polpa de maçã Gala>abacaxi.

Como esperado, o conteúdo de fenólicos encontrados na casca de maçã e de goiaba foi significativamente maior em relação às respectivas polpas. O conteúdo de fenólicos do epicarpo de maçã Gala foi quatro vezes maior do que para a polpa e três vezes maior para as variedades de goiaba. Estes resultados também foram observados para a maçã por Wolfe, Wu e Liu (2003) e para a casca de goiaba por Jiménez-Escrig *et al.* (2001).

Para as variedades de goiaba não se observa diferença na recuperação de fenólicos após SPE. O conteúdo de fenólicos encontrados na PC de goiaba vermelha foi similar ao encontrado na fruta.

Entre as PC comerciais, acerola apresentou o maior valor de fenólicos (861 mg GAE/100 g b.u.). Entretanto, este valor provavelmente é devido à alta concentração de ácido ascórbico presente. O ascorbato na concentração acima de 5 μ M dá uma reação positiva com o reagente de Folin. Este nível de concentração só foi observado para a amostra de acerola, não interferindo com os demais resultados

dos EMB. O conteúdo de fenólicos totais para as amostras de PC segue a ordem decrescente: açaí > caju > amora > graviola= goiaba vermelha > murici.

O conteúdo de fenólicos totais em hortaliças segue a ordem decrescente: repolho roxo > alface roxa = agrião > pimentão vermelho e verde > almeirão = rúcula > alface crespa > repolho branco=agrião. Entre as variedades de repolho e alface, o conteúdo de fenólicos foi de três e quatro vezes maior para a variedade roxa em relação à variedade verde. Estes resultados estão de acordo com Hertog, Hollman e Katan (1992), e Du Pont *et al.*, (2000) que atribuíram as grandes variações de flavonóides nos vegetais folhosos (alface, repolho e endívia) às diferenças entre variedades, porção do vegetal, influência sazonal e condições agronômicas, principalmente porque a formação de flavonóides é dependente da luz.

Tabela 8: Concentração de fenólicos totais em extrato metanólico bruto e porcentagem de recuperação de flavonóides e ácidos fenólicos após separação em fase sólida.

Amostra	Fenólicos totais (mg GAE/100 g b.u.)	Recuperação de fenólicos após SPE (%)	
		FN	FA
Frutas			
Carambola	126,2 ± 10,1	19,4 ± 3,2	
Maçã Gala, polpa	81,5 ± 3,0	28,8 ± 2,8	
Maçã Gala, casca	309,4 ± 5,3	25,7 ± 0,5	9,2 ± 0,8
Nêspera	112,5 ± 1,6	59,8 ± 0,4	
Abacaxi (cv Pérola)	67,2 ± 0,6	16,0 ± 1,1	
Amora silvestre	373,0 ± 11,2	69,0 ± 2,0	8,5 ± 0,9
Jambolão	582,6 ± 16,1	9,6 ± 0,4	1,42 ± 0,03
Goiaba branca, polpa	160,0 ± 15,3	5,4 ± 0,5	
Goiaba branca, casca	428,2 ± 18,6	11,4 ± 0,0	
Goiaba vermelha, polpa	124,5 ± 3,5	12,0 ± 0,9	
Goiaba vermelha, casca	419,6 ± 13,6	13,5 ± 0,3	
Polpa congelada comercial (PC)			
Goiaba vermelha	118,8 ± 3,6	13,2 ± 0,9	
Caju	233,7 ± 7,5	6,8 ± 0,2	
Acerola	861,2 ± 61,9	4,8 ± 0,1	2,4 ± 0,3
Graviola	120,1 ± 7,9	12,6 ± 0,2	
Murici	67,1 ± 3,3	23,5 ± 0,5	
Acaí	328,3 ± 8,8	28,7 ± 1,2	26,5 ± 1,3
Amora	224,7 ± 18,6	37,9 ± 0,6	10,4 ± 0,5
Hortaliças			
Alface roxa (cv. Mimosa)	169,5 ± 1,3	17,2 ± 1,0	73,1 ± 2,0
Alface crespa	52,8 ± 8,6	29,7 ± 0,5	
Pimentão verde	119,1 ± 10,1	6,6 ± 0,2	
Pimentão vermelho	130,5 ± 12,1	6,8 ± 0,4	
Agrião	167,7 ± 5,7	62,7 ± 0,9	
Almeirão	102,7 ± 0,1	75,0 ± 4,7	
Rúcula	89,8 ± 4,4	23,5 ± 2,0	
Repolho	40,1 ± 5,4	17,3 ± 3,5	
Repolho roxo	177,8 ± 13,9	38,8 ± 0,4	5,3 ± 0,2
Jiló	44,8 ± 1,6	24,9 ± 2,7	
Leguminosa			
Feijão preto, cotilédone	42,6 ± 1,0	28,9 ± 6,1	49,1 ± 1,1
Feijão preto, tegumento	2971,4 ± 81,8	21,2 ± 1,0	7,3 ± 0,3
Feijão preto, inteiro	217,8 ± 20,4	39,3 ± 0,4	17,0 ± 0,4

FN- Flavonóide neutros; FA- Flavonóides ácidos. Os eluatos de FN e FA de amostras que não contêm antocianinas em sua composição foram somadas. Resultados expressos como média ± DP (n=3).

4.3.6. Conteúdo de ácido ascórbico e atividade antioxidante

Vitamina C é definida como um termo genérico para todos os compostos que exibem atividade biológica de L-ácido ascórbico (AA), tais como L-ácido desidroascórbico (DHA), normalmente presente em quantidade <10% do pool total da vitamina (LEE; KADER, 2000).

O conteúdo de ácido ascórbico das amostras analisadas variou entre 3,8 a 885 mg/100 g b.u. (Tabela 9). A concentração de vitamina C das amostras está de acordo com os valores apresentados no “Food Composition and Nutrition Tables” (SOUCI; FACHMANN; KRAUT, 1994), exceto para o repolho branco que está presente em menor concentração. A polpa congelada de acerola foi a melhor fonte de vitamina C dentre todas as amostras analisadas, mas a concentração encontrada na polpa congelada comercial é ligeiramente inferior ao descrito para acerola, entre 1 a 2 g/100 g b.u. (SOUCI; FACHMANN; KRAUT, 1994).

Todos os tegumentos de frutas tiveram maior concentração de AA em relação às respectivas polpas. Geralmente, o tegumento de vegetais apresenta maior conteúdo de AA para proteger a fruta do stress externo causado pela luz e oxidação (LEE; KADER, 2000).

Entre o grupo das hortaliças, é interessante notar que somente DHA foi detectado, com exceção do pimentão vermelho e verde. A rápida oxidação da vitamina C é observada em condições favoráveis à perda de água, ou ainda, o stress causado por esta perda pode afetar o sistema de seqüestro de radicais livres promovendo a oxidação da vitamina C (LESEM, 1988).

Nunes *et al.* (1998) observaram que em brócolis, espinafre e alface, a refrigeração com alta umidade levava à maior retenção de AA quando comparado à estocagem com baixa umidade. Ainda, em morangos, a perda de vitamina C foi menor nas amostras protegidas por um filme de PVC que diminuía a perda de água em relação àquelas que não apresentavam esta proteção.

Tabela 9: Conteúdo de ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico e ácido ascórbico total em frutas, polpas congeladas de fruta e hortaliças.

Amostra	Ácido ascórbico (mg/100 g b.u.)	Ácido desidroascórbico (mg/100 g b.u.) *	Ácido ascórbico total (mg/100 g b.u.)
Frutas			
Carambola	31 ± 2	6 ± 3	37,4 ± 0,2
Maçã Gala, polpa	nd	nd	nd
Maçã Gala, casca	nd	5,9 ± 0,1	5,9 ± 0,1
Nêspora	nd	3,8 ± 0,1	3,8 ± 0,1
Jambolão	21,8 ± 0,2	1,1 ± 0,4	22,9 ± 0,6
Abacaxi (cv Pérola)	20,5 ± 0,4	2 ± 1	22,4 ± 0,9
Amora silvestre	7,51 ± 0,03	3,0 ± 0,7	10,5 ± 0,7
Goiaba branca, polpa	130,8 ± 0,3	5,6 ± 0,5	136,4 ± 0,2
Goiaba branca, casca	263 ± 10	5,4 ± 0,2	268,9 ± 0,3
Goiaba vermelha, polpa	37,5 ± 0,7	18 ± 2	56 ± 2
Goiaba vermelha, casca	170,2 ± 0,4	28 ± 2	199 ± 1
Polpa congelada comercial (PC)			
Goiaba vermelha	39 ± 1	11 ± 1	49,9 ± 0,3
Caju	191 ± 4	3,8 ± 0,3	195 ± 4
Acerola	774 ± 28	111 ± 6	885 ± 33
Graviola	nd	nd	nd
Murici	nd	nd	nd
Acai	nd	nd	nd
Amora	nd	nd	nd
Hortaliças			
Alface roxa (cv. Mimosa)	nd	12,2 ± 0,7	12,2 ± 0,7
Alface crespa	nd	9,3 ± 0,2	9,3 ± 0,2
Pimentão verde	86,4 ± 0,6	7,0 ± 2,0	92 ± 2
Pimentão vermelho	103 ± 1	2,5 ± 0,6	105 ± 1
Agrião	nd	57,2 ± 0,6	57,2 ± 0,6
Almeirão	nd	11,9 ± 0,9	11,9 ± 0,9
Rúcula	nd	48,6 ± 0,3	48,6 ± 0,3
Repolho	nd	16,6 ± 0,2	16,6 ± 0,2
Repolho roxo	nd	37,3 ± 0,6	37,3 ± 0,6
Jiló	nd	22,0 ± 0,8	22,0 ± 0,8

nd- não detectado; *Diferença entre conteúdo de ácido ascórbico e ácido ascórbico total. Resultados expressos como média ± DP (n=3).

4.4. CONCLUSÃO

Os alimentos vegetais que apresentaram alta atividade antioxidante nos sistemas lipossomo e β -caroteno/ácido linoléico foram:

- a. Frutas: flavonóides neutros e ácidos de casca de maçã Gala, amora silvestre e jambolão.
- b. Polpas congeladas de fruta : flavonóides ácidos de acerola, flavonóides neutros e ácidos de amora e açaí.
- c. Hortaliças: flavonóides neutros e ácidos de alface roxa e repolho roxo.
- d. Leguminosas: flavonóides neutros e ácidos de tegumento de feijão preto.

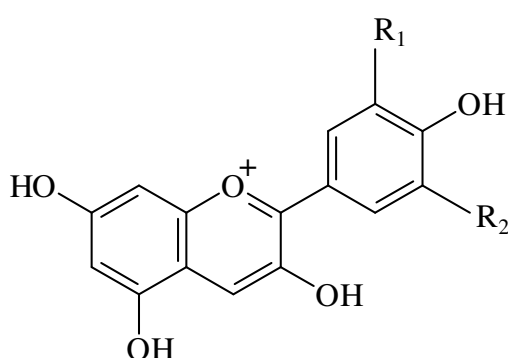
Todos os alimentos vegetais que apresentaram alta atividade antioxidante, apresentam antocianina em sua composição de flavonóides.

5. IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS DE AMORA SILVESTRE

5.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A partir da avaliação da atividade antioxidante de alimentos vegetais, a amora silvestre (*Morus* sp.) foi selecionada para a identificação das antocianinas que a compõem, visto que apresentou pronunciada atividade antioxidante nos dois sistemas de oxidação (lipossomo e β -caroteno/ácido linoléico) e alto conteúdo de fenólicos totais. Assim, a identificação das estruturas dos flavonóides (principalmente antocianinas) deste fruto é de grande interesse, uma vez que podem ser realizadas diversas relações com respeito a sua biodisponibilidade e efeito biológico.

As antocianinas são pigmentos encontrados em frutas e vegetais e conferem cor vermelha, violeta ou azul. As antocianidinas são derivados hidroxilados e metoxilados do fenil-2-benzopirílio (Figura 17) e aproximadamente 15 antocianidinas são conhecidas. Contudo, somente seis foram encontrados e identificados em alimentos vegetais e frutas (WU; PRIOR, 2005a e 2005b) e contribuem para a pigmentação. Entre elas estão a cianidina, pelargonidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (Figura 16).



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

Figura 16: Estrutura fundamental das antocianidinas.

A estrutura das antocianinas varia em:

- (a) número e posição de substituintes hidroxila e metoxila no esqueleto básico;
- (b) o tipo, número e posição no qual os açúcares estão ligados ao esqueleto básico;
- (c) a acilação dos açúcares e o tipo de grupo acilante.

Os pigmentos antociânicos são geralmente encontrados na forma glicosilada, denominada de antocianina, que libera por hidrólise sua forma aglicona, denominada antocianidina.

Os açúcares normalmente encontrados ligados às antocianinas são a glicose, ramnose, galactose e arabinose, geralmente na posição 3 ou 3, 5-hidroxi. Os açúcares rutinose (6-*O*- α -L-ramnosil-D-glucosídeo), soforose (2-*O*- β -D-glicosil-D-glucosídeo) e sambubiose (2-*O*- β -D-xilosil-D-glucosídeo) também podem estar presentes (CLIFFORD, 2000; WU ; PRIOR, 2005b).

Os grupos acilantes mais comuns são os ácidos hidroxicinâmicos, tais como ácido caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico e ácidos alifáticos como o ácido acético, málico, oxálico e succínico (STAFFORD, 1990; WU; PRIOR, 2005b).

A estrutura e a cor das antocianinas são profundamente afetadas pela natureza de seu ambiente físico-químico, principalmente as variações no pH do meio. Em pH fortemente ácido prevalece o cátion flavílio com uma carga positiva delocalizada no sistema aromático pirílio, embora os carbonos 2 e 3 sejam as posições mais carregadas positivamente (BROUILLARD *et al.*, 1997).

Devido à presença da carga positiva, o íon flavílio atua como um eletrófilo podendo ocorrer adição nucleofílica da água resultando na perda de cor (geralmente iniciando em pH próximo a 2) e eventualmente seguida por uma abertura reversível do anel levando à formação de duas formas isoméricas de chalconas, incolor. Além disso, os dois grupos hidroxila (posição 4' e 7) possuem caráter ácido e se desprotonam em pH próximo à neutralidade, formando as bases quinoidais que são coloridas. As reações citadas de desprotonação, abertura de anel e ligação covalente com a água não envolvem diretamente a participação de açúcares ou grupos acila (BROUILLARD *et al.*, 1997).

Portanto, dependendo da acidez do meio, a quantidade do pigmento é dividida entre cromóforos (espécies flavílio e quinoidal) e incolor (chalcona). Na forma chalcona a antocianina é muito mais sensível a fatores físico-químicos, podendo levar a uma degradação irreversível. A copigmentação com ânions orgânicos estabiliza a estrutura na sua forma colorida. O copigmento geralmente não possui

cor mas contribui com o aumento da estabilidade dos cromóforos nas antocianinas (Stafford, 1990).

Assim, a cor e a intensidade de cada vegetal colorido não estão necessariamente associadas a um cromóforo (aglicona) distinto mas a uma combinação de diferentes características intrínsecas e extrínsecas da molécula que podem produzir uma infinita variedade de tonalidades (HARBORNE, 1988).

As frutas denominadas “berries” ou frutas vermelhas são ricas em flavonóides e ácidos fenólicos. Muitas delas contêm acima de 100 mg/kg flavan-3-ol, 300 mg/kg de flavonóis, acima de 200 mg/kg de ácidos hidroxicinâmicos e relativa alta quantidade de antocianinas, especialmente em mirtilo, groselha preta e cereja (acima de 5 g/kg) (HEINONEN, MEYER; FRANKEL, 1998).

Semelhante às demais classes de flavonóides, as antocianinas apresentam elevada habilidade de reduzir radicais livres, apresentando também atividade antioxidante em diversos sistemas, tais como LDL e lipossomo (Satué-Gracia *et al.*, 1997). Extratos de frutas (morango e ameixa) contendo alto conteúdo de antocianinas apresentaram alta atividade seqüestradora do radical DPPH (ESPIN *et al.*, 2000). Além disso, alta correlação foi encontrada entre o conteúdo de antocianinas e atividade antioxidante (método ORAC) em vários cultivares da espécie *Vaccinium* (PRIOR *et al.*, 1998) e em mirtilo, morango e framboesa após vários períodos de estocagem (KALT *et al.*, 1999).

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. REAGENTES QUÍMICOS

Os padrões de flavonóides cianidina e pelargonidina foram obtidos da Extrasintese (Genay, France), quercetina foi obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, E.U.A.) e ácido clorogênico da Apin Chemical (Abingdon, Reino unido). Os demais reagentes foram de grau analítico e grau HPLC, quando requerido.

5.2.2. MATERIAL

As amostras de amora silvestre (*Morus* sp.) foram colhidas em setembro de 2002 e 2003. Foram colhidos aqueles frutos que se apresentaram completamente maduros. Após a seleção, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, sendo armazenadas em ultra-freezer à temperatura de -70°C.

5.2.3. MÉTODOS

5.2.3.1. Extração de flavonóides

Para a identificação dos flavonóides da amora silvestre, 5 g de amostra triturada em nitrogênio líquido foi homogeneizado com 100 mL de MeOH/água/AcOH na proporção de 70:30:5 (v/v), incluindo a água contida na amostra, em Ultra-Turrax durante dois minutos. O homogeneizado foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 06 à vácuo. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes com 50 mL nas mesmas condições descritas anteriormente.

Os extratos foram concentrados em rotaevaporador, em temperatura de banho de 40°C até volume próximo a 20 mL. As amostras concentradas foram ajustadas com água destilada para o volume de 50 mL para posterior aplicação em coluna de Poliamida. As extrações foram realizadas em duplicata.

5.2.3.2. Extração em fase sólida

Uma alíquota de 2 mL da amostra concentrada foi passada em coluna de 1 g de poliamida como descrito anteriormente no item 4.2.3.2.

Os eluatos de flavonóides ácidos e neutros foram secos e ressuspensos em 1 mL de MeOH/AcOH (95:5 v/v) e filtrados utilizando filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, E.U.A.) de 0,22 µ de poro.

5.2.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A quantificação e a identificação parcial dos flavonóides foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência. O cromatógrafo utilizado foi o da Hewlett-Packard 1100 (Palo Alto, E.U.A.), equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector com arranjo de diodo (DAD), controlado pelo software ChemStation.

A coluna utilizada foi a Prodigy 5 μ ODS₃ 250 x 4,60 mm (Phenomenex Ltd., Reino Unido) com fluxo de 1 mL/min e a eluição foi realizada com gradiente de solventes constituído por A: água/tetrahidrofurano/ácido trifluoracético (98:2:0,1) e B: acetonitrila. O gradiente linear utilizado está apresentado na Tabela 10. As amostras foram injetadas em duplicata (5-20 μ L) e a identificação foi feita a partir das características dos espectros.

Tabela 10: Gradiente linear das fases móveis utilizado para cromatografia líquida de alta eficiência de flavonóides neutros e ácidos.

Flavonóides neutros			Flavonóides ácidos		
Tempo (min)	Solvente B (%)	Solvente A (%)	Tempo (min)	Solvente B (%)	Solvente A (%)
0-5	8	92	0-7	17	83
5-15	10	90	7-15	25	75
15-25	25	75	15-25	35	65
25-35	50	50	20-25	50	50
30-35	90	10	25-35	90	10
35-45	8	92	35-45	17	83

A calibração dos padrões foi realizada com as antocianinas cianidina e pelargonidina da Extrasynthese, o flavonol quercetina e ácido clorogênico, injetados em triplicata, em cinco concentrações diferentes.

Os resultados foram expressos em mg de aglicona por 100 g de amostra (b.u.).

5.2.3.4. Purificação de antocianinas de amora silvestre

A purificação das antocianinas de amora silvestre foi realizada por cromatografia de papel (CP) descendente.

O eluato de flavonóides neutros obtido a partir da coluna de poliamida (item 5.2.3.2) foi aplicado em papel Whatman 3MM no sentido longitudinal e desenvolvido em uma primeira etapa com HCl 1% durante 10 horas. Foram observadas duas bandas de antocianinas que puderam ser visualizadas por apresentarem cor e denominadas de Pigmento 1 e 2. As bandas de antocianinas obtidas foram recortadas e eluídas três vezes com MeOH/AcOH (95:5 v/v) e evaporadas sob vácuo a 40°C em rotaevaporador até secar. As antocianinas foram ressuspensas no mesmo solvente e novamente aplicadas em papel Whatman 3MM e desenvolvidas em uma segunda etapa com ácido acético 15% por seis horas.

Novamente, as bandas de antocianinas foram eluídas três vezes com MeOH/AcOH (95:5 v/v) sob agitação, evaporadas sob vácuo a 40°C até secar, e ressuspensas em água. As impurezas foram removidas através de três extrações com acetato de etila e o solvente remanescente foi evaporado por corrente de nitrogênio. As bandas foram posteriormente aplicadas em coluna de poliamida como descrito na seção 4.2.3.2. As antocianinas foram eluídas com MeOH/HCl 0,01%, secas em rotaevaporador e ressuspensas no mesmo solvente.

Nas duas etapas de desenvolvimento em cromatografia em papel, as bandas eluídas em HCl 1% e ácido acético 15% foram submetidas a CLAE para confirmação das antocianinas em relação a sua pureza e tempo de retenção.

As antocianinas purificadas foram utilizadas para identificação por espectrofotometria UV/visível e por espectrômetro MS/MS.

5.2.3.5. Hidrólise de glicosídeos e identificação de carboidratos

5.2.3.5.1. Hidrólise ácida

Foi realizada hidrólise ácida segundo Ordaz-Galindo *et al.* (1999). Uma alíquota dos extratos metanólicos obtido em 5.2.3.4 foi tratada com 10 mL de HCl 2N durante uma hora em banho-maria fervente, sob corrente de nitrogênio. Após a hidrólise, as agliconas foram separadas dos açúcares em coluna de poliamida, segundo item 4.2.3.2. A água de lavagem foi recolhida para análise de açúcares e as agliconas foram eluídas com MeOH/HCl 0,01%.

A identificação das agliconas foi feita por CLAE (item 5.2.3.3) e através da espectrofotometria UV/visível.

Para a análise de açúcares, a água de lavagem foi neutralizada com NaOH e liofilizada. Desse liofilizado, 0,4 g foi extraído com 400 µL de piridina e adicionado do reagente de derivatização (1:1 v/v). A derivatização foi realizada com metil-N-trimetilsililfluoroacetamida (37°C/30 min.). A análise dos açúcares foi feita por cromatografia gasosa-impacto de elétrons (CG-EI), acoplado a detector de massa. A identificação dos carboidratos foi realizada pelo espectro de massas.

5.2.3.5.2. Cromatografia gasosa de carboidratos (CG-EI-MS)

A identificação dos carboidratos foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Hewlett Packard 6890 acoplado a um detector seletivo de massas (HP 5973) e equipado com fonte de ionização por impacto de elétrons. A separação cromatográfica foi conduzida usando uma coluna capilar SUPELCO 24181 SPB-50 (30,0 m x 250 µm x 0,25 µm). Foi utilizado modo de injeção splitless com volume de injeção de 1 µL. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste em um fluxo de 1 mL/min. A temperatura utilizada durante a corrida foi de 70°C/5 min seguido de elevação para 300°C/10 min e mantida a esta temperatura durante 50 minutos.

5.2.3.5.3. Hidrólise alcalina

A hidrólise alcalina foi realizada segundo Ordaz-Galindo *et al.* (1999). Uma alíquota dos extratos metanólicos obtidos em 5.2.3.4 foi saponificada com solução de NaOH 10% por 8 minutos à temperatura ambiente, sob corrente de nitrogênio. Em seguida, os glucosídeos foram separados dos ácidos orgânicos em coluna de poliamida. A identificação das antocianinas foi feita por CLAE (item 5.2.3.3) e através de espectrofotometria UV/Visível.

5.2.3.6. Identificação espectrofotométrica UV-Visível de antocianinas

Os pigmentos 1 e 2 purificados por CP e posteriormente submetidos e hidrólise ácida e alcalina foram analisadas através de espectrofotometria de UV/visível em espectrofotômetro Hewlett Packard 8453 em solução de MeOH/HCl 0,01% e solução de MeOH/HCl 0,01% com o acréscimo de reagentes complexantes

(AlCl_3 e $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$), através dos quais foram obtidas informações sobre o padrão de hidroxilação e substituição da molécula.

5.2.3.7. Identificação das antocianinas por espectrômetro massa-massa

A identificação das antocianinas obtidas por CP também foi conduzida por injeção direta no espectrômetro de massas equipado com duplo quadrupolo (Quatro LC, Micromass, Altringham, Cheshire, UK), equipado com interface de ionização por elétron spray (ESI). Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

A ESI foi conduzida em modo positivo. Para a análise no espectrômetro de massas foi utilizado voltagem do capilar de 3,00 kV, temperatura de dessolvatação de 350°C, voltagem do cone de 30 V para Pigmento 1 e 40 V para Pigmento 2 e Energia de colisão de 5 para o primeiro quadrupolo e de 30 para o segundo quadrupolo.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Identificação e quantificação de flavonóides presentes na amora silvestre

De acordo com a análise por CLAE de amora silvestre (Figura 17A e 17B), foi identificada a presença de dois derivados de cianidina, um de pelargonidina e um derivado de quercetina na fração de flavonóides neutros. Na fração de flavonóides ácidos, dois picos de ácido hidroxicinâmico foram identificados.

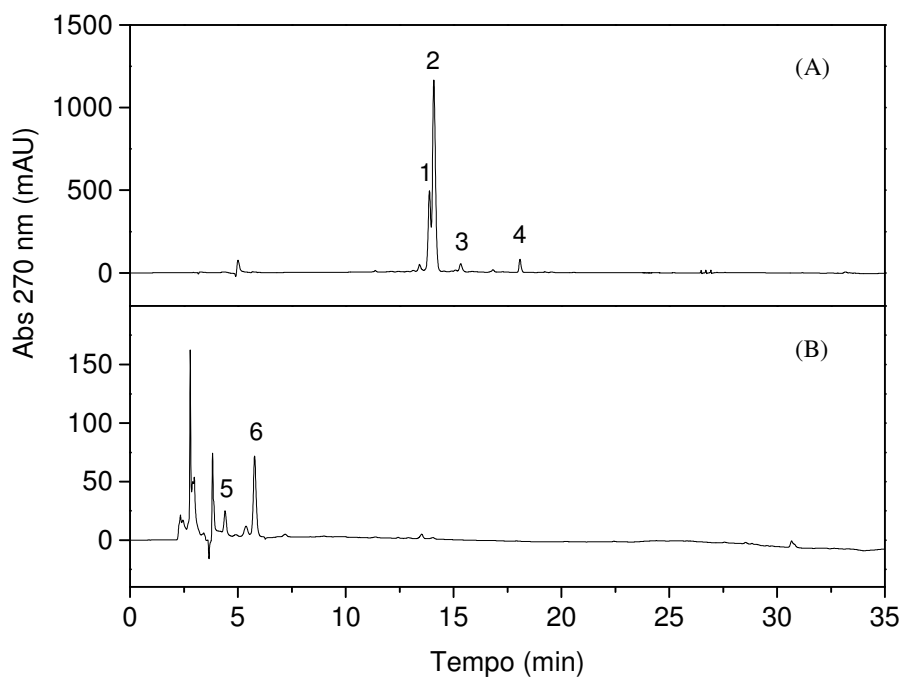


Figura 17: Cromatograma de flavonóides de amora silvestre analisada por cromatografia líquida de alta eficiência. (A) flavonóides neutros; (B) flavonóides ácidos. (1 e 2) derivados de cianidina; (3) derivado de pelargonidina; (4) derivado de quercetina; (5 e 6) ácido hidroxicinâmico.

O número de antocianinas presentes em vegetais é muito variável. Wu e Prior (2005a e 2005b) identificaram por HPLC-ESI-MS/MS desde duas antocianinas em pistache, pêssego e nectarina, até 31 e 34 em uva Concorde e rabanete vermelho, respectivamente. Com exceção da amora-preta, todas as frutas bagas analisadas por Wu e Prior (2005a) não apresentaram grupos acilados na estrutura da antocianina, contudo, verificou-se uma composição bastante variável de antocianidinas com diferentes padrões de glicosilação em uma mesma fruta.

As concentrações de flavonóides em amostras obtidas em diferentes anos (2002 e 2003) apresentaram variações significativas para todos os derivados de flavonóides identificados ($p < 0,05$). As concentrações encontradas foram de 256 e de 138 mg/100g b.u. para cianidina; 3,6 e 2,7 mg/100g b.u. para pelargonidina; 14,1 e 15,3 mg/100 g b.u. de quercetina; e 12,4 e 14,1 mg/100 g b.u. de ácido hidroxicinâmico, nos anos de 2002 e 2003, respectivamente (Figura 18).

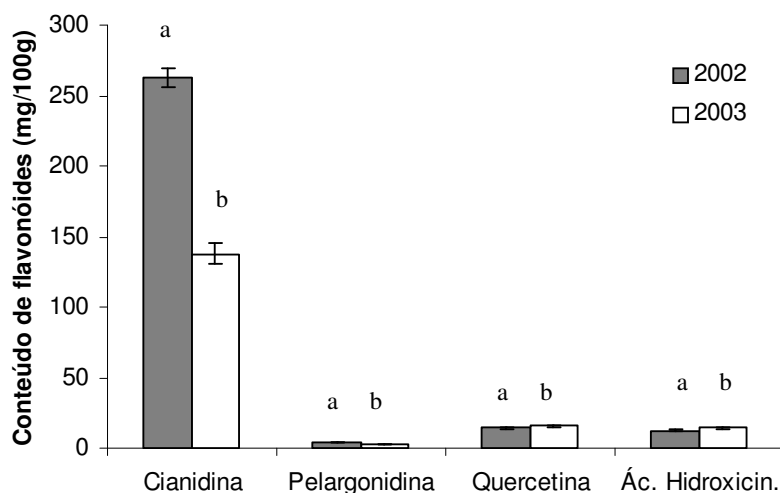


Figura 18: Concentração de flavonóides em amora silvestre nos anos de 2002 e 2003. Letras diferentes entre as épocas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

5.3.2. Isolamento de antocianinas de amora silvestre

Para o isolamento das antocianinas encontradas na fração metanol (FN) da amora silvestre, procedeu-se à separação em cromatografia em papel (CP) (Whatman 3MM).

As antocianinas foram isoladas por CP unidimensional utilizando dois solventes. O primeiro solvente consistiu de HCl 1% de onde foram separadas duas bandas de antocianinas. Estas bandas foram eluídas separadamente e aplicadas novamente em CP unidimensional, utilizando ácido acético 15% como segunda fase móvel. As duas bandas foram denominadas de pigmento 1 (P1) e pigmento 2 (P2).

Para o isolamento de flavonóides por CP recomenda-se o uso de no mínimo dois solventes de corrida para assegurar compostos puros. Entretanto, solventes contendo ácidos minerais durante os estágios finais de purificação devem ser evitados uma vez que estes reagem com substâncias do papel de filtro produzindo arabinose, que pode induzir a erros quando é realizada a identificação dos açúcares (HARBORNE, 1967).

O R_f dos pigmentos na CP foi de 0,50 e 0,73 no solvente HCl 1% e 0,54 e 0,67 no solvente AcOH 15% para os pigmentos 1 e 2, respectivamente. O grau de pureza das bandas eluídas foi confirmada por CLAE (Figura 19). Os parâmetros avaliados foram a presença de um único pico no cromatograma e através da coincidência dos espectros obtidos pela análise de cinco pontos do pico.

Os tempos de retenção dos pigmentos em CLAE foram de 13,9 e 14,2 min para os pigmentos 2 e 1, respectivamente. O pigmento 1 concentra aproximadamente 71% do total de cianidina glicosilada de amora silvestre, enquanto que o pigmento 2 concentra os demais 29%. Esta proporção aumenta para 80:20 nas amoras colhidas em 2003.

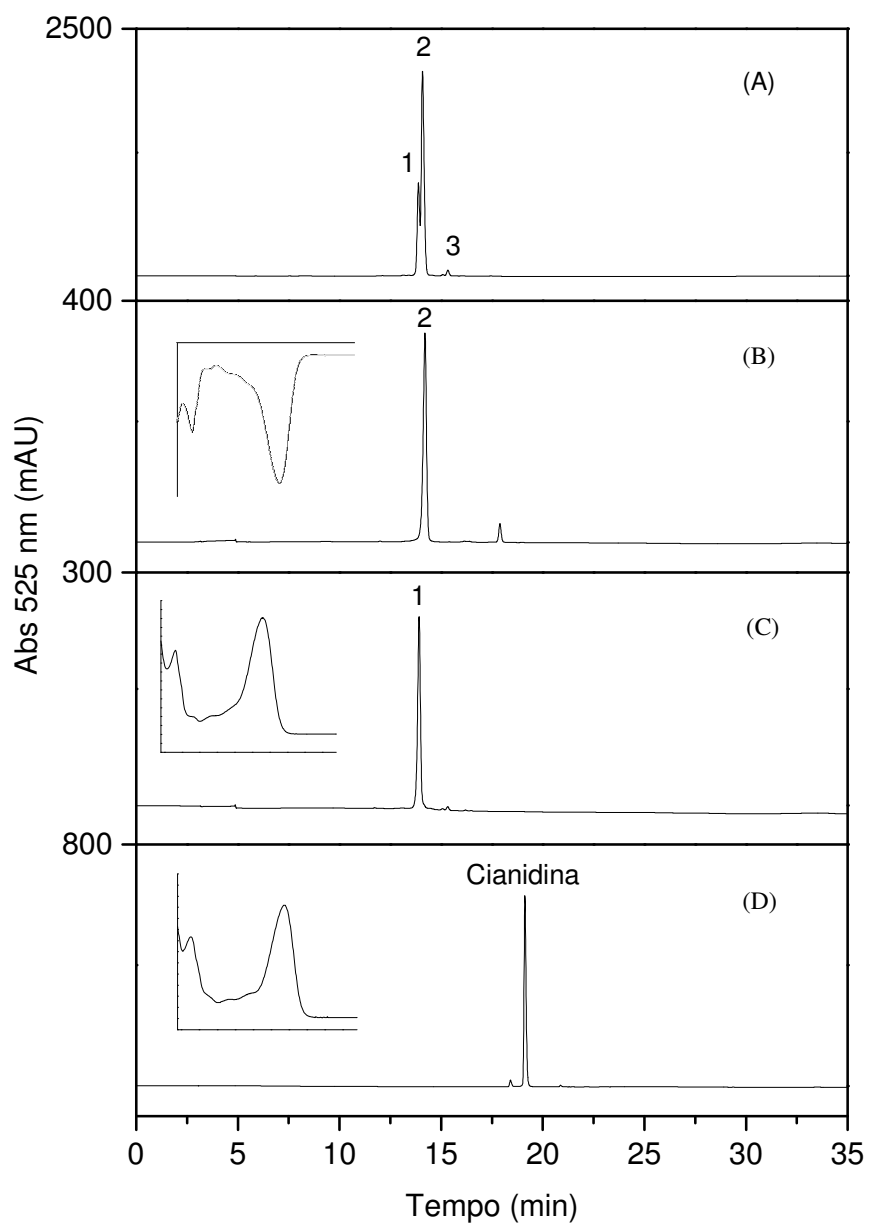


Figura 19: Cromatograma obtido por CLAE de antocianinas de amora silvestre purificado por cromatografia em papel. (A) flavonóides neutros, (B) pigmento 1 e (C) pigmento 2 isolado por cromatografia em papel (solvente ácido acético 15%); (D) pigmento 1 após hidrólise ácida.

5.3.3. Caracterização espectrofotométrica de antocianinas

Importantes propriedades estruturais podem ser obtidas a partir de dados do espectro da amostra, incluindo a natureza da aglicona (HARBORNE, 1967), a posição da molécula de açúcar (HARBORNE, 1958) e informações a respeito da acilação por ácidos orgânicos aromáticos.

Os pigmentos 1 e 2 isolados por CP foram caracterizados por espectrofotometria UV/visível. Inicialmente foram realizadas a hidrólise ácida dos pigmentos para a identificação da aglicona e hidrólise alcalina para a identificação de presença de grupos acil ligados à molécula de antocianina.

Os resultados da caracterização química são apresentados nas Tabelas 11 e 12 e os respectivos espectros de absorção nas Figuras 20 e 21 para os pigmentos 1 e 2, respectivamente.

Tabela 11: Caracterização por espectrofotometria UV/visível da antocianina de amora silvestre correspondente ao Pigmento 1 isolado por cromatografia em papel.

	$\lambda_{\text{máx.}}(\text{nm})$	$E_{440}/E_{\text{máx}}$ (%)	AlCl_3 $\lambda_{\text{máx.}}(\text{nm})$	AlCl_3 ($\Delta\lambda$)	$E_{340}/E_{\text{máx}}$ (%)
P1	282, 529	23	574	45	10
P1 (após hidr. alcalina)	281, 529	26			20
P1 (após hidr. ácida)	279, 537	22	574	37	
Cianidina ^{1,2}	277, 535	19		18	
Cyn 3-glucosídeo ^{1,2}	274, 523	24			<20
Cyn 3,5-diglucosídeo ^{1,2}	273, 524	13			<20

¹ Harborne, 1958; ² Harborne, 1967

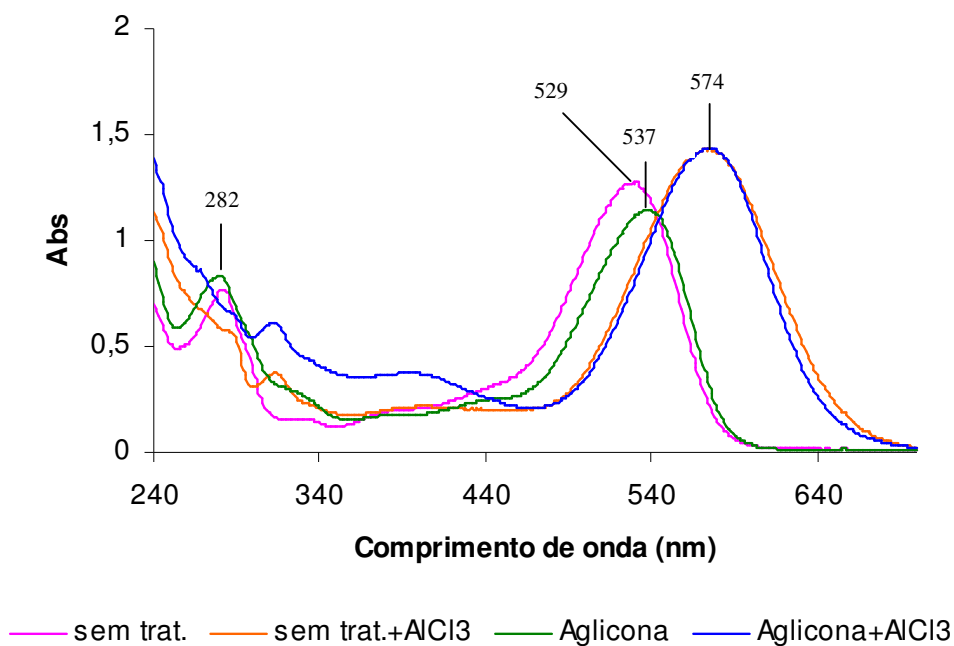


Figura 20: Espectro de absorção do pigmento 1 isolado a partir da cromatografia em papel (ácido acético 15%).

Tabela 12: Caracterização por espectrofotometria UV/visível da antocianina de amora silvestre correspondente ao pigmento 2 isolado por cromatografia em papel.

	$\lambda_{\text{máx.}}(\text{nm})$	$E_{440}/E_{\text{máx}}$ (%)	AlCl_3 $\lambda_{\text{máx.}}(\text{nm})$	AlCl_3 ($\Delta\lambda$)	$E_{340}/E_{\text{máx}}$ (%)
P2	281, 531	23	574	43	13
P2 (hydr. alcalina)	281, 531	25			23
P2 (hydr. ácida)	277, 537	22	575	38	
Cianidina ^{1,2}	277, 535	19		18	
Cyn 3-glucosídeo ^{1,2}	274, 523	24			<20
Cyn 3,5-diglucosídeo ^{1,2}	273, 524	13			<20

¹ Harborne, 1958; ² Harborne, 1967

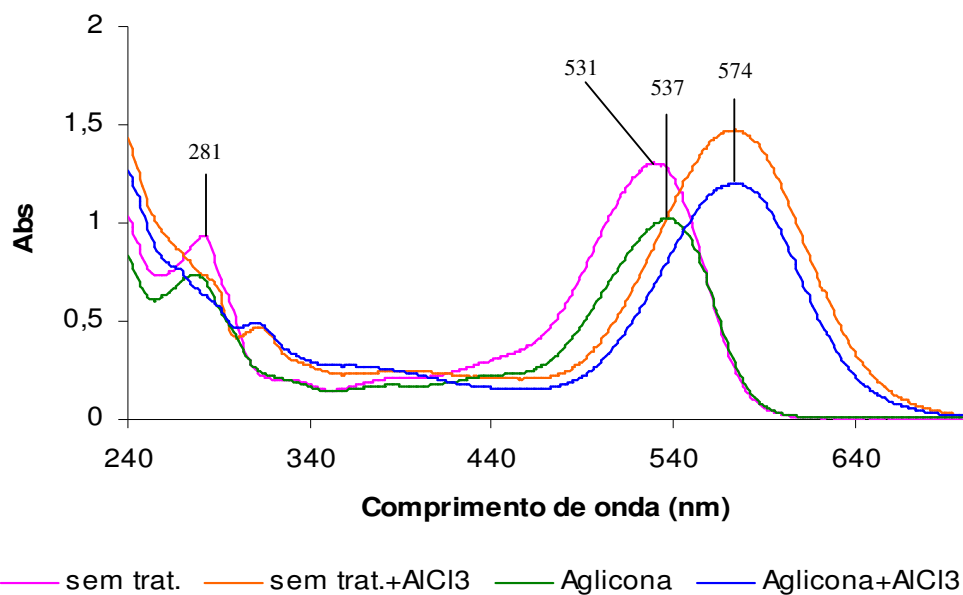
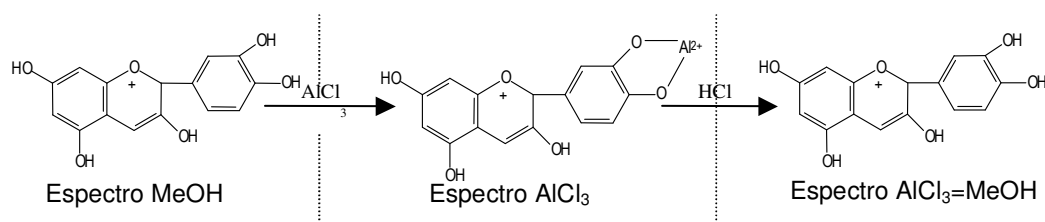


Figura 21: Espectro de absorção do pigmento 2 isolado a partir da cromatografia em papel (ácido acético 15%).

Interpretação do espectro de absorção (HARBORNE, 1958; HARBORNE, 1967; MARKHAM, 1982):

1. **$\lambda_{\text{máx.}}$** - as antocianidinas e seus derivados glicosilados exibem absorção máxima na região do visível (465-550 nm) e uma menor na região UV (275 nm).
2. **Complexação com AlCl_3** - todas as antocianidinas e seus derivados glicosilados que possuem o *O*-dihidroxi livres apresentam deslocamento batocrômico de 25-36 nm na presença do íon alumínio em pH 2-4. As antocianidinas que apresentam núcleo catecol são: cianidina (277, 535 nm), delphinidina (277, 546 nm) e petunidina (276, 543 nm). Este complexo é desfeito pela adição de HCl.



3. **$E_{340}/E_{\text{máx.}}$** - as antocianinas aciladas apresentam dois picos de absorção na região do UV devido à superposição do espectro de absorção do grupo acil, normalmente ácido cinâmico, sobre o espectro do pigmento. A posição do novo pico, entre 310-340 nm, indica a natureza do ácido cinâmico presente. A relação entre a intensidade deste pico quando comparada à intensidade de absorção no $\lambda_{\text{máx.}}$ ($E_{340}(\text{acil})/E_{\text{máx}}(\text{visível})$) mostra o número de unidades de ácido cinâmico presente no pigmento. Assim, em metanol acidificado o valor entre 48-71% é indicativo de uma proporção molar de 1:1 com o ácido cinâmico. Já o valor de 83-107% é indicativo de uma proporção molar de 2:1. Valores <40% demonstram ausência de grupos acilantes.
4. **Hidrólise alcalina**- a hidrólise alcalina remove os grupos acil quantitativamente deixando o açúcar da antocianina intacta.
5. **Hidrólise ácida**- clivagem do açúcar da antocianina *O*-glicosilado com a obtenção da respectiva aglicona. A glicosilação causa um deslocamento hipsocrômico no espectro em relação à aglicona. O

tamanho do deslocamento depende de qual e como as hidroxilas estão glicosiladas. O tipo de açúcar não influi no deslocamento.

Então: glicosilação em posição 3-OH causa o maior deslocamento hipsocrômico ($\Delta\lambda$ 10-15nm);

glicosilação em posição 5-OH causa um deslocamento hipsocrômico menor;

glicosilações em posição 3-OH e 3,5-di-OH apresentam pequenas diferenças entre os espectros, mas antocianinas com 5-OH livre possuem pico de absorção na região de 410-450 nm ($E_{440}/E_{máx}$) em relação ao 3,5-OH glicosilado.

6. **$E_{440}/E_{máx}$** - utilizado para distinguir as duas classes de antocianinas, 3- e 3,5-glucosídeos. A porcentagem de intensidade a 440 nm dos 3,5-glucosídeos é aproximadamente a metade da antocianidina correspondente no qual o grupo 5-OH está livre.

Desta maneira, a partir dos dados extraídos das Tabela 14 e 15 e descritos em literatura (HARBORNE, 1958; HARBORNE, 1967; MARKHAM, 1982), podemos dizer que os pigmentos referentes a P1 e P2 são possíveis derivados de cianidina com glicosilação em posição 3, visto que:

- a reação dos pigmentos referentes a P1 e P2 (não hidrolisado e hidrolisado) com $AlCl_3$ causa um deslocamento batocrômico ($\Delta\lambda$), o que o caracteriza como sendo uma antocianina *O*-didroxi livre. Neste grupo temos a cianidina, delphinidina e petunidina. O complexo antocianina- $AlCl_3$ é desfeito após adição de HCl.
- a hidrólise ácida dos pigmentos 1 e 2 resulta em uma única antocianidina (Tabela 11 e 12). O $\lambda_{máx}$.do pigmento após hidrólise ácida (forma aglicona) está próximo ao citado na literatura para a cianidina (277 e 535 nm). Demais antocianinas possuem $\lambda_{máx}$ diferente aos encontrados.
- análise por CLAE da antocianidina obtida por hidrólise ácida (Figura 19) confere com o tempo de retenção (19,1 min) e espectro de absorção do padrão cloreto de cianidina.
- os pigmentos não estão ligados a ácidos orgânicos cinâmicos visto que a relação **$E_{340}/E_{máx}$** é <40%. Este resultado é confirmado pela hidrólise alcalina já que não se verificou alteração no espectro de absorção quando comparado ao pigmento não tratado.

- os pigmentos isolados por CP são possíveis 3-glicosídeos, já que a relação entre $E_{440}/E_{máx}$ é semelhante aos relatados em literatura.
- Através da análise do espectro de absorção não é possível identificar o(s) açúcares que compõem a molécula.

5.3.4 Análise de carboidratos

A identificação dos carboidratos obtidos a partir da hidrólise ácida dos pigmentos 1 e 2 foi realizada por CG-EL-MS. Para o pigmento 1 foram encontrados dois picos de açúcares que foram identificados pela comparação do espectro de massas como sendo de glicose (Figura 22). O cromatograma do pigmento 2 indicou a presença de quatro picos de açúcares identificados como dois picos de ramnose e dois picos de glicose (Figura 23).

A presença de dois picos de um mesmo açúcar pode ser esperada, uma vez que podem estar presentes tanto na forma de estrutura de cadeia aberta quanto de cadeia fechada.

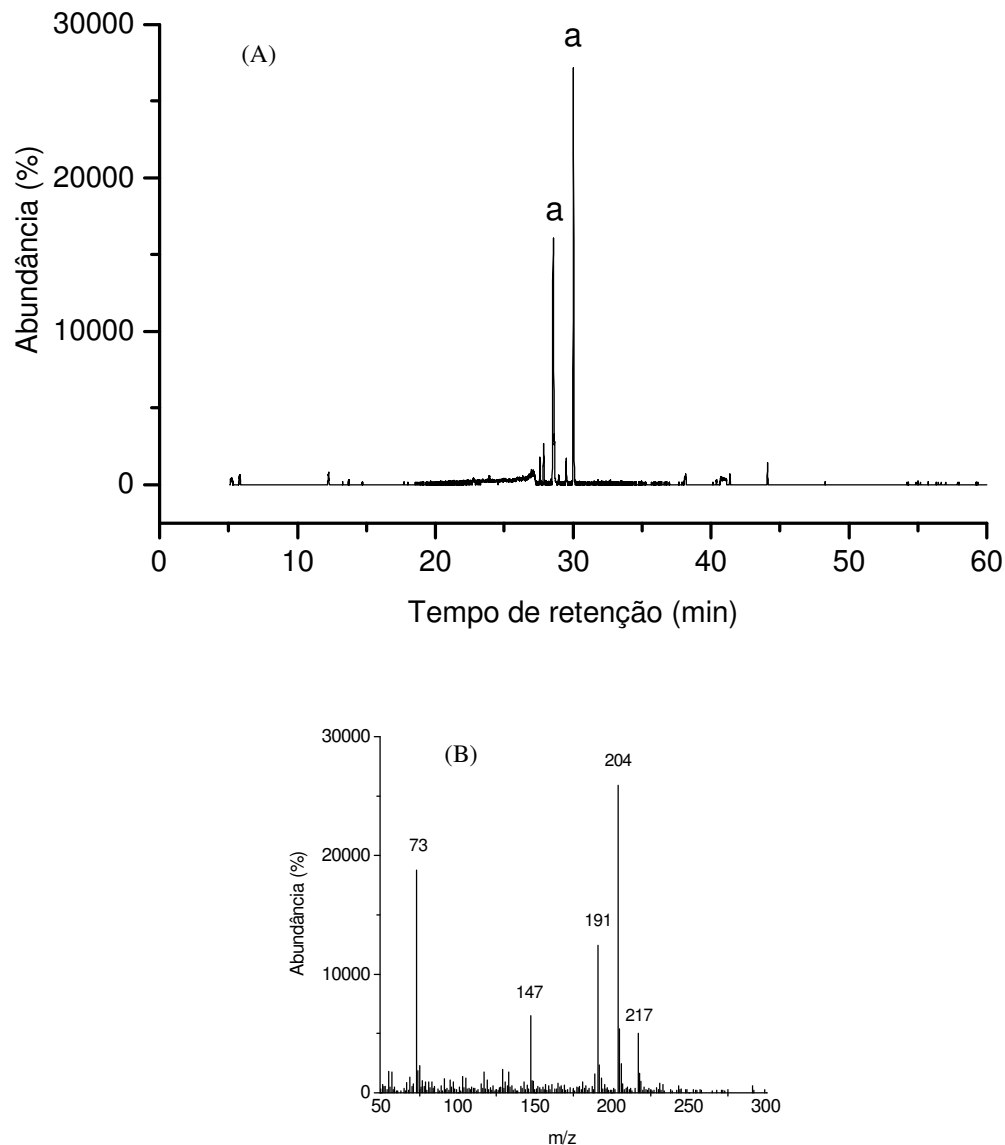


Figura 22: Cromatograma de carboidratos separados por CG-EI-MS após hidrólise ácida do pigmento 1 (A). O açúcar identificado pelo seu espectro de massas foi: (a) glicose, onde (B) corresponde ao espectro de massas de glicose

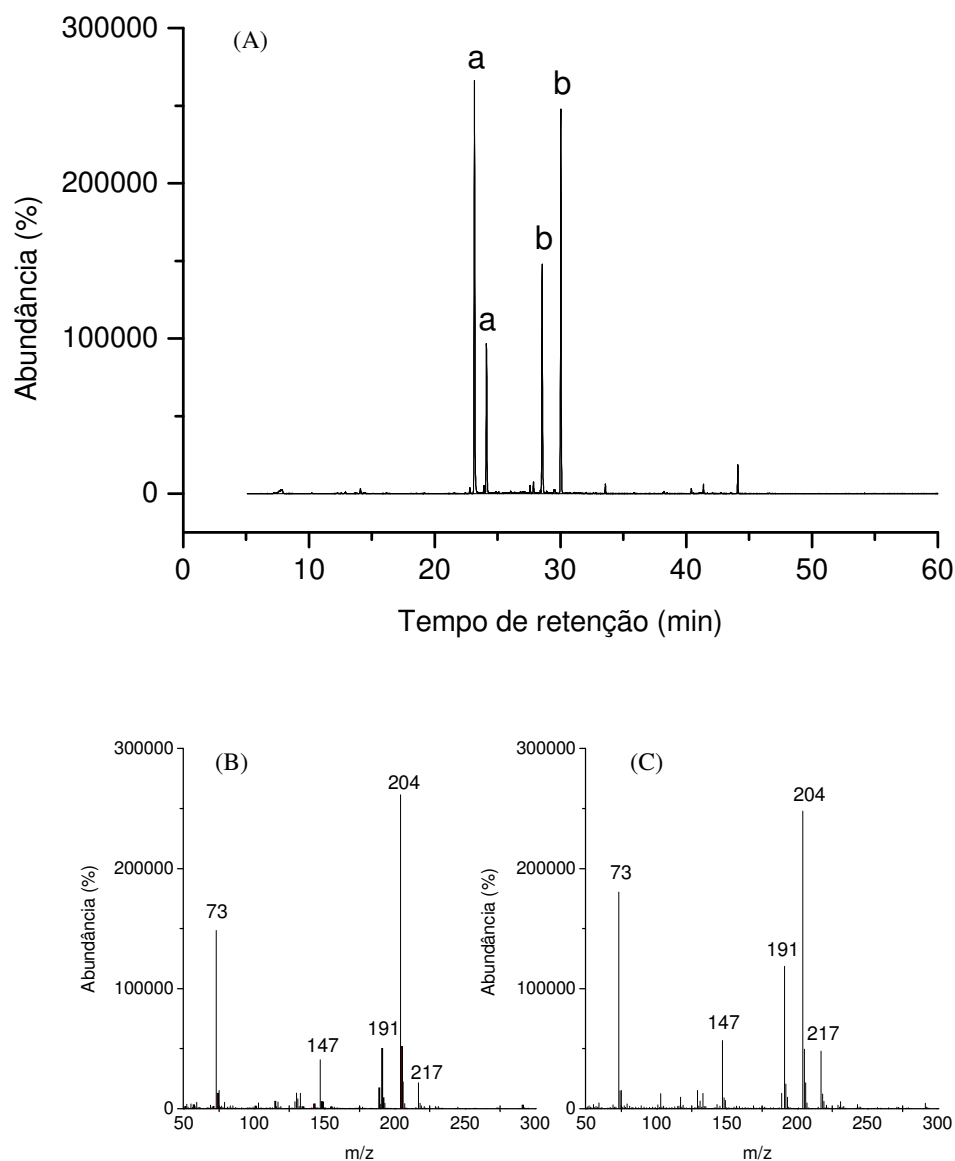


Figura 23: Cromatograma de açúcares separados por CG-EI-MS após hidrólise ácida do pigmento 2 (A). Os açúcares identificados pelo seu espectro de massa são: (a) ramnose e (b) glicose, onde (B) corresponde ao espectro de massa da ramnose e (C) corresponde ao espectro de massa da glicose.

5.3.5. Identificação de antocininas por espectrômetro MS/MS

A análise do espectro de massas dos pigmentos 1 e 2 foi realizada por injeção direta no espectrômetro de massas. O pigmento 1 pôde ser identificado apresentando íon molecular (m/z) de 449 (Figura 24), que por colisão com argônio formou o fragmento de m/z 287 correspondente à aglicona e resultante da perda de uma molécula de hexose, m/z -162 (Figura 25). De acordo com Dugo *et al.* (2001), antocianinas de “black bilberry” com m/z de 449 foram identificadas como cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-galactosídeo e petunidina-3-arabinosídeo. Considerando que m/z 287 corresponde ao íon molecular da cianidina e a análise de açúcares detecta glicose como açúcar do pigmento 1, pode-se concluir que a antocianina 1 é provavelmente uma cianidina-3-glucosídeo.

O pigmento 2 pôde ser identificado apresentando íon molecular 595 (Figura 26), com dois fragmentos de m/z 449 e 287 (Figura 27) após colisão com argônio. O composto de m/z 449 correspondente a cianidina-3-glucosídeo resultante da perda de uma molécula de ramnose, m/z -146 e o composto de m/z 287 corresponde a cianidina. De acordo com Garcia-Beneytez, Cabello e Revilla (2003), antocianinas de casca de uva com m/z de 595 foram identificadas como cianidina-3-*O-p*-cumaroilglucosídeo. Entretanto, considerando que a análise de açúcares detecta glicose e ramnose como açúcares presentes na estrutura do pigmento 2, e que na análise por espectrofotometria UV/visível a relação $E_{340}/E_{máx}$ é <40%, o que indica a ausência de ácidos orgânicos na molécula, pode-se concluir que a antocianina 2 é uma provável cianidina-3-glucoramnosídeo. Como é detectado um fragmento de m/z de 449, pode-se também concluir que a glicose é o açúcar ligado diretamente à posição 3-OH da cianidina.

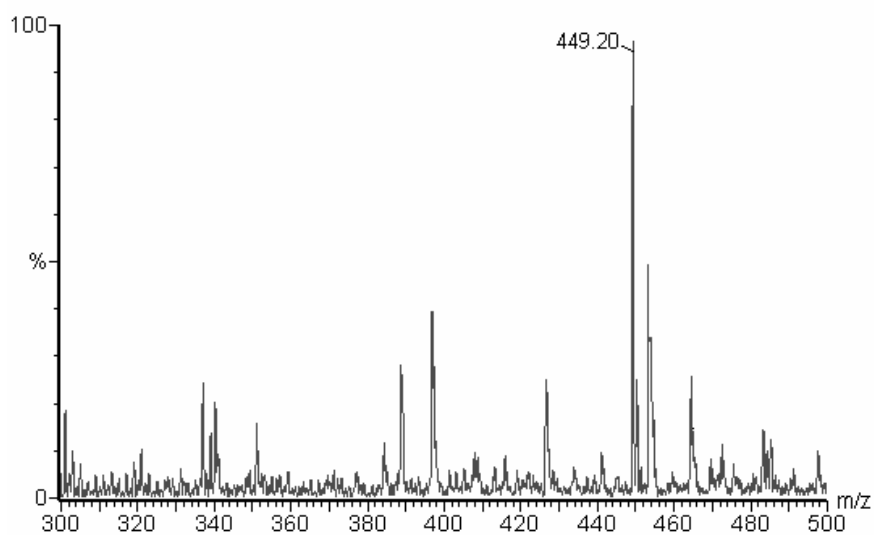


Figura 24: Espectro de massas ESI-MS-MS (modo positivo) de cianidina-3-glucosídeo, demonstrando m/z 449.

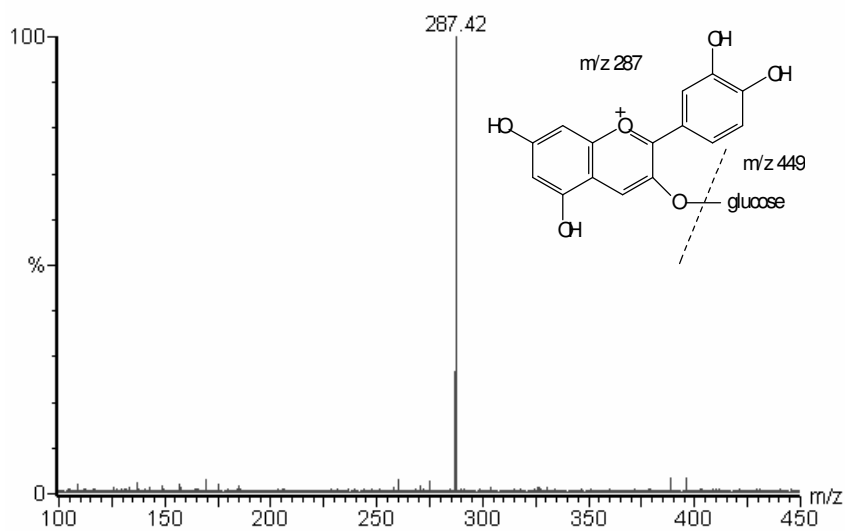


Figura 25: Espectro MS/MS dos produtos gerados por colisão com argônio, centrado em m/z 449.

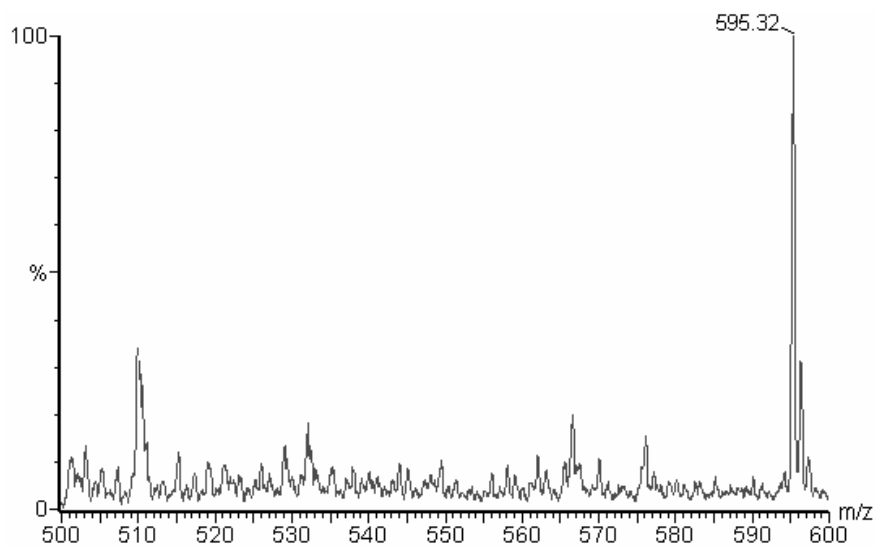


Figura 26: Espectro de massas ESI-MS-MS (modo positivo) de cianidina-3-glucoramnosídeo demonstrando m/z 595.

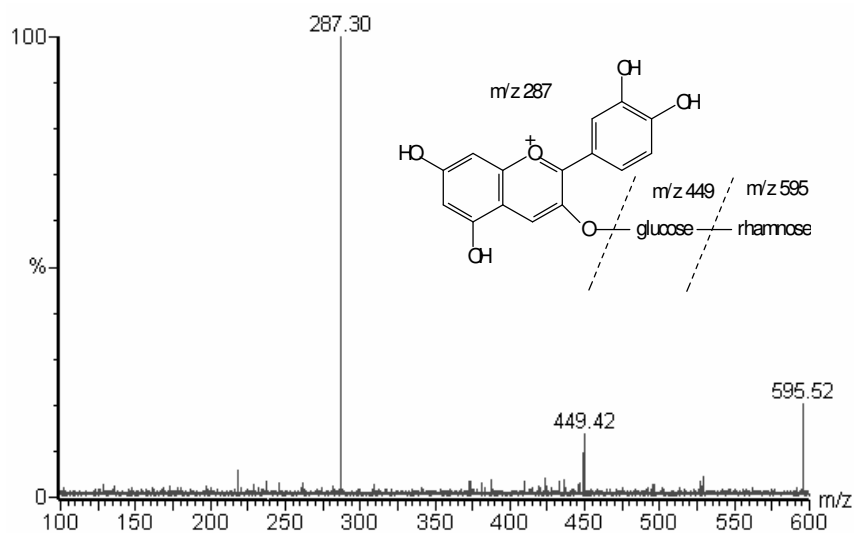


Figura 27: Espectro MS/MS dos produtos gerados por colisão com argônio, centrado em m/z 595.

O cromatograma extraído da análise por CLAE/DAD dos pigmentos 1 e 2 após purificação por CP não indica a presença de nenhum outro composto, contudo, a análise por espectrômetro de massas mostra a presença de outros compostos. Tanto no pigmento 1 quanto no pigmento 2 observa-se a presença de um íon molecular de 453 em alta abundância. A fragmentação deste composto não coincide com dados de literatura referente a antocianinas (Figura 28).

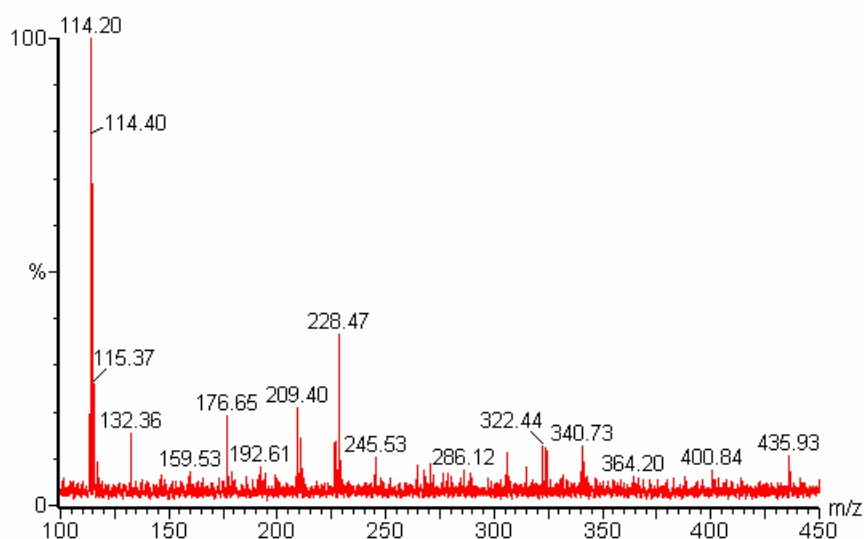


Figura 28: Espectro MS/MS dos produtos gerados por colisão com argônio do interferente presente nas bandas 1 e 2 a m/z 453. Composto não identificado.

Desta maneira, considerando todas as informações obtidas a partir da espectrofotometria UV/visível, espectroscopia de massas e a partir da identificação dos açúcares, as duas maiores frações de antocianinas que compõem a amora silvestre são: cianidina-3-glucosídeo (pigmento 1) e cianidina-3-glucoramnosídeo (pigmento 2).

Gerasopoulos e Stravroulakis (1997) encontraram cianidina-glucoramnosídeo como pigmento responsável por aproximadamente 60% da coloração de *Morus* sp., sendo também identificados a cianidina-3-soforosídeo, pelargonidina-3-rutinosídeo, e um composto não identificado (responsável por aproximadamente 35%). Outra fruta citada em literatura que contém cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo é a Capulina (*Prunus serotina* Ehrh) (ORDAZ-GALINDO et al., 1999). Ainda, em fruto de açaí (*Euterpes oleracea*) foram identificados também a cianidina-rutinosídeo e cianidina-glucosídeo como as principais antocianinas e peonidina-rutinosídeo presente em pequena concentração (GALLORI et al., 2004; MARX et al., 2003).

5.4. CONCLUSÃO

Na identificação dos compostos fenólicos de amora silvestre foram encontrados:

- e. Flavonóides: derivados de cianidina como principais componentes; derivados de pelargonidina e quercetina em pequena concentração.
- f. Ácidos hidroxicinâmicos.

Foram identificados como derivados de cianidina, a cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-glucoramnosídeo.

6. ESTUDOS PRELIMINARES DE BIODISPONIBILIDADE DE ANTOCIANINAS DE AMORA SILVESTRE (*Morus sp.*)

6.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A atividade antioxidante das antocianinas (KÄHKÖNEN; HEINONEN, 2003) tem sido correlacionada a diversos efeitos biológicos, tais como atividade anti-inflamatória (SEERAM; MOMOIN; BOURQUIN, 2001; SEERAM; ZHANG; NAIR, 2003; TALL *et al.* 2004), inibição da agregação plaquetária (MORAZZONI; MAGISTRETTI, 1990), inibição da proliferação celular e indução da apoptose (KATSUBE *et al.*, 2003; KANG *et al.*, 2003).

Entretanto, apesar das diversas atividades biológicas demonstradas em sistema *in vitro*, sua eficiência *in vivo* depende principalmente da taxa de absorção, metabolismo, distribuição nos diversos tecidos e finalmente sua excreção (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

As antocianinas são rapidamente absorvidas pelo estômago (PASSAMONTI *et al.*, 2003; TALAVÉRA *et al.*, 2003) e intestino delgado (TALAVÉRA *et al.*, 2004) e aparecem na circulação sanguínea e urina na forma intacta, metoxilada e/ou conjugada ao ácido glucurônico (ICHIYANAGI *et al.*, 2005; TALAVÉRA *et al.*, 2005).

Apesar dos diversos estudos relacionados ao metabolismo de antocianinas, poucos são os trabalhos elucidando o mecanismo de absorção destes compostos. De maneira geral, dois são os mecanismos de absorção dos flavonóides glicosilados através da mucosa intestinal. Uma vez que nos vegetais os flavonóides encontram-se na forma glicosilada, estes devem primeiramente sofrer hidrólise pela β -glicosidase endógena (lactase floridzina hidrolase- LPH) (GEE *et al.*, 2000), ou pelas enzimas da flora microbiana do intestino grosso (HOLLMAN; KATAN, 1999) e posterior absorção por difusão passiva da forma aglicona liberada. O segundo mecanismo de absorção de flavonóides glicosilados é pela interação com o transportador da glicose sódio dependente (SGLT1), com subsequente desglicosilação no enterócito pela β -glicosidase citosólica (MATSUMOTO *et al.*, 2001). No estômago, o mecanismo de absorção das antocianinas permanece desconhecido, entretanto, Passamonti, Vrhovsek e Mattivi (2002) sugeriram que um

transportador de ácidos orgânicos, a bilitranslocase, expresso no epitélio gástrico, esteja envolvido na absorção de antocianinas neste órgão.

Desta maneira, uma vez identificadas as principais antocianinas da amora silvestre (*Morus* sp.), este estudo propõe avaliar a distribuição e concentração das antocianinas nos diversos órgãos do sistema digestório (estômago, intestino delgado, intestino grosso), no plasma e no tecido excretor (rim), visto ser o último órgão onde transita antes de ser eliminado. Além disso, propõe-se estudar os prováveis mecanismo de absorção e transporte das antocianinas no sistema digestivo.

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1. REAGENTES QUÍMICOS

O padrão de flavonóide cianidina foi obtido da Extrasintese (Genay, France) e rutina da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os reagentes DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil), trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), β -caroteno, ácido linoléico, butilhidroxitolueno (BHT), α -D-glicose e floridzina (floreína-2'- β -D-glucosídeo) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, E.U.A.). Os demais reagentes foram de grau analítico e grau HPLC, quando requerido.

6.2.2. MATERIAL

As amostras de amora silvestre (*Morus* sp.) foram colhidas entre setembro a outubro de 2003 e congeladas em nitrogênio líquido, sendo armazenadas em ultra-freezer à temperatura de -70°C. Para a extração de antocianinas, a amora silvestre foi pulverizada com nitrogênio líquido.

6.2.3. MÉTODOS

6.2.3.1. Extração de antocianinas de amora silvestre

A extração de antocianinas foi realizada de acordo com o método descrito por Price *et al.* (1999), com algumas modificações. A amostra pulverizada (25 g) foi homogeneizada três vezes em metanol/água/ácido acético na proporção de 70:30:5 (100 mL na primeira extração, 50 mL nas seguintes) utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça), em banho de gelo. O homogeneizado foi filtrado com papel de filtro Whatman n° 06 e posteriormente concentrado em rotaevaporador (Rotavapor, RE 120, Büchi, Flawil, Suíça), em temperaturas de banho de 40°C até volume próximo a 20 mL. As amostras concentradas tiveram seu volume ajustado com água deionizada em balão de 50 mL para posterior aplicação em colunas de poliamida (SPE).

6.2.3.2. Extração em fase sólida (SPE)

Uma alíquota de 25 mL da amostra concentrada foi eluída em coluna de 10 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparada em seringa própria de 60 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 100 mL

de metanol e 200 mL de água destilada. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 200 mL de água destilada e a eluição dos flavonóides foi realizada com 150 mL de metanol acidificado com HCl 0,1%. O fluxo através da coluna foi controlado por meio de manifold (Visiprep 24 DL Supelco, Bellefonte, PA). O eluato foi completamente seco através de rotaevaporação sob vácuo a 40°C e ressuscitado em água destilada. O extrato de antocianinas foi ainda submetido a uma corrente de nitrogênio, e congelado até a administração aos ratos. Uma alíquota de 50µL do extrato foi ressuscitada em 450µL de metanol HPLC/AcOH (95:5 v/v) e filtrada utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, E.U.A.) de 0,22 µ de poro para a quantificação das antocianinas por CLAE/DAD .

6.2.3.3. Estudo de biodisponibilidade de antocianinas em animais

Todos os experimentos com animais foram submetidos à aprovação pela Comissão de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Protocolo nº 53 de 19/11/2004).

6.2.3.3.1. Animais

Para o estudo de biodisponibilidade de antocianinas de amora em ratos foram utilizados 32 ratos Wistar macho de peso aproximado de 200 g. Na noite anterior ao experimento, os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em 7 grupos de 4 animais e mantidos em jejum com acesso a água *ad libitum*.

6.2.3.3.2. Desenho experimental

O extrato de antocianina obtido no item 6.2.3.2 foi dissolvido em água e administrado aos animais por gavagem na concentração correspondente a 25 mg de cianidina total/200 g peso do animal, com exceção do grupo controle ao qual foi administrado água. Após a gavagem, os animais foram devolvidos às gaiolas e providos de água, sem a ração.

Os ratos foram anestesiados pela administração intraperitoneal de hidrato de cloral (400mg/Kg em solução salina) e sacrificados após 15 e 30 minutos, 1, 2, 3, 4 e 8 horas após a administração do extrato de antocianina (n=4 para cada tempo). O

sangue foi coletado através da artéria abdominal em tudo a vácuo com EDTA (3 mL). Os rins, estômago, intestino delgado e o intestino grosso também foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

6.2.3.3.3. Preparação e determinação de antocianinas no material biológico

A) *Sangue*. O sangue coletado foi centrifugado a 2000 g, 15 min a 4°C, acidificado com 20% do volume com ácido trifluoracético 5% (McGHIE *et al.*, 2003) e estocado a -20 °C. A determinação de antocianinas no plasma foi realizado segundo Matsumoto *et al.* (2001). Uma alíquota do plasma (1,5-2,0 mL) foi diluída com 3 mL de ácido oxálico 10 mM e eluída em coluna de 0,2 g de Supelclean LC-18 (Supelco, Bellefonte, PA, USA), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology) e pré-condicionada pela passagem de 10 mL de metanol contendo 5% TFA, seguida de 20 mL de ácido oxálico 10 mM. Após a aplicação do plasma, a coluna foi lavada com 20 mL de ácido oxálico 10 mM e a eluição das antocianinas foi realizada com 15 mL de metanol contendo 5% TFA. Os eluatos assim obtidos foram secos completamente em rotavaevaporador a 40°C sob vácuo e ressuspensos em 1 mL de metanol:ácido acético (99:5 v/v) para quantificação por CLAE/DAD.

B) *Estômago, intestino delgado e intestino grosso*. Os órgãos foram liofilizados e homogeneizados por 2 minutos utilizando Ultra-Turrax com 100 mL de metanol/água/ácido acético na proporção de 70:30:5 (v/v). O extrato assim obtido foi posteriormente centrifugado a 10.000 g/10 min/4 °C e o resíduo re-extraído nas mesmas condições. O sobrenadante das duas extrações foi agregado e concentrado em rotaevaporador a 40°C até a remoção do metanol. Uma alíquota da amostra livre de metanol foi eluída em coluna de 1 g de poliamida, como descrito anteriormente no item 4.2.3.2.

Os eluatos foram secos completamente em rotaevaporador a 40°C sob vácuo e ressuspensos em 1 mL de metanol:ácido acético (99:5 v/v) para quantificação por CLAE/DAD.

C) *Rim*. A determinação de antocianinas no tecido renal foi realizada segundo Tsuda, Horio e Osawa (1999). O tecido renal (~0,7 g) foi homogeneizado em 4 volumes de tampão fosfato 0,4 M (pH 3,9) contendo 0,1% de EDTA em Ultra-Turrax.

Uma alíquota (800 μ L) do homogenato foi misturada a 4,0 mL de acetona gelada contendo 0,1% TFA e centrifugada a 3000 g/ 15 min a 4°C. O sobrenadante coletado foi posteriormente acidificado com 40 μ L de TFA e seco em rotaevaporador a 40°C sob vácuo e ressuspendido em 1 mL de metanol:ácido acético (99:5 v/v) para a quantificação por CLAE/DAD.

Para a análise por CLAE/DAD, todas as amostras foram filtradas utilizando filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, E.U.A.) de 0,22 μ de poro.

A área abaixo da curva de concentração vs tempo (AAC_{0-8h}) de antocianinas no plasma e rim foi calculada utilizando o programa Statistica versão 5.0 da StatSoft (Tulsa, E.U.A.).

6.2.3.4. Fermentação de antocianinas de amora em sistema *in vitro*

A fermentação das antocianinas foi realizada usando sistema *in vitro*, sob condições de anaerobiose estrita com material fecal de ratos Wistar macho. A incubação foi realizada em tubo de ensaio com tampa de rosca, selada com uma camada de parafilme.

6.2.3.4.1. Preparo do meio de cultura

O meio de cultura foi composto por tampão carbonato-fosfato contendo elementos traço e resazurin, com indicador redox, e preparado como descrito por Lebet, Arrigon e Amodo (1998) (Tabela 13).

Alíquotas de 10 mL da solução tampão foram distribuídas em tubos com tampa de rosca e autoclavadas a 121°C por 15 min. Resazurin foi adicionado como um indicador de pH que após autoclavagem torna-se um indicador de anaerobiose. A cor rosa indica um potencial redox alto (>-80 mV), enquanto que uma solução incolor indica um potencial redox baixo (<-80 mV), ou seja, condições anaeróbicas. O potencial redox do intestino grosso é de aproximadamente -150 mV (Rechner *et al.*, 2004).

Tabela 13. Composição da solução tampão para a fermentação *in vitro*.

Solução elemento traço	mg/L	Solução tampão	g/L
FeSO ₄ . 7H ₂ O	3680	NaHCO ₃	9,240
MnSO ₄ . H ₂ O	1159	Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	7,125
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	440	NaCl	0,470
CoCl ₂ . 6H ₂ O	120	KCl	0,450
NiCl ₂	100	Uréia	0,400
CuSO ₄ . 5H ₂ O	98	CaCl ₂ . 6H ₂ O	0,180
Mo ₇ (NH ₄) ₆ O ₂₄ . 4H ₂ O	17	Na ₂ SO ₄ anidro	0,100
		MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,100
		Solução elemento traço	10mL/L
		Resazurin (1mg/mL)	1mL/L

6.2.3.4.2. Preparo do inóculo

Para a obtenção do material fecal, três ratos Wistar macho foram anestesiados por administração intraperitoneal de hidrato de cloral (500mg/Kg em solução salina) e a porção final do reto removido. O material fecal foi coletado em um saco insuflado de CO₂ contendo solução tampão carbonato-fosfato, a 37°C. A proporção de fezes e tampão foi de 1:3 (w/v). A mistura foi homogeneizada em Stomacher® (Stomacher 400, Seward, London, GB) por 2 min e utilizada como inóculo.

6.2.3.4.3. Fermentação de antocianinas *in vitro*

Dois mililitros do inóculo e o volume correspondente a 5 mg de cianidina total obtido no item 6.2.3.2 foram adicionados aos tubos contendo o meio de cultura. O “headspace” foi preenchido com CO₂. Após o equilíbrio da pressão interna, os tubos foram selados com um filme de parafilme e fechados hermeticamente. Os tubos foram incubados em shaker a 37°C. Decorrido o tempo de incubação (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 h), foram adicionados aos tubos 0,1 mL de solução saturada de HgCl₂ para a inativação da atividade microbiana. Alíquotas da cultura (1-8 mL) foram retiradas para extração em fase sólida.

Para verificar a degradação da amostra pelo meio de cultura, um controle consistindo de solução tampão e solução de antocianina, sem o inóculo, foi incubado

nas mesmas condições. Alíquotas foram retiradas nos mesmos tempos de fermentação e submetidas a extração em fase sólida. O experimento foi conduzido em duplicata para cada tempo de incubação.

As alíquotas obtidas da fermentação foram passadas em coluna de 1 g de poliamida como descrito anteriormente no item 4.2.3.2 e eluídas com solução de HCl 0,1% em MeOH. O eluato foi seco e ressuspense em 1 mL de MeOH/AcOH (95:5 v/v) e filtrado utilizando filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, E.U.A.) de 0,22 μ de poro para quantificação por CLAE/DAD.

6.2.3.5. Absorção de antocianinas em sistema *in vitro*, com segmentos intestinais evertidos.

6.2.3.5.1. Animais

Para o estudo de absorção intestinal de antocianinas de amora, foram utilizados ratos Wistar machos de peso aproximado entre 180 a 250 g. Anterior ao experimento, os animais foram mantidos em jejum de 12 h com acesso a água *ad libitum*.

6.2.3.5.2. Desenho experimental

Para o estudo de absorção intestinal e metabolização das antocianinas obtidas de amora silvestre, foi realizado ensaio *in vitro* utilizando segmentos intestinais evertidos de ratos segundo método descrito por Karasov e Diamond (1983).

Para a obtenção dos segmentos intestinais, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral (500 mg/Kg em solução salina). Após a anestesia, o abdômem do animal foi aberto e o segmento do intestino foi removido por um corte na parte proximal do duodeno e um outro na porção distal do íleo (\pm 20 cm) e divididas em duas porções. O segmento intestinal foi lavado com solução de Ringer e removido do tecido conectivo. A solução de Ringer é composta por 128 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 2,5 mM CaCl_2 ; 1,2 mM KH_2PO_4 ; 1,2 mM MgSO_4 ; 20 mM NaHCO_3 e ajustada para pH 7,3 com HCl 1N. Posteriormente, o segmento de intestino foi invertido com o auxílio de uma vareta de aço-inox (2,8 mm de diâmetro) e lavado novamente com solução de Ringer gelada. Uma das extremidades do segmento intestinal foi acoplada a um tubo de vidro (6 mm de diâmetro) de aproximadamente

10 cm, enquanto a outra foi amarrada (formando um saco). Um volume (aproximadamente 2 mL) de solução de Ringer foi aplicado através do tubo para o interior do saco e denominado de solução serosal. A preparação de intestino evertido foi suspensa em um tubo contendo 30 mL de solução de Ringer contendo cianidina glicosilada (0,125 mM; 0,25 mM; 0,5 mM equivalente em aglicona) obtida a partir do extrato de antocianina de amora silvestre (cyn-3-glu e cyn-3-gluurha), cianidina (0,5 mM), glicose (1, 2,5 e 5 mM) ou rutina (5 mM), acrescida ou não de floridzina 0,1 mmol/L e denominado de solução mucosal (Figura 29). Ainda, o extrato de cianidina glicosilada (0,5 mM) foi suspenso em solução de Ringer isenta de sódio. Neste caso, todos os sais de sódio foram substituídos por sais de potássio. A solução mucosal foi constantemente borbulhada com uma mistura gasosa de 95% O₂, 5% CO₂ (mistura carbogênica), e mantida em banho-maria a 37°C. Alíquotas de 100 µL da solução serosal foram retiradas com uma seringa em intervalos de 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos de incubação para análise de flavonóides por CLAE/DAD (segundo item 5.2.3.3) e quantificação de glicose pelo método enzimático colorimétrico.

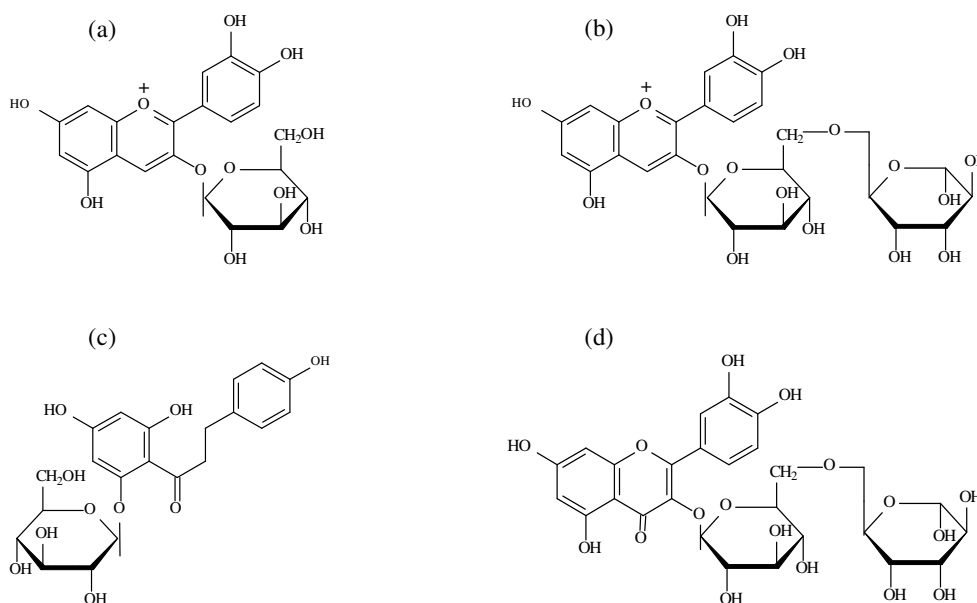


Figura 29: Estrutura de (a) cianidina-3-glucosídeo, (b) cianidina-3-glucoramnosídeo, (c) floridzina e (d) rutina utilizadas no experimento de intestino evertido.

Após o tempo de incubação, cada segmento intestinal foi levado a estufa 105°C, por 4 h, para remoção da umidade. Os resultados foram expressos em $\mu\text{moles/g}$ intestino (b.s.). As análises foram realizadas em triplicata, sendo que cada repetição era formada por 2 segmentos intestinais extraída de 1 rato. Para a análise de antocianinas no tecido intestinal, o tecido foi liofilizado decorrido o tempo de incubação.

A figura 30 apresenta o esquema simplificado para o ensaio de absorção.

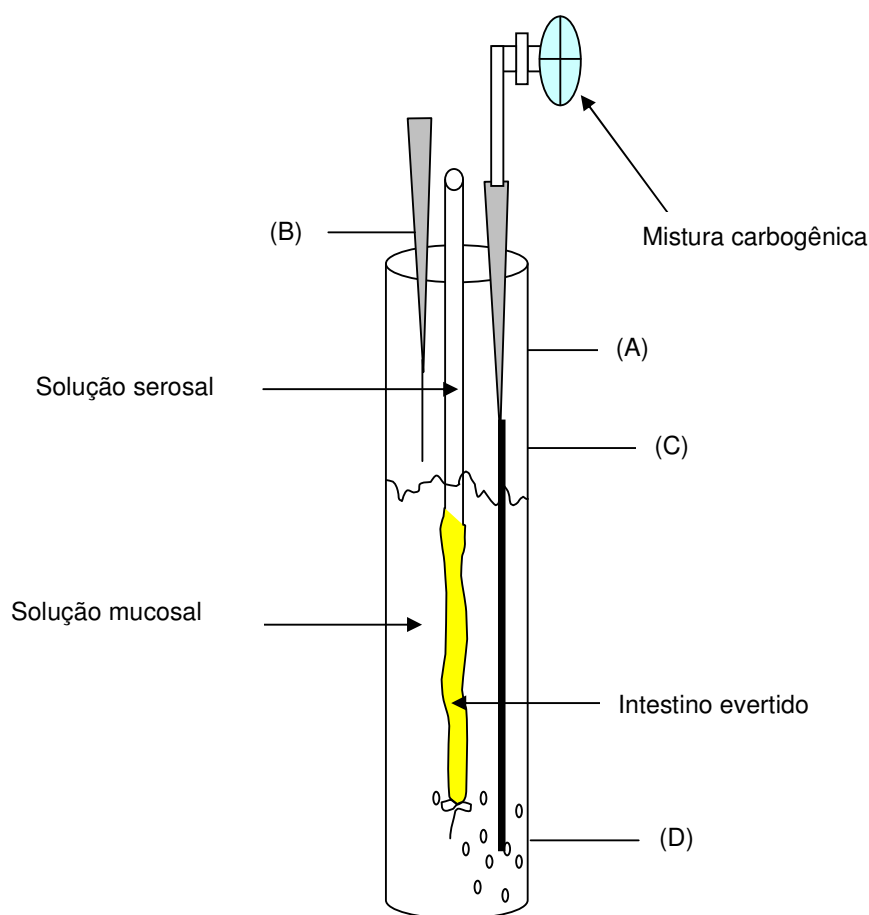


Figura 30: Sistema modelo *in vitro* para absorção de antocianinas. (A) agulha para entrada de mistura carbogênica; (B) agulha para saída de gás; (C) cânula de vidro; (D) tubo de ensaio.

6.2.3.6. Determinação de glicose

As variações de glicose na solução serosal, obtida nos intervalos de tempo estabelecido, foram determinadas pelo método colorimétrico glicose oxidase-peroxidase/ABTS⁺ segundo Bergmeyer e Bernt (1974).

6.2.3.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A quantificação e identificação das antocianinas foi realizada por CLAE-DAD como descrito anteriormente no item 5.2.3.3 utilizando o gradiente de concentração determinada para os flavonóides neutros. As amostras foram injetadas em duplicata (20 µL) e as antocianinas foram obtidas na forma glicosilada, sendo identificadas e quantificadas de acordo com o padrão externo, na forma de aglicona. Considerou-se uma avaliação positiva na identificação quando a porcentagem de identidade dos espectros foi da ordem de 99,9%. A calibração foi realizada através da injeção do padrão em triplicata e em cinco concentrações diferentes.

6.2.3.8. Determinação do coeficiente de partição

O coeficiente de partição foi determinado segundo Henczi, Nagy e Weaver (1995) com algumas alterações. Extrato seco de antocianina ou de cianidina na concentração de 10^{-4} a 10^{-5} M foi ressuspensa em 1,0 mL de água destilada saturada com n-octanol e agitado vigorosamente em vortex por 2 min. Posteriormente, 1,0 mL de n-octanol saturado com água foi adicionado e agitado novamente. A mistura foi mantida em repouso por 15 min e centrifugada a 3000 g/10 min a 8°C. Uma alíquota de 300 µL da fase n-octanol foi seca em speed vac e ressuspensa em 300 µL de MeOH/AcOH (95:5 v/v). Uma alíquota de 600 µL da fase aquosa foi passada em coluna de 0,2 g de poliamida como descrito anteriormente no item 4.2.3.2 e eluída com solução de HCl 0,1% em MeOH. O eluato foi seco e ressuspensa em 300 µL de MeOH/AcOH (95:5 v/v). As amostras foram então filtradas utilizando filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, E.U.A.) de 0,22 µ de poro para quantificação por CLAE/DAD. O coeficiente de partição foi obtido pela relação entre a área do pico na fase n-octanol e fase aquosa, respectivamente.

6.2.3.9. Atividade antioxidante do plasma

A atividade antioxidante do plasma foi analisada utilizando-se de dois métodos: método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e pelo método DPPH.

6.2.3.9.1. Método β -caroteno/ácido linoléico

A análise da atividade antioxidante foi desenvolvida segundo descrito no item 4.2.3.5.2.

6.2.3.9.2. Método DPPH

A atividade antioxidante foi determinada através da redução do radical estável DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes na amostra, segundo descrito por BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET (1995).

A solução de DPPH (~20 mg/mL em metanol) foi preparada de forma a apresentar absorvância em 517 nm entre 0,6 e 0,7. As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 250 μ L da solução de DPPH, 40 μ L de metanol para o grupo controle, ou o mesmo volume para o plasma obtido em 6.2.3.3.3 (A), adequadamente diluídos. A reação foi mantida a temperatura ambiente por 20 min, no escuro. As leituras das absorvâncias foram realizadas em 517 nm em espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A absorvância das amostras (A_m) correlacionado a absorvância do controle (A_c) resulta na porcentagem de redução de radicais DPPH (% SRL), que pode ser expressa através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ SRL} = \frac{(A_c - A_m)}{A_c} \times 100$$

A curva de calibração foi preparada com uma solução Trolox, e os resultados foram expressos em μ moles equivalentes de Trolox/mL de plasma.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Absorção de antocianinas de amora silvestre em ratos

A absorção de antocianinas de amora silvestre foi testada através de ensaios com ratos Wistar macho por administração oral de 25 mg de cianidina total/200 g peso do animal (19,89 mg cianidina-3-glucosídeo e 5,11 mg cianidina-3-glucoramnosídeo) contida no extrato de antocianina de amora purificada parcialmente em coluna de poliamida. Após a administração por gavagem do extrato, os ratos foram sacrificados nos tempos de 15 e 30 min, 1, 2, 3, 4 e 8h. O sangue, rim, estômago, intestino delgado e intestino grosso foram coletados para a análise de antocianinas por CLAE/DAD.

A Figura 31 apresenta um cromatograma obtido por CLAE de plasma e rim de rato após 15 min (Figuras 31B e 31C, respectivamente) da administração oral de 25 mg cianidina total/200 g peso, juntamente com um cromatograma do perfil de antocianinas do extrato de amora (Figura 31A). Nenhuma antocianina foi detectada no plasma e rim dos ratos controle (Figura 31b e 31c, respectivamente). No plasma, além da cianidina-3-glucoramnosídeo (cyn-3-glurha) e cianidina-3-glucosídeo (cyn-3-glu), quatro picos de antocianinas (M1-M4) foram detectadas após 15 minutos da administração oral (Figura 31B). Estes picos também apareceram nos demais tempos de coleta, em menor concentração. No rim (Figura 31B), além da cyn-3-glurha e cyn-3-glu, detectou-se a presença de 3 picos adicionais, não identificados, nos mesmos tempos de retenção dos metabólitos encontrados no plasma (M2-M4). Nenhum outro flavonóide presente no extrato de amora foi detectado no plasma ou no rim.

As antocianinas apareceram no sangue e urina na forma glicosilada. Em recente estudo com ratos TALAVÉRA *et al.* (2005) avaliaram os níveis plasmáticos de cianidina-3-glu administrada como ração enriquecida de extrato de amora preta (*Rubus* sp.). Os dados indicaram que cyn-3-glu foi absorvida na forma glicosilada, em concordância com prévios trabalhos realizados por ICHIYANAGI *et al.* (2005). Ainda, formas glicosiladas de antocianinas foram detectadas na forma inalterada no sangue de ratos e humanos após administração oral de extrato de mirtilo (composto por derivados glicosilados de delfinidina, cianidina, malvidina e petunidina) (McGHIE *et al.*, 2003; MAZZA *et al.*, 2002) e sabugueiro- *Sambucus nigra* (compostos

principalmente por cianidina-3-glu e cyn-3-sambubiosídeo) (MATSUMOTO *et al.*, 2001).

Entretanto, poucos são os relatos de trabalhos sobre os metabólitos de antocianinas. Recentemente, Ichiyanagui *et al.* (2005) e Talavéra *et al.* (2005) sugeriram uma rota metabólica para os derivados glicosilados da cianidina administrada por via oral a ratos. No plasma, foram encontradas as formas glucuronidadas (cyn-glucuronídeo e cyn-metoxilada e glucuronidada) além da forma metoxilada da cyn (peonidina-3-glu e peonidina-3-pentose). Segundo Ichiyanagui *et al.* (2005), as formas conjugadas do ácido glucurônico provavelmente foram formadas no processo de absorção gastrointestinal visto que não apareceram no sangue quando a cyn-3-glu foi administrada por via intravenosa.

No presente experimento, a forma aglicona da cianidina não foi detectada no plasma ou no rim dos animais. Tsuda, Horio e Osawa (1999) também não detectaram a forma aglicona da cianidina no plasma, entretanto, encontraram o ácido protocatecúico, produto de sua degradação. Desta maneira, sugeriram que o acúmulo de ácido protocatecúico no plasma pode ter ocorrido por 2 vias: (a) ou o ácido protocatecúico formado no intestino delgado a partir da degradação da cyn foi absorvido e acumulado no plasma ou (b) a forma aglicona da cyn foi absorvida e degradada no plasma devido a sua instabilidade, resultando no aparecimento do ácido protocatecúico. A formação do ácido protocatecúico a partir da cyn-3-glu no plasma foi descartada visto que foram necessárias 16 h para que isto ocorresse. Entretanto os dados são controversos, visto que Talavéra *et al.* (2005) detectaram tanto a forma aglicona da cianidina como a da peonidina, sua forma metoxilada.

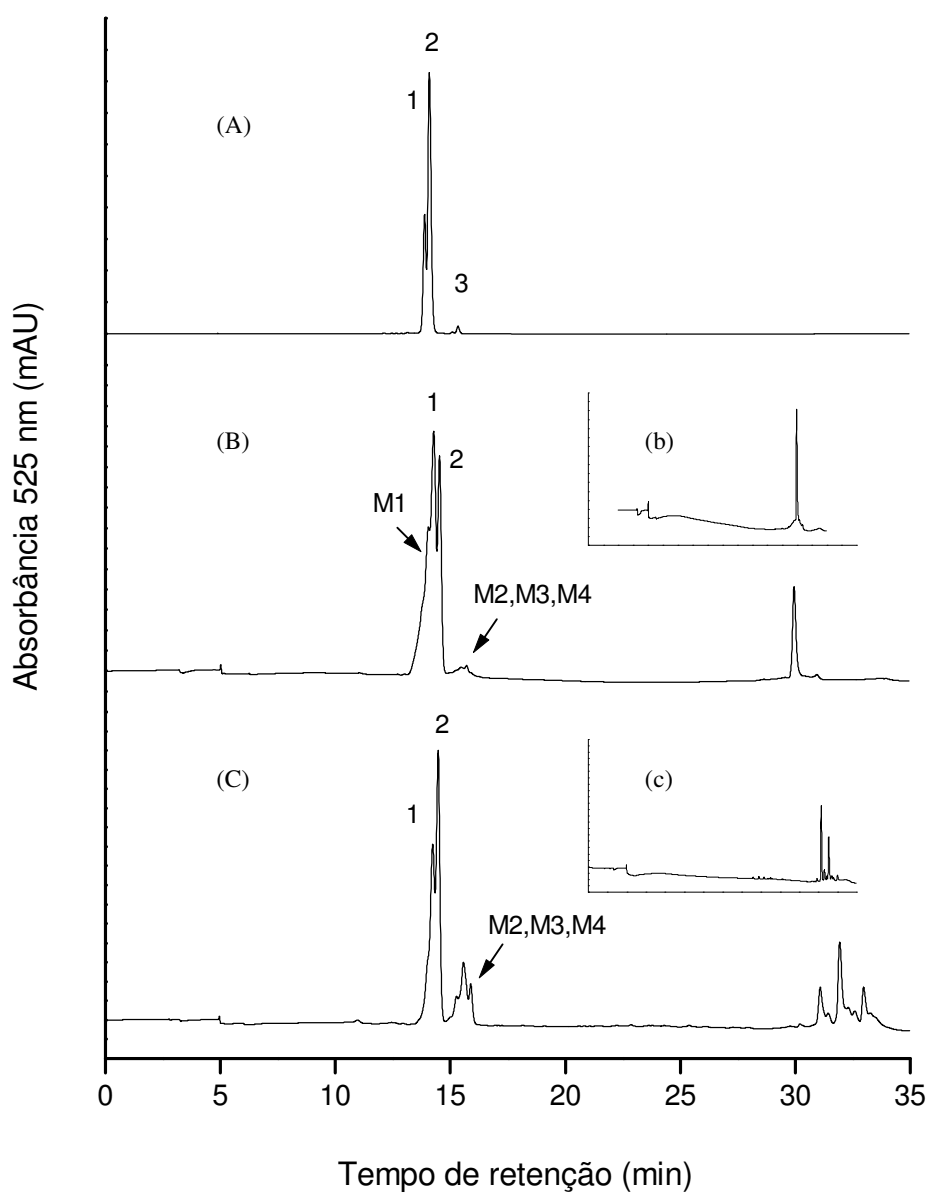


Figura 31: Cromatogramas obtido por CLAE/DAD, detectada a 525 nm, de plasma e rim de ratos Wistar macho após administração de extrato de antocianina. **(A)** antocianinas presentes no extrato de amora silvestre, **(B)** plasma 15 minutos após administração e **(C)** rim de ratos 15 min após administração oral por gavagem de extrato de amora. (b) plasma e (c) rim de rato controle, respectivamente. Picos identificados: 1, cianidina-3-glucoramnosídeo; 2, cianidina-3-glucosídeo; 3, pelargonidina. M1-M4, metabólitos formados no processo de absorção.

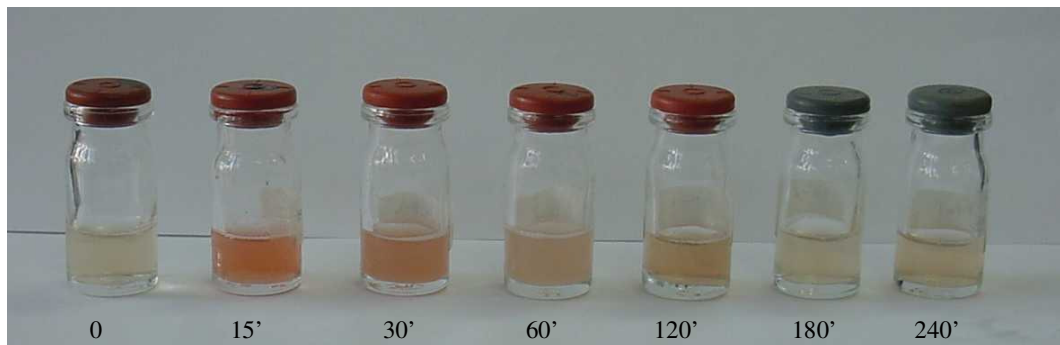


Figura 32: Plasma de rato Wistar macho obtido após administração oral de cianidina de amora silvestre em diferentes tempo de coleta. As amostras de plasma foram acidificadas com 20% do volume com TFA 5%.

A Figura 32 apresenta as amostras de plasma recolhidas de ratos Wistar machos após administração de cianidina de amora e acidificação com TFA. Uma vez que as antocianinas apresentam cor vermelha em meio ácido devido à formação do cátion flavílio, a presença de antocianinas no plasma pôde ser comprovado visualmente.

As Figuras 33 e 34 mostram o perfil médio de cianidina total encontrado no plasma e no rim, respectivamente. Em ambos os casos, as concentrações máximas foram observadas 15 min após administração oral do extrato, alcançando a concentração máxima de $5,69 \pm 1,44 \mu\text{g/mL}$ e $10,60 \pm 2,47 \mu\text{g/g}$ (b.u.) no plasma e no rim, respectivamente.

Utilizando a regra trapezoidal para calcular a área abaixo da curva de concentração-tempo (AAC_{0-8h}) do plasma, obteve-se um AAC_{0-8h} de $2,76 \pm 0,88 \mu\text{g.h/mL}$ o que correspondeu a $21,25 \mu\text{g}$ de cianidina total absorvida no plasma durante 8h pós-administração, considerando peso médio do rato de 200 g; 7% do peso corpóreo de sangue e 55% de plasma. Para o rim, encontrou-se um AAC_{0-8h} de $9,74 \pm 0,75 \mu\text{g.h/g}$ (b.u.) o que correspondeu a $6,90 \mu\text{g}$ de cianidina total absorvida durante 8h pós-administração (peso do rim ~ 3 g). Assim, estimou-se que $28,15 \mu\text{g}$ de cianidina total foi absorvida, o que correspondeu a 0,11% da concentração inicial administrada.

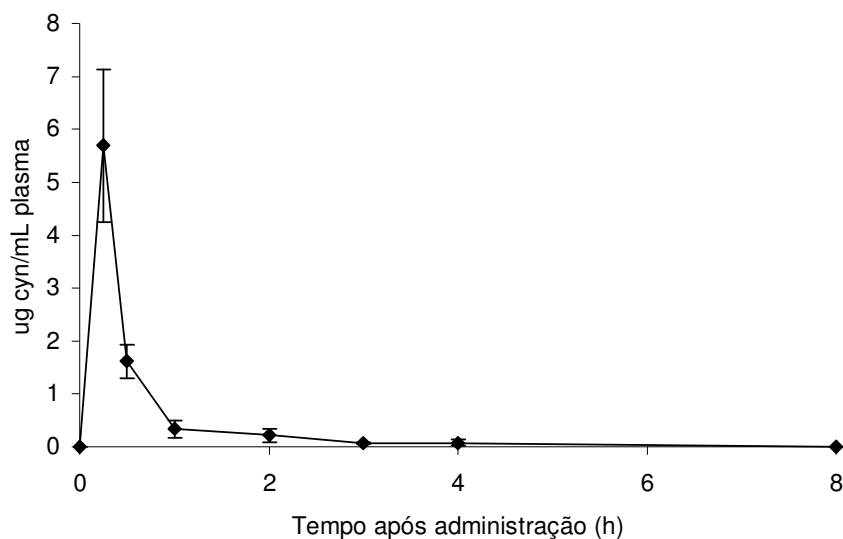


Figura 33: Curva de cianidina total plasmática de amora silvestre após administração a ratos Wistar machos (~200 g), determinada por CLAE/DAD. Média \pm DP de três ratos.

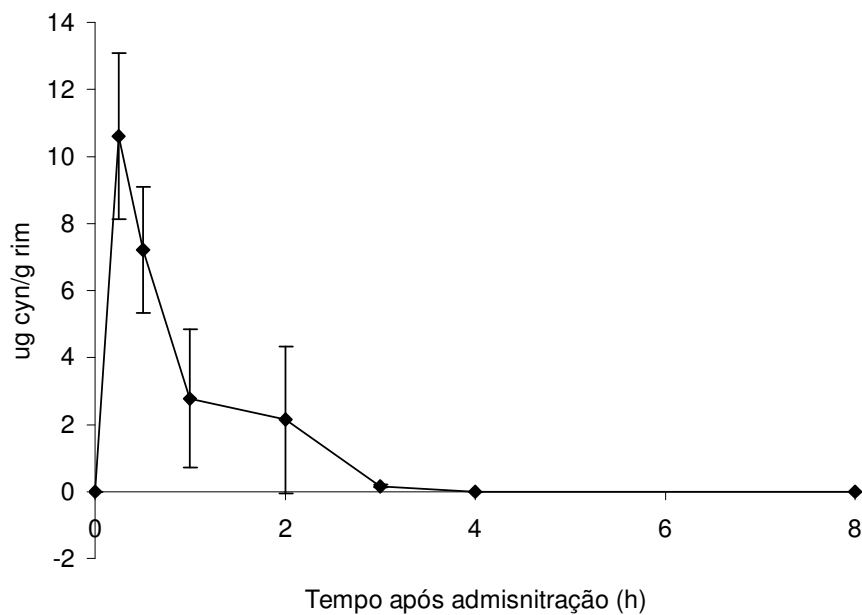


Figura 34: Curva de cianidina total de amora silvestre no rim após administração a ratos Wistar machos (~200 g), determinada por CLAE/DAD. Média \pm DP de três ratos.

A baixa porcentagem de absorção da cianidina também foi observada por Mazza *et al.* (2002) em plasma humano após administração de antocianinas de mirtilo, com absorção de 0,002-0,003% após 3 h.

Após 15 min da administração oral, observou-se um declínio na concentração de cianidina total, tanto no plasma quanto no rim e praticamente ausência após 8 h. Para muitos flavonóides, a concentração plasmática decresce rapidamente (tempo de meia-vida de 1-2 h) (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Esta rápida excreção é facilitada pela conjugação da forma aglicona com grupos sulfato ou glucuronídeo. Contudo, o tempo de meia-vida observado para a quercetina é muito maior (24 h) (HOLLMAN *et al.*, 1997). Esta lenta eliminação é parcialmente explicada por sua particular afinidade pela albumina plasmática (MANACH *et al.*, 1995).

Assim, para a manutenção de altas concentrações plasmáticas de antocianina, a ingestão repetida em curto período de tempo parece ser necessária. VAN HET HOF *et al.* (1999) também verificaram que para a manutenção dos níveis plasmáticos de flavan-3-ol era necessário a ingestão de chá preto a cada 2 h.

6.3.2. Distribuição de cianidina no sistema digestório de ratos

A Figura 35 apresenta o cromatograma do perfil de antocianinas presentes no sistema digestório de ratos que receberam, por via oral, extrato de antocianina. As antocianinas presentes no extrato de amora foram detectadas (cyn-3-glu, cyn-3-glurha, derivado de pelargonidina) nas três porções do sistema digestório dos animais. A forma aglicona, cianidina, foi detectada no intestino delgado e grosso (Figura 35B e 35C).

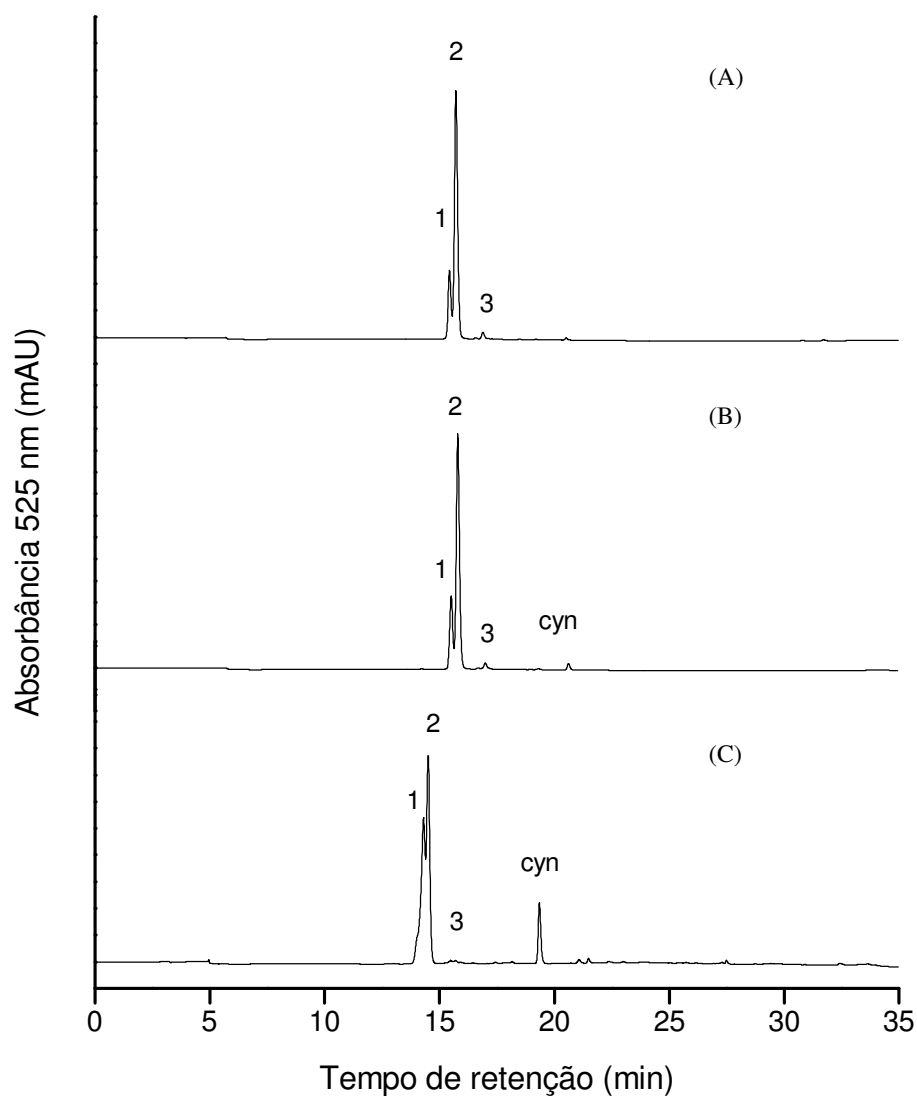


Figura 35: Cromatograma obtido por CLAE/DAD de estômago, intestino delgado e intestino grosso de ratos após administração oral com extrato de antocianina. (A) estômago, (B) intestino delgado e (C) intestino grosso. Picos identificados: 1, cianidina-3-glucoramnosídeo; 2, cianidina-3-glucosídeo; 3, pelargonidina; cyn, cianidina.

As Figuras 36, 37 e 38 apresentam as curvas de concentração de cianidina (cyn) glicosilada e seus metabólitos no estômago, intestino delgado e intestino grosso, após administração oral.

No estômago e intestino delgado, a concentração máxima de cyn glicosilada foi alcançada 15 minutos após administração, enquanto que no intestino grosso foi alcançada após 3h.

No intestino delgado e grosso, além das duas formas glicosiladas, a forma aglicona também foi detectada em pequena concentração, embora não tenha sido detectada no plasma, podendo ter sido formada a partir da ação de β -glucosidases presentes na bordadura em escova do epitélio intestinal. Em estudo com ratos, Tsuda, Horio e Osawa (1999) também sugeriram que cyn-3-glu é parcialmente hidrolisada pelas β -glucosidases do intestino, explicando desta maneira a presença da forma aglicona no jejuno. Entretanto, neste mesmo experimento, nenhuma forma aglicona da cianidina foi detectada no sangue.

No intestino grosso, as formas glicosiladas da cyn também foram detectadas após 30 min da administração, alcançando a concentração máxima após 3h, o que culmina com a maior concentração da forma aglicona da cyn, sugerindo que a desglicosilação pode também ocorrer no intestino grosso através da fermentação pelas bactérias fecais ou ser proveniente da hidrólise enzimática ocorrida no intestino delgado.

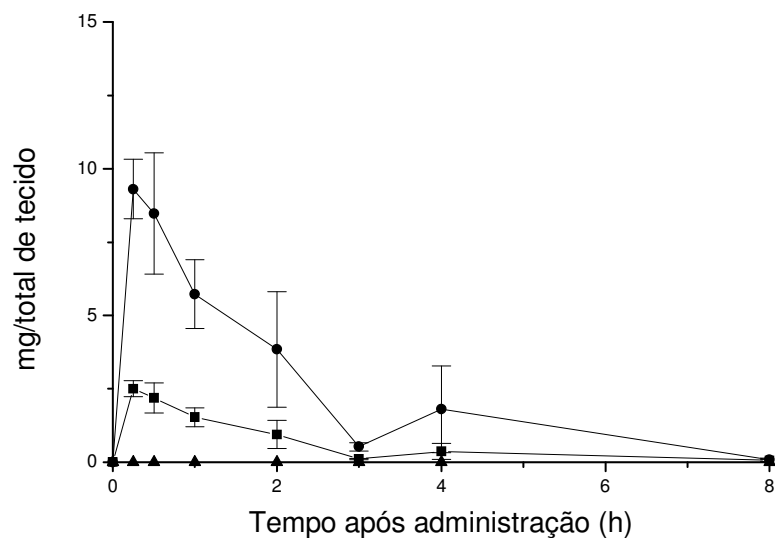


Figura 36: Concentração de derivados de cianidina no estômago de rato Wistar macho após administração de antocianinas de amora. Cianidina (▲), cianidina-3-glucosídeo (●) e cianidina-3-glucoramosídeo (■). Média \pm DP (n=3 ratos)

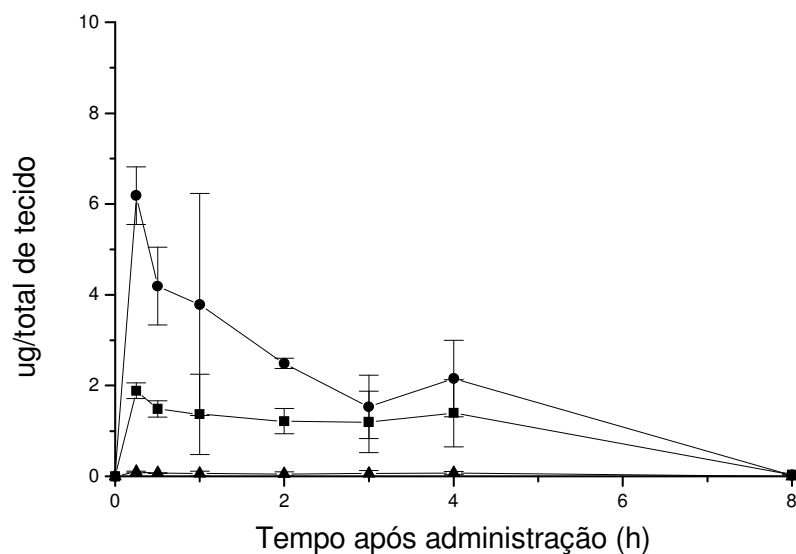


Figura 37: Concentração de derivados de cianidina no intestino delgado de rato Wistar macho após administração de antocianinas de amora. Cianidina(▲), cianidina-3-glucosídeo (●) e cianidina-3-glucoramosídeo (■). Média \pm DP (n=3 ratos)

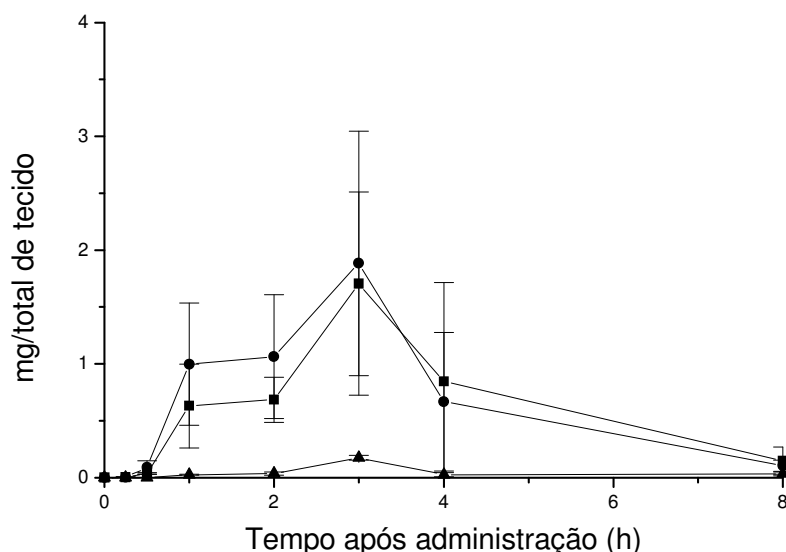


Figura 38: Concentração de derivados de cianidina no intestino grosso de rato Wistar macho após administração de antocianinas de amora. Cianidina(▲), cianidina-3-glucosídeo (●) e cianidina-3-glucoramnosídeo (■). Média \pm DP (n=3 ratos).

Como pode ser observado na Tabela 14, a maior porcentagem de recuperação de cianidina total nos órgãos e tecidos ocorre 15 minutos após a administração, correspondendo a 80% do total administrado. A recuperação diminui sucessivamente a partir de 30 min o que indica que a cianidina pode ter sido progressivamente destruída no intestino delgado e intestino grosso, visto que a concentração plasmática e renal é baixa.

A relação cyn-3-glu/cyn-3-glurha no sistema digestório cai progressivamente no intestino delgado e grosso, demonstrando que a degradação da cyn-3-glu é maior do que a cyn-3-glurha (Tabela 15). Poucos são os dados na literatura relatando a desglicosilação de antocianinas, contudo, sabe-se que a hidrólise de flavonóides glicosilados no intestino delgado ocorre provavelmente pela ação da β -glucosidade lactase floridzina hidrolase (EC 3.2.1.23) presente na bordadura em escova do epitélio intestinal. A ação desta enzima sobre os flavonóides glicosilados depende do tipo de açúcar presente na estrutura fundamental. De maneira geral, esta hidrolase atua sobre os glucosídeos, contudo, não atua sobre os ramnoglucosídeos (DAY *et al*, 2000a; SCALBERT; WILLIANSON, 2000), independentemente do flavonóide.

conjugado ao açúcar. Assim, a queda na relação cyn-3-glu/cyn-3-glurha pode ser devida principalmente à hidrólise enzimática da primeira.

Já Bernardene, Magnuson e Giusti (2005) observaram que a degradação de antocianinas no conteúdo fecal de ratos alimentados com extratos ricos em antocianinas depende do tipo e número de açúcares conjugados. A degradação foi alta para os glucosídeos, moderada para os galactosídeos e não significativa para os arabinosídeos ou xilosídeos, sendo que as antocianinas aciladas ou os diglucosídeos foram mais estáveis quando comparadas aos monoglucosídeos correspondentes. Apesar dos ramnoglucosídeos não terem sido analisados por Bernardene, Magnuson e Giusti (2005), podemos então supor que a cyn-3-glurha seja mais estável que a cyn-3-glu, visto ser um diglicosídeo.

Tabela 14: Porcentagem de recuperação de cianidina total de amora nos tecidos e órgãos de ratos após administração por gavagem.

Tempo (h)	Recuperação de cianidina total (%)					total
	rim	plasma	ID ⁽¹⁾	estômago	IG ⁽²⁾	
0,25	0,13	0,32	32,26	47,22	0,02	79,95
0,5	0,09	0,09	22,71	42,67	0,39	65,96
1	0,03	0,02	12,04	29,04	6,57	47,70
2	0,03	0,01	14,81	18,16	7,43	40,44
3	0,00	0,00	10,92	2,52	14,31	27,75
4	0,00	0,00	10,41	4,62	5,20	20,24
8	0,00	0,00	0,22	0,22	0,99	1,96

⁽¹⁾ID- intestino delgado; ⁽²⁾IG- intestino grosso

Tabela 15: Relação entre cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-glucoramnosídeo distribuído no trato gastro intestinal após administração oral a rato Wistar macho.

Tempo (h)	Relação cyn-3-glu/cyn-3-glurha		
	Estômago	<i>Intestino delgado</i>	<i>Intestino grosso</i>
Inicial	3,85		
0,25	3,72	3,28	1,67
0,5	3,86	2,82	2,45
1	3,73	2,77	1,58
2	4,08	2,04	1,55
3	4,97	1,27	1,11
4	4,94	1,55	0,79
8	1,45	0,62	0,69

6.3.3. Fermentação *in vitro* de cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-glucoramnosídeo de amora (*Morus sp.*).

Diversos estudos sugerem que a absorção pelo intestino delgado de polifenóis provenientes da dieta é relativamente pequena (10-20%) (KUHNLE *et al.*, 2000a; KUHNLE *et al.*, 2000b; SPENCER *et al.*, 1999). A baixa absorção ocorre provavelmente porque a maior parte dos polifenóis ingeridos, incluindo aqueles absorvidos e conjugados no enterócito, são transportados novamente ao lúmen diretamente ou pela bile (CRESPY *et al.*, 1999). Posteriormente, estes alcançam o intestino grosso onde são metabolizados pela microflora colônica.

Em experimento *in vitro*, as bactérias fecais de rato Wistar macho foram capazes de degradar completamente as duas cianidinas glicosiladas de extrato de amora após 10 h de fermentação. O maior decréscimo foi observado após 1 h, com 57% das cianidinas totais degradadas (Figura 39A). Entretanto, observa-se que a degradação das antocianinas também ocorre no meio de cultura sem o inóculo (branco consistindo de meio de cultura e cianidinas, sem bactérias fecais). Deste total, 28% foi resultante da degradação pelas condições do meio de cultura. Assim, a degradação real pela fermentação foi de 29%.

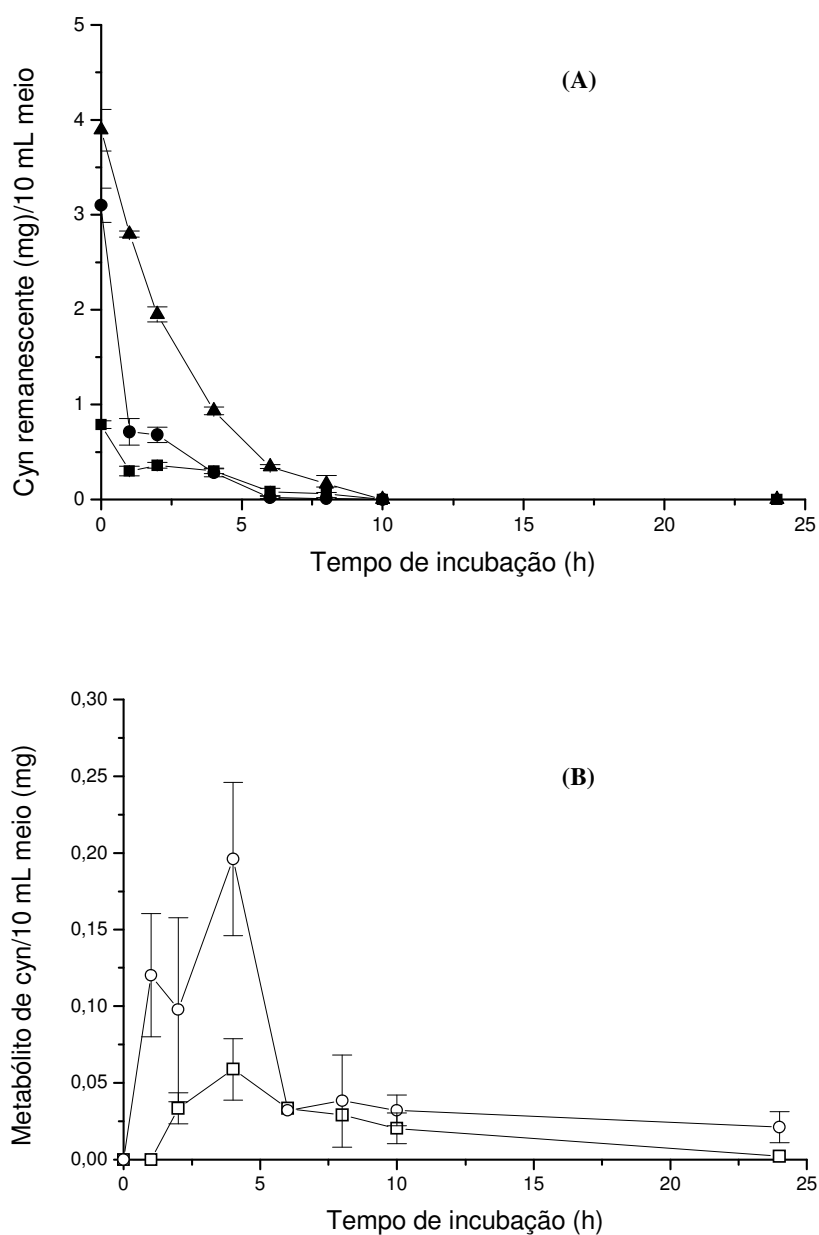


Figura 39: Degradação de derivados de cianidina durante fermentação *in vitro*. **(A)** Perfil de degradação de cyn-3-glu (●) e cyn-3-glurha (■). **(B)** Metabólitos formados a partir de cyn-3-glu e cyn-3-glurha durante 24 h de fermentação *in vitro*. Cianidina aglicona (□) e ácido protocatecúico (○). A fermentação foi realizada em condições de anaerobiose, a 37°C, com material fecal obtido a partir de 3 ratos Wistar macho. O Branco (▲) consistiu de meio de cultura e extrato de amora sem material fecal. Média \pm DP (n=3 ratos)

Observou-se ainda o acúmulo de metabólitos tais como a forma aglicona da cianidina, resultante da desglicosilação, e seu produto de degradação, o ácido protocatecúico. A concentração máxima dos metabólitos foi alcançada após 4h de fermentação com valores de $0,05 \pm 0,025$ e $0,20 \pm 0,05$ mg/10 mL de meio, para cianidina e ácido protocatecúico, respectivamente (Figura 39B). A relação entre cyn-3-glu/cyn-3-glurha (Tabela 16) também apresenta queda gradual durante o período de fermentação *in vitro*, o mesmo observado no intestino delgado e intestino grosso de ratos após administração oral de antocianinas de amora silvestre.

Tabela 16: Relação entre cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-glucoramnosídeo durante fermentação em sistema *in vitro*.

Tempo de incubação (h)	Relação cyn-3-glu/cyn-3-glurha
0	3,90
1	2,37
2	1,89
4	0,93
6	0,25
8	0,17
10	0
24	0

Diferente das enzimas humanas, as enzimas da microflora colônica catalisam a quebra da estrutura dos flavonóides a moléculas simples, tais como os ácidos fenólicos (SPENCER, 2003). Segundo Rechener *et al.* (2004), os principais produtos formados a partir da fermentação *in vitro* de compostos fenólicos foram 3-(3-

hidroxifenil)-ácido propiônico, para o ácido clorogênico; 3-(4-hidroxifenil)-ácido propiônico e ácido 3-fenilpropiônico, para a naringina, e ácido 3-hidroxifenil acético para a rutina além das formas agliconas das duas últimas. O grau de degradação dos compostos estudados foi significativamente influenciado pela concentração do substrato assim como pelas variações individuais da microflora fecal (p.ex. rutina apresentou degradação completa entre 2-24 h de incubação dependendo da microflora do doador). Em acordo, Justesen *et al.* (2000) encontraram os mesmos produtos de degradação para a rutina e naringina.

A absorção destes metabólitos pela mucosa intestinal ainda não é bem estabelecida. Entretanto, a presença de ácido hipúrico na urina de indivíduos que ingeriram chá preto sugere a absorção dos metabólitos da microflora colônica. O ácido hipúrico é um conjugado entre ácido benzóico e glicina, derivado do metabolismo de bactérias intestinais sobre os compostos fenólicos e aminoácidos aromáticos (CLIFFORD *et al.*, 2000). De maneira geral, apesar das diferentes classes de flavonóides, os produtos finais de degradação aparentemente são muito semelhantes, visto a similaridade estrutural das diversas classes de flavonóides.

6.3.4. Absorção de antocianinas em sistema *in vitro*, com segmentos intestinais evertidos

Diversos métodos são utilizados para a avaliação da absorção de nutrientes e drogas. Dentre estes estão os modelos *in silico*, membranas artificiais simulando modelos de absorção, modelos *in vitro* tais como células Caco-2 e modelos *in situ* como intestino evertido e perfusão do intestino de rato, além de estudos de absorção *in vivo* (BOHETS *et al.*, 2001).

Dentre os métodos citados acima, o método de intestino evertido tem a vantagem de ser rápido e barato, além do pequeno volume no interior do segmento (solução serosal) resultar em um rápido aumento na concentração do composto em estudo. Além disso, elimina-se o efeito da ação bacteriana. Sob condições ótimas experimentais, o segmento intestinal pode permanecer viável por mais de 120 min. Além das vantagens metodológicas, a técnica proporciona o estudo de transporte do composto em combinação com o metabolismo intestinal. Entretanto, uma grande desvantagem do uso desta metodologia reside no fato de que o composto em estudo tem de atravessar todas as camadas intestinais (inclusive o músculo), ao invés de somente a mucosa intestinal (BOHETS *et al.*, 2001).

A fim de verificar a integridade funcional do segmento intestinal, foi ensaiada a absorção de glicose na preparação de intestino evertido (Figura 40). A glicose é basicamente absorvida através da interação com o transportador de glicose sódio dependente (SGLT1) presente na bordadura em escova. Nas concentrações de 1, 2,5 e 5 mM de glicose, observamos elevação gradual da concentração na solução serosal, alcançando valores de 2 ± 1 , 6 ± 1 , $6,43 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/g}$ intestino (bs), respectivamente, após 90 min de incubação. Na presença de flordizina, uma dihidrochalcona, observou-se uma inibição total da absorção de glicose. Este efeito era esperado uma vez que a flordizina é um inibidor potente da SGLT1 (Day *et al.*, 2003), o que comprova o transporte de glicose a partir desta via ou funcionamento do sistema.

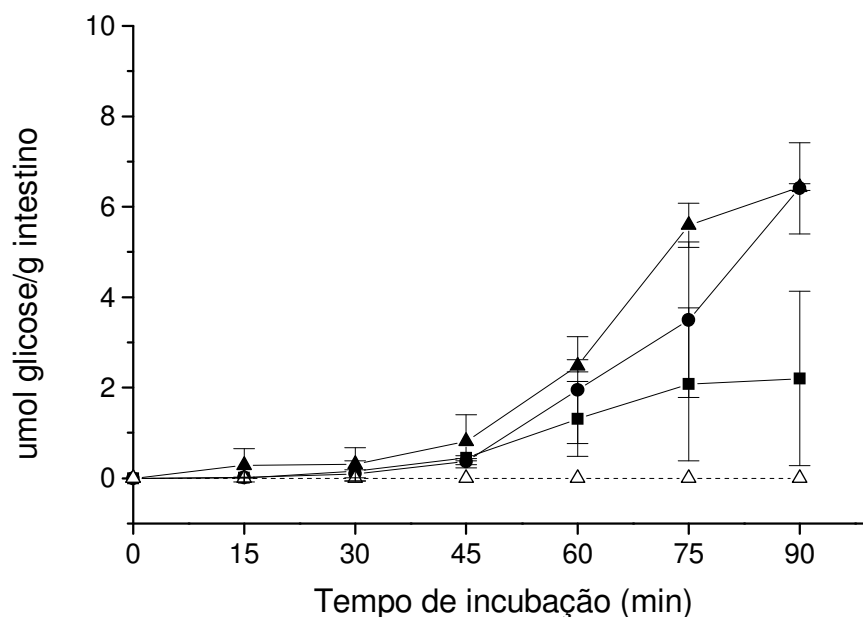


Figura 40: Absorção de glicose na solução serosal em sistema modelo *in vitro*, com segmentos de intestino evertido. Concentração de (■) 1,0 mM; (●) 2,5 mM; (▲) 5,0 mM de glicose; (△) 5,0 mM de glicose e 0,1 mmol/L flordizina na solução mucosal. Resultados obtidos de 6 segmentos intestinais (3 ratos) e expressos como média \pm DP (base seca).

A absorção da cyn-3-glu e cyn-3-glurha na forma intacta pôde ser confirmada em sistema *in vitro* utilizando intestino evertido de rato. A incubação do segmento intestinal com diferentes concentrações de extrato de antocianina de amora silvestre resultou em absorção da cyn-3-glu e cyn-3-glurha (Figura 41). A absorção foi dose dependente, aumentando continuamente com o tempo de incubação. Após 90 min de incubação com 0,5 mM de cianidina glicosilada, a concentração máxima alcançada na solução serosal foi de $0,095 \pm 0,0035$ μ mol de cianidina total/g de intestino (bs). Além das duas formas de cianidina glicosilada, observou-se o aparecimento de quatro picos adicionais (C1-C4) no cromatograma obtido por CLAE (Figura 42).

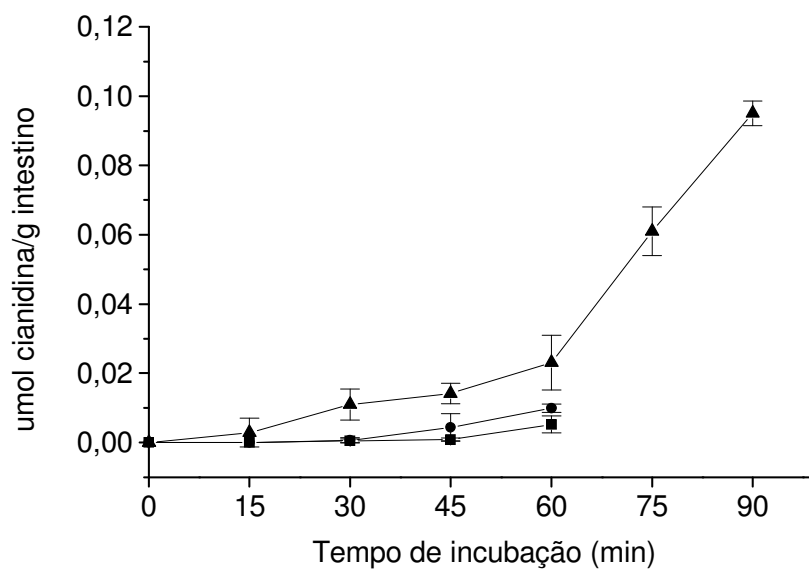


Figura 41: Absorção de cianidina total de amora silvestre na solução serosal em sistema modelo *in vitro*, com segmentos de intestino evertido. Concentração de (■) 0,125 mM; (●) 0,25 mM (▲) 0,5 mM de cianidina total de extrato de amora silvestre na solução mucosal. Resultados obtidos de 6 segmentos intestinais (3 ratos) e expressos como média \pm DP (base seca).

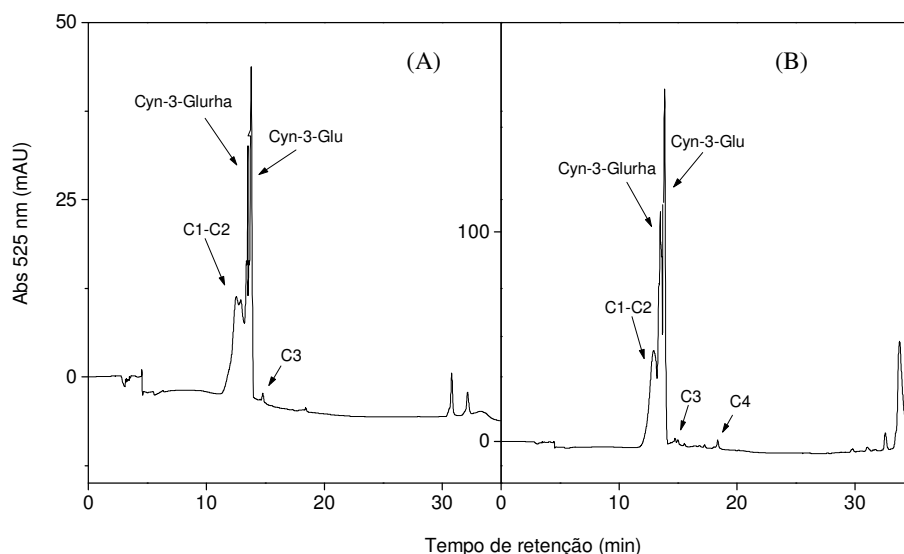


Figura 42: Cromatograma obtido por CLAE/DAD da solução serosal e do tecido intestinal em modelo de intestino evertido com extrato de antocianina. (A) tecido intestinal e (B) intestino evertido de rato Wistar incubado com extrato de antocianina. Compostos identificados cianidina-3-glucosídeo (cyn-3-glu) e cianidina-3-glucoramnosídeo (cyn-3-glurha). Compostos metabólicos não identificados (C1-C4).

Utilizando-se do mesmo sistema, a forma aglicona da cianidina não foi absorvida, uma vez que a incubação desta (0,5 mM na solução mucosal), obtida a partir da hidrólise ácida do extrato de antocianina, não foi detectada na solução serosal ou no tecido intestinal.

Sugere-se que a forma aglicona dos flavonóides possa ser absorvida através da difusão passiva devido a baixa polaridade da estrutura e portanto, facilidade de difusão na membrana lipídica (MANACH *et al.*, 2004). A difusão passiva depende principalmente do coeficiente de partição. O coeficiente de partição mede a afinidade relativa de um composto pela fase aquosa ou lipídica e é importante para determinar se um composto atravessará passivamente, por difusão, a membrana e como estará particionado na célula (RANG; DALE; RITTER., 2000).

Devido a cianidina ter características apolares (Tabela 17), parece ser bastante razoável e possível que ela atravessasse por difusão passiva a bicamada lipídica da membrana do enterócito, contudo, a ausência de cianidina na solução

serosal pode ser decorrente da ionização característica da estrutura das antocianinas. Em pH fortemente ácido prevalece o cátion flavílio com uma carga positiva delocalizada no sistema aromático pirílio, enquanto que em pH próximo à neutralidade, as duas hidroxilas vicinais (posição 7 e 4') se desprotonam formando as bases quinoidais negativamente carregadas (BROUILLARD *et al.*, 1997).

Uma vez que o pH intestinal se encontra ao redor de 7, pode-se supor que apesar da alta lipofilicidade da forma aglicona da cianidina, esta encontra-se ionizada no pH intestinal, dificultando sua difusão através da membrana, visto que compostos ionizados dificilmente atravessam a membrana, exceto quando existe um sistema de transporte específico (RANG; DALE; RITTER, 2000).

A glicosilação afeta profundamente a solubilidade dos flavonóides, dificultado desta maneira sua absorção por esta via. A quercetina e a rutina (quercetina-3-glucoranosídeo) apresentam coeficiente de partição (log P) n-octanol/água de $1,2 \pm 0,13$ e $0,37 \pm 0,06$, respectivamente (BROWN *et al.*, 1998). Compostos com coeficiente de partição >1 são mais lipofílicos, uma vez que apresentam maior concentração na camada de n-octanol (LIAO; YIN, 2000).

O coeficiente de partição encontrado para a cianidina-3-glurha e cyn-3-glu foi de 0,88 e 0,90, respectivamente (Tabela 17). Uma vez que estes compostos são mais hidrofílicos que a sua forma aglicona e considerando a possibilidade de estarem ionizados no pH intestinal, a difusão passiva torna-se pouco provável como mecanismo de transporte.

Tabela 17: Coeficiente de partição de flavonóides em n-octanol/água.

Compostos	Coeficiente de partição
Cianidina-3-glucosídeo	$0,90 \pm 0,04$
Cianidina-3-glucoranosídeo	$0,88 \pm 0,08$
Cianidina	a

a, concentração de cianidina na fase aquosa foi muito baixa para ser detectada. Resultados expressos como média \pm DP de n=3.

Além da difusão passiva, outro mecanismo proposto para a absorção de flavonóides é o transporte das formas glicosiladas através do transportador de glicose sódio dependente (SGLT1). Uma vez que as duas formas glicosiladas de cianidina do extrato de amora estão conjugadas a hexoses, pode haver uma facilidade em se ligarem a SGLT-1 e desta maneira serem transportadas para o enterócito e posteriormente à circulação sanguínea.

A adição de floridzina juntamente com o extrato de antocianina de amora parece ter uma influência parcial na permeabilidade da cyn-3-glu e cyn-3-glurha (Figura 43). A inibição da SGLT1 pela floridzina retarda a absorção de cianidina até 30 min após incubação, contudo, não afeta significativamente o aparecimento de cyn-3-glu e cyn-3-glurha na solução serosal, uma vez que após este período a cianidina atinge concentrações semelhantes às aquelas obtidas quando na ausência do inibidor. Já a remoção de sódio do meio de incubação leva a uma inibição de quase 100% da absorção de cianidina (Figura 43). Uma vez que a SGLT1 é sódio dependente, supõe-se que o transporte por esta via esteja bloqueado.

A absorção de cianidina pelo mucosa intestinal foi também inibida pela adição de 5 mM de glicose na solução mucosal (Figura 43). A absorção de cianidina total caiu de $0,0231 \pm 0,0079$ (sem glicose) para $0,0026 \pm 0,0002$ $\mu\text{mol/g}$ intestino (bs) (89% de inibição), após 60 min de incubação, sendo que nos 30 minutos iniciais de incubação, não foi detectada cianidina na solução serosal. Ainda, a absorção de glicose aumentou com a presença do extrato de antocianina, atingindo concentrações superiores que quando a glicose foi incubada isoladamente.

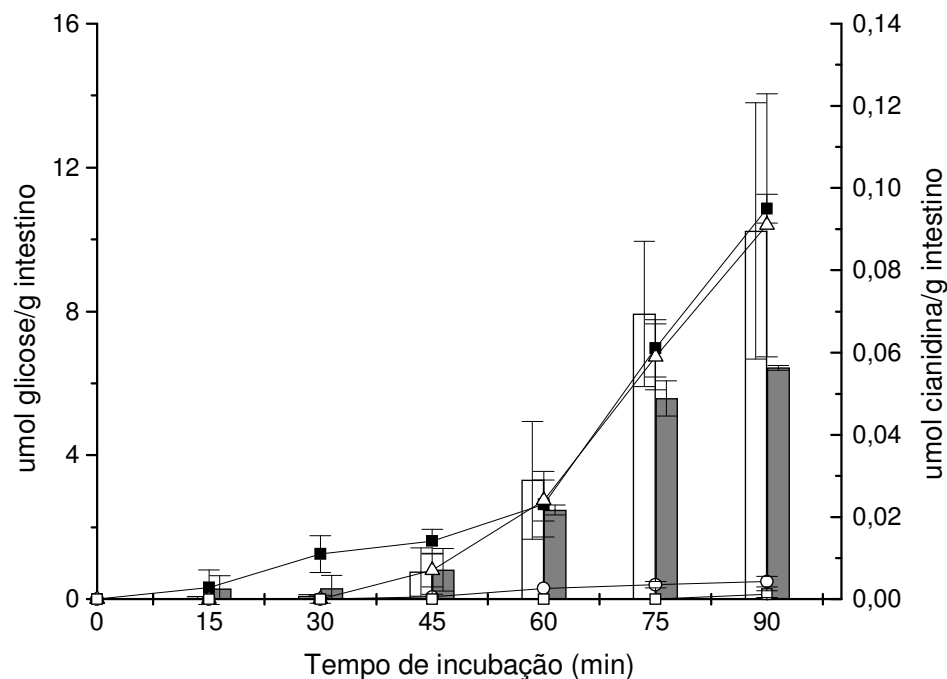


Figura 43: Absorção de glicose (Glu) e cianidina total (cyn) na solução serosal em sistema modelo *in vitro*, com segmento intestinal evertido. Gráfico em linha representa a concentração de cyn, onde a solução mucosal foi composta por (■) 0,5 mM de cyn total de amora silvestre; (○) 0,5 mM de cyn total de amora silvestre e 5 mM de Glu; (Δ) 0,5 mM de cyn total de amora silvestre e 0,1 mmol/L de flordizina; (□) 0,5 mM de cyn total de amora silvestre em solução de Ringer sem sódio. Gráfico em coluna representa a concentração de Glu, onde a solução mucosal foi composta por: coluna cheia, 5 mM de Glu; coluna vazia, 5 mM de Glu e 0,5 mM de cyn total. Resultados obtidos de 6 segmentos intestinais (3 ratos) e expressos como média \pm DP (base seca).

A rutina também foi testada quanto a sua absorção (Figura 44). Da mesma maneira que a cyn-3-glu e cyn-3-glurha, a rutina foi absorvida e aparentemente, carregado pela SGLT1. A incubação da rutina com flordizina leva a um retardo na absorção do flavonol para após 30 min. Também, a incubação da rutina com glicose leva a inibição parcial (86% de inibição) após 60 min, perfil semelhante ao observado para os glicosídeos da cianidina.

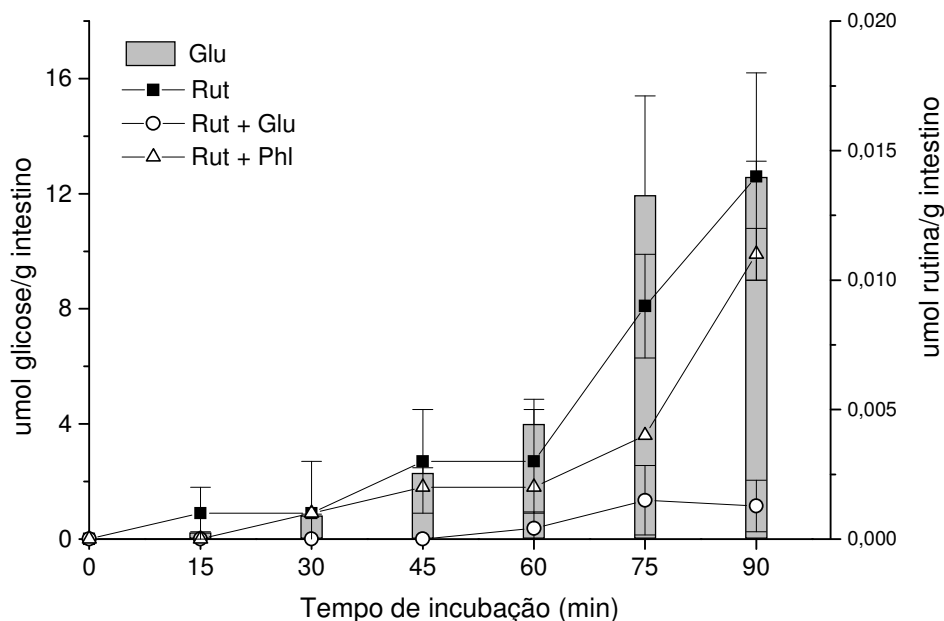


Figura 44: Absorção de glicose (Glu) e rutina (Rut) na solução serosal em sistema modelo *in vitro*, com segmento de intestino evertido. Gráfico em linha representa a concentração de cyn, onde a solução mucosa foi composta por (■) 0,5 mM de rutina; (Δ) 0,5 mM de rutina e 0,1 mmol/L de flordizina; (○) 0,5 mM de rutina e 5 mM de Glu. Gráfico em coluna representa a concentração de Glu, onde a solução mucosa foi composta por: 0,5 mM de rutina e 5 mM de Glu. Resultados obtidos de 6 segmentos intestinais (3 ratos) e expressos como média \pm DP (base seca).

Neste estudo, a análise do tecido da mucosa demonstrou a presença das formas glicosiladas da cianidina e também da rutina e seus metabólitos (Figura 45). Altas concentrações de cianidina glicosilada e rutina foram encontrados no tecido intestinal incubado por 60 min, provavelmente decorrente da análise ter sido realizado em todo o tecido intestinal e não somente na mucosa. Ainda, em nenhum dos experimentos foi identificada a forma aglicona da cianidina ou quercetina.

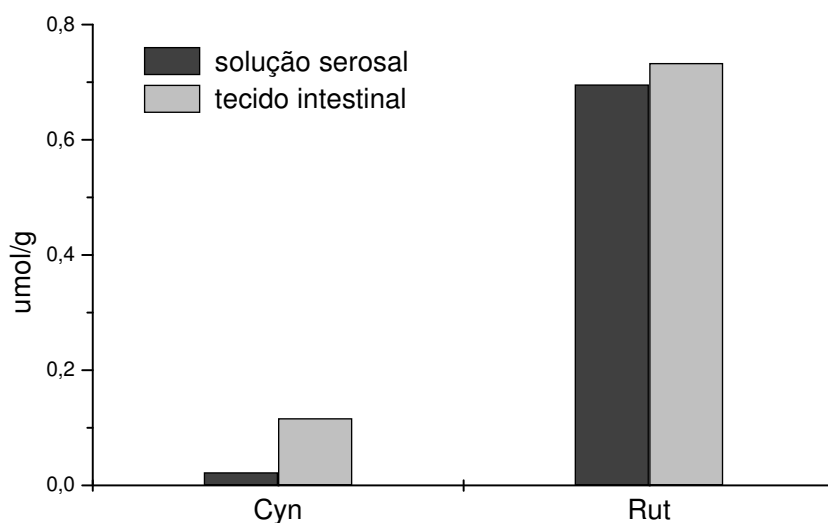


Figura 45: Conteúdo de cianidina e rutina na solução serosal e no tecido intestinal. A incubação foi realizada por 60 min em presença de 0,5 mM de cianidina de extrato de amora e 0,5 mM de rutina em solução de Ringer. Resultados obtidos de 6 segmentos intestinais (3 ratos) e expressos em base seca.

Estudos realizados por Gee *et al.* (1998 e 2000) e confirmados por Walgren *et al.* (2000) e Wolfram, Block e Ader (2002), sugerem que a quercetina 3-glucosídeo e quercetina-4-glucosídeo são capazes de interagir com o transportador de glicose sódio-dependente (SGLT1) presente na mucosa intestinal e assim serem absorvidos na forma glicosilada. Como a quercetina-3-glucosídeo e cianidina-3-glicosídeo apresentam grande similaridade estrutural, a presença da forma glicosilada da cianidina no plasma poderia ser um indicativo do envolvimento do transportador da glucose (SGLT1) na absorção das antocianinas.

Três são os mecanismos de transporte de hexose pela membrana intestinal. Dois deles, transportadores por difusão facilitada (GLUT2 e GLUT5), o qual atuam como canais para o transporte passivo. A GLUT2 se encontra na membrana basolateral e transporta a glucose e outras hexoses da célula epitelial para a circulação sanguínea, o que restringe sua função. A GLUT5 se encontra no lado apical do enterócito, entretanto, parece ser específica para o transporte facilitado da frutose (MUECKLER, 1994) e portanto pouco provável no transporte de qualquer

outro substrato. O terceiro mecanismo é o transportador de glicose sódio-dependente (SGLT1), expresso no jejuno, e que transporta a glicose e a galactose para dentro do enterócito (WRIGHT *et al.*, 1997).

Apesar de vários trabalhos demonstrarem a absorção de antocianinas diretamente na forma glicosilada, poucos são aqueles que fazem referência ao mecanismo específico de transporte pela mucosa intestinal.

A interação da cyn-3-glurha e cyn-3-glu com a SGLT1 pode ser observada pela inibição parcial do transportador SGLT1 pela floridzina. Entretanto, o papel da floridzina no intestino é bastante complexo, uma vez que além de inibidor competitivo da SGLT1, mas não transportada por ela, a floridzina também é substrato para a β -glicosidase lactase floridzina hidrolase (LPH), a qual libera por hidrólise a floretina e a glicose.

Apesar da interação de vários glicosídeos da quercetina com a SGLT1 ter sido demonstrada por Gee *et al.* (1998), Day *et al.* (2003) sugeriram que quercetina-3-glucosídeo e quercetina-4'-glucosídeo são transportadas em menor extensão por este transportador. Neste caso, a provável rota de absorção proposta por estes pesquisadores foi a prévia desglicosilação do flavonol pela LPH e subsequente difusão passiva da forma aglicona, uma vez que no interior do enterócito, somente a forma aglicona e seus metabólitos foram encontrados. Aparentemente as formas glicosiladas dos flavonóides são melhor absorvidas em relação às respectivas agliconas (GEE *et al.*, 2000). Entretanto, este fato foi atribuído não à absorção direta do glicosídeo pela SGLT1, mas à proximidade da quercetina liberada após hidrólise catalisada pela LPH com a membrana do enterócito (Day *et al.*, 2003).

Trabalhos anteriores (HANKE *et al.*, 1980; WARDEN *et al.*, 1980) desmonstraram que a glicose marcada, liberada a partir da hidrólise da floridzina na superfície da mucosa intestinal possui uma vantagem na cinética de absorção via SGLT1, mesmo este estando inibido pela floridzina. Esta observação foi atribuída à proximidade do transportador SGLT1 com o sítio de hidrólise da LPH.

Entretanto, a inibição da absorção das duas cianidinas glicosiladas pela remoção do íon sódio do meio de incubação reforça a hipótese de que o transportador SGLT1 é uma das principais vias de absorção da cyn-3-glu e cyn-3-glurha.

Ainda, cianidina-3-glucoramnosídeo foi encontrada no interior do enterócito e na solução serosal em segmento de intestino evertido e também no plasma. A LPH atua sobre diversos flavonóides glicosilados, entretanto, foi demonstrado que não tem atividade sobre os ramnoglicosídeos (DAY *et al.*, 2000a). Desta maneira, a possibilidade de hidrólise da cyn-3-glurha pela LPH torna-se remota, ficando o transporte pela SGLT1 como a via mais provável de absorção. Além disso, a forma aglicona da cianidina não foi detectada em nenhum compartimento analisado (tecido intestinal ou solução serosal), o que diminui a possibilidade de absorção da forma aglicona por difusão passiva.

6.3.5. Atividade antioxidante do plasma

Diversos estudos *in vitro* demonstraram a atividade antioxidante das antocianinas em vários sistemas-modelo (SATUÉ-GRACIA; HEINONEN; FRANKEL, 1997; SEERAM; MOMOIN; BOURQUIN, 2001; SEERAM; NAIR, 2002; WANG; CAO; PRIOR, 1997). Entretanto, uma vez que as antocianinas podem sofrer diversas transformações no decorrer do processo de absorção, fica evidente que nem sempre os resultados obtidos em estudos *in vitro* são mantidos em sistema *in vivo*.

A atividade antioxidante total do plasma de rato após administração oral de extrato concentrado de antocianina (cyn-3-glu e cyn-3-glurha) foi avaliada pelo método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e pelo método DPPH ou sequestrante de radicais livres.

Nas condições experimentais, o plasma do grupo controle não apresentou atividade antioxidante (Figura 46). A atividade antioxidante tende a um aumento significativo nos tempos 15 e 30 min após administração do extrato, com inibição de 44 ± 5 e $40 \pm 5\%$ ($P < 0,05$), respectivamente, onde coincide com os maiores valores de antocianina total no plasma (Figura 33). Nos tempos 1, 2, 3 e 4 h após administração a atividade antioxidante cai para aproximadamente 30% de inibição seguida de nova queda 8h após administração do extrato de amora ($14 \pm 4\%$ inibição).

A atividade redutora de radicais livres do plasma (método DPPH) (Figura 47) também apresentou um aumento significativo nos tempos 15, 30 e 1h ($P < 0,05$) após administração oral, em relação ao grupo controle, o qual coincide com a atividade antioxidante encontrada no método anterior.

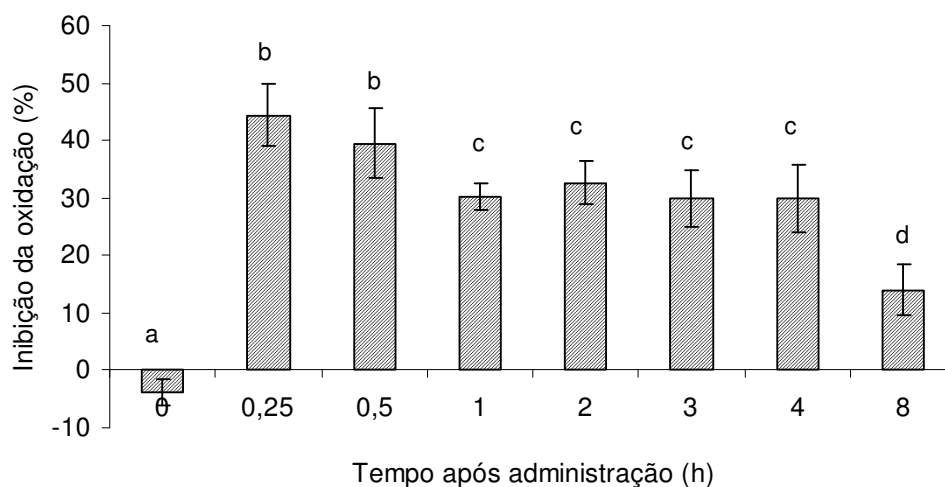


Figura 46: Atividade antioxidante de plasma de ratos Wistar que receberam extrato de amora silvestre, em sistema β -caroteno/ácido linoléico. Letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). Média \pm DP (n=3 ratos)

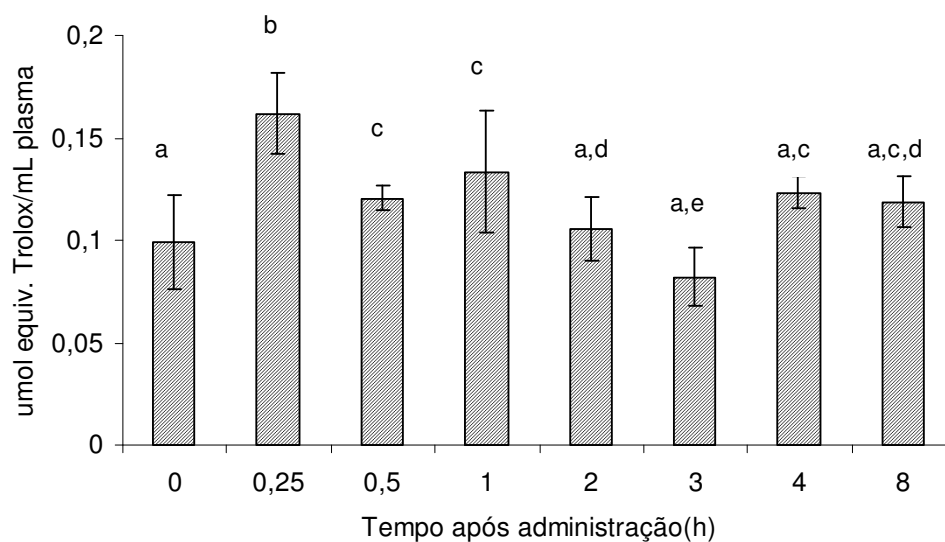


Figura 47: Atividade redutora de radicais livres de plasma de ratos Wistar que receberam extrato de amora silvestre, em sistema DPPH. Letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). Média \pm DP (n= 3 ratos)

Diversos estudos demonstram o aumento da atividade antioxidante do plasma após alimentação com extrato de antocianina de diversas fontes. Tsuda, Horio e Osawa (1998) demonstraram que ratos alimentados com cyn-3-glu apresentavam redução na concentração de compostos reativos com o ácido tiobarbitúrico no plasma e aumento na resistência à peroxidação lipídica induzida pelo 2,2'-azobis (2-amidinopropano) hidrocloreto (AAPH) ou Cu^{2+} .

Mazza, Cottrell e Holub (2002) também observaram que o aparecimento de antocianinas no plasma humano, após consumo de suco de mirtilo, foi diretamente correlacionado com o aumento na capacidade antioxidante ($\text{ORAC}_{\text{acetone}}$, $P < 0,01$).

Ainda, a atividade antioxidante *in vivo* de cianidina tem sido recentemente estudada por Ramirez-Tortosa *et al.* (2001) em ratos mantidos com dieta deficiente em vitamina E. Ao administrar uma dieta de extrato rico em antocianina, observou-se um aumento significativo na atividade antioxidante do plasma e diminuição da concentração de hidroperóxidos e 8-oxo-deoxiguanosina no fígado. Esses compostos são índices de peroxidação lipídica e danos ao DNA, respectivamente. Já Frank *et al.* (2002) observaram que ratos alimentados com 2g/Kg de cyn-3-glu por 4 semanas tiveram a concentração de tocoferol elevada no fígado e no rim, além de apresentarem baixa concentração de ácidos graxos saturados no fígado ($P < 0,05$).

As antocianinas normalmente estão presentes no sangue na forma glicosilada. Entretanto, formas metabolizadas também estão presentes em pequena quantidade, mas sua contribuição na atividade antioxidante ainda é questionada. As espécies de metabólitos de antocianinas circulantes no plasma humano após consumo de extrato de fruta de *Aronia melanocarpa* (composto principalmente por cyn-3-galactosídeo e cyn-3-arabinosídeo) foram identificados como conjugados glucuronídeos, e derivados metoxilados e oxidados de cyn-3-galactosídeo e cyn glucuronídeo (KAY *et al.*, 2004).

Após determinar a taxa e posição de glucuronidação da quercetina com extrato de fígado humano, Day *et al.* (2000b) demonstraram que a atividade antioxidante dos metabólitos da quercetina foi dependente da posição da conjugação. Todos os metabólitos conjugados e metoxilados apresentaram atividade inibitória em sistema xantina oxidase, principalmente a quercetina-4'-glucuronídeo com alta atividade inibitória, semelhante à quercetina. Além disso, com exceção da quercetina-3-glucuronídeo, todos os metabólitos apresentaram atividade inibitória da enzima lipoxigenase.

6.4. CONCLUSÃO

As antocianinas extraídas da amora silvestre (*Morus* sp.), administradas por via oral a ratos, foram absorvidas e excretadas rapidamente e encontradas no sangue preferencialmente como glicosídeo da cianidina e em pequena quantidade na forma metabolizada, não identificada.

A elevação da concentração de antocianinas no sangue resultou também na elevação da atividade antioxidante do plasma.

O sistema de transporte das antocianinas da amora silvestre (*Morus* sp.) parece envolver o transporte de glicose sódio dependente (SGLT1) e parte são metabolizados já no enterócito. Esta conclusão é reforçada pelo efeito inibitório da absorção das duas cianidinas glicosiladas pela adição de D-glicose e flordizina e pela remoção do íon sódio do meio de incubação no segmento de intestino evertido. A difusão passiva da forma aglicona da cianidina parece pouco provável uma vez que não se observa a absorção pelo segmento intestinal e não se encontra circulante no sangue.

Nas porções do sistema digestório (estômago, intestino delgado e intestino grosso), cyn-3-glu e cyn-3-glurha encontram-se inalteradas, mas pequena quantidade da forma aglicona (cianidina) também é encontrada na porção do intestino.

Ainda, as cianidinas glicosiladas são completamente metabolizadas pela microflora colônica, como demonstrado em estudo de fermentação *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALEA, V.; CILLARD, J.; DUBOS, M.; SERGENT, O., CILLARD, P.; MOREL, I. Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myrcetin in primary rat hepatocyte cultures. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v.26, n.11-12, p.1457-1466, 1999.
- ABDALLA, D.S.P. **Antioxidantes**. 1- Conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. ARS CURANDI, São Paulo, p.143-164, 1993.
- ARABBI, P.R. **Determinação de flavonóides em alimentos vegetais consumidos no Brasil**. São Paulo, 2003. 94p. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 52, n.5, p.1124-1131, 2004.
- ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.24, n.9, p.1355-1363, 1998.
- AWAD, M.A.; JAGER, A. Flavonoid and chlorogenic acid concentrations in skin of 'Jonagold' and 'Elstar' apples during and after regular and ultra low oxygen storage. **Posth. Biol. Technol.**, Amsterdam, v.20, n.1, p.15-24, 2000.
- BERGMEYER, H.U.; BERNET, E. D-glucose:determination in the glucose oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U.; GAWEHN, K. Methods of enzymatic analysis. 2ed. New York:Academic Press, v.2, p. 1212-1215, 1974.
- BERNADENE, J.H.; MAGNUSON, A.; GIUSTI, M.M. Analysis of anthocyanins in rat intestinal contents- impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.53, n.8, p.2859-2866, 2005.
- BOHETS, H.; ANNAERT, P.; MANNERS, G.; van BEIJSTERVELDT, L.; ANCIAUX, K.; VERBOVEN, P.; MEULDERMANS, W.; LAVRIJSEN, K. Strategies for absorption in drug discovery and development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.1, 367-383, 2001.
- BOYER, J.; BROWN, D.; LIU, R.H. Uptake of quercetin 3-glucoside from whole onion and apple extracts by Caco-2 cell monolayers. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 52, n.23, p.7172-7179, 2004.

- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. – Wiss. u.- Technol.**, London, v.28, p.25-30, 1995.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, Lawrence, v.56, n.11, p.317-333, 1998.
- BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.F. Anthocyanins as natural food colours- selected aspects. **Food Chemistry**, Oxford, v.58, n.1-2, p.103-109, 1997.
- BROUILLARD, R.; FIGUEIREDO, P.; ELHABIRI, M.; DANGLES, O. Molecular interactions of phenolic compounds in relation to the color fruit and vegetables. In: **Phytochemistry of fruit and vegetables**. TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ROBINS, R.J. Oxford: Clarendon Press, p. 29-49.1997.
- BROWN, J.E.; KHODR, H.; HIDER, R.C.; RICE-EVANS, C.A. Structural dependence of flavonoid interaction with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. **Biochem. J.**, London, v.330, n.3, p.1173-1178, 1998.
- BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.300, n. 2, p.535-543, 1993.
- BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, n.6, p.2774-2779, 2001.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, n.11, p.3426-3431, 1996.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant and pro-oxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v. 22, n.5, p. 749-760, 1997.
- CAO, G.; MUCCITELLI, H.U.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PRIOR, R.L. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.73, n.5, p.920-926, 2001.
- CAO, G.; PRIOR, R.L. Postprandial increases in serum antioxidant capacity in older women. **J. Appl. Physiol.**, Washington DC, v.89, n.3, p.877-883, 2000.
- CAO, Z., ZHU, X. Antioxidant action of tetrandrine:an alkaloid from the roots of *Radix stephania tetrandra*, S Moore. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.73, n.1, p.106-110, 1997.

- CARDADOR-MARTINEZ, A.; LAORCA-PIÑA, G.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, n.24, p.6975-6980, 2002.
- CHATTERJEE, S.N.; AGARWAL, S. Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v.4, n.1, p.51-72, 1988.
- CHOU, S.T.; CHAO, W.W.; CHUNG, Y.C. Antioxidative activity and safety of 50% ethanolic red beans extract (*Phaseolus radiatus* L. var. Aurea). **J. Food Sc.**, Chicago, v. 68, n.1, p. 21-25, 2003.
- CHU, Y.; CHANG, C.; HSU, H. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.80, n.8, p.561-566, 2000.
- CIAPPELLANO, S.; BRUSAMOLINO, A.; DRISSNER, M.; GALVANO, G. Intestinal absorption of phenolic compounds. Proceeding of 53rd National Congress of Italian Society of Physiology. 26-29 September, Ferrara, Italy, 2002
- CLIFFORD, M.N. Anthocyanins- nature, occurrence and dietary burden. **J. Sci.Food Agric.**, Bognor Regis, v.80, n.7, p.1063-1072, 2000.
- CLIFFORD, M.N.; COPELAND, E.L.; BLOXSIDGE, J.P.; MITCHELL. L.A. Hipuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. **Xenobiotica**, London, v.30, n.3, p.317-326, 2000.
- COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids- chemistry, metabolism, cardio protective effects, and dietary sources. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v.7, n.2, p.66-76, 1996.
- CORDENUNSI, B.R.; GENOVESE, M.I.; NASCIMENTO, J.R.O.; HASSIMOTTO, N.M.A.; SANTOS, R.J.; LAJOLO, F.M. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. **Food Chem.**, Oxford, v.91, p.113-121, **2003**.
- COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J.P.; CIMANGA, K.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D. Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **J. Nat. Prod.**, Washington DC, v.61, n.6, p.711-76, 1998.
- CRESPY, V.; MORAND, C.; MANACH, C.; BESSON, C.; SCALBERT, A.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 277, n.1, p.G120-G126, 1999.

- CUSHMAN, M.; NAGARATHAMAN, D.; BURG, D.; GEAHLEN, R.L. Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoids analogues. **J. Med. Chem.**, v.34, n.2, p.798-806, 1991.
- DAY, A.J.; CAÑADA, F.J.; DIAZ, J.C.; KROON, P.A.; McLAUCHLAN, R.; FAULDS, C.B.; PLUMB, G.W.; MORGAN, M.R.A.; WILLIANSOM, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycoside are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.468, n.2-3, p.166-170, 2000a.
- DAY, A.J.; BAO, Y.; MORGAN, M.R.A.; WILLIANSOM, G. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.29, n.12, p.1234-1243, 2000b.
- DAY, A.J.; GEE, J.M.; DuPONT, S.; JOHNSON, I.T.; WILLIAMSON, G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. **Bioch. Pharmacol.**, London, v. 65, n.7, p.1199-1206, 2003.
- DONOVAN, J. L.; MEYER, A.S.; WATERHOUSE, A.L. Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.46, n.4, p.1247-1252, 1998.
- DONOVAN, J.L.; CRESPIY, V.; MANACH, C.; MORAND, C.; BESSON, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.131, n.6, p.1753-1757, 2001.
- DREWNOWSKI, A.; GOMEZ-CARNERO, C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.72, n.6, p.1424-1435, 2000.
- DUGO, P.; MONDELLO, L.; ERRANTE, G.; ZAPPIA, G.; DUGO, G. Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high-performance liquid chromatograph with electron spray ionization detection. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, n.8, p.3987-3992, 2001.
- DUPONT, M.S.; MONDIN, Z.; WILLIAMSON, G.; PRICE, K.R. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, n.9, p.3957-3964, 2000.
- DUTHIE, S.J.; COLLINS, A.R.; DUTHIE, GH.G.; DOBSON, V.L. Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human lymphocytes. **Mutation Research: Genetic**

- Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Netherlands, v.393, n.3, p.223-231, 1997.
- DYRBY, M.; WESTERGAARD, N.; STAPELFELDT, H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. **Food Chemistry**, Oxford, v.72, n.4, p.431-437, 2001.
- EARNEST, D.V.; HIXSON, L.J.; ALBERT, D.S. Piroxicam and other cyclooxygenase inhibitors: potential for cancer chemoprevention. **J. Cell. Biochem.**, Oxford, v.161, Suppl.161, p.156-166, 1992.
- ESPIN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHES, H.J.; GARCIA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, n.5, p.1588-1592, 2000.
- FRANK, J.; KAMAL-ELDIN, A.; LUNDH, T.; MÄÄTTÄ, K.; TÖRRÖNEN, R.; VESSBY, B. Effects of dietary anthocyanins on tocopherol and lipids in rats. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, n.25, p.7226-7230, 2002.
- FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L.; KINSELLA, J.E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **The Lancet**, New York, v.342, n.8879, p.1103-1104, 1993.
- FRANKEL, E.N.; BOSANEK, C.A.; MEYER, A.S.; SILLIMAN, K.; KIRK, L.L. Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.46, n.3, p.834-838, 1998.
- GALLORI, S.; BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C.; BARBOSA, W.L.R.; VINCIERI, F.F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí palm). **Chromatographia**, v.59, n.11/12, p. 739-743, 2004.
- GARCÍA-ALONSO, M.; PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry**, Oxford, v.84, n.1, p. 13-18, 2003.
- GARCÍA-BENEYTEZ, E.; CABELLO, F.; REVILLA, E. Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, n.19, p.5622-5629, 2003.
- GAZZANI, G.; G.; PAPETTI, A.; MASSOLINI, G.; DAGLIA, M. Anti- and prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.46, n.10, p.4118-4122, 1998.

- GEE, J.M.; DU PONT, M.S.; RHODES, M.J.C.; JOHNSON, I.T. Quercetin glycosides interact with the intestinal glucose transport pathway. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.25, n.1, p.19-25, 1998.
- GEE, J.M.; DU PONT, M.S.; DAY, A. J.; PLUMB, G. W.; WILLIAMS, G.; JOHNSON, I.T. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, n.11, p.2765-2771, 2000.
- GERASOPOULOS, D.; STRAVROULAKIS, G. Quality characteristics of four mulberry (*Morus* sp) cultivars in the area of chaenia, Greece. **J. Sci. Food. Agric.**, Bognor Regis, v.73, n.2, p.261-264, 1997.
- HADLEY, C.W.; MILLER, E.C.; SCHWARTZ, S.J.; CLINTONS, S.K. Tomatoes, lycopene, and prostate cancer: progress and promise. **Exp. Biol. Med.**, v.227, n.10, p.869-880, 2002.
- HALVORSEN, B.L.; HOLTE, K.; MRHRSTAD, M.C.W.; BARIKMO, I.; HVATTUM, E.; REMBERG, S.F.; WOLD, A.; HAFFNER, K.; BAUGEROD, H.; ANDERSEN, L.F.; MOSKAUG, J.; JACOBS, D.R.; BLOMHOFF, R. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. **J. Nutr.**, Bethesda, v.132, n.3, p.461-471, 2002.
- HANKE, D.W.; WARDEN, D.A.; EVANS, J.O.; FANNIN, F.F.; DIEDRICH, D.F. The kinetic advantage for transport into hamster intestine of glucose generated from phlorizin by brush border β -glucosidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.599, n.2, p.652-663, 1980.
- HARAGUCHI, H.; MOCHIDA, Y.; SAKAI, S.; MASUDA, H.; TAMURA, Y.; MIZUTANI, K.; TANAKA, O.; CHOU, W. Protection against oxidative damage by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. **Biosc. Biotech. Biochem.**, Tokyo, v.60, n.6, p.945-948, 1996.
- HARBORNE, J.B. Spectral methods of characterizing anthocyanins. **Biochem. J.**, London, v.70, p.22-28, 1958.
- HARBORNE, J.B. The anthocyanins pigments. In: _____. **Comparative Biochemistry of the Flavonoids**. Academic Press Inc. London. p. 1-36, 1967.
- HARBORNE, J.B. **Flavonoids: Advances in research since 1980**. New York: Chapman and Hall Ltd. 621 p. 1988.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Oxford, v.55, n.6, p.481-504, 2000.

- HEINONEN, I.M.; MEYER, A.S.; FRANKEL, E.N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.46, n.10, p.4107-4112, 1998a.
- HEINONEN, I.M.; LEHTONEN, P.J.; HOPIA, A. Antioxidant activity of berry and fruits wines and liquors. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.46, n.1, p.25-31, 1998b.
- HENCZI, M.; NAGY, J.; WEAVER, D.F. Determination of octanol-water partition coefficient by an HPLC method for anticonvulsivant structure-activity studies. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.47, n.4, p. 345-347, 1995.
- HERTOG, M.G.I.; HOLLMAN, C.H., KATAN, M.B. Content of potentially ant carcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.40, n.12, p.2379-2383, 1992.
- HIRAYAMA. B. A.; LOSTAO. M. P.; MANAYOTOVA-HEIERMANN. M.; LOO. D. D.; TURK. R.; WRIGH, E. M. Kinetic and specificity difference between rat, human, and rabbit Na⁺-glucose cotransporters (SGLT-1). **Am. J.Physiol.**, Bethesda, v.270, n.6, p.G919-G926, 1996.
- HOLLMAN, P.C.H.; van TRIJP, J.M.P.; BUYSMAN, M.N.C.P.; van der GAAG, M.S.; MENGELERS, M.J.B.; de VRIES, J.H.M.; KATAN, M.B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. **FEBS Letters**. Amsterdam, v.418, n.1-2, p.152-156, 1997.
- HOLLMAN, P.C.; BIJSMAN, M.N.C.P.; van GAMEREN, Y.; CNOSSEN, E.P.J.; de VRIES, J.H.M.; KATAN, M.B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Rad. Res.**, London, v. 31, n.6, p.569-573, 1999.
- HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids; intake, health effects and bioavailability. **J. Agric. Food Chem.** Columbus, v.37, n.4, p.937-942, 1999.
- HUANG, S.; FRANKEL, E.N. Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.45, p.3033-3038, 1997.
- ICHIYANAGI, T.; SHIDA, Y.; RAHMAN, M.M.; HATANO, Y.; MATSUMOTO, H.; HIRAYAMA, M.; KONISHI, T. Metabolic pathway of cyanidin-3-*O*- β -glucopyranoside in rats. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.53, n.1, p.145-150, 2005.
- ISHIKAWA, T.; SUZUKAWA, M.; ITO, T.; YOSHIDA, H.; AYAORI, M.; NISHIWAKI, M.; YONEMURA, A.; HARA, Y.; NAKAMURA, H. Effect of tea flavonoid

- supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.66, n.2, p.261-266, 1997.
- JOVANOVIĆ, S.V.; STEENKEN, S.; TOSIC, M.; MARJANOVIĆ, B.; SIMIĆ, M.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Am. Chem. Soc.**, v.116, n.11, p.4846-4851, 1994.
- JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RINCÓN, M.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, n.11, p.5489-5493, 2001.
- JOHNSEN, S.P.; OVERVAD, K.; STRIPP, C.; TJØNNELAND, A.; HUSTED, S.E.; SØRENSEN, H.T. Intake of fruit and vegetables and risk of ischemic stroke in a cohort of Danish men and women. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.78, n.1, p.57-64, 2003.
- JOHNSON, M.K.; LOO, G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. **Mutation Research: DNA Repair**, Netherlands, v.459, n.3, p.211-218, 2000.
- JUSTESEN, U.; ARRIGONI, E.; LARSEN, B. R.; AMADO, R. Degradation of flavonoid glycosides and aglycones during in vitro fermentation with faecal flora. **Lebensm.-Wiss.u.-Technol.**, London, v.33, n.6, p.424-430, 2000.
- JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. **Food Chemistry**, Oxford, v.73, n.2, p.245-250, 2001.
- KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.47, n.10, p.3954-3962, 1999.
- KÄHKÖNEN, M.P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, n.3, p.628-633, 2003.
- KALT, W.; FORNEY, C.F.; MARTIN, A.; PRIOR, R.L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.47, n.11, p.4638-4644, 1999.
- Kang, S.; Seeram, N.P.; Strasburg, G.M.; Chang, Y.C.; Booren, A.M.; Gray, J.I.; DeWitt, D. L. Tart cherry inhibit tumor development in Apc (min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.194, n.1, p.13-19, 2003.

- KAO, E.; WANG, C.; LIN, W.; YIN, Y.; WANG, C.; TSENG, T. Anti-inflammatory potential of flavonoid contents from dried fruit *Crataegus pinnatifida* in vitro and in vivo. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.53, n.2, p.430-436, 2005.
- KARASOV, W.H.; DIAMOND, J.M. A simple method for measuring intestinal solute uptake *in vitro*. **J. Comp. Physiol.**, Berlin, v.152, n.1, p.105-116, 1983.
- KATSUBE, N.; IWASHITA, K.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, n.1, p.68-75, 2003.
- KAY, C.D.; MAZZA, G.; HOLUB, B.J.; WANG, J. Anthocyanin metabolites in human urine and serum. **Brit. J. Nutr.**, Wallingford, v.91, n. 6, p.933-942, 2004.
- KIM, H.P.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J. Pharmacol. Sc.**, v.96, p.229-245, 2004.
- KOBAYASHI. Y.; SUZUKI. M.; SATSU. H.; ARAI. S.; HARA. Y.; SUZUKI. K.; MIYAMOTO. Y.; SHIMIZU. M. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, n.1, p.5618-5623, 2000.
- KUHNLE, G.; SPENCER, J.P.E.; CHOWRIMOOTO, G.; SCHROETER, H.; DEBNAM, E.S.; SRAI, S.K.; RICE-EVANS, C. HAHN, U. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.272, n. 1, p.212-217, 2000a.
- KUHNLE, G.; SPENCER, J.P.E.; CHOWRIMOOTO, G.; SCHROETER, H.; DEBNAM, E.S.; SRAI, S.K.; RICE-EVANS, C. HAHN, U. Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.277, n.2, p.507-512, 2000b.
- LAMPE, J.W. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.70, n.3, p.475S-90S, 1999.
- LAPIDOT, T.; WALKER, M.D.; KANNER, J. Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic β -cells in vitro. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, n.25, p.7220-7225, 2002.
- LAUGHTON, M.J.; HALLIWELL, B.; EVANS, P.J.; HOULT, J.R. Antioxidant and pro oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myrcetin. **Biochem. Pharmacol.**, London, v.38, n.17, p.2859-2865, 1989.

- LEBET, V.; ARRIGON, E.; AMODÒ, R. Measurement of fermentation products and substrate disappearance during incubation of dietary fibre sources with human faecal flora. **Lebensm.-Wiss.u. Technol.**, London, v.31, n.5, p.473-479, 1998.
- LEE, S.K.; KADER, A.A. Preharvest and postharvest factors influencing the vitamin C content of horticultural crops. **Posth. Biol. Technol.**, Amsterdam, v.20, n.3, p.207-220, 2000.
- LEONG, L.P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in singapore markets. **Food Chemistry**. Oxford, v.76, n.1, p.9-75, 2002.
- LESEM, Y.Y. Plant senescence processes and free radicals. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v.5, n.1, p.39-49, 1988
- LIANG, Y.; HUANG, Y.; TSAI, S.; SHIAU, S.; CHEN, C.; LIN, J. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. **Carcinogenesis**, London, v.20, n.10, p.1945-1952, 1999.
- LIAO, K.; YIN, M. Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, n.6, p.2266-2270, 2000.
- LUGASI, A.; HÓVÁRI, J. Flavonoid aglycons in foods of plant origin: vegetables. **Acta Alimentaria**, Budapest, v.29, n.4, p. 345-352, 2000.
- MACHEIX, J-J.; FLEURIET, A; BILLOT, J. **Fruit phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 378p., 1990.
- McGHIE, T.K.; AINGE, G.D.; BARNETT, L.E.; COONEY, J.; JENSEN, D.J. Anthocyanin glycoside from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, p.4539-4548, 2003.
- MANACH, C.; MORAND, C.; TEXIER, O.; FAVIER, M.L.; AGULLO, G.; DEMIGNE, C.; REGERAT, F.; RĚMÉSY, C. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. **J. Nutr.**, Bethesda, v.125, n. 7, p.1911-1922, 1995.
- MANACH.C.; REGERAT. F.; TEXIER. O.; AGULLO. G.; DEMIGNE.C.; REMESY.C. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. **Nutr. Res.**, New York, v.16, n.3, p.517-544, 1996.

- MANACH, C.; SACALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L.
Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.79, n.5, p.727-747, 2004.
- MARKHAM, K.R. **Techniques of Flavonoids Identification**. Academic Press. London. 112p. 1982.
- MARX, F.; LICHTENTHÄLER, R.; RODRIGUES, R.B.; PAPAGIANNPOULOS, M.; MAIA, J.G.S. Evaluation of the total oxidant scavenging capacities of açai (*Euterpes oleracea*) and cashew apple (*Anacardium occidentale*) juices and identification of the active compounds by LC-MS. 5° Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. Campinas-Br, 3-9 de novembro 2003.
- MATSUMOTO, H.; IBANA. H.; KISHI. M.; TOMINAGA. S.; HIRAYAMA. M.; TSUDA. T. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in blood as the intact forms. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, n.3, p.1546-1551, 2001.
- MAZZA, G.; KA, C.D.; COTTRELL, T.; HOLUB, B.J. Absorption of anthocyanins from the blueberries and serum antioxidant status in human subjects. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, n.26, p.7731-7737, 2002.
- MEYER, A.S.; YI, O.; PEARSON, D.A.; WATERHOUSE, A.L.; FRANKEL, E.N. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.45, n.5, p.1638-1643, 1997.
- MILBURY, P.E.; CAO, G.; PRIOR, R.L.; BLUMBERG, J. Bioavailability of elderberry anthocyanins. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.123, n.8, p.997-1006, 2002.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaing, v.48, p.91-92, 1971.
- MORAZZONI, P.; MAGISTRETTI, M.J. Activity of Myrtocyan®, an anthocyanoside complex from *Vaccinium myrtillus* (VMA), on platelet aggregation and adhesiveness. **Fitoterapia**, Milano, v. 61, p.13-21, 1990.
- MORONEY, M.A.; ALCARAZ, M.J.; FORDER, R.A.; CAREY, F.; HOULT, J.R.S. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoid. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v.40, n.11, p.787-792, 1988.

- MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J. PARAJO, J.C. Natural antioxidants from residual source. **Food Chemistry**, Oxford, v.72, n.2, p.145-171, 2001.
- MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v.219, n.3, p.713-725, 1994.
- MUNDAY, R.; MUNDAY, C.M. Selective induction of phase II enzymes in the urinary bladder of rats by allyl isothiocyanate, a compound derived from Brassica vegetables. **Nutrition Cancer**, Mahwah, v.44, n.1, p.52-59, 2002.
- MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T. A comparative study on the various in vitro assays of active oxygen scavenging activity in foods. **J. Food Chem. Toxicol.**, v. 67, n.2, p.539-541, 2002.
- MUROTA, K.; MITSUKUNI, Y.; ICHIKAWA, M.; TSUSHIDA, T.; MIYAMOTO, S.; TERAOKA, J. Quercetin-4'-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rat intestinal mucosa homogenates against ion-induced lipid peroxidation. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.52, n.7, p.1907-1912, 2004.
- NAKAMURA, Y., OHTO, Y., MURAKAMI, A., OHGASHI, H. Superoxide scavenging activity of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* Britton var. Acuta f. Viridis. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.46, n.11, p.4545-4550, 1998.
- NIKI, E. Free radicals in the 1900's: from *in vitro* to *in vivo*. **Free Rad. Res.**, London, v.33, n.6, p.693-704, 2000.
- NUNES, M.C.N.; BRECHT, J.K.; MORAIS, A.M.M.B.; SARGENT, S.A. Controlling temperature and water loss to maintain ascorbic acid levels in strawberries during post harvest handling. **J. Food Sci.**, Chicago, v.63, n.6, p.1033-1036, 1998.
- OHSHIMA, H.; BARTSCH, H. Chronic infections and inflammatory process as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis **Mutat. Res.: Fundamental and Molecular mechanisms of Mutagenesis**, Netherlands, v.305, n.2, p.253-264, 1994.
- OHSHIMA, H.; YOSHIE, Y.; AURIOL, S.; GILBERT, I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxy nitrile and nitroxyl anion. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v.25, n.9, p.1057-1065, 1998.
- OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H. VREE, T.B.; KATAN, M. B. Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, n.15, p.1200-1203, 2000.

- ORDAZ-GALINDO, A; WESCHE-EBELING, P.; WROLSTAD, R.E.; RODRIGUEZ-SAONA, L.; ARGALIZ-JAMET, A. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins. **Food Chemistry**, Oxford, v.65, n.2, p.201-206, 1999.
- OTEIZA, P.I.; BECHARA, E.J.H. 5-Aminolevulinic acid induces lipid peroxidation in cardiolipin-rich liposomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v.305, n.2, p.282-287, 1993.
- PAPETTI, A.; DAGLIA, M.; GAZZANI, G. Anti- and pro-oxidant water soluble activity of *Cichorium genus* vegetables and effect of thermal treatment. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, n.16, p.4696-4704, 2002.
- PASCAL, G. Functional Foods in the European Union. **Nutr. Rev.**, Lawrence, v. 54, n.11, p.S199-S201, 1996.
- PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.296, n.3, p.631-636, 2002.
- PASSAMONTI, S.; VRHROVSEK, U.; VANZO, A.; MATTIVI, F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.544, n.1-3, p.210-213, 2003.
- PEDRIELLI, P.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on α -tocopherol in homogeneous solutions of peroxydation methyl linoleate. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, n.4, p.738-7144, 2002.
- PETERSON, J.; DWYER, J. Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire. **J. Am. Diet Assoc.**, v.98, n.6, p.677-682, 685, 1998.
- PICAGLIA, R.; MAROTTI, M.; BALDONI, G. Factors influencing anthocyanin content in red cabbage (*Brassica oleraceae* var. *capitata* L. f. *rubra* (L) Thell). **J. Sc. Food Agric.**, Bognor Regis, v. 82, n.13, p.1504-1509, 2002.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as Antioxidants. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v.63, n.7, p.1035-1042, 2000.
- PLUMB, G.W.; PRICE, K.R.; WILLIAMSON, G. Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea. **Redox Report**, W Yorks, v. 4, n.1-2, p. 13-16, 1999.
- PRICE, K.R.; PROSSER, T.; RIHETIN, AMF; RHODES, MJC. A comparison of the flavanol content and composition in desert, cooking and cider-making apples;

- distribution within the fruit and effect of juicing. **Food Chemistry**, Oxford, v.66, n.4, p.489-494, 1999.
- PRIOR, R.L.; CAO, G.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; McEWEN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C.M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.46, n.7, p.2686-2693, 1998.
- RAMIREZ-TORTOSA, C.; ANDERSEN, O.M.; GARDNER, P.T.; MORRICE, P.C.; WOOD, S.G.; DUTHIE, S.J.; COLLINS, A.R.; DUTHIE, G.G. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipidic peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v.31, n.9, p.1033-1037, 2001.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Absorção e distribuição das drogas. In: **Farmacologia**, 4 ed. Editora guanabara Koogan S.A., p.51-77, 2000.
- RECHNER, A.R.; SMITH, M.A.; KUHNLE, G.; GIBSON, G.R.; DEBMAN, E.S.; SRAI, S.K.S.; MOORE, K.P.; RICE-EVANS, C.A. Colonic metabolism of dietary polyphenolics: influence of structure on microbial fermentation products. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v.36, n.2, 212-225, 2004.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v.20, n.7, p.933-956, 1996.
- RIOS, L.Y.; BENNETT, R.N.; LAZARUS, S.A.; REMESY, C.; SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.76, n.5, p.1106-1110, 2002.
- RISSANEN, T.H.; VOUTILAINEN, S.; VIRTANEN, J.K.; VENHO, B.; VANHARANTA, M.; MURSU, J.; SALONEN, J.T. Low intake of fruits, berries and vegetables is associated with excess mortality in men: the kuopio ischaemic heart disease risk factor (KIHD) study. **J. Nutr.**, Bethesda, v.133, n.1, p.199-204, 2003.
- RIZZOLO, A.; FORNI, E.; POLESELO, A. HPLC assay of ascorbic acid in fresh and vegetables. **Food Chem.**, Oxford, v.14, p.189-199, 1984.
- ROBERTS, W.G.; GORDON, M.H. Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, n.5, p.1486-1493, 2003.

- SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidants agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v.19, n.4, p.481-486, 1995.
- SAKAKIBARA, H.S. HONDA, Y.; NAKAGAWA, S.; ASHIDA, H.; KANAZAWA, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, n.3, p.571-581, 2003.
- SATUÉ-GRACIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.45, n.9, p.3362-3367, 1997.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, n.8, p.2073S-2085S, 2000.
- SEERAM, N.P.; MOMOIN, M.G.; BOURQUIN, L.D. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. **Phytomedicine**, Stuttgart, v.8, n.5, p.362-369, 2001.
- SEERAM, N.P.; BOURQUIN, L.D.; NAIR, M.G. Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, n.10, p.4924-4929, 2001.
- SEERAM, N.P.; NAIR, M.G. Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, n.19, p.5308-5312, 2002.
- SEERAM, N.P.; ZHANG, Y.J.; NAIR, M.G. Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins. **Nutrition and cancer- an International Journal**, Mahwah, v.46, n.1, p.101-106, 2003.
- SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos de avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. v.22, p.94-103, 1999.
- SKIBOLA, C. F.; SMITH, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v.29, n.2-3, p.375-383, 2000.
- SMITH, T.J. YANG, C.S. Effects of food phytochemicals or xenobiotic metabolism. In: Hunag, M.T.; Osawa, T. H.O, C.T.; Rosen, E.T. **Food phytochemicals for cancer prevention I. Fruits and vegetables**. Washington, DC: American Chemical Society, p.17-48, 1994.
- SOUICI, S.W.; FACHMANN, W.; KRAUT, H. **Food Composition and Nutrition Tables**. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers,. 1091pp, 1994.

- SPENCER, J.P.E.; CHOWRIMOOTO, G.; CHOUDHURY, R.; DEBNAM, E.S.; SRAI, S.K.; RICE-EVANS, C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.458, n.2, p.224-230, 1999.
- SPENCER, J.P.E.; CHAUDRY, F.; PANNALA, A.S.; SRAI, S.K.; DEBNAM, E.S.; RICE-EVANS, C. Decomposition of cocoa procyanidin in the gastric milieu. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.272, n.1, p.236-241, 2000.
- SPENCER, J.P. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. **J. Nutr.**, Bethesda, v.133, p.3255S-3261S, 2003.
- STAFFORD, H.A. **Flavonoid metabolism**. Boca Raton: CRC Press, 298p., 1990.
- STEFFEN, L.M.; JACOBS, D.R.; STEVENS, J.; SHAHAR, E.; CARITHERS, T.; FOLSOM, A.R. Associations of whole-grain, refined-grain, and fruit and vegetable consumption with risks of all-cause mortality and incident coronary artery disease and ischemic stroke: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.78, n.3, p.383-390, 2003.
- SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X.; LIU, R.H. antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, n.25, p.7449-7454, 2002.
- SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus Domestica* L.- The quantitative analysis of phenolic constituents. **J. Sc. Food Agric.**, Bognor Regis, v.10, p.63-68, 1959.
- TAKEOKA, G.R.; DAO, L.; FLESSA, S.; GILLESPIE, D.M.; JEWELL, W.T.; HUEBNER, B.; BERTOW, D.; EBELER, S.E. Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, n.8, p.3713-3717, 2001.
- TALAVÉRA, S.; FELGINES, C.; TEXIER, O.; BESSON, C.; LAMAISON, J.; RÉMÉSY, C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.133, n.12, p.4178-4182, 2003.
- TALAVÉRA, S.; FELGINES, C.; TEXIER, O.; BESSON, C.; MANACH, C.; LAMAISON, J.; RÉMÉSY, C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. **J. Nutr.**, v.134, n.9, p.2275-2279. 2004.
- TALAVÉRA, S.; FELGINES, C.; TEXIER, O.; BESSON, C.; GIL-IZQUIERDO, A.; LAMAISON, J.; RÉMÉSY, C. Anthocyanins metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain are efficiently absorbed from the

- small intestine in rats. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.53, n.10, p.3902-3908, 2005.
- TALL, J.M.; SEERAM, N.P.; ZHAO, C.; NAIR, M.G.; MEYER, R.A.; RAJA, S.N. Tart cherry anthocyanins suppress inflammation-induced pain behavior in rat. **Behavioural Brain Research**, v.153, n.1, p.181-188, 2004.
- THOMAS, J. A. Oxidative stress, oxidant defense, and dietary constituents. In: **Moderns Nutrition in health and disease**, Philadelphia: Lea & Febiger. v.1, p.501-512, 8ed, 1994.
- TRAXSLER, P.; GREEN, J.; METT, H.; SÉQUIN, U.; FURET, P. Use of a pharmacophore model for the design of EGFR tirosine kinase inhibitors: isoflavones and 3-phenyl-4(1H)-quinolones. **J. Med. Chem.**, v.42, n.6, p.1018-1026, 1999.
- TSUDA, T.; OHSHIMA, K.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.42, n.2, p.248-251, 1994.
- TSUDA, T.; SHIGA, K.; OSHIMA, K.; OSAWA, T. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. **Bioch.Pharmacol.**, London, v.52, n.7, p.1033-1039, 1996.
- TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. Dietary cyanidin 3-O- β -glucoside increase *ex vivo* oxidation resistance of serum in rats. **Lipids.**, Champain, v.33, n.6, p.583-588, 1998.
- TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. Absorption and metabolism of cyanidin 3-O- β -D-glucoside in rats. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.449, n.2-3, p.179-182, 1999.
- TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats. **Biofactors**, Bethesda, v.13, n.1-4, p.133-139, 2000.
- Van BUREN, J. de VOS, L.; PILNIK, W. Polyphenols in Golden Delicious apple juice in relation to method of preparation. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.24, n.3, p.448-451, 1976.
- Van der SLUIS, A.A.; DEKKER,M.; SKREDE, G.; JONGEN, W.M.F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, n.25, p.7211-7219, 2002.

- Van het HOF, K.H.; WISEMAN, S.A.; YANG, C.S.; TIJBURG, L.B. Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.220, n.4, p.203-209, 1999.
- VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.46, n.10, p.4113-4117, 1998.
- VIANA, M.; BARBAS, C.; NONET, B.; BONET, M.V.; CASTRO, M.; FRAILE, M. V.; HERRERA, E. In vitro effects of a flavonoids-rich extract on LDL oxidation. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.123, n.1-2, p.83091, 1996.
- VICKERY, M.L.; VICKERY, B. Secondary plant metabolism. London: Macmillan Press Ltd., 335p, 1981.
- VINSON, J.A.; HAO, Y.; SU, X.; ZUBIK, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Vegetables. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.46, n.9, p.3630-3634, 1998.
- VINSON, J.A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, n.11, p.5315-5321, 2001.
- WALGREN, R.A.; LIN, J.T.; KINNE, R.K.H.; WALLE, T. Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'- β -glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1¹. **J. Pharmacol Exp. Ther.**, v.294, n.3, p.837-843, 2000.
- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, n.3, p.701-705, 1996.
- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.45, n.2, p.304-309, 1997.
- WARDEN, D.A.; FANNIN, F.F.; EVANS, J.O.; HANKE, D.W.; DIEDRICH, D.F. A hydrolase-related transport system is not required to explain the intestinal uptake of glucose liberated from phloridzin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.599, n.2, p.664-672, 1980.
- WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. **Plant Physiol.**, Rockville, v.126, n.2, p. 485-493, 2001.
- WINTERBOURN, C.C.; SUTTON, H.C. Iron and xanthine oxidase catalyze formation of an antioxidant species distinguishable from OH: comparison with the Haber-Weiss reaction. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.244, n.1, p.27-34, 1986.

- WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant activity of apple peels. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, n.3, p.609-614, 2003.
- WOLFFRAM, S.; BLOCK, M.; ADER, P. Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. **J. Nutr.**, Bethesda, v.132, n.4, p.630-635, 2002.
- WRIGHT, E.M.; HIRSCH, J.R.; LOO, D.D.F.; ZAMPIGHI, G.A. Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. **J. Exper. Biol.**, Cambridge, v.200, n.2, p.287-293, 1997.
- WU, X.; PRIOR, R.L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Fruits and berries. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.53, n.7 p.2589-2599, 2005 (a).
- WU, X.; PRIOR, R.L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-Tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.53, n.8 p.3101-3113, 2005 (b).
- ZHENG, W.; WANG, S. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, n.2, p.502-509, 2003.