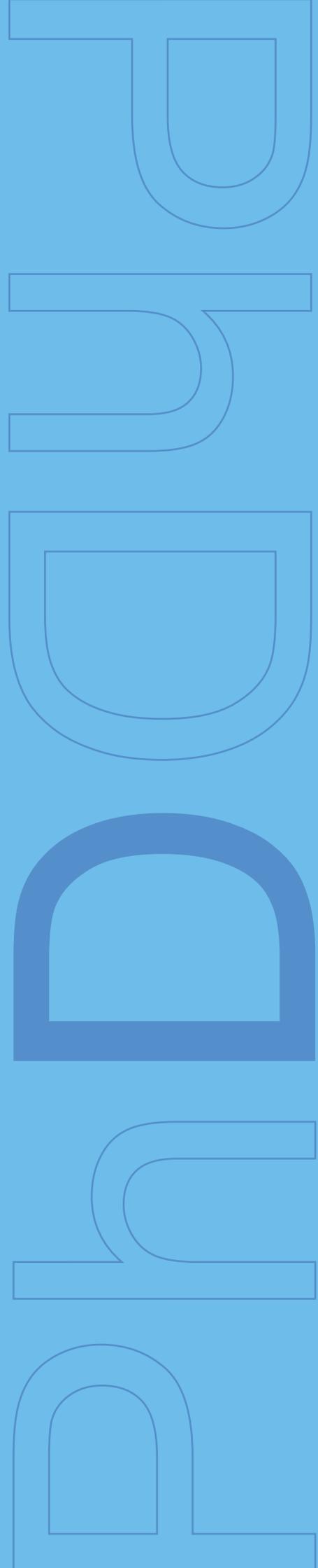
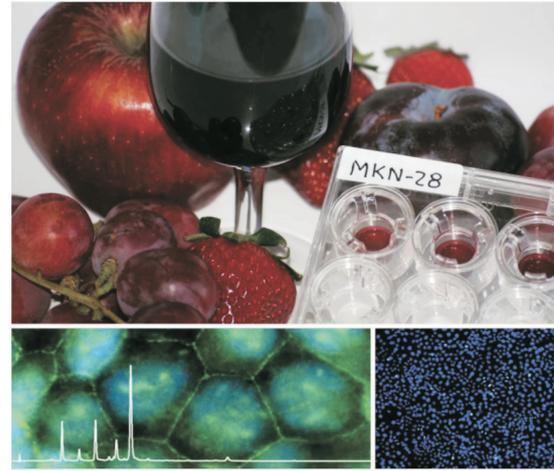


# Hemi-síntese, biodisponibilidade e propriedades biológicas de pigmentos antociânicos e metabolitos

Iva Luzia Reis Fernandes  
2012





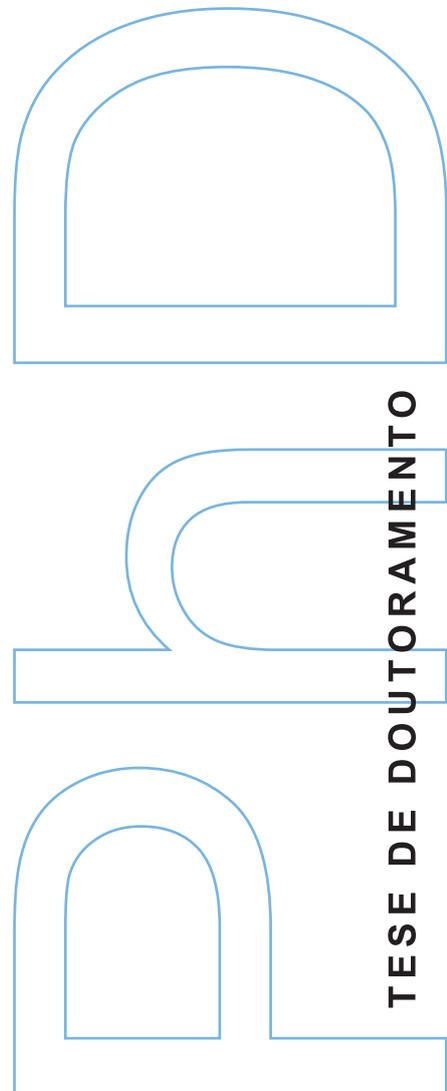
# Hemi-síntese, biodisponibilidade e propriedades biológicas de pigmentos antociânicos e metabolitos

Iva Luzia Reis Fernandes

Doutoramento em Química  
Departamento de Química e Bioquímica  
2012

## **Orientador**

Professor Doutor Nuno Mateus, Professor Associado com  
Agregação, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



TESE DE DOUTORAMENTO

## LISTA DE PUBLICAÇÕES

Esta investigação foi realizada no centro de investigação em Química, no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, com o apoio financeiro de uma bolsa de Doutoramento (SRFH / BD / 38883 / 2007) atribuída pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia e com financiamento do projeto (PTDC/QUI/65501/2006).

Esta dissertação integra resultados que foram publicados em congressos científicos internacionais através de comunicações em painel e em revistas de circulação internacional com arbitragem científica:

### Capítulos de livros

2. Faria, A., **I. Fernandes**, C. Calhau, N. Mateus (2013). "Bioavailability of anthocyanins", Handbook of Natural Products. K. Ramawat and J. M. Merillon. Germany, Springer. II. ISBN-978-3-642-22143-9
1. **Fernandes, I.**, V. de Freitas, N. Mateus (2010). "Propriedades antitumorais de compostos polifenólicos presentes em vinhos tintos e sumos de fruta. Interação com fármacos antimaláricos", In 7.<sup>a</sup> Jornada "Bebidas e Saúde", p.219-264. Ed: iBeSa-Instituto de Bebidas e Saúde, Porto. ISBN- 978-972-99931-5-2

### Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica

4. **Fernandes, I.**, F. Nave, R. Gonçalves, V. de Freitas, N. Mateus (2012) On the bioavailability of flavanols and anthocyanins: featuring flavanol-anthocyanin dimers. Food Chemistry 35 (2):812–818. doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.037

3. **Fernandes, I.**, V. de Freitas, C. Reis, N. Mateus (2012) A new approach on the gastric absorption of anthocyanins. *Food & Function* 3(5):508-516. doi:10.1039/C2FO10295A
2. **Fernandes, I.**, A. Faria, J. Azevedo, S. Soares, C. Calhau, V. De Freitas, N. Mateus (2010) Influence of Anthocyanins, Derivative Pigments and Other Catechol and Pyrogallol-Type Phenolics on Breast Cancer Cell Proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (6):3785-3792. doi:10.1021/jf903714z
1. **Fernandes, I.**, J. Azevedo, A. Faria, C. Calhau, V. de Freitas, N. Mateus (2009) Enzymatic Hemisynthesis of Metabolites and Conjugates of Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2):735-745. doi:10.1021/jf802844p

### Comunicações orais

2. **Fernandes I.**, V. de Freitas and N. Mateus. "A new approach on the gastric absorption of anthocyanins" "26<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols", Florence, Italy, 22-26 July 2012.
1. **Fernandes I.**, V. de Freitas and N. Mateus. "Propriedades antitumorais de compostos polifenólicos presentes em vinhos tintos e sumos de fruta." 7.<sup>a</sup> Jornada "Bebidas e Saúde", Porto, Portugal, 2010.

### Comunicações em painel ("poster")

6. Marques F., **I. Fernandes**, V. de Freitas e N. Mateus. "Desenvolvimento da hemi-síntese de metabolitos metilados de antocianinas – propriedades antioxidantes", 11<sup>o</sup> Encontro de Química dos Alimentos, Bragança, Portugal, 16 a 19 Setembro 2012.
5. **Fernandes I.**, H. Oliveira, M. Araújo, V. de Freitas, P. Sá, N. Mateus. "Antitumoral properties of Port Wine polyphenols", 11<sup>o</sup> Encontro de Química dos Alimentos, Bragança, Portugal, 16 a 19 Setembro 2012.
4. **Fernandes I.**, F. Nave, R. Gonçalves, V. de Freitas and N. Mateus. "On the bioavailability of flavanols and anthocyanins: featuring flavanol-anthocyanin dimers", 26<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols, Florence, Italy, 22-26 July 2012.
3. **Fernandes I.**, V. de Freitas and N. Mateus. "Contribution for the development of a model to study anthocyanin gastric absorption", 6<sup>th</sup> International Workshop on Anthocyanins, Charlotte, North Carolina, 11-14 September, 2011.
2. **Fernandes I.**, Faria A., Azevedo J., Calhau C., Freitas V., Costa V. and Mateus N. "Influence of cyanidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside and respective portisins on breast cancer cell proliferation: a structure-activity approach.", 4<sup>th</sup> International

Conference on Polyphenols and Health, Yorkshire, England, 7-11 December 2009, P89.

1. **Fernandes I.**, Azevedo J., Freitas V. and Mateus N. "Enzymatic hemi-synthesis of metabolites and conjugates of anthocyanins.", XXIV<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols, Salamanca, Spain, 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> July 2008, T5.20.



## **FCT** Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR Portugal





## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração e o apoio de várias pessoas e instituições. Desta forma gostaria de expressar o meu sincero agradecimento:

Ao Professor Doutor Nuno Mateus, orientador deste trabalho, pelo seu apoio e disponibilidade constantes, pelas suas críticas e sugestões, pelo dinamismo e motivação contagiante, pela sua paciência, pela forma como acreditou neste trabalho e pela confiança que depositou em mim. Obrigada por me ter mostrado que a química, tal como a biologia, é uma ciência apaixonante.

Ao Professor Doutor Victor Freitas pela forma como coorientou este trabalho, pela transmissão das suas opiniões e conhecimentos, fazendo com que o caminho a percorrer fosse menos difícil. Obrigada por me ter ajudado a ultrapassar as barreiras da inexperiência.

À Professora Doutora Conceição Calhau e ao seu grupo de investigação, em particular à sua aluna de Pós-Doutoramento Ana Faria por toda a disponibilidade e interesse demonstrado por este trabalho e por toda a colaboração na realização de algumas experiências. Em seu nome gostaria também de agradecer à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, em especial ao serviço de Bioquímica, por me ter disponibilizado as instalações e o equipamento necessário para a realização das mesmas.

Ao Professor Doutor Vitor Costa e às suas alunas de Doutoramento Rita Vilaça e Sílvia Pires pelo apoio na realização dos estudos de eletroforese bidimensional.

Ao grupo de investigação em Química Física do Centro de Investigação em Química, em particular ao Professor Doutor Eduardo Marques por me ter permitido utilizar o microscópio de fluorescência.

A todos os elementos do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências, que em algum momento contribuíram para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e em especial, ao Departamento de Química e Bioquímica por ser responsável pelo meu crescimento académico e científico.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo apoio financeiro concedido através de uma bolsa de Doutoramento (SFRH / BD / 38883 / 2007) e dos projetos nos quais este trabalho se encontra inserido, PTDC/AGR-ALI/67579/2006, PTDC/QUI/65501/2006 e PTDC/AGR-ALI/65503/2006.

Gostaria também de agradecer ao iBeSa pelo apoio financeiro cedido a este projeto e em especial ao Eng.º Machado Cruz por toda a confiança nele depositou.

A todas as pessoas que trabalham no Laboratório de Química Orgânica da linha 2 do Centro de Investigação em Química por me terem recebido de braços abertos e terem tornado a minha estadia tão agradável.

Em especial, aos meus amigos e colegas de laboratório, o André, a Ana Luísa, a Ana Faria, a Joana Azevedo, a Joana Oliveira, o Frederico, a Natércia, o Luís, a Paulinha, o Rui, a Susana e a Virgínia que de uma forma ou de outra deram o seu apoio, por se terem mostrado sempre disponíveis para me ajudarem e pelas pessoas incríveis que são, pelos momentos de alegria que passamos juntos e pela vossa energia contagiante.

Aos amigos, pelos bons e maus momentos passados, pelas brincadeiras, pelas chatices, por me fazerem rir tantas vezes, pela vossa compreensão, carinho e principalmente pela vossa amizade. Longe ou perto, sempre juntos!

Aos meus pais, ao meu irmão e à minha cunhada Cristina, pela compreensão, apoio, incentivo, pela força, por me terem ajudado a saber manter o equilíbrio e a nunca desistir dos meus objetivos mesmo nos piores momentos e pelo orgulho que sempre sentiram de mim.

Não podia deixar de agradecer à D. Albina e ao Sr. Lopes, por sempre me receberem como uma filha e à minha cunhada Carla, por se preocupar comigo e por estar sempre disposta para me ajudar e aconselhar.

Às minhas sobrinhas preferidas, a Mafaldinha e a Rita, por serem a minha alegria.

Ao Ricardo, pela partilha e amor de todos estes anos e por me ajudares a ultrapassar os piores momentos com um sorriso.

## RESUMO

No organismo humano, as antocianinas são metabolizadas a diferentes metabolitos, que são posteriormente detetados no plasma e podem contribuir para os efeitos biológicos associados à ingestão dos compostos parentais.

Uma das reações de fase II mais importante é a O-metilação do grupo catecol, que poderá eventualmente alterar as suas propriedades antioxidantes e antiproliferativas. No primeiro capítulo, antocianinas isoladas de películas de uvas tintas da espécie *Vitis Vinifera* foram incubadas com enzimas da fração citosólica de células hepáticas de rato, na presença do respetivo substrato, no sentido de se obter metabolitos metilados. Os novos metabolitos formados foram identificados por LC-MS e RMN como produtos monometilados das respetivas antocianinas.

A avaliação das propriedades antioxidantes e biológicas foi precedida pelo estudo da biodisponibilidade intestinal dos conjugados através das células Caco-2, tendo sido possível comprovar que os metabolitos são absorvidos com uma eficiência de transporte superior às respetivas antocianinas e a sua absorção é dependente do tempo de incubação e da presença de glicose.

Os metabolitos metilados mantêm a capacidade de captar radicais livres e o poder redutor, sugerindo a sua possível atuação, *in vivo*, como antioxidantes.

O efeito antioxidante dos metabolitos nos danos no DNA induzidos pelo peróxido de hidrogénio na presença ferro foi também avaliado. Todas as antocianinas testadas e respetivos metabolitos aumentaram os danos no DNA, tendo esse efeito sido mais acentuado nos compostos que possuem um grupo pirogalhol na sua estrutura.

No que diz respeito aos ensaios de citotóxicidade, em termos gerais, todos os compostos inibiram, de forma dependente da concentração, o crescimento das linhas celulares tumorais humanas testadas: adenocarcinoma gástrico (MKN-28), adenocarcinoma da mama (MCF-7) e adenocarcinoma do colon (Caco-2), tendo as

antocianinas nativas sido as mais ativas. Este resultado sugere que a conjugação com grupos metilo reduz o efeito antiproliferativo das antocianinas parentais.

No que diz respeito às antocianinas, comprovada a sua absorção intestinal, foi objetivo do segundo capítulo investigar possíveis atividades biológicas de antocianinas e de pigmentos derivados. Com esta finalidade, antocianinas e vinilpiranoantocianinas (portisinas) foram estudadas no sentido de se avaliar o seu efeito antiproliferativo na linha celular de adenocarcinoma da mama com recetores de estrogénios, MCF-7 (ER+) e na expressão das duas isoformas do recetor de estrogénios (ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ ). Outras classes de flavonóides e compostos fenólicos foram igualmente testadas.

Em termos gerais, as portisinas e os respetivos precursores inibiram, de forma dependente da concentração, o crescimento da linha celular MCF-7 (ER+). Curiosamente o efeito antiproliferativo foi mais intenso quando as células foram tratadas com a antocianina Dp3glc e a respetiva portisina (presença do grupo pirogalhol). Foram testados outros compostos fenólicos tendo-se verificado uma maior citotóxicidade por parte dos compostos que possuem um anel pirogalhol na sua estrutura. Estes resultados são compatíveis com a hipótese da presença de um grupo pirogalhol num polifenol ser responsável por um efeito inibidor mais intenso da linha celular MCF-7.

O efeito das antocianinas Cy3glc e Dp3glc na proliferação celular foi avaliado por incorporação do nucleótido 5-bromo-2'-desoxi-uridina no DNA e quantificado por imunofluorescência. O tratamento com a Dp3glc induziu uma redução significativa do número de células em fase S comparativamente com o controlo.

Curiosamente, o efeito antiproliferativo mais intenso observado para o tratamento com a antocianina Dp3glc não foi acompanhado por uma modificação na expressão do ER. Contudo, a antocianina Cy3glc induziu uma subexpressão dos níveis de mRNA do ER. A segunda parte deste projeto integra o estudo da contribuição da biodisponibilidade gástrica de antocianinas e da absorção intestinal de pigmentos antociânicos para a biodisponibilidade genérica de antocianinas. Para o efeito, foi desenvolvido um novo modelo celular que permitiu avaliar a biodisponibilidade gástrica de antocianinas. Foi utilizado como modelo de barreira gástrica a linha celular de adenocarcinoma epitelial gástrico, MKN-28, superando as dificuldades inerentes ao uso de culturas primárias de células epiteliais gástricas. A resistência elétrica transepitelial (TEER) das células foi medida ao longo dos vários dias de crescimento, tendo-se observado um aumento progressivo da resistência o que sugere a manutenção da integridade da membrana e a formação de junções apertadas.

A presença de proteínas das junções apertadas (occludinas) em células MKN-28 confluentes foi confirmada por imunofluorescência. As células MKN-28 expressam occludinas e estas proteínas estão localizadas nos locais de contacto entre as células, o que assegura a integridade da monocamada. O transporte de antocianinas através das células MKN-28 foi dependente do tempo e de uma forma geral independentemente do gradiente de pH utilizado e da natureza da antocianina. As três antocianinas testadas foram capazes de atravessar as células MKN-28 provavelmente por um mecanismo de transporte saturado.

A contribuição da ingestão de pigmentos antociânicos para a biodisponibilidade antocianinas foi realizada recorrendo a um modelo de barreira intestinal, as células Caco-2. Assim, avaliou-se a absorção do dímero (+)-catequina-(4,8)-malvidina-3-O-glicose (Cat-Mv3glc) a qual foi comparada com a da antocianina malvidina-3-glicose (Mv3glc), a do flavan-3-ol (+)-catequina (Cat) e a da procianidina B3 (Cat-Cat) de forma a compreender a influência de algumas características estruturais na eficiência de transporte. O dímero Cat-Mv3glc foi absorvido através das células Caco-2, no entanto apresentou uma eficiência de absorção menor do que os monómeros Cat e Mv3glc. Por outro lado, o dímero Cat-Mv3glc foi capaz de atravessar a barreira intestinal mais eficientemente do que o dímero Cat-Cat. Esta característica pode estar relacionada com a presença da molécula de glicose na sua estrutura. Estes resultados são extremamente relevantes, pois constituem a primeira referência à absorção de pigmentos antociânicos e comprovam que compostos mais polimerizados podem ser absorvidos a nível intestinal podendo contribuir para aumentar a biodisponibilidade dos monómeros que os constituem.

Palavras-chave: polifenol, flavonóide, antocianinas, hemi-síntese, biodisponibilidade, antioxidante, antitumoral, metabolização.



## ABSTRACT

In the human organism anthocyanins are metabolized to different metabolites, which are further found in plasma and should contribute to the biological effects associated to the intake of the parent compounds. One of the most important phase II reactions is the O-methylation of the catechol group, which can be expected to have an effect on their antioxidant and antiproliferative properties. In the first chapter, isolated anthocyanins from *Vitis Vinifera* were incubated with rat liver cytosolic enzymes in the presence of activated co-factors in order to obtain, methylated compounds.

The compounds were identified as monomethylated products by HPLC-MS and NMR. Previously to the antioxidant and biological activities evaluation, the absorption of the metabolites through Caco-2 cells was assessed by performing transepithelial transport assays. The metabolites were absorbed in this intestinal model with a higher efficiency than the anthocyanins. Their absorption was dependent on the incubation time and on the presence of glucose.

The antioxidant activity of metabolites was evaluated and compared to that of the corresponding anthocyanins. The methylated metabolites still retain significant radical scavenging activity and reducing power, suggesting that they could act as potential antioxidants, *in vivo*.

The protective effect of metabolites and corresponding anthocyanins on the hydroxyl radical-induced damage in calf thymus DNA was also evaluated. The O-methylation of the hydroxyls of the pyrogallol B-ring resulted in a decrease of the hydroxyl radical-induced DNA damage activity with regard to the parent compounds.

The antiproliferative activity of the metabolites in comparison with the parental anthocyanins was also evaluated in three cancer cell lines, gastric epithelial cancer cell line (MKN-28), colon cancer cell line (Caco-2) and human breast cancer cell line (MCF-

7), by the protein-binding dye SRB assay. Similar to what was observed above, the metabolites had a less pronounced antiproliferative effect in the three cell lines.

The aim of the second chapter was to investigate the possible biological activities of anthocyanins and derivative pigments, namely their effect on breast adenocarcinoma cell proliferation and on estrogen receptor expression.

For this purpose, anthocyanins and vinylpyranoanthocyanin-catechins (portisins) were studied in order to evaluate the growth inhibitory effect (antiproliferative) on the estrogen responsive human breast cancer cell line (ER+) MCF-7 and their effect on estrogen receptor (ER- $\alpha$  and ER- $\beta$ ) expression. Other flavonoid classes and phenolic molecules were also tested, aiming to study possible structural features related with these effects (structure-activity relationship).

Generally, all anthocyanin pigments studied inhibited, in a dose-dependent manner, the growth of the (ER+) MCF-7 cells, with no significant differences between them. Curiously, the antiproliferative effect was higher when cells were treated with Dp3glc and its respective portisin. The treatment of (ER+) MCF-7 cells with two flavonols (quercetin or myricetin) resulted in an increase of the antiproliferative effect, with myricetin being the most active. The same trend was observed when MCF-7 cells were treated with hydroxyphenolic acids and other phenolic molecules, being the most potent the ones bearing a tri-hydroxylated B ring (pyrogallol group).

Altogether, these results are compatible with the hypothesis that phenolic molecules bearing a pyrogallol-type structure in ring B have more potent inhibitory effect on MCF-7 cell proliferation as a result of this structural feature.

The effect of the two anthocyanins on cell proliferation was evaluated by measurement of cellular protein content and quantification of 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation into newly synthesized DNA of actively proliferating cells. Dp3glc seems to induce a reduction in the number of cells in S-phase. Although no antiproliferative effect was observed with Cy3glc.

Curiously, the higher antiproliferative effect observed after cell treatment with Dp3glc was not followed by modification on ER expression. However, the anthocyanin Cy3glc was able to induce a downregulation of ER levels.

In the second part of this work the contribution of anthocyanin gastric absorption and anthocyanin-flavonol pigments intestinal absorption to the entire anthocyanin absorption was determined.

Further investigations on the mechanisms by which anthocyanins are absorbed are limited by the lack of testable gastric epithelial cell models that form functional barriers.

The methods available to evaluate the absorption of drugs at the gastric level make use of isolated gastric epithelial cell, which is both time and labour consuming.

In the present study, a biologically relevant in vitro model of moderately differentiated adenocarcinoma stomach cells (MKN-28) was used as gastric barrier. The transepithelial electrical resistance (TEER) of MKN-28 cell monolayers was evaluated at pH values that cover the physiologic range of the stomach, ensuring at the same time the cell monolayer integrity. The immunofluorescence assay attested the localization of occludins at the cellular margins, which is associated with a non-disrupted membrane. Anthocyanins were found to cross MKN-28 cells in a time dependent manner and probably by a saturable transport mechanism.

The intestinal bioavailability of anthocyanin-derived pigments like flavanol-anthocyanin dimers already reported to occur in food products is a major unsolved issue. The absorption of the flavanol-anthocyanin dimer (+)-catechin-(4,8)-malvidin-3-O-glucoside (Cat-Mv3glc) through Caco-2 cells was assessed by performing transepithelial transport assays. The ability of Cat-Mv3glc to cross Caco-2 cells was compared with that of malvin-3-glucoside (Mv3glc), (+)-catechin (Cat) and procyanidin B3 (Cat-Cat) in order to evaluate the influence of some structural features in the transport efficiency. The flavanol-anthocyanin dimer was absorbed in this intestinal model although with a lower efficiency than the monomers Cat and Mv3glc. On the other hand, Cat-Mv3glc was found to cross the intestinal barrier model more significantly than Cat-Cat. This feature may be related to the presence of the glucose moiety in its structure. Overall, this study brings more insights on the bioavailability of anthocyanins and flavanols and represents the first report on the bioavailability of flavanol-anthocyanins.

**Keywords:** polyphenol, flavonoid, anthocyanins, hemi-synthesis, bioavailability, antioxidant, antitumoral, metabolization.



## ÍNDICE

<b>LISTA DE PUBLICAÇÕES.....</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>XVII</b>
LISTA DE FIGURAS .....	XXI
LISTA DE TABELAS.....	XXIX
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XXXI</b>
<b>ORGANIZAÇÃO DA TESE .....</b>	<b>XXXV</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
1. Polifenóis na saúde .....	3
2. Flavonóides .....	5
2.1. Antocianinas.....	7
2.1.1. Estrutura química.....	7
2.1.2. Ingestão e ocorrência .....	11
2.1.3. Toxicidade .....	14
2.1.4. Influência do pH.....	14
2.2. Propriedades biológicas das antocianinas .....	16
2.2.1. Atividade antioxidante e prooxidante .....	17
2.2.2. Atividade antitumoral .....	19
2.3. Biodisponibilidade – conceitos básicos .....	20
2.3.1. Fatores que afetam a biodisponibilidade .....	21
2.4. Biodisponibilidade de antocianinas .....	23
2.4.1. Cavidade oral, estômago, intestino delgado e cólon .....	28
2.5. Mecanismos de absorção e transporte .....	31
2.5.1. Distribuição nos tecidos.....	33
2.6. Metabolismo de fase II .....	34
2.7. Estabilidade gastrointestinal e microbiota .....	37
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>

<b>PARTE 1 - HEMI-SÍNTESE, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E BIOLÓGICAS DE PIGMENTOS ANTOCIÂNICOS E METABOLITOS.....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO I - HEMI-SÍNTESE DE METABOLITOS METILADOS DE ANTOCIANINAS: BIODISPONIBILIDADE E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS .....</b>	<b>45</b>
1. Introdução.....	47
1.1. Propriedades antioxidantes.....	47
1.2. Stresse oxidativo, danos no DNA e a Reação de Fenton .....	52
1.2.1. Papel do ferro na formação de ROS.....	52
1.2.2. Efeito prooxidante dos complexos polifenol-ferro .....	53
1.3. Métodos de análise da atividade antioxidante de polifenóis.....	54
1.3.1. Métodos de quantificação do efeito dos polifenóis nos danos do DNA induzidos pelo ferro .	54
1.3.2. DPPH.....	55
1.3.3. FRAP .....	55
2. Objetivos.....	57
3. Material e Métodos .....	59
3.1. Reagentes.....	59
3.2. Obtenção dos extratos de antocianinas .....	59
3.3. Preparação das frações microsomal e citosólica de fígado de rato.....	59
3.4. Hemi-síntese enzimática de metabolitos metilados de antocianinas.....	60
3.5. Análise dos compostos por HPLC.....	61
3.5.1. HPLC-DAD .....	61
3.5.2. HPLC-DAD-MS.....	61
3.6. Purificação dos compostos por HPLC preparativo.....	62
3.7. Caraterização estrutural dos metabolitos metilados de antocianinas por RMN.....	62
3.8. Avaliação da capacidade antirradicalar dos metabolitos metilados de antocianinas.....	63
3.9. Avaliação do poder redutor dos metabolitos metilados de antocianinas .....	63
3.10. Avaliação da capacidade protetora dos metabolitos metilados de antocianinas nos danos no DNA.....	64
3.11. Culturas celulares.....	65
3.11.1. Avaliação da viabilidade celular.....	66
3.12. Ensaio SRB para avaliação do efeito antitumoral dos compostos .....	66
3.13. Estudos de transporte transepitelial .....	68
4. Resultados.....	71
4.1. Extração e purificação de antocianinas.....	71
4.2. Hemi-síntese enzimática metabolitos metilados das antocianinas.....	72
4.2.1. Metilação da delfinidina-3-glicose (Dp3glc) .....	73
4.2.2. Metilação da cianidina-3-glicose (Cy3glc) .....	75
4.2.3. Metilação da Petunidina-3-glicose (Pt3glc).....	78
4.3. Caraterização estrutural dos metabolitos metilados das antocianinas por RMN.....	82
4.4. Transporte dos compostos através das células Caco-2.....	89
4.5. Propriedades antioxidantes dos metabolitos metilados de antocianinas.....	91
4.5.1. Avaliação da capacidade antirradicalar .....	91
4.5.2. Avaliação do poder redutor.....	92
4.5.3. Avaliação da capacidade protetora dos metabolitos metilados nos danos no DNA induzidos por Fe <sup>2+</sup> .....	94
4.6. Propriedades antiproliferativas dos metabolitos metilados de antocianinas.....	96
5. Conclusão.....	101
<b>CAPÍTULO II - HEMI-SÍNTESE DE PIGMENTOS ANTOCIÂNICOS E PROPRIEDADES ANTITUMORAIS: RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE.....</b>	<b>103</b>

1.	Introdução.....	105
1.1.	Propriedades biológicas de antocianinas .....	105
1.1.1.	Atividade estrogénica/antiestrogénica de flavonóides .....	105
1.1.2.	Mecanismo clássico de ativação dos ERs .....	107
1.1.3.	Acções genómicas do ER.....	109
1.1.3.1.	Independente de ligandos.....	109
1.1.3.2.	Independente de EREs.....	109
1.1.4.	Acções não-genómicas do 17- $\beta$ -estradiol.....	110
1.2.	Pigmentos derivados de antocianinas .....	110
1.2.1.	Derivados Pirúvicos e Portisinas .....	111
2.	Objetivos.....	115
3.	Material e Métodos .....	117
3.1.	Reagentes .....	117
3.2.	Hemi-síntese química de pigmentos antociânicos .....	117
3.2.1.	Derivados pirúvicos .....	117
3.2.2.	Portisinas .....	118
3.3.	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	119
3.4.	Purificação dos compostos por HPLC preparativo .....	119
3.5.	Compostos fenólicos estudados.....	119
3.5.1.	Culturas celulares.....	120
3.5.1.1.	Condições de cultura .....	120
3.5.1.2.	Avaliação da viabilidade celular.....	121
3.6.	Ensaio SRB para avaliação do efeito citotóxico dos compostos .....	121
3.7.	Ensaio BrdU para avaliação do efeito antiproliferativo dos compostos .....	122
3.8.	Análise do recetor de estrogénios (ER) por RT – PCR .....	123
3.8.1.	Extração e quantificação de RNA .....	124
3.8.2.	Reação em Cadeia da Polimerase Reversa .....	124
3.9.	PCR em tempo real (RT <sup>2</sup> -PCR).....	126
3.10.	Análise da expressão proteica das células MCF-7 por eletroforese bidimensional.....	127
3.10.1.	Coloração com prata .....	128
3.11.	Tratamento estatístico.....	128
4.	Resultados e Discussão .....	129
4.1.	Efeito de antocianinas e portisinas no crescimento da linha celular MCF-7 (ER+): relação estrutura-atividade.....	129
4.2.	Efeito do grau de hidroxilação e configuração do anel B no efeito antiproliferativo dos diferentes compostos: relação estrutura-atividade.....	132
4.3.	Efeito de antocianinas na proliferação celular .....	136
4.4.	Efeito das antocianinas Dp3glc e Cy3glc na expressão do ER.....	138
4.4.1.	RT-PCR .....	138
4.4.2.	PCR em tempo real (RT <sup>2</sup> -PCR) .....	142
4.5.	Efeito das antocianinas Dp3glc e Cy3glc na expressão proteica de células MCF-7 .....	143
5.	Conclusão.....	146
<b>PARTE 2 - BIODISPONIBILIDADE DE ANTOCIANINAS E PIGMENTOS ANTOCIÂNICOS .....</b>		<b>149</b>
<b>CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DO MODELO DE BARREIRA GÁSTRICA: TRANSPORTE DE ANTOCIANINAS .....</b>		<b>151</b>
1.	Introdução.....	153
2.	Objetivos.....	157

3.	Material e Métodos .....	159
3.1.	Reagentes .....	159
3.2.	Células e condições de cultura.....	159
3.3.	Ajuste do pH apical .....	160
3.4.	Permeabilidade do marcador fluorescente amarelo Lucifer .....	160
3.5.	Estudos de transporte transepitelial .....	161
3.6.	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	161
3.7.	Imunofluorescência .....	162
3.8.	Análise por LC-MS .....	162
3.9.	Análise estatística .....	163
4.	Resultados e Discussão .....	165
4.1.	Variação da resistência eléctrica transepitelial das células MKN-28.....	165
4.2.	Ensaio de imunofluorescência.....	166
4.3.	Efeito do pH na integridade da barreira.....	167
4.4.	Efeito do pH na resistência da membrana .....	169
4.5.	Permeabilidade aparente (Papp) da sonda de permeabilidade paracelular: amarelo de Lucifer .	170
4.6.	Transporte do ácido acetilsalicílico através das células MKN-28 .....	171
4.7.	Transporte das antocianinas através das células MKN-28: efeito do pH apical.....	173
4.8.	Estudo cinético do transporte de Cy3glc através das células MKN-28 .....	179
5.	Conclusão.....	180
<b>CAPÍTULO II - ABSORÇÃO INTESTINAL DE PIGMENTOS ANTOCIÂNICOS .....</b>		<b>181</b>
1.	Introdução.....	183
1.1.	Flavan-3-óis.....	183
1.1.1.	Proantocianidinas .....	184
1.2.	Ocorrência, biodisponibilidade e propriedades biológicas.....	186
1.3.	Pigmentos antociânicos .....	186
2.	Objetivos.....	189
3.	Material e Métodos .....	191
3.1.	Reagentes .....	191
3.2.	Hemi-síntese química de pigmentos antociânicos .....	191
3.2.1.	Dímero: (+)-Catequina-(4,8)-malvidina-3-O-glicose.....	191
3.2.2.	Fracionamento.....	191
3.3.	Estabilidade dos compostos em condições ácidas.....	192
3.4.	Células e condições de cultura.....	193
3.5.	Estudos de transporte transepitelial .....	193
3.6.	Análise por LC-MS .....	194
3.7.	Análise estatística .....	194
4.	Resultados e Discussão .....	195
4.1.	Hemi-síntese, purificação e caracterização estrutural dos compostos.....	195
4.2.	Estabilidade dos compostos em condições ácidas.....	199
4.3.	Transporte dos compostos através das células Caco-2.....	200
4.4.	Metabolismo intestinal.....	204
5.	Conclusão.....	205
<b>CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>		<b>207</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>215</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura química do núcleo flavânico.....	7
Figura 2. Estrutura das oses mais abundantes nas estruturas das antocianinas existentes na natureza.....	10
Figura 3. a) Estrutura de uma antocianidina-3-glicósido e b) uma antocianidina-3,5-diglicósido. ....	10
Figura 4. Estrutura dos a) ácidos hidroxicinâmicos e b) ácidos alifáticos.....	11
Figura 5. Equilíbrio químico das antocianinas em solução aquosa, $R_1$ e $R_2 = H, OH, \text{ ou } OMe$ , adaptado de <i>Mazza</i> e colaboradores (Mazza and Brouillard 1990). ....	16
Figura 6. Diagrama simplificado da biocinética de um composto (Byers and Sarver 2009). ....	20
Figura 7. Efeito do pH no equilíbrio químico de antocianinas monoglicósido, não aciladas, adaptado de <i>Clifford</i> (Clifford 2000). ....	27
Figura 8. Representação esquemática das diferentes formas de equilíbrio das antocianinas existentes a diferentes pHs, durante o processo de absorção, ingestão e metabolismo, adaptado de (McGhie and Walton 2007). $R_1$ e $R_2 = H, OH, \text{ ou } OMe$ .....	28
Figura 9. Vias de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de antocianinas. SGLT1: cotransportador glicose/sódio; CBG: $\beta$ -glicosidase citosólica; UDP-GT: glicuroniltransferase; COMT: catecol-O-metil-transferase; SULT: sulfotransferase; LPH: Lactase. $R_1$ e $R_2 = H, OH, \text{ ou } OMe$ .....	31
Figura 10. Vias hepáticas de destoxificação, adaptado de <i>Liska</i> e colaboradores (Liska, Lyon et al. 2006).....	35
Figura 11. Vias de degradação das antocianinas a compostos fenólicos monoméricos, adaptado de <i>Keppler, Felgines, Fleschhut</i> e colaboradores (Keppler and Humpf 2005; Felgines, Talavera et al. 2006; Fleschhut, Kratzer et al. 2006). ....	39

Figura 12. Interligação de vias de sinalização celular ativadas por stresse oxidativo, adaptado de Acharya e colaboradores (Acharya, Das et al. 2010). .....	50
Figura 13. Mecanismo de estabilização da forma semiquinona, formada por oxidação da Cy3glc (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández et al. 2009). .....	51
Figura 14. Quelatação do $Fe^{3+}$ por grupos catecol ou pirogalhol, com subsequente formação de quinonas e semiquinona. Catecol, R= H, Pirogalhol, R= OH .....	53
Figura 15. Estrutura química do 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. ....	55
Figura 16. Redução do complexo de tripiridiltriazina férrica $[Fe(III)-TPTZ2]^{3+}$ a tripiridiltriazina ferrosa $[Fe(II)-TPTZ2]^{2+}$ .....	56
Figura 17. Representação esquemática da placa de 96 poços mostrando a distribuição da linha celular e das cinco concentrações dos dois compostos A e B ao longo da placa. Representados estão também o controlo das linhas celulares (não expostas aos compostos) e o controlo dos compostos A e B (sem células). .....	67
Figura 18. Representação esquemática de um poço de um transwell de 6 poços contendo um <i>insert</i> com membrana de policarbonato, 0,4 $\mu$ m de poro e 24 mm de diâmetro, mostrando a localização da monocamada de células. Representados estão também o lado apical contendo o composto em meio Hanks com glicose ou butirato e o lado basolateral contendo meio Hanks com 2 % SFB, ambos os lados a pH 7,4. ....	69
Figura 19. Cromatograma de HPLC a 520 nm, da fração água/metanol a 10 % (v/v) obtida após purificação de um extrato de uva em resina de poliamida, 1) Dp3glc, 2) Cy3glc, 3) Pt3glc, 4) Pn3glc, 5) Mv3glc e 6) Mv3acetglc. ....	71
Figura 20. Cromatograma salientando os picos referentes à Dp3glc e ao seu conjugado com grupos metilo (Me-Dp3glc), obtido por HPLC-DAD a 520 nm, a) antes e b) após purificação por HPLC preparativo. ....	73
Figura 21. Espectros de UV-Vis salientando os $\lambda_{m\acute{a}x}$ da Dp3glc, da Pt3glc e do conjugado com grupo metilo, registado por DAD. ....	75
Figura 22. Cromatograma salientando os picos referentes à Cy3glc e aos seus conjugados com grupos metilo (Me-Cy3glc), obtido por HPLC-DAD a 520 nm, a) antes e b) após purificação por HPLC preparativo. ....	76
Figura 23. Espectros de UV-Vis salientando os $\lambda_{m\acute{a}x}$ da Cy3glc e dos conjugados com grupos metilo, registado por DAD. ....	77
Figura 24. Cromatograma salientando os picos referentes à Pt3glc e ao seu conjugado com grupo metilo (Me-Pt3glc), obtido por HPLC-DAD a 520 nm, a) antes e b) após purificação por HPLC preparativo. ....	78

- Figura 25. Espectros de UV-Vis salientando os  $\lambda_{\text{máx}}$  da Pt3glc, da Mv3glc e do conjugado com grupo metilo, registado por HPLC-DAD. .... 79
- Figura 26. Eficiência de transporte das antocianinas Dp3glc e Cy3glc e respetivos conjugados metilados (100  $\mu\text{M}$ ) através das células Caco-2 (Apical  $\rightarrow$  Basolateral). Os resultados são apresentados como eficiência de transporte (%) (média  $\pm$  EPM). A eficiência de transporte é apresentada sob a forma de percentagem, calculada de acordo com a seguinte equação: (concentração de composto no lado basolateral a um determinado tempo/concentração de composto no lado apical ao tempo 0 h) x 100. Ensaio de transportes realizados em meio Hanks com a) 5,5 mM glicose ou b) 1 mM de butirato. .... 90
- Figura 27. Capacidade antirradicalar de 10  $\mu\text{M}$  de antocianina e conjugado metilado, avaliada pelo método DPPH. Resultados expressos em  $\mu\text{M}$  de Trolox. \*\*\*  $p < 0,001$  (diferença significativa vs respetivo conjugado metilado). .... 91
- Figura 28. Poder redutor de 10  $\mu\text{M}$  de antocianina e conjugado metilado, avaliada pelo método FRAP. Resultados expressos em  $\mu\text{M}$  de Trolox. \*\*\*  $p < 0,001$  (diferença significativa vs respetiva antocianina). .... 93
- Figura 29. Efeito das antocianinas e dos respetivos conjugados metilados na proteção de danos de DNA. O controlo continha apenas a solução de DNA de timo de vitelo. O controlo negativo continha todos os componentes da mistura reacional, com exceção do antioxidante. \*  $p < 0,05$  (diferença significativa vs controlo negativo). .... 95
- Figura 30. Efeito de antocianinas e respetivos conjugados metilados na proliferação de células MKN-28, Caco-2 e MCF-7 avaliado através do conteúdo celular proteico pelo método SRB. As células foram tratadas com uma gama de concentrações (6,3 – 100,0  $\mu\text{M}$ ) de cada composto durante 48 h. Cada valor representa a média  $\pm$  EPM (n = 6 a 12). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . .... 101
- Figura 31. Mecanismos de sinalização do 17- $\beta$ -estradiol e do recetor de estrogénios (Hall, Couse et al. 2001). .... 108
- Figura 32. Mecanismo proposto para a formação dos derivados pirúvicos das antocianinas monoglicósido, (Fulcrand, Benabdeljalil et al. 1998).  $R_1$  e  $R_2 = \text{H, OH, ou OMe}$ . .... 112
- Figura 33. Mecanismo proposto para a formação das portisinas – vinilpiranoantocianina-catequina (Mateus, Silva et al. 2003).  $R_1$  e  $R_2 = \text{H, OH, ou OMe}$ . .... 113
- Figura 34. Estrutura química de a) antocianinas e b) vinilpiranoantocianinas-catequina. .... 130
- Figura 35. Efeito das antocianinas Cy3glc e Dp3glc e das respetivas portisinas na proliferação de células MCF-7 (ER+), avaliado através do conteúdo celular proteico pelo método SRB. As células MCF-7 foram tratadas com uma gama de concentrações (12,5 – 100,0  $\mu\text{M}$ ) de cada composto durante 48 h. Cada valor representa a média  $\pm$  EPM (n = 6-32). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  (diminuição significativa vs respetivo controlo). .... 131

- Figura 36. Estrutura química de a) flavonóis (quercetina e miricetina) b) ácidos fenólicos (ácido protocatechúico e ácido gálgico) e c) fenóis simples (catecol, pirogalhol e floroglucinol). ..... 133
- Figura 37. Efeito de a) antocianinas, b) flavonóis, c) ácidos fenólicos e d) fenóis na proliferação de células MCF-7 (ER+), avaliado através do conteúdo celular proteico pelo método SRB. As células MCF-7 foram tratadas com uma gama de concentrações (6,3 – 100,0  $\mu$ M) de cada composto durante 48 h. Cada valor representa a média  $\pm$  EPM (n = 6-22). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$  (diminuição significativa vs respetivo controlo). ..... 135
- Figura 38. Efeito das antocianinas Dp3glc e Cy3glc na proliferação de células MCF-7 avaliado pelo ensaio do BrdU. Ensaio de imunofluorescência (400x) de células MCF-7 tratadas durante 48 h com: 0,1 % DMSO (veículo), 100,0  $\mu$ M de Dp3glc e 100,0  $\mu$ M de Cy3glc. Células em proliferação são visualizadas com coloração verde quando marcadas com BrdU. O DNA está marcado com DAPI. É apresentada uma experiência representativa (de três experiências independentes com resultados similares). Cada valor representa média  $\pm$  EPM (n = 3). A quantificação do número de células em fase S é apresentada no gráfico. \* $p < 0,05$  (diminuição significativa vs respetivo controlo). ..... 138
- Figura 39. Efeito das antocianinas Dp3glc e Cy3glc na expressão das isoformas ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  em células MCF-7 (ER+) avaliado por RT-PCR. Células MCF-7 foram tratadas com: 0,1 % DMSO (veículo), 100,0  $\mu$ M de Dp3glc e 100,0  $\mu$ M de Cy3glc durante 48 h, sendo apresentada uma experiência representativa de três experiências independentes com resultados idênticos. Cada valor representa a média  $\pm$  EPM (n = 3). A expressão relativa de cada banda (REL) foi normalizada e comparada com a expressão do gene GAPDH para cada amostra. \* $p < 0,05$  (diminuição significativa vs respetivo controlo). ..... 141
- Figura 40. Efeito das antocianinas Dp3glc e Cy3glc na expressão das isoformas a) ER- $\alpha$  e b) ER- $\beta$  em células MCF-7 (ER+) avaliado por RT<sup>2</sup>-PCR. Células MCF-7 foram tratadas com: 0,1 % DMSO (veículo), 100,0  $\mu$ M de Dp3glc e 100,0  $\mu$ M de Cy3glc durante 48 h, sendo apresentada uma experiência representativa de três experiências independentes com resultados idênticos. Cada valor representa a média  $\pm$  EPM (n = 3). A expressão relativa de cada banda (REL) foi normalizada e comparada com a expressão do gene GAPDH para cada amostra. \* $p < 0,05$  (diminuição significativa vs respetivo controlo). ..... 143
- Figura 41. Análise de alterações no proteoma de células MCF-7 tratadas com as antocianinas Cy3glc e Dp3glc. As células MCF-7 foram tratadas com 100,0  $\mu$ M de Cy3glc e Dp3glc durante 48 h. As proteínas foram extraídas das células controlo e das células tratadas com antocianinas, separadas por eletroforese bidimensional, e coradas com prata como descrito em material e métodos. É apresentada uma experiência representativa (de duas experiências independentes com resultados similares). ..... 145

- Figura 42. Estruturas do estômago humano. O estômago apresenta 3 camadas de músculo: uma camada exterior longitudinal, uma camada central circular e uma camada interna oblíqua. A camada interna é formada por quatro sub-camadas: a serosa, a muscular, a submucosa e a mucosa. A mucosa é formada por glandulas gástricas, que contêm células produtoras de enzimas digestivas, ácido clorídrico e muco (<http://www.britannica.com/>). ..... 154
- Figura 43. Variação da resistência eléctrica transepitelial (TEER) ao longo de 7 dias de cultura, à temperatura ambiente e a 37 °C. .... 166
- Figura 44. Imunocitoquímica de células MKN-28, marcação das ocludinas. Para a imunodeteção das junções apertadas, as células foram marcadas com o anticorpo anti-occludina (verde) e os núcleos com DAPI (azul). As setas indicam a presença de ocludinas na membrana celular. .... 167
- Figura 45. Variação do pH no lado apical e basolateral ao longo de 3 h: a) pH apical após adição de HCl 6 M; b) pH apical após adição de 25 mM ácido cítrico e c) pH apical após adição de HCl (concentração final = 0,3 %) a cada 30 min. .... 169
- Figura 46. Variação da TEER ao longo de 3 h. .... 170
- Figura 47. Gráfico exemplificativo da quantidade cumulativa de amarelo lucifer transportada através das células MKN-28 ao longo das 3 h de incubação, com o gradiente de pH 5,0/ 7,4. O valor de Papp apresentado corresponde ao cálculo do declive da reta. .... 171
- Figura 48. Eficiência de transporte do ácido acetilsalicílico (500 µM) através das células MKN-28 (Apical→ Basolateral). Os resultados são apresentados como eficiência de transporte (%) (média ± EPM). A eficiência de transporte é apresentada sob a forma de percentagem, calculada de acordo com a seguinte equação: (concentração de composto no lado basolateral a um determinado tempo/concentração de composto no lado apical ao tempo 0 h) x 100. .... 172
- Figura 49. Estrutura química das antocianinas delphinidina-3-glicose (Dp3glc), cianidina-3-glicose (Cy3glc) e malvidina-3-glicose (Mv3glc). .... 173
- Figura 50. Cromatograma de HPLC da estabilidade da Cy3glc a diferentes pHs, registado a 520 nm. As amostras foram recolhidas do lado basolateral de células MKN-28 incubadas com Cy3glc (500 µM) durante 3 h: a) amostras mantidas a pH 7,4 e analisadas aos tempos 0, 6 e 24 h e b) amostras mantidas acidificadas com 1% de HCl (5 M) e analisadas aos tempos 0, 6 e 24 h. .... 175
- Figura 51. Cromatograma de HPLC da Mv3glc a pH 7,4, registado a 345 e 520 nm. O espectro de UV-vis das formas chalcona e catião flavílio é apresentado no canto superior direito. .... 176
- Figura 52. Espectros da análise por HPLC-DAD-MS da forma chalcona da Mv3glc. O varrimento de massa total (entre 400 e 2000) está à esquerda salientando a massa do ião pseudo-

- molecular  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  511 correspondente à Mv3glc na forma chalcona. Ao centro e à direita estão os varrimentos de ampliação ( $MS^2$  e  $MS^3$ , respetivamente)..... 177
- Figura 53. Eficiência de transporte das antocianinas (500  $\mu$ M) através das células MKN-28 (Apical→ Basolateral). Os resultados são apresentados como eficiência de transporte (%) (média  $\pm$  EPM). A eficiência de transporte é apresentada sob a forma de percentagem, calculada de acordo com a seguinte equação: (concentração de composto no lado basolateral a um determinado tempo/concentração de composto no lado apical ao tempo 0 h) x 100. a) pH apical 3,0 /pH basolateral 7,4; b) pH apical 5,0 /pH basolateral 7,4. \*p < 0,05 (Dp3glc vs Mv3glc, aos 180 min)..... 178
- Figura 54. Gráfico de Michaelis–Menten da velocidade de absorção da Cy3glc em função da concentração. A Cy3glc foi adicionada às células MKN-28 num intervalo de concentrações que variava entre 50 e 2000  $\mu$ M (pH apical 5,0 /pH basolateral 7,4). Os parâmetros cinéticos foram calculados por regressão linear usando o software GraphPad v5. A inserção em cima à direita representa o gráfico de Lineweaver–Burk. .... 179
- Figura 55. Representação da estrutura química dos flavan-3-óis mais comuns..... 183
- Figura 56. Estrutura química geral de uma procianidina oligomérica..... 184
- Figura 57. Decomposição das proantocianinas por aquecimento em meio ácido. Reação de Bate-Smith (Bate-Smith 1954). .... 185
- Figura 58. Mecanismo proposto para a formação do dímero Cat-Mv3glc de acordo com *Salas* e colaboradores (Salas, Atanasova et al. 2004). .... 187
- Figura 59. Estrutura química da malvidina-3-glicose (Mv3glc); da (+)-catequina (Cat); da procianidina B3 (Cat-Cat) e do dímero (+)-catequina-4,8-malvidina-3-glicose (Cat-Mv3glc)... 195
- Figura 60. Cromatograma de HPLC-DAD, registado a 520 nm, da hemi-síntese de pigmentos antociânicos a partir de Mv3glc e (+)-taxifolina reduzida por tetrahidroborato de sódio. .... 196
- Figura 61. Cromatogramas de HPLC e espetros de UV-vis da malvidina-3-glicose (Mv3glc); da (+)-catequina (Cat); da procianidina B3 (Cat-Cat) e do dímero (+)-catequina-4,8-malvidina-3-glicose (Cat-Mv3glc)..... 198
- Figura 62. Estabilidade da Cat-Cat e da Cat-Mv3glc em condições ácidas (pH 2,0) durante 3 h a 37 °C. Os resultados são apresentados em estabilidade (%) (média  $\pm$  DP) de duas experiências realizadas em separado e analisadas por HPLC. As percentagens de estabilidade foram calculadas com base na seguinte equação (concentração composto a um determinado tempo/(concentração composto ao tempo 0 h) x 100..... 200
- Figura 63. Cromatograma de HPLC-DAD, da estabilidade térmica da Cat em meio Hanks pH 7,4 ao fim de 18 h, registado a 280 nm. As amostras foram recolhidas do lado apical do

*transwell* com células Caco-2 após 2 h de incubação com Cat (100  $\mu$ M): a) amostra mantida à temperatura ambiente (TA) e b) amostra armazenada a -18 °C. .... 201

Figura 64. Eficiência de transporte da Mv3glc, da Cat, do Cat-Mv3glc e da Cat-Cat através das células Caco-2 (Apical→ Basolateral). Os resultados são apresentados como eficiência de transporte (%) (média  $\pm$  EPM). A eficiência de transporte é apresentada sob a forma de percentagem, calculada de acordo com a seguinte equação: (concentração de composto no lado basolateral a um determinado tempo/concentração de composto no lado apical ao tempo 0) x 100, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 (diferenças significativas entre os compostos para o mesmo tempo de incubação). .... 202

Figura 65. Concentração apical de composto em percentagem, ao tempo 0 min e após 120 min de incubação. Os resultados são apresentados como concentração de composto apical (%) (média  $\pm$  EPM). A concentração de composto apical é apresentada sob a forma de percentagem, calculada de acordo com a seguinte equação: (concentração de composto no lado apical ao tempo 120 min/concentração de composto no lado apical ao tempo 0) x 100. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01. .... 204



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura geral das principais classes de flavonóides. ....	6
Tabela 2. Representação da estrutura das antocianinas (catião flavílio) mais comuns na natureza e respetivo comprimento de onda máximo de absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ). ....	9
Tabela 3. Concentração em antocianinas em frutos, vegetais e bebidas, adaptado de <i>Clifford</i> e colaboradores (Clifford 2000). ....	12
Tabela 4. Biocinética das antocianinas em humanos após administração oral, adaptado e atualizado de <i>Daayf</i> e colaboradores (Daayf and Lattanzio 2008). ....	24
Tabela 5. Identificação estrutural por LC-MS das antocianinas presentes no extrato de uvas tintas. ....	72
Tabela 6. Estrutura química da antocianina Dp3glc e dos conjugados com grupo metilo. Sistema de numeração da antocianina. ....	74
Tabela 7. Estrutura química da antocianina Cy3glc e dos conjugados com grupos metilo. Sistema de numeração da antocianina. ....	77
Tabela 8. Estrutura química da antocianina Pt3glc e do conjugado com grupo metilo. Sistema de numeração da antocianina. ....	80
Tabela 9. Identificação estrutural por HPLC-MS das cinco antocianinas monoglicósidas presentes na espécie <i>Vitis Vinifera</i> e dos metabolitos formados a partir das diferentes antocianinas precursoras. ....	81
Tabela 10. Desvios químicos ( $\delta$ ) dos $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e correlações HMBC e HSQC obtidas para a 4'-Me-Dp3glc, analisados em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{DCI}$ (95:5). ....	83
Tabela 11. Desvios químicos ( $\delta$ ) dos $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e correlações HMBC e HSQC obtidas para a a) 4'-Me-Cy3glc e a b) 3'-Me-Cy3glc, analisados em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TFA}$ (98:2). ....	85

Tabela 12. Desvios químicos ( $\delta$ ) dos $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e correlações HMBC e HSQC obtidas para a 4'-Me-Pt3glc, analisados em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{DCI}$ (95:5). .....	88
Tabela 13. Compostos ensaiados listados por família química.....	120
Tabela 14. Condições de PCR.....	125
Tabela 15. Programa de PCR.....	125
Tabela 16. Análise dos compostos estudados por LC-MS.....	197

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abs</b>	Absorvância
<b>AP-1</b>	Proteína Ativadora 1
<b>ARE</b>	Elementos de Resposta Antioxidante
<b>Caco-2</b>	Células derivadas de carcinoma de cólon humano com diferenciação enterocítica
<b>Cat</b>	(+)-Catequina
<b>Cy3glc</b>	Cianidina-3-glicose
<b>C<sub>máx</sub></b>	Concentração plasmática máxima
<b>COMT</b>	Catecol-O-Metil-Transferase
<b>DBD</b>	Domínio de Ligação ao DNA
<b>Dp3glc</b>	Delfinidina-3-glicose
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos
<b>DNA</b>	Ácido 2-Desoxirribonucleico
<b>E<sub>2</sub></b>	17- $\beta$ -Estradiol
<b>EGF</b>	Fator de Crescimento Epidérmico
<b>EGFR</b>	Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico
<b>EPM</b>	Erro Padrão da Média
<b>ER</b>	Recetor de Estrogénios
<b>ER+</b>	Células com recetores de estrogénios
<b>ER-</b>	Células sem recetores de estrogénios
<b>ER-<math>\alpha</math></b>	Subunidade- $\alpha$ do recetor de estrogénios
<b>ER-<math>\beta</math></b>	Subunidade- $\beta$ do recetor de estrogénios

<b>EREs</b>	Elementos de Resposta Estrogénica
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FSH</b>	Hormona de Estimulação Folicular
<b>GLUT2</b>	Transportador de glicose por difusão facilitada tipo 2
<b>GSH</b>	Glutathione
<b>HBD</b>	Domínio de ligação a Hormonas
<b>HDL</b>	Proteínas de alta densidade
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Singlet Quantum Connectivity</i>
<b>HPLC-DAD</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Detector de Barra de Díodos
<b>HRP</b>	Peroxidase de Rabano
<b>i. d.</b>	Diâmetro interno
<b>J</b>	Constante acoplamento
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis Menten
<b>LBD</b>	Domínio de Ligação ao Ligando
<b>LC-MS</b>	Cromatografia Líquida-Espetrometria de Massa
<b>LDL</b>	Proteínas de Baixa Densidade
<b>LPH</b>	Lactase
<b>MAPK</b>	Proteína Cínase Ativada por Mitogénios
<b>MCF-7</b>	Linha celular derivada de um carcinoma mamário
<b>Me</b>	Grupo metilo
<b>MEME</b>	Meio Mínimo Essencial <i>Eagle</i>
<b>MKN-28</b>	Linha celular derivada de adenocarcinoma epitelial gástrico
<b>Mv3glc</b>	Malvidina-3-glicose
<b>p</b>	Nível de significância estatístico
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salino
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ROS</b>	Espécies Reativas de Oxigénio
<b>RT-PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase Reversa
<b>SAM</b>	S-Adenosil-L-Metionina

<b>SFB</b>	Soro Fetal de Bovino
<b>SGLT1</b>	Cotransportador glicose/sódio
<b>SRB</b>	Sulforodamina B
<b><math>t_{\text{máx}}</math></b>	Tempo ao qual se atingiu $C_{\text{máx}}$
<b><math>T_R</math></b>	Tempo retenção
<b><math>V_{\text{máx}}</math></b>	Velocidade máxima
<b>UV-vis</b>	Ultravioleta-visível
<b><math>\delta</math></b>	Desvio químico em relação ao tetrametilsilano (em ppm)



## ORGANIZAÇÃO DA TESE

A presente tese está organizada em duas partes, as quais são precedidas de uma introdução geral na qual é feito o enquadramento bibliográfico do trabalho a desenvolver, sendo apresentados os conceitos gerais relativos à estrutura química, biodisponibilidade e propriedades biológicas de antocianinas. Esta introdução pretende destacar conceitos que se afiguram essenciais para compreender as opções metodológicas realizadas ao longo do trabalho as quais pretendem responder a algumas questões da comunidade científica que permanecem por esclarecer.

A parte 1 engloba dois capítulos subjacentes ao tema “Hemi-síntese, propriedades antioxidantes e biológicas de pigmentos antociânicos e metabolitos”.

No capítulo I pretende-se realizar investigação fundamental no âmbito da caracterização estrutural/conformacional e físico-químico-biológica de metabolitos de antocianinas obtidos por hemi-síntese enzimática a partir de precursores naturais: as antocianinas. A caracterização estrutural/conformacional destes novos compostos, conjugada com a respetiva avaliação biológica permitiu o estabelecimento de uma relação estrutura-atividade. O desenvolvimento da hemi-síntese de metabolitos de antocianinas e a respetiva purificação e análise permitiu a obtenção de compostos puros para a avaliação da sua biodisponibilidade intestinal e propriedades antioxidantes e biológicas *in vitro*. No que diz respeito às propriedades biológicas dos metabolitos, os estudos focaram-se numa das patologias mais comuns da sociedade moderna: o cancro. Para o efeito, foram avaliadas as propriedades antitumorais destes compostos em diversas linhas celulares tumorais.

No capítulo II é feita uma breve introdução ao cancro da mama e aos mecanismos celulares envolvidos nesta patologia. É ainda, realçada a importância da pesquisa da atividade antitumoral em compostos de origem natural e de síntese, de aplicação

alimentar, face à urgente necessidade de conhecimento das propriedades biológicas associadas aos mesmos.

São igualmente apresentados, os resultados da hemi-síntese, isolamento e purificação de antocianinas e portisinas.

Posteriormente são discutidos os resultados da avaliação da atividade antitumoral de antocianinas, portisinas e outras classes de compostos polifenólicos, estruturalmente relacionados. Assim como, os resultados do estudo da relação estrutura-atividade e de possíveis mecanismos celulares afetados pela ação de alguns dos compostos que se revelaram mais potentes, em particular da classe das antocianinas.

A parte 2 é inteiramente dedicada ao estudo da biodisponibilidade de antocianinas e pigmentos antociânicos e engloba dois capítulos.

O primeiro capítulo explora a biodisponibilidade gástrica, mais concretamente pretende responder à inexistência de uma linha celular humana padrão estabelecida para prever a absorção gástrica de componentes da dieta. Ao longo do capítulo é descrito o desenvolvimento das condições analíticas e de cultura celular ótimas para o crescimento de linha celular tumoral humana do epitélio gástrico e a sua aplicação no estudo da absorção gástrica de antocianinas.

No capítulo II da parte 2 é explorada a influência de componentes estruturais na absorção de pigmentos antociânicos num modelo de barreira intestinal tradicional.

Por último, são apresentadas algumas considerações deste trabalho que pretendem interrelacionar os vários temas abordados e o contributo de cada capítulo para uma área de investigação multidisciplinar que visa elucidar o paradoxo entre os efeitos benéficos das antocianinas e a sua aparente reduzida biodisponibilidade.

Este projeto aborda uma temática atual, e apesar do avanço realizado nos últimos anos, muito fica ainda por clarificar, nessa conjuntura são referidas algumas linhas de investigação a desenvolver posteriormente.

# INTRODUÇÃO GERAL



## 1. Polifenóis na saúde

Os polifenóis são representantes típicos de fitoquímicos e constituem a classe de compostos naturais mais abundante e dispersa na natureza. O portefólio destes compostos será sempre incompleto em resultado da contínua evolução de novos genes resultantes da duplicação genética, de mutações e do subsequente recrutamento e adaptação a novas funções.

Os polifenóis são sintetizados pelas plantas como resultado do seu metabolismo secundário e como resposta a estímulos exteriores, desempenhando um papel muito importante: no crescimento celular; na coloração e regulação da maturação dos frutos; na proteção destes face a agentes agressores tais como, as bactérias e os insetos; no desenvolvimento de características sensoriais e organolépticas (cor, sabor e adstringência); proteção dos danos da radiação solar UV, quelatação metais pesados tóxicos e conferem proteção antioxidante de radicais livres gerados durante o processo de fotossíntese (Goldstein and Swain 1963; Bonvehi and Coll 1997; Harborne and Williams 2000).

Os fatores que motivam a investigação destes compostos incluem a mera curiosidade científica ou a expectativa de descobrir produtos de valor para o ser humano. Um número crescente de estudos moleculares, *in vitro* e epidemiológicos têm sido realizados no sentido de confirmar os efeitos postulados para estes compostos. Os estudos epidemiológicos analisam as implicações do consumo de polifenóis em diferentes situações patológicas.

Atualmente, é comum associar o consumo da dieta mediterrânica, na qual o vinho, o azeite, as frutas e legumes são elementos fundamentais à prevenção da ocorrência de patologias como as doenças cardiovasculares, as doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson) e o cancro, as quais representam algumas das principais causas de mortalidade e morbilidade mundial (Hollman and Katan 1999; Kaur and Kapoor 2001).

O Paradoxo Francês é o exemplo clássico desta associação: a população de uma determinada região de França apresentava uma incidência de doença coronária reduzida, apesar do elevado consumo de gorduras saturadas e hábitos tabágicos, que foi atribuída ao consumo moderado e regular de vinho tinto (Renaud and de Lorgeril 1992). Estudos mais recentes descrevem o papel dos polifenóis do vinho tinto na prevenção da formação das placas ateroscleróticas (Szmitko and Verma 2005).

Estes estudos, para além da sua complexidade, devem ter em consideração a composição bioquímica dos componentes da dieta e a biodisponibilidade dos compostos em estudo. A absorção e biodisponibilidade de polifenóis em humanos são ainda controversas (Karakaya 2004).

Os efeitos benéficos dos polifenóis são frequentemente atribuídos à sua capacidade de contrariar o stresse oxidativo que acompanha estas patologias. No entanto, a atividade biológica dos polifenóis não deve ser exclusivamente atribuída às suas propriedades antioxidantes. Aumentam as evidências que mostram que os polifenóis podem ser absorvidos no organismo humano em doses que, em princípio, são suficientes para exercer ação antioxidante ou outras atividades biológicas *in vivo* (Scalbert and Williamson 2000).

Contudo, alguns autores alertam para as reduzidas quantidades em que os polifenóis conjugados são detetados em comparação com os produtos resultantes da ação das enzimas da microflora bactéria e subsequente metabolismo no fígado.

Embora estudos recentes tenham demonstrado que terapias baseadas no consumo de polifenóis são capazes de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigénio (Lee and Lee 2006), alguns antioxidantes exibem atividade prooxidante em certas condições e potencial carcinogénico noutras, sendo que os suplementos alimentares com elevadas doses de um único antioxidante podem ser nefastos para a saúde humana. Atualmente, o reduzido risco de incidência de cancro parece estar mais relacionado com uma dieta rica em múltiplos antioxidantes, em oposição à suplementação com um em específico. A combinação de agentes antioxidantes com diferentes modos de ação parece aumentar a eficácia e minimizar a toxicidade (Lee and Lee 2006). Os efeitos aditivos e sinérgicos dos fitoquímicos obtidos de frutos e vegetais parecem ter efeitos antitumorais mais eficientes do que os dispendiosos suplementos alimentares (Liu 2004).

Os polifenóis são também de aplicação na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica, devido à possibilidade de serem usados como substitutos de antioxidantes sintéticos ou como corantes alimentares naturais, seguindo a atual tendência de reduzir a utilização dos corantes sintéticos (Moure, Cruz et al. 2001).

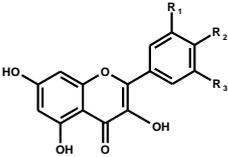
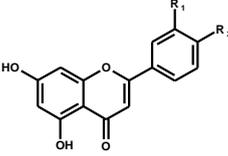
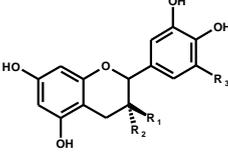
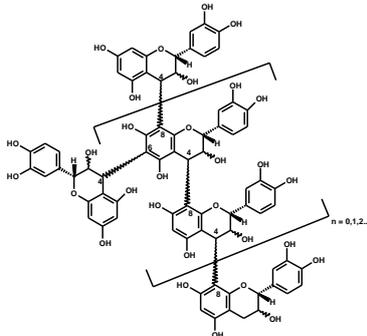
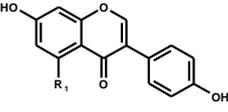
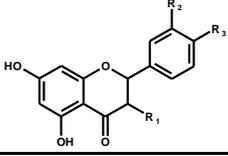
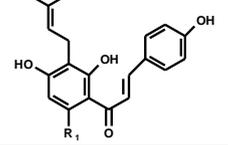
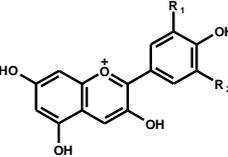
Em 1936, foi proposto pelo cientista húngaro Albert Szent-Gyorgi que os polifenóis fossem denominados de “vitamina P”, no entanto como não são essenciais para processos biológicos básicos (crescimento e divisão celular) e não se conheçam manifestações clínicas associadas à sua deficiência, essa denominação rapidamente foi substituída.

Embora não sejam classificados como nutrientes essenciais, os polifenóis contribuem, sem dúvida, para o bem-estar físico e para a promoção da saúde. Estima-se que a ingestão diária média de polifenóis seja cerca de 1 grama por dia (Scalbert and Williamson 2000).

## 2. Flavonóides

Atualmente são conhecidas mais de 8000 estruturas de polifenóis, que têm como característica comum um anel aromático contendo pelo menos dois grupos hidroxilo (Boudet 2007). O termo fenol ou polifenol descreve os compostos que possuem um anel benzênico substituído por um ou mais grupos hidroxilo (-OH), respectivamente. Os polifenóis podem ser divididos em pelo menos 10 classes com base na sua estrutura química (Ross and Kasum 2002). Dentro de todos os grupos de compostos que constituem os polifenóis, o grupo dos flavonóides é o mais representativo (Tabela 1).

Tabela 1. Estrutura geral das principais classes de flavonóides.

Flavonóides	<b>Flavonóis</b> 	$R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = H$ : Canferol $R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = H$ : Quercetina $R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = OH$ : Miricetina
	<b>Flavonas</b> 	$R_1 = H; R_2 = OH$ : Apigenina $R_1 = OH; R_2 = OH$ : Luteolina
	 <p style="text-align: center;">Monómero</p>	$R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = H$ : Catequina (cat) $R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = H$ : Epicatequina $R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = OH$ : Galhocatequina
	<b>Flavan-3-óis</b>  <p style="text-align: center;">Proantocianidinas</p>	
	<b>Isoflavonas</b> 	$R_1 = H$ : Daidzeína $R_1 = OH$ : Genisteína
	<b>Flavanonas</b> 	$R_1 = H; R_2 = H; R_3 = OH$ : Naringenina $R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = OMe$ : Hesperetina
	<b>Chalconas</b> 	$R_1 = OMe$ : Xantumol $R_1 = OH$ : 8-Prenilnaringenina
	<b>Antocianidinas</b> 	$R_1 = H; R_2 = H$ : Pelargonidina (Pg) $R_1 = OH; R_2 = H$ : Cianidina (Cy) $R_1 = OH; R_2 = OH$ : Delfinidina (Dp) $R_1 = OMe; R_2 = OH$ : Petunidina (Pt) $R_1 = OMe; R_2 = H$ : Peonidina (Pn) $R_1 = OMe; R_2 = OMe$ : Malvidina (Mv)

Os flavonóides podem ser divididos em várias classes, como os flavonóis, os flavanóis, as flavonas, as flavanonas, as isoflavonas, as antocianidinas e as chalconas, de acordo com o nível de oxidação do anel C e com os seus substituintes (Scalbert and Williamson 2000) (Tabela 1).

Os flavonóides apresentam uma estrutura comum C6-C3-C6, constituída por dois anéis aromáticos ligados por um anel heterocíclico, que caracteriza o núcleo flavânico (Figura 1).

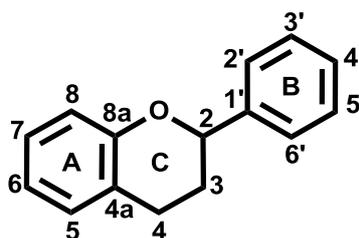


Figura 1. Representação da estrutura química do núcleo flavânico.

Frequentemente encontram-se ligados a glicósidos, o que os torna solúveis em água. Ocasionalmente também aparecem nas plantas como agliconas.

## 2.1. Antocianinas

### 2.1.1. Estrutura química

As antocianinas são geralmente aceites como sendo o maior grupo de pigmentos solúveis em água existente na natureza (Clifford 2000). O termo antocianina é de origem Grega e resulta da conjugação das palavras *anthos*, que significa flor, e *kyanos*, que significa azul-escuro, revelando assim uma das suas funções mais importantes como corante natural (Delgado-Vargas, Jimenez et al. 2000). As antocianinas constituem um grupo importante de pigmentos provenientes das plantas, sendo responsáveis pelas suas cores atrativas (vermelho, púrpura, violeta e azul) (Brouillard 1983). Contribuindo para a coloração de frutos, vegetais e flores, as antocianinas promovem a atração de animais, permitindo a dispersão de sementes e polinização. As antocianinas podem ainda ter um papel importante na proteção das

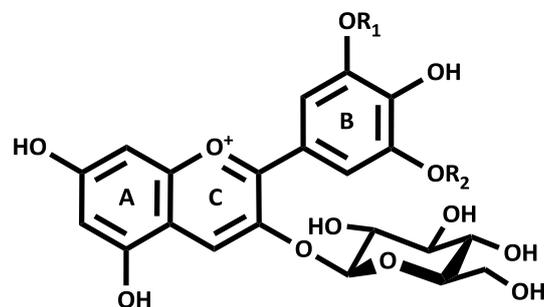
plantas contra os danos induzidos pela radiação ultravioleta (UV) (Harborne and Williams 2000).

De um modo geral, as estruturas das antocianinas correspondem a glicósidos do catião flavílio polihidroxiados e/ou metoxilados (Tabela 2). Até ao momento são conhecidas 25 antocianidinas naturais, mas apenas seis são comuns em plantas superiores (Stintzing and Carle 2004): a pelargonidina (Pg), a peonidina (Pn), a cianidina (Cy), a malvidina (Mv), a petunidina (Pt) e a delphinidina (Dp).

Em resultado do longo cromóforo formado por oito ligações duplas conjugadas com carga positiva (Tabela 2), as antocianinas apresentam cores intensas em condições acídicas. O comprimento de onda de absorção máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) na região do visível está compreendido entre os 465 e 550 nm, enquanto que o outro máximo de absorção se situa na zona do UV entre 270 e 280 nm.

As suas formas agliconas (não glicosiladas) denominadas antocianidinas diferem entre si pelo número e posição de grupos hidroxilo e metoxilo ligados aos anéis A e B (Tabela 2), originando diferentes cores que vão do laranja-vermelho (Pg) para o azul-violeta (Dp), a  $\text{pH} \approx 1$ . Em geral, a hidroxilação induz um deslocamento batocrómico, enquanto a metilação dos grupos hidroxilo reverte esta tendência (Brouillard 1983; Brouillard and Cheminat 1988).

Tabela 2. Representação da estrutura das antocianinas (catião flavílio) mais comuns na natureza e respetivo comprimento de onda máximo de absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ).



Antocianina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Pg3glc	H	H	503; 431
Pn3glc	OCH <sub>3</sub>	H	517
Cy3glc	OH	H	516
Mv3glc	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	528
Pt3glc	OCH <sub>3</sub>	OH	526
Dp3glc	OH	OH	524

Os glicósidos das antocianidinas (antocianinas) podem diferir entre si pela natureza, número e posição das oses ligadas à molécula, assim como também pela presença e natureza do ácido esterificado nas oses (Kong, Chia et al. 2003). As oses encontram-se maioritariamente ligados na posição O-3, podendo também se encontrar na posição O-5 e, mais raramente, na posição O-7. As antocianinas também podem ser glicosiladas no anel B. As oses ligadas à aglicona podem ser pentoses (xilose e arabinose), metilpentoses (ramnose) ou hexoses (glicose e galactose) (Figura 2). As oses podem estar ligadas sob a forma de mono, di ou trissacarídeos.

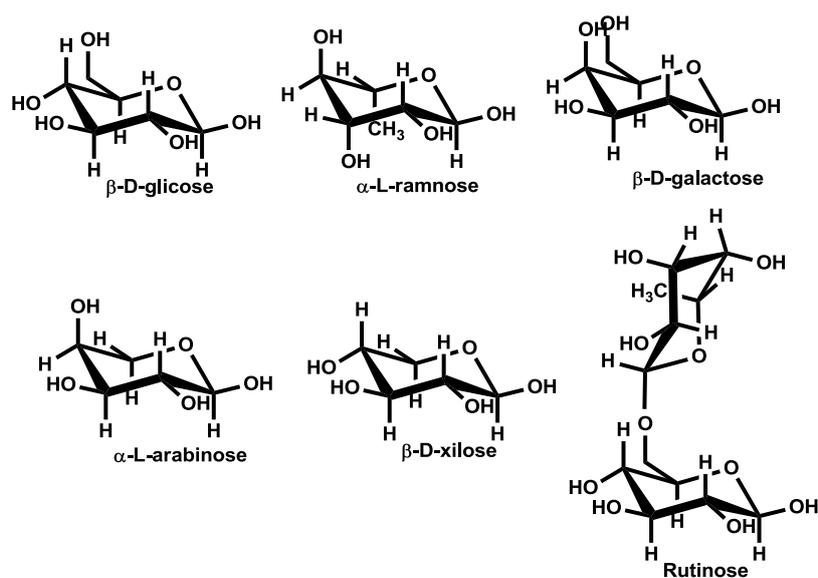


Figura 2. Estrutura das oses mais abundantes nas estruturas das antocianinas existentes na natureza.

As antocianinas mais abundantes são as 3-glicósido e as 3,5-diglicósido como exemplificado na Figura 3. A glicosilação confere uma maior estabilidade e aumenta a solubilidade do pigmento.

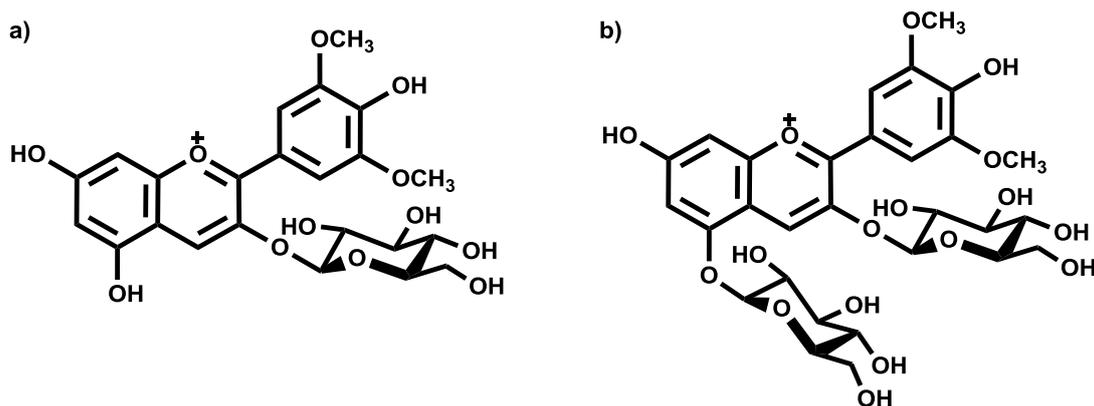


Figura 3. a) Estrutura de uma antocianidina-3-glicósido e b) uma antocianidina-3,5-diglicósido.

As oses podem-se encontrar esterificadas com alguns ácidos tais como, ácidos hidroxicinâmicos que incluem o ácido *p*-cumárico, o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido sinápico ou ácidos hidroxibenzóicos, e ainda com ácidos alifáticos que incluem o ácido acético, o ácido malónico, o ácido málico, o ácido oxálico e o ácido succínico (Figura 4).

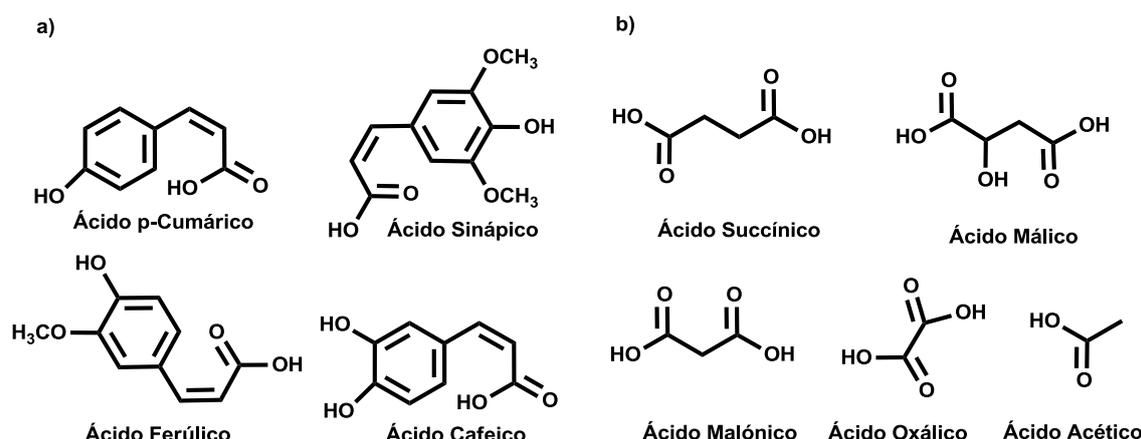


Figura 4. Estrutura dos a) ácidos hidroxicinâmicos e b) ácidos alifáticos.

A esterificação das oses com ácidos orgânicos induz resistência ao calor, luminosidade, dióxido de enxofre, pH elevado e melhora a qualidade da cor e a estabilidade (Brouillard 1983). Contudo, a esterificação reduz a biodisponibilidade das antocianinas (Mazza, Kay et al. 2002).

Devido à diversidade de glicosilação e acilação, existem mais de 600 antocianinas na natureza (Kong, Chia et al. 2003).

### 2.1.2. Ingestão e ocorrência

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis presentes na maioria das espécies do Reino das Plantas. As antocianinas podem ser encontradas em todas as partes das plantas, embora existam principalmente nas flores e nos frutos (Brouillard and Cheminat 1988; Bohm, Boeing et al. 1998; Harborne and Williams 2001). Entre plantas diferentes ou culturas uniformes da mesma planta, o conteúdo total em antocianinas varia consideravelmente, afetado pela composição genética, luz, temperatura e fatores

agrícolas. Os dados disponíveis mostram um intervalo muito alargado da quantidade de antocianinas nas plantas, justificável em parte devido à falta de um método robusto para quantificação das antocianinas (Clifford 2000). A quantificação das antocianinas é difícil uma vez que a sua absorvidade molar depende do equilíbrio de diferentes estruturas químicas com cor e incolores, do valor de pH e da presença de copigmentos, sendo portanto requerido um considerável cuidado na quantificação destes compostos em alimentos ou na dieta alimentar para que os valores determinados sejam confiáveis (Tabela 3.).

Tabela 3. Concentração em antocianinas em frutos, vegetais e bebidas, adaptado de Clifford e colaboradores (Clifford 2000).

<b>Origem</b>	<b>Concentração antocianinas (mg/L ou mg/Kg)</b>
Mirtilos	4600
Amora	820-1800
Uva-do-monte	825-5030
Cereja	3500-4500
Groselha	460-2000
Uvas tintas	300-7500
Laranja vermelha	2000
Ameixa	20-250
Framboesa vermelha	100-600
Framboesa preta	1700-4277
Morango	150-350
Repolho	250
Beringela	7500
Rabanete	110-600
Beterraba	150-450
Milho roxo	16420
Cebola	>250
Vinho Tinto	240-350
Vinho Porto	140-1100

Embora o conteúdo destes compostos varie extensamente dependendo do produto alimentar, o perfil das antocianinas é característico de cada alimento sendo muitas vezes usado para a sua identificação (Giusti, Rodriguez-Saona et al. 1999).

A distribuição percentual das seis antocianidinas mais comuns, nas partes comestíveis das plantas é a seguinte: Cy (50 %), Pg (12 %), Pn (12 %), Dp (12 %), Pt (7 %) e Mv (7 %) (Kong, Chia et al. 2003). As três antocianidinas não metiladas (Cy, Dp e Pg) são as mais difundidas na Natureza. Alguns alimentos contêm um número limitado de antocianinas, enquanto outros podem conter uma mistura de mais de vinte antocianinas (Clifford 2000). A cianidina ocorre em aproximadamente 90% dos frutos e é a aglicona que surge com mais frequência. As antocianinas-3-glicósido são as mais frequentes, não sendo portanto surpreendente que a cianidina-3-glicose (Cy3glc), seja a que surge mais comumente (Kong, Chia et al. 2003).

A ocorrência das antocianinas está amplamente difundida nas plantas, sendo estes compostos consumidos como parte integrante de uma dieta normal. As antocianinas são ingeridas por humanos, como resultado da ingestão de frutos e vinhos tintos. Estima-se que o consumo anual mundial atinja as 10000 toneladas de antocianinas derivadas apenas de uvas tintas (Clifford 2000).

Considerando as várias classes de flavonóides, o potencial consumo diário de antocianinas é eventualmente o maior (> 100 mg/dia por pessoa), sendo muito superior (23 mg/dia por pessoa), ao estimado para outros flavonóides, incluindo quercetina, canferol, miricetina, apigenina e luteolina (Hertog, Hollman et al. 1993; Middleton, Kandaswami et al. 2000). Dependendo dos hábitos nutricionais, estima-se que o consumo diário de antocianinas pelo Homem possa atingir as centenas de miligramas por pessoa. Nos Estados Unidos da América (EUA) estima-se que o consumo diário esteja compreendido entre as 180-215 mg/pessoa (Kuhnau 1976), valor que ultrapassa significativamente o dos restantes flavonóides. Mais recentemente outros estudos estimam que o consumo de antocianinas apresente valores inferiores na ordem dos 3-15 (Wu, Beecher et al. 2006; Chun, Chung et al. 2007) a 150 mg/dia (Heinonen 2007). Consequentemente, a escolha dietética pode ter um impacto substancial na quantidade de antocianinas consumidas.

Os consumidores regulares de vinho tinto apresentam provavelmente níveis significativamente superiores. O consumo de extratos de frutos e vegetais com elevado conteúdo de antocianinas, já comercialmente disponíveis, está associado a um aumento os níveis de antocianinas ingeridas. Em resultado das propriedades antioxidantes e outras propriedades benéficas para a saúde associadas a estes

compostos, é crescente a sua utilização como corantes naturais, seguindo a atual tendência de reduzir a utilização dos corantes sintéticos.

### 2.1.3. Toxicidade

As antocianinas são consideradas não tóxicas para a saúde humana, em resultado do seu consumo por animais e humanos ao longo de gerações sem quaisquer aparentes efeitos adversos (Brouillard 1983). Em 1996, um extrato de bagas de *V. myrtillus* contendo 36% de antocianinas foi utilizado para testar a tolerância das antocianinas após a sua ingestão por animais (Morazzoni and Bombardelli 1996). Em ratinhos e ratos, doses superiores a 2000 mg/kg de peso corporal foram administradas sem quaisquer sintomas adversos para o animal. A administração oral diária do mesmo extrato a ratos e cães em doses de 125-150 mg/kg e 80-320 mg/kg de peso corporal, respetivamente, durante 6 meses não provocou morte ou qualquer efeito adverso.

O uso de antocianinas naturais em alimentos e bebidas é permitido dentro da Comunidade Europeia (E-163), Japão e Estados Unidos. O Comité de peritos/especialistas em aditivos alimentares (*FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA*) composto pela Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (*Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO*) e pela Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization – WHO*) concluiu que os extratos de antocianinas são de toxicidade muito reduzida baseado em estudos de avaliação da capacidade de indução de mutações e efeitos no desenvolvimento embrionário.

Em 1982, a dose diária aceite para o Homem foi de 0-2,5 mg/kg de peso corporal por dia (Clifford 2000). O que se traduz num máximo de 150-175 mg/dia para um adulto de 60-70 kg.

### 2.1.4. Influência do pH

A cor das antocianinas é resultado da conjugação dos eletrões  $\pi$  nos anéis A-C. Se esta conjugação for quebrada a cor característica destes compostos desaparece dando origem a pigmentos incolores, tal como acontece com o aumento do pH ou a ligação de moléculas de bissulfito. Os substituintes influenciam consideravelmente a estabilidade destes compostos. Outros fatores como o pH, a temperatura, a

luminosidade, a presença de outros compostos fenólicos, a ação de diferentes enzimas e a presença de iões metálicos, podem igualmente apresentar um significativo impacto na estabilidade das antocianinas.

Uma vez que é a impressionante cor das antocianinas que atrai a atenção existe uma tendência para ignorar a existência de outras formas de equilíbrio. Tal desatenção teria implicações para a análise, controlo de qualidade e possivelmente para compreensão das suas propriedades biológicas. Em solução aquosa as antocianinas sofrem alterações estruturais dependentes do pH (Figura 5.) (Brouillard 1983). Em soluções aquosas ácidas, as antocianinas existem em quatro formas principais em equilíbrio: o catião flavílio de cor vermelha, a base quinoidal de cor azul, a pseudobase carbinol incolor e a chalcona de cor amarela. A pH inferior a 1, as antocianinas encontram-se essencialmente na forma de catião flavílio. À medida que o pH aumenta, ocorre hidratação do catião flavílio pelo ataque nucleofílico da água que origina o aparecimento da forma de base carbinol incolor; a partir de pH 2 começam a surgir as formas chalcona e a proporção de catião flavílio diminui bruscamente, traduzindo-se numa diminuição importante da cor vermelha em solução; a pH entre 3 e 4 todas as formas de equilíbrio se encontram presentes, predominando a forma de base carbinol incolor; a pH superior a 4 existe predominantemente a forma de base carbinol incolor, sendo a fração molar do catião flavílio insignificante. A pH neutro ou alcalino existe predominantemente uma mistura da base quinoidal violeta e do respetivo anião azul, traduzindo-se numa cor azulada da solução.

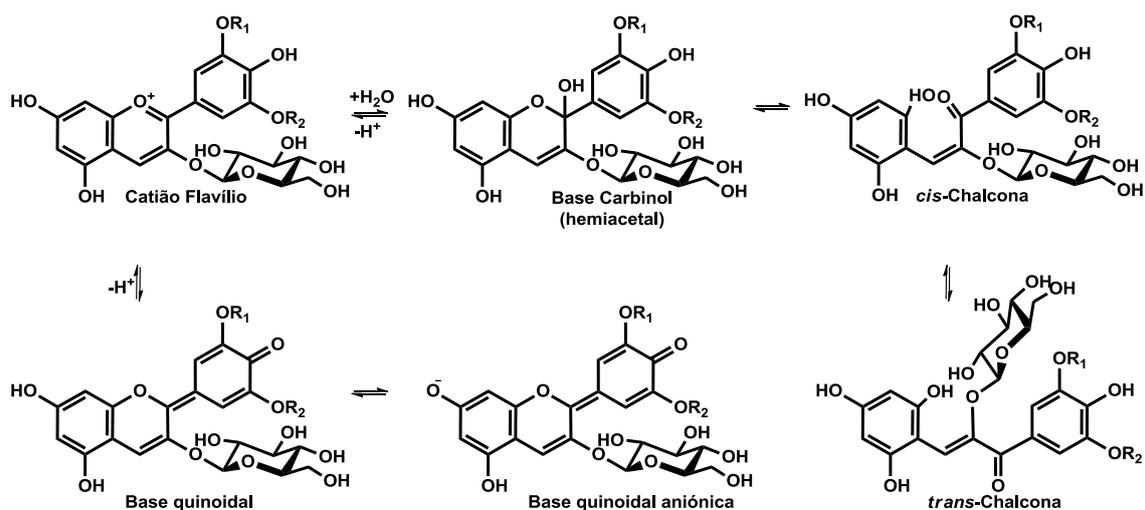


Figura 5. Equilíbrio químico das antocianinas em solução aquosa,  $R_1$  e  $R_2 = \text{H, OH, ou OMe}$ , adaptado de Mazza e colaboradores (Mazza and Brouillard 1990).

As antocianinas são estabilizadas por substituições na posição C4. Esta substituição inibe a adição de moléculas de água e a subsequente formação de espécies incolores. E impede igualmente a ligação do ácido sulfónico na posição C4 formando espécies incolores. Alguns pigmentos antociânicos do vinho, protegidos na posição C4, apresentam propriedades bem distintas dos seus precursores antociânicos.

## 2.2. Propriedades biológicas das antocianinas

O interesse na bioquímica e nos efeitos biológicos dos compostos antociânicos aumentou substancialmente na última década em resultado de crescentes evidências que demonstram os seus potenciais efeitos terapêuticos (Kong, Chia et al. 2003; Lila 2004). Recentemente inúmeros estudos mostraram que as antocianinas apresentam uma grande variedade de atividades biológicas (Kong, Chia et al. 2003), incluindo antioxidante (Rice-Evans, Miller et al. 1996; Wang, Cao et al. 1997; Fukumoto and Mazza 2000; Mazza, Kay et al. 2002), anti-inflamatória (Seeram, Bourquin et al. 2001; Wang and Mazza 2002; Youdim, McDonald et al. 2002) e anticarcinogénica (Kamei, Kojima et al. 1995; Hou 2003; Katsube, Iwashita et al. 2003), melhoramento da visão (Matsumoto, Nakamura et al. 2003), indução de apoptose (Katsube, Iwashita et al. 2003) e efeitos neuroprotetores (Galli, Shukitt-Hale et al. 2002). Adicionalmente, as

antocianinas exibem vários efeitos em células e vasos sanguíneos que podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares (Renaud and de Lorgeril 1992; Xu, Ikeda et al. 2004).

A maioria das evidências que suportam efeitos terapêuticos associados às antocianinas resultam de estudos *in vitro*, existindo ainda falta de evidência, *in vivo*, com base em estudos em animais ou humanos. Estes efeitos são dependentes da biodisponibilidade das antocianinas quer na sua exposição às células quer na exposição a um organismo. As antocianinas exibem uma bioquímica complexa e muito está ainda por conhecer sobre as atividades bioquímicas destes compostos.

### 2.2.1. Atividade antioxidante e prooxidante

A oxidação é um dos mais importantes mecanismos responsáveis pelas principais doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, nomeadamente cancro, doenças cardiovasculares, cataratas e disfunção cognitiva. Evidências de vários estudos indicam que os antioxidantes podem prevenir muitos dos processos oxidativos que contribuem para a causa dessas doenças crónicas (Rice-Evans 2001).

Em 1990, Bors e colaboradores descrevem as três características estruturais que determinam o potencial antioxidante de um flavonóide: a) o grupo di-hidroxilado (catecol) no anel B; b) a ligação dupla C2-C3 em conjugação com um grupo 4-oxo; c) a presença adicional dos grupos hidroxilo nas posições C3 e C5 (Bors, Heller et al. 1990).

Na década passada, muitos autores referem as antocianinas como potentes antioxidantes e em certas condições superiores aos antioxidantes tradicionais, tais como hidroxianisol, hidroxitolueno,  $\alpha$ -tocoferol (Wang, Cao et al. 1997; Narayan, Naidu et al. 1999; Fukumoto and Mazza 2000).

Num estudo de experimentação clínica com mulheres idosas, a capacidade antioxidante do soro aumentada, utilizando vários métodos *in vitro*, incluindo *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC), *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC), *Total Reactive Antioxidant Potentials* (TRAP), esteve associada ao consumo de morangos ou vinho tinto (Cao, Russell et al. 1998).

Este estudo foi corroborado por um estudo mais recente que mostrou que a concentração de antocianinas no soro de indivíduos de sexo masculino após consumo

de 1,2 g de antocianinas de mirtilos estava positivamente relacionada com a capacidade antioxidante do soro (Mazza, Kay et al. 2002).

As antocianinas demonstraram possuir capacidade antioxidante em vários sistemas *ex vivo* e *in vitro* incluindo, prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (Satué-Gracia, Heinonen et al. 1997; Aviram and Fuhrman 2002), lípidos (Narayan, Naidu et al. 1999; Wang, Nair et al. 1999) e ácido 2-desoxirribonucleico (DNA) (Ramirez-Tortosa, Andersen et al. 2001) e inibição da ativação do sistema imunológico (Wang and Mazza 2002).

A capacidade antioxidante das antocianinas *in vitro* tem sido atribuída a diversas características estruturais e envolve sequestro de radicais livres, quelatação de metais e inibição de enzimas oxidativas (Noda, Kaneyuki et al. 1998; Huang, Ou et al. 2005).

Diversos fatores podem afetar os efeitos antioxidantes das antocianinas e de outros polifenóis *in vivo*, incluindo as quantidades consumidas, absorvidas e/ou metabolizadas, e as concentrações no plasma e/ou tecidos. As antocianinas parentais e os derivados metabolizados provavelmente apresentam capacidades antioxidantes diferentes.

A glicosilação de antocianinas mostrou diminuir a capacidade de sequestrar radicais comparativamente com a respetiva aglicona, uma vez que reduz a capacidade do radical antociânico em deslocalizar eletrões. Um estudo mostrou que a atividade antioxidante aumenta com o aumento do número de grupos hidroxilo na molécula e diminui com a glicosilação das antocianidinas (Fukumoto and Mazza 2000). Importa ainda referir que as agliconas ou antocianidinas não foram detetadas em quantidades significativas nos fluidos ou tecidos humanos, o que provavelmente resulta da sua relativa instabilidade.

Alguns extratos concentrados de plantas ricas em flavonóides tais como, folhas do chá verde, isoflavonas da soja e sementes de uva são introduzidos no mercado como nutracêuticos, tendo como alvo a população envelhecida com doenças cardiovasculares, cancro e doenças inflamatórias crónicas. Enquanto as propriedades antioxidantes de flavonóides, suportam um papel benéfico a nível nutricional e patológico, alguns estudos começam a concentrar a atenção na atividade prooxidante destes *in vitro* (Cotelle 2001; Galati, Moridani et al. 2001; Heim, Tagliaferro et al. 2002).

A atividade prooxidante parece ser proporcional ao número total de grupos hidroxilo (Cao, Sofic et al. 1997). Num estudo de *Hanasaki* e colaboradores a atividade prooxidante esteve restrita aos flavonóides com múltiplos grupos hidroxilo substituídos,

especialmente no anel B (Hanasaki, Ogawa et al. 1994). Este efeito prooxidante parece estar associado aos efeitos antiproliferativo e proapoptótico dos flavonóides (Ueda, Nakamura et al. 2002). Existem adicionalmente evidências que a ligação insaturada C2-C3 e o grupo oxo na posição C4 das flavonas podem promover a formação de espécies reativas de oxigénio induzidas pelo cobre divalente na presença de oxigénio (Cao, Sofic et al. 1997). Estes estudos sugerem que algumas das características estruturais que otimizam a capacidade antioxidante dos flavonóides podem também modular os seus efeitos adversos.

Apesar da tendência de flavonóides com múltiplos grupos hidroxilo de promover danos celulares, é necessário ter em consideração que as alterações metabólicas da sua estrutura podem atenuar a reatividade destes compostos *in vivo* (Heim, Tagliaferro et al. 2002).

### 2.2.2. Atividade antitumoral

As antocianinas mostraram ser capazes de inibir a proliferação de linhas celulares tumorais e apresentaram um efeito inibidor superior ao de muitos flavonóides (Kamei, Kojima et al. 1995). Os mecanismos antitumorais descritos para as antocianinas são frequentemente atribuídos diretamente às suas capacidades antioxidantes, contudo muitas das atividades antitumorais descritas para as antocianinas parecem estar associadas a outros mecanismos para além da sequestração de radicais (Wang and Stoner 2008).

O recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é uma das proteínas de membrana que induz a proliferação celular. Um estudo *in vitro* mostrou que a Cy e a Dp inibem a proliferação da linha celular epitelial tumoral A431, através da inibição do EGFR, contudo a Mv3glc não mostrou qualquer atividade mesmo para concentrações superiores a 100,0  $\mu\text{M}$  (Meiers, Kemeny et al. 2001).

O óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ) é um radical livre diatómico produzido a partir da L-arginina pelas sintetases do óxido nítrico em várias células de mamíferos. O  $\text{NO}\bullet$  pode ser gerado em excesso durante a resposta a infeções bacterianas ou virais, promovendo o stresse oxidativo. Um estudo, *in vitro*, demonstra, pela primeira vez, que as antocianinas inibem a produção de  $\text{NO}\bullet$  (Wang and Mazza 2002).

Vários outros estudos reportam propriedades antitumorais associadas às antocianinas não relacionadas com efeitos antioxidantes, incluindo interação com enzimas, fatores

de crescimento e recetores, atividade antimutagénica e inibição da ativação metabólica de carcinogénios (Middleton, Kandaswami et al. 2000; Hou 2003; Lazze, Savio et al. 2004; Lala, Malik et al. 2006).

### 2.3. Biodisponibilidade – conceitos básicos

Os conceitos básicos de biocinética no organismo humano surgiram do estudo da ação de fármacos ou farmacocinética. Atualmente estes princípios são normalmente aplicados para estudar e prever o movimento de uma substância no organismo, tal como uma toxina, um poluente ambiental ou mesmo um fitoquímico, tal como ilustrado na Figura 6 (Byers and Sarver 2009).

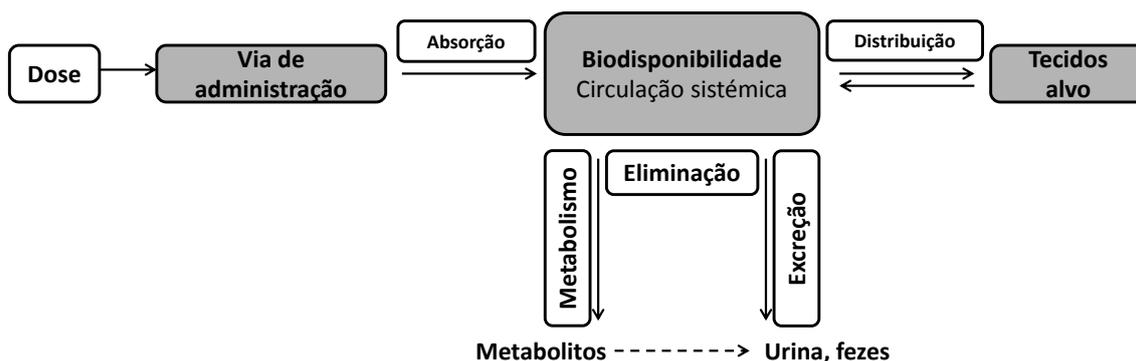


Figura 6. Diagrama simplificado da biocinética de um composto (Byers and Sarver 2009).

A dose é a quantidade de um composto administrado ao organismo. A forma como este composto é administrado é a via de administração, sendo que as vias de administração mais comuns incluem: via intravenosa, via oral, subcutânea e intramuscular.

O termo absorção refere-se ao movimento do composto do local de administração até à circulação sistémica. Dependendo da dose, o composto pode nunca atingir a circulação sistémica, contudo a fração de composto administrada que atinge a circulação sistémica denomina-se fração biodisponível ou biodisponibilidade. Depois

de absorvido na circulação sistémica, a corrente sanguínea conduz o composto aos diferentes tecidos.

Em alguns casos, tecidos específicos do organismo podem atuar como locais de armazenamento, enquanto as concentrações do composto no plasma são elevadas, sendo este posteriormente libertado para a corrente sanguínea, este movimento controlado do composto entre os tecidos alvo e o plasma denomina-se de distribuição. Quando atingem os tecidos alvo os compostos podem sofrer conversão enzimática, sendo transformados em estruturas químicas diferentes, denominando-se este processo de metabolismo ou biotransformação. A excreção é o processo pelo qual os compostos ou os seus metabolitos são eliminados do organismo, tipicamente através das fezes e/ou urina. A eliminação engloba todos os processos que reduzem a quantidade do composto no organismo, incluindo assim a biotransformação e a excreção.

Ao longo de todos estes processos existem barreiras constituídas por um ou mais tipos de células que formam a fronteira entre dois ambientes fisiológicos diferentes. O movimento dos compostos através dos tecidos implica que estes consigam atravessar as membranas biológicas. Existem vários mecanismos pelos quais um composto pode atravessar membranas biológicas, incluindo transporte passivo, absorção mediada por um transportador, transporte especializado (endocitose). O transporte passivo é exclusivo de moléculas pequenas, lipossolúveis, não iónicas, que atravessam a membrana de acordo com o gradiente de concentração, sem gasto de energia. A absorção mediada por um transportador envolve um ou mais transportadores e inclui influxo ou efluxo de substâncias. Este transporte pode ser uniporte (transporte de uma molécula), simporte (transporte de duas ou mais moléculas diferentes na mesma direção) ou antiporte (transporte de duas ou mais moléculas diferentes em direções opostas), sendo um processo saturável e específico.

A ação conjunta da absorção, distribuição e eliminação ditam o potencial biológico do composto e conseqüentemente determinam a sua concentração no local de ação.

### *2.3.1. Fatores que afetam a biodisponibilidade*

Os polifenóis, e os flavonóides em particular, são consumidos como parte integrante de uma dieta normal sendo portanto a sua principal via de administração a ingestão oral.

A sua biodisponibilidade à semelhança do que acontece com outros xenobióticos ingeridos por via oral pode ser influenciada por vários fatores. As suas características físico-químicas, tais como tamanho da molécula, lipo ou hidrossolubilidade e o seu pKa podem ditar a sua capacidade de atravessar membranas por difusão simples ou não.

Por um lado, devido ao seu tamanho, as moléculas maiores podem implicar outros mecanismos de transporte que não incluem a difusão. Por outro lado se um composto é hidrofílico, não tem tendência a atravessar membranas livremente, no entanto se for demasiado lipofílico, pode não ser solúvel nas secreções gástricas o que também dificulta a sua absorção. Adicionalmente, um composto com carga iónica não conseguirá atravessar membranas por difusão, podendo ser necessário outro tipo de processo para entrar na célula.

Vários fatores inerentes às características do trato gastrointestinal podem influenciar a absorção de xenobióticos, tais como o pH, a presença de alimentos, enzimas digestivas, ácidos biliares, microflora e a sua permeabilidade.

A mobilidade gástrica e o tempo de escoamento podem influenciar a biodisponibilidade uma vez que um maior tempo de contacto está associado a uma maior absorção.

No que se refere aos flavonóides, a matriz alimentar é muito importante podendo influenciar a forma como os compostos são absorvidos: o flavonóide tem de ser libertado da matriz em que está inserido e por outro lado a matriz pode influenciar a solubilidade do flavonóide. Por exemplo o etanol parece ter efeitos cruciais na absorção intestinal de antocianinas. O etanol pode aumentar a sua biodisponibilidade como foi demonstrado pelo aumento da captação de polifenóis do vinho tinto quando comparado com os níveis resultantes da ingestão de vinho tinto desalcoholizado (Scholz and Williamson 2007).

Outro aspeto importante é a frequência de consumo. No caso das antocianinas a exposição crónica do epitélio intestinal a antocianinas favorece a sua absorção (Faria, Pestana et al. 2009). Esta fundamentação está de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) que alerta para o consumo crónico de frutas e vegetais associado a um modo de vida saudável.

Adicionalmente, outros fatores como idade, diferenças interindividuais e de género, o metabolismo e a ligação a proteínas podem acrescentar variação na absorção de compostos entre dois indivíduos distintos.

Em conjunto estes fatores podem provocar variações inter e intraindividuais, no entanto o conhecimento da biocinética dos flavonóides e dos seus metabolitos é crítica para compreender os efeitos biológicos observados num determinado organismo.

Embora a atividade antioxidante de flavonóides *in vitro* esteja bem caracterizada e suportada em diferentes condições de stresse, o potencial destes compostos *in vivo* é ainda pouco claro.

Os flavonóides das diferentes classes possuem propriedades químicas diferentes o que torna impossível estudar a biodisponibilidade de forma generalizada. As antocianinas são uma classe de flavonóides com características muito particulares, na natureza, as antocianinas são glicosiladas com diferentes tipos de açúcar, apresentam carga positiva a pH ácido e são quimicamente instáveis a variações de pH (McGhie and Walton 2007). Estas características afetam a sua absorção, metabolismo, biodisponibilidade, distribuição e como consequência, a sua bioatividade.

Vários estudos em animais e humanos têm associado efeitos biológicos ao consumo de antocianinas, no entanto para que esses efeitos ocorram, os compostos ou os seus metabolitos têm de atingir os tecidos alvo. A biodisponibilidade é muitas vezes tida como garantida e os mecanismos pelos quais as moléculas se tornam biodisponíveis e as formas químicas que são bioativas não são adequadamente explorados. Estas questões permanecem com poucas e indefinidas respostas.

#### **2.4. Biodisponibilidade de antocianinas**

Apesar do indiscutível progresso conseguido na investigação na área da biodisponibilidade de flavonóides a complexidade deste tema subsiste (Walle 2004). Da perspetiva da nutrição preventiva, espera-se que, após o seu consumo diário, os flavonóides atuem em concentrações baixas e de forma continuada.

Os estudos *in vitro*, geralmente aplicam concentrações de flavonóides muito superiores às observadas *in vivo* e em formas biologicamente pouco relevantes (agliconas ou estruturas nativas), permanecendo a significância das suas conclusões no que se referem aos efeitos nutritivos especulativas.

No que se refere às antocianinas, este estudo torna-se ainda mais complexo em resultado coexistência destas em diferentes formas de equilíbrio a pH fisiológico (Figura 5). Um conhecimento aprofundado da biodisponibilidade das antocianinas mostra-se essencial para compreender os seus efeitos biológicos.

A biocinética das antocianinas em humanos foi avaliada por diferentes estudos que se encontram compilados na Tabela 4.

Tabela 4. Biocinética das antocianinas em humanos após administração oral, adaptado e atualizado de Daayf e colaboradores (Daayf and Lattanzio 2008).

Fonte	Dose antocianinas (mg)	Duração (h)	% Recuperação urinária	C <sub>max</sub> (nmol/L)	t <sub>max</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	Referências
Groselhas	95	3	0,79	4,64	3	-	(Milbury, Vita et al. 2010)
Mirtilos e arandos vermelhos	650	48	-	138	1,5	-	(Nurmi, Mursu et al. 2009)
Sumo laranja vermelha	71	24	1,2	1,9	0,5	-	(Vitaglione, Donnarumma et al. 2007)
Bagas de airela	651	24	5,00	-	-	-	(Ohnishi, Ito et al. 2006)
Bagas de aronia	721	24	0,15	96,1	2,8	1,5	(Kay, Mazza et al. 2005)
Framboesa	431	24	0,16	-	-	-	(Felgines, Talavera et al. 2005)
Extrato de hibisco	147	7	0,018	7,6	1,5	2,6	(Frank, Janßen et al. 2005)
Sumo uvas tintas	283	7	0,23	222,7	0,5	1,8	(Bitsch, Janssen et al. 2004a)
Vinho tinto	280	7	0,18	95,5	1,5	2,0	
Bagas de sabugueiro	3570	5	0,053	-	-	-	(Bitsch, Netzel et al. 2004b)
Groselha preta	145	7	0,04	-	-	1,7	(Bitsch, Netzel et al. 2004c)
Bagas de sabugueiro	147	7	0,37	-	-	1,7	
Bagas de aronia	1300	24	-	592	-	-	(Kay, Mazza et al. 2004)
Vinho tinto	280	7	0,23	222,7	0,5	1,83	(Frank, Netzel et al. 2003)
Sumo uvas tintas	283	7	0,18	95,5	1,5	1,52	
Groselhas preta	345	7	0,029	-	-	-	(McGhie, Ainge et al. 2003)
Amoras	189	7	0,064	-	-	-	
Mirtilos	439	7	0,020	-	-	-	
Morangos	77	24	1,9	-	-	-	(Felgines, Talavera et al. 2003)
Sumo de groselhas pretas	1239	4	0,07	-	0,7	-	(Nielsen, Dragsted et al. 2003)
	716	4	0,05	-	0,7	-	
Bagas de sabugueiro	1900	6	0,03	-	-	-	(Mulleder, Murkovic et al. 2002)
Mirtilos	1200	4	0,003	29,2	4,0	-	(Mazza, Kay et al. 2002)

<b>Mirtilos</b>	690	6	0,004	-	-	-	(Wu, Cao et al. 2002)
<b>Bagas de sabugueiro</b>	720	24	0,08	97,4	1,2	-	(Milbury, Cao et al. 2002)
<b>Vinho tinto</b>	68	6	0,03	1,4	0,3	-	(Bub, Watzl et al. 2001)
<b>Vinho tinto sem álcool</b>	56	6	0,03	1,7	1,5	-	
<b>Uvas tintas</b>	117	6	0,03	2,8	3,0	-	
<b>Bagas de sabugueiro</b>	720	24	0,05	97,4	1,2	2,2	(Cao, Muccitelli et al. 2001)
<b>Groselhas pretas</b>	236	8	0,11	60,0	1,5	3,0	(Matsumoto, Inaba et al. 2001)
<b>Bagas de sabugueiro</b>	500	-	0,05	-	-	-	(Murkovic, Mülleder et al. 2001)
<b>Groselhas pretas</b>	153	5	0,03	-	-	-	(Netzel, Strass et al. 2001)
<b>Mistura de frutos silvestres</b>	162	-	-	29,0	1,0	-	(Miyazawa, Nakagawa et al. 1999)
<b>Vinho tinto</b>	218	12	3,3	-	-	-	(Lapidot, Harel et al. 1998)

$C_{max}$  – Concentração máxima;  $t_{max}$  – tempo para atingir a concentração máxima;  $t_{1/2}$  – tempo de semivida de eliminação

Nos estudos apresentados as antocianinas foram administradas a partir de diferentes fontes que incluíram bebidas (vinho tinto e sumos de fruta), frutas (morangos, uvas, ...) e diferentes extratos de bagas ou concentrados. Os valores apresentados incluem: dose administrada, percentagem de recuperação urinária, concentração máxima no plasma ( $C_{máx}$ ) e tempo para atingir a concentração máxima ( $t_{máx}$ ). Os valores referem-se a antocianinas totais incluindo metabolitos, quando identificados. Foram administradas doses de 56 a 3570 mg, durante 3 a 48 h, as concentrações máximas no plasma variaram entre 1,4 e 592 nmol/L e foram detetadas ao fim de 0,3 a 4 h. Os valores reportam recuperações urinárias baixas entre 0,003 e 5 % da quantidade ingerida, tendo o tempo de semivida de eliminação variado entre as 0,3 e 3,0 h.

Ao comparar os diferentes parâmetros foi possível concluir que as antocianinas:

- são absorvidas na forma de glicósidos e metabolitos;
- são absorvidas e eliminadas rapidamente;
- apresentam uma variabilidade considerável nos parâmetros descritos;
- apresentam uma  $C_{máx}$  muito reduzida.

Em termos globais e apesar da considerável variabilidade nos valores dos parâmetros biocinéticos, as antocianinas parecem ser rapidamente absorvidas e eliminadas, atingindo concentrações máximas no plasma e urina baixas.

Apesar da biodisponibilidade de antocianinas parecer baixa, esta pode estar subestimada por várias razões: variação na dose administrada, estrutura química das antocianinas nas diferentes fontes alimentares ou após processamento, idade ou género dos indivíduos e os métodos de análise e quantificação. Os métodos usados podem necessitar de ser otimizados para a análise dos metabolitos das antocianinas.

A análise dos parâmetros cinéticos para as diferentes doses permite afirmar que um aumento da dose nem sempre é acompanhado de um aumento da quantidade absorvida. O mecanismo de absorção/biodisponibilidade dos polifenóis parece envolver mecanismos de transporte saturáveis, tal como descrito para os glicósidos de quercetina (Gee, DuPont et al. 2000). As vias metabólicas envolvidas na glicuronilação, metilação e conjugação com sulfato são limitadas por co-fatores, podendo a dose administrada influenciar a via de metabolização (Kay 2006).

O aspeto essencial neste momento é confirmar esta aparente reduzida biodisponibilidade das antocianinas no sentido de compreender as atividades biológicas que lhes têm sido atribuídas. Este objetivo vai manter-se difícil de atingir, dada a elevada diversidade estrutural das antocianinas existentes na Natureza e consequentemente dos respetivos metabolitos que podem ser sintetizados *in vitro* e no trato gastrointestinal.

Por outro lado, a natureza iónica das antocianinas permite alterações na estrutura da molécula podendo em solução coexistir diferentes formas químicas em equilíbrio dependendo do pH (Brouillard 1983). As antocianinas são mais estáveis em meios ácidos, a valores de pH mais baixos do que em soluções alcalinas, com valores de pH superiores. A instabilidade pode resultar em degradação química provocando alterações estruturais ou mesmo a formação de novos compostos químicos.

A maioria dos estudos sobre a biodisponibilidade e a absorção das antocianinas, foram realizados com deteção UV-Vis com base na conversão completa com a acidificação de todas as formas químicas em formas do catião flavílio. No entanto, *in vivo*, as antocianinas estão nas formas hemiacetal e/ou chalcona. Também, é possível que algumas formas que existem a pH neutro não possam ser convertidas na forma de catião flavílio devido a reações que possam ocorrer com outras moléculas presentes no plasma ou na urina.

O efeito geral do pH no equilíbrio de uma antocianina monoglicósido não acilada está representado na Figura 7. As formas que ocorrem a nível do trato gastrointestinal não são conhecidas com certeza. A forma de catião flavílio deverá estar presente apenas ao nível do estômago, enquanto as outras formas predominam nas restantes zonas do trato gastrointestinal e nos tecidos, se absorvidas.

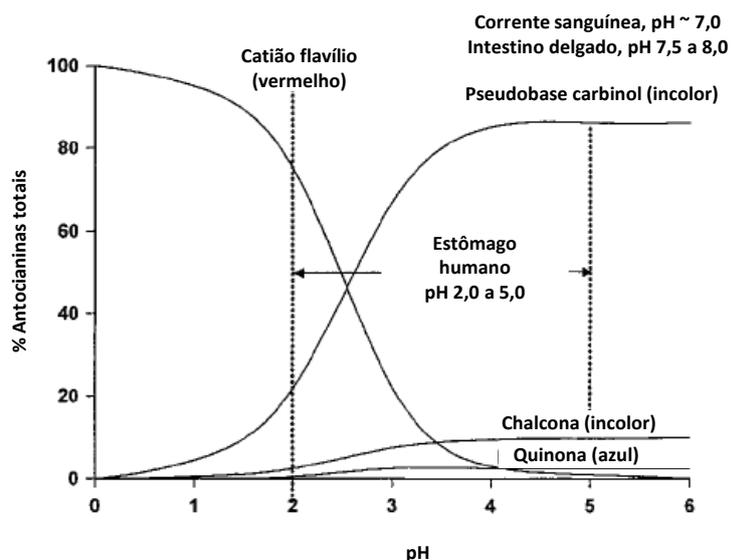


Figura 7. Efeito do pH no equilíbrio químico de antocianinas monoglicósido, não aciladas, adaptado de Clifford (Clifford 2000).

Tal como apresentado na Figura 8, devido ao metabolismo ou modificação molecular estas estruturas não vão regenerar o catião flavílio e conseqüentemente este não irá ser detetado por métodos analíticos baseados na separação por HPLC e deteção a 520 nm.

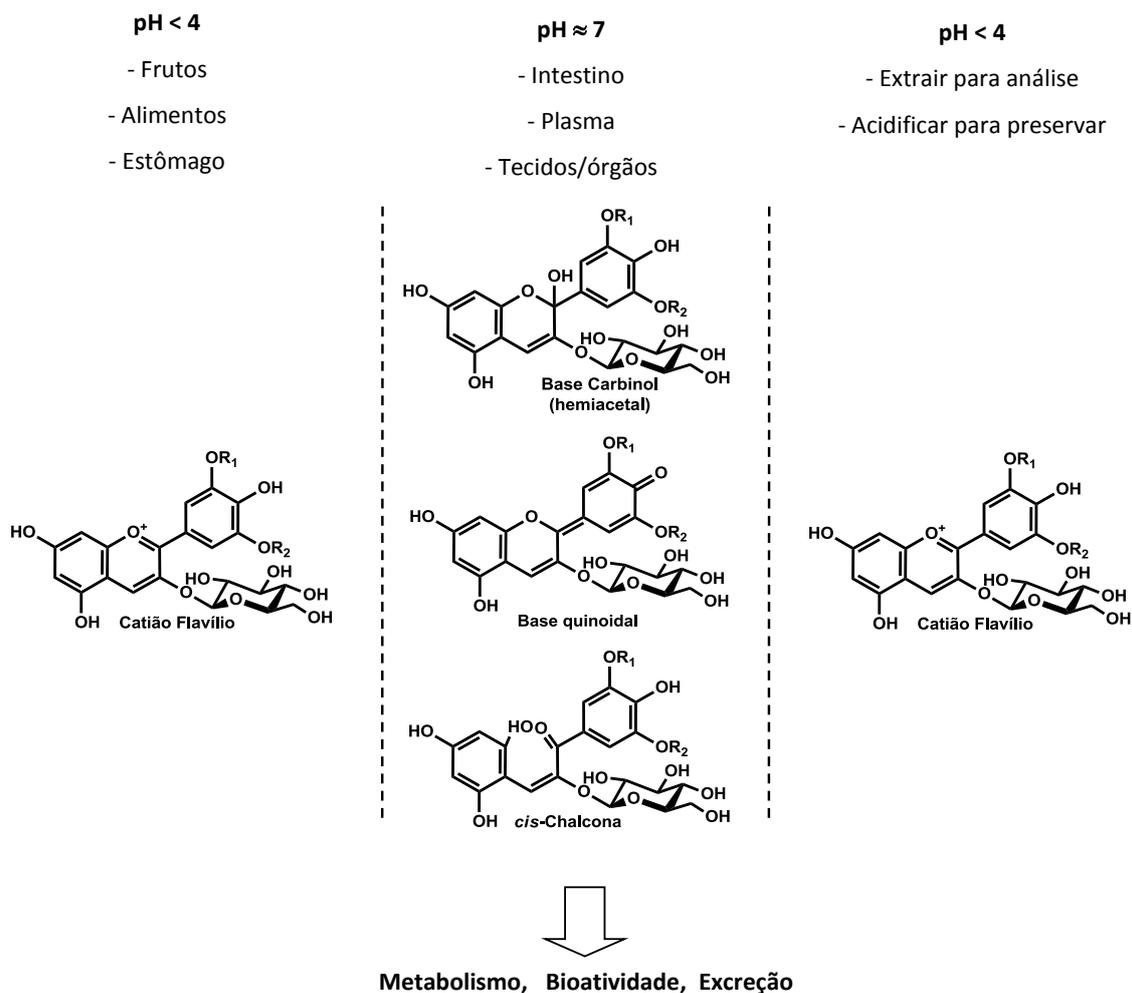


Figura 8. Representação esquemática das diferentes formas de equilíbrio das antocianinas existentes a diferentes pHs, durante o processo de absorção, ingestão e metabolismo, adaptado de (McGhie and Walton 2007). R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>= H, OH, ou OMe

#### 2.4.1. Cavidade oral, estômago, intestino delgado e cólon

A absorção intestinal das antocianinas é considerada baixa (Daayf and Lattanzio 2008), no entanto fatores adicionais podem contribuir para os valores propostos (Vanzo, Terdoslavich et al. 2008).

Os processos físico-químicos que antecedem a absorção gastrointestinal, nomeadamente interação com proteínas dos alimentos ou com proteínas salivares e enzimas digestivas (Matsui, Ueda et al. 2001; Walle, Browning et al. 2005; Wiese, Gärtner et al. 2009) podem contribuir para essa reduzida biodisponibilidade a nível intestinal.

Num trabalho recente realizado com voluntários saudáveis, antocianinas de amoras silvestres foram detetadas na cavidade oral na forma aglicona em resultado da atividade das  $\beta$ -glicosidases bacterianas e das células epiteliais (Mallery, Budendorf et al. 2011). No mesmo estudo, foram detetados na saliva, o metabolito microbiano da Cy3glc, o ácido protocatechúico, e conjugados glicuronilados de antocianinas, sendo os resultados consistentes com a absorção celular e metabolismo de fase II ao nível da cavidade oral (Mallery, Budendorf et al. 2011). A importância destas transformações nos efeitos ao nível do epitélio oral é difícil de avaliar considerando a reduzida permanência dos alimentos na cavidade oral.

Após a ingestão, as antocianinas são rapidamente detetadas no plasma nas suas formas parentais, o que sugere a sua absorção através da cavidade gástrica (Cao and Prior 1999; Cao, Muccitelli et al. 2001; Milbury, Cao et al. 2002; Mulleder, Murkovic et al. 2002).

O estômago foi já identificado como local de absorção de diferentes compostos (Piskula, Yamakoshi et al. 1999; Crespy, Morand et al. 2001). Em concreto, as antocianinas glicosiladas podem ser rapidamente absorvidas no estômago após ingestão por um processo que pode envolver o transportador aniónico bilitranslocase, entram na circulação sistémica depois de passarem pelo fígado (Passamonti, Vrhovsek et al. 2003; Talavera, Felgines et al. 2003). Uma parte é metabolizada e alguns metabolitos são transportados para o intestino com a bÍlis.

As antocianinas glicosiladas que não são absorvidas no estômago chegam ao intestino delgado, onde em resultado do pH mais básico é deslocado o equilíbrio para a forma carbinol pseudobase. O mecanismo de absorção ao nível do intestino ainda não foi identificado, no entanto não parece ser semelhante aos flavonóis. Ao contrário destes, as antocianinas são rápida e eficientemente absorvidas no intestino delgado na forma glicosilada (Miyazawa, Nakagawa et al. 1999; Tsuda, Horio et al. 1999; Talavera, Felgines et al. 2004). As antocianinas absorvidas entram na circulação sistémica depois de passarem pelo fígado. Adicionalmente, as antocianinas são rapidamente metabolizadas e aparecem na circulação ou são excretadas na bÍlis e urina na forma intacta ou metabolizada (glicuronilada, sulfatada ou metilada) (Miyazawa, Nakagawa et al. 1999; McGhie, Ainge et al. 2003; Talavera, Felgines et al. 2003; Ichianagi, Rahman et al. 2004; Talavera, Felgines et al. 2004; Ichianagi, Shida et al. 2005; Ichianagi, Shida et al. 2005).

As antocianinas que não são absorvidas chegam ao cólon onde são degradadas em moléculas mais simples. Um estudo recente sugere que esta degradação pode ocorrer

espontaneamente nas condições fisiológicas (Woodward, Kroon et al. 2009) ou em resultado da ação da microflora intestinal.

Uma vez que ácidos fenólicos resultantes da degradação das antocianinas podem ser absorvidos no cólon (Williamson and Clifford 2010) é possível que estes sejam adicionalmente metabolizados pelas células hepáticas (Woodward, Needs et al. 2011). Os efeitos benéficos associados às antocianinas podem ser explicados pela lenta e contínua libertação de ácidos fenólicos no cólon e consequente absorção para a circulação sanguínea.

Apesar da aparente reduzida biodisponibilidade, as concentrações plasmáticas das antocianinas parecem ser suficientes para induzir, *in vivo*, alterações em vias de transdução de sinal e expressão genética (Karlsen, Retterstøl et al. 2007; DeFuria, Bennett et al. 2009) o que está de acordo com o seu eventual papel nas funções fisiológicas e efeitos benéficos para a saúde.

Na Figura 9 apresenta-se uma representação esquemática resumida das vias de absorção e metabolismo das antocianinas.

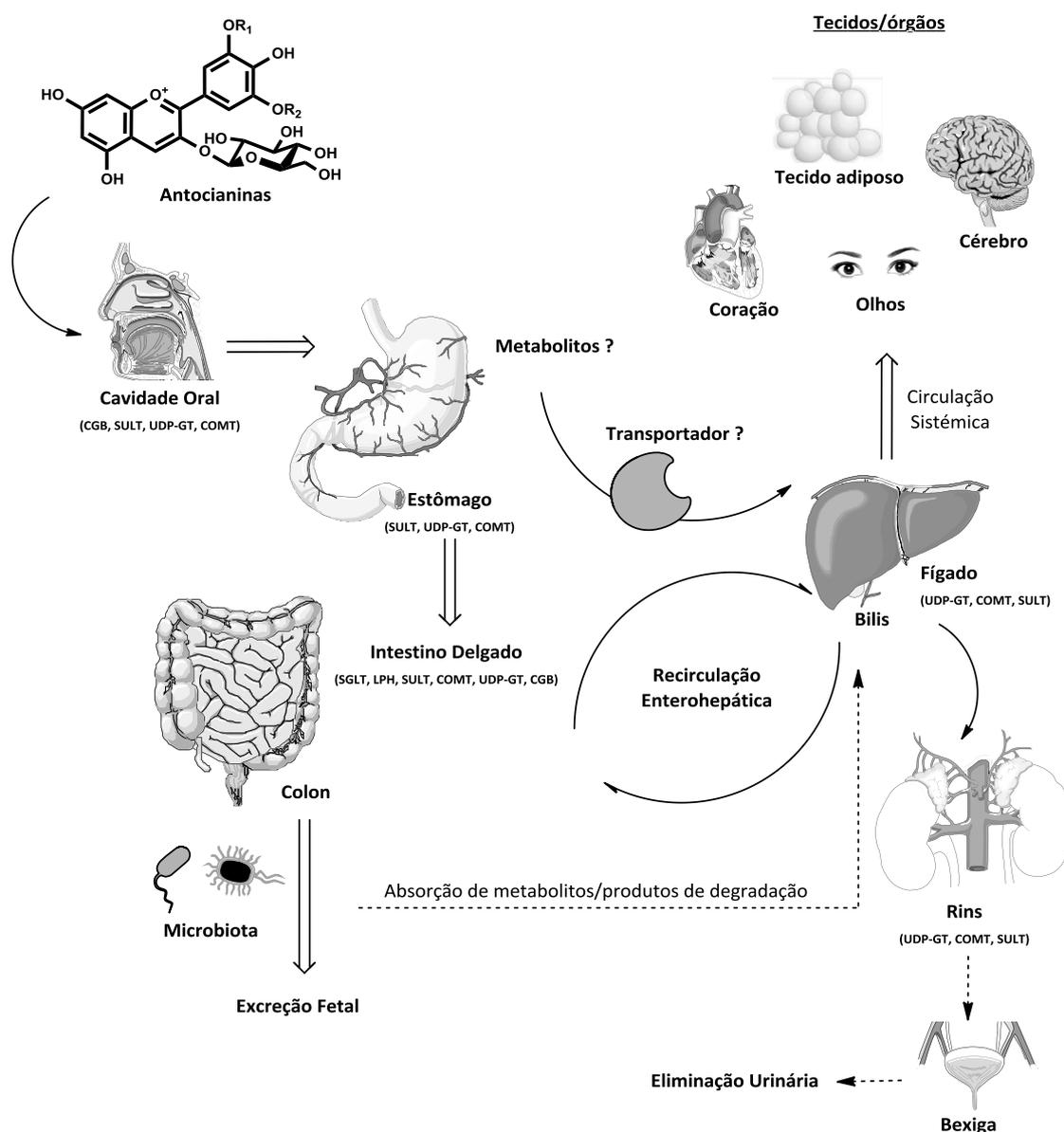


Figura 9. Vias de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de antocianinas. SGLT1: cotransportador glicose/sódio; CGB:  $\beta$ -glicosidase citosólica; UDP-GT: glicuroniltransferase; COMT: catecol-O-metil-transferase; SULT: sulfotransferase; LPH: Lactase.  $R_1$  e  $R_2$ = H, OH, ou OMe

## 2.5. Mecanismos de absorção e transporte

As antocianinas são moléculas solúveis em água, não apresentando tendência a ser absorvidas pelas células ou entrar no sistema circulatório de animais ou humanos (Hollman 2004). Contudo, e de acordo com os estudos de biodisponibilidade

anteriormente apresentados, foi já demonstrado que as antocianinas são absorvidas no trato gastrointestinal, transportadas para o sistema circulatório e excretadas na urina.

Recentemente, a absorção de um extrato de antocianinas em células de Caco-2 foi investigada (Yi, Akoh et al. 2006). Embora a eficiência do transporte seja reduzida, as características estruturais das diferentes antocianinas estiveram associadas a variações na absorção das mesmas. A antocianina Mv3glc apresentou uma maior eficiência de transporte do que a correspondente antocianina não metilada (Dp3glc). As estruturas glicosiladas foram transportadas mais eficientemente do que as que apresentam moléculas de galactose ligadas. As antocianinas ligadas a moléculas de glicose são mais eficientemente absorvidas do que as ligadas a moléculas de arabinose, e entre as agliconas a Dp e a Cy são absorvidas com maior eficiência do que a Mv (McGhie, Ainge et al. 2003; Ichiyanagi, Shida et al. 2006).

Todos os estudos que envolvem a avaliação da absorção e biodisponibilidade de antocianinas detetam a absorção de antocianinas glicosiladas. Esta parece ser um dos aspetos que diferencia a absorção de antocianinas e de outros flavonóides.

Um número considerável de estudos sobre a absorção/biodisponibilidade das antocianinas foi já efetuado, no entanto, comparativamente com outras classes de flavonóides, nomeadamente os flavonóis, pouco se sabe sobre os seus mecanismos de absorção e transporte.

Vários estudos de biodisponibilidade mostraram que as antocianinas rapidamente aparecem no sistema circulatório. Este facto pode ser interpretado como resultado da absorção das antocianinas ao nível do estômago. Existem evidências da absorção direta das antocianinas no estômago (Passamonti, Vrhovsek et al. 2003; Talavera, Felgines et al. 2003; Passamonti, Vanzo et al. 2005). Adicionalmente, as antocianinas mostraram ser capazes de interatuar com a bilitranslocase (transportador orgânico de aniões) expressa no epitélio gástrico, fornecendo um mecanismo plausível da absorção de antocianinas ao nível do estômago (Passamonti, Vrhovsek et al. 2002). A administração de quantidades elevadas de antocianinas, muito acima dos níveis observados numa dieta normal, podem induzir a saturação deste transporte e contribuir para a reduzida biodisponibilidade das antocianinas descrita (Talavera, Felgines et al. 2003).

Existem igualmente evidências de absorção direta das antocianinas ao nível do intestino delgado de ratos, por perfusão *in situ*, sendo posteriormente eficientemente excretadas na bÍlis e na urina (Talavera, Felgines et al. 2004).

O cotransportador glicose/sódio (SGLT1) e a lactase (LPH) parecem estar envolvidos na absorção de quercetina-glicosilada no intestino delgado e a sua atividade é inibida na presença de glicose ou floridzina (Hollman, Bijsman et al. 1999). Embora nenhum destes inibidores tenha mostrado afetar a absorção de Cy3glc, a presença de quercetina-3-glicose reduziu significativamente a absorção desta antocianina (Walton, McGhie et al. 2006). Este estudo sugere que a absorção de antocianinas e flavonóides está de alguma forma relacionada.

Em estudos *in vitro*, existem evidências que a absorção de alguns flavonóides glicosilados inclua a interação com o SGLT1 (Gee, DuPont et al. 1998; Gee, DuPont et al. 2000). Alguns autores sugerem que as antocianidinas glicosiladas podem, em parte, ser absorvidas por um mecanismo semelhante ao anteriormente descrito (Clifford 2000; Mulleder, Murkovic et al. 2002). Outros autores defendem que a interação com o SGLT1, não comprova necessariamente que ocorra transporte. Os glicósidos fenólicos podem interagir com o transportador impedindo o transporte de oses, mas não serem transportados, possivelmente como resultado do volume elevado das agliconas ligadas à glicose (Day, Canada et al. 2000). Não obstante a já provada absorção direta das antocianinas (Cao and Prior 1999; Miyazawa, Nakagawa et al. 1999; Matsumoto, Inaba et al. 2001; Wu, Cao et al. 2002; McGhie, Ainge et al. 2003), alguns autores sugerem um segundo mecanismo. As antocianinas podem ser absorvidas ao nível do intestino na forma aglicona após sofrerem hidrólise por ação da  $\beta$ -glicosidase (Tsuda, Horio et al. 1999). Resultados anteriores tinham já demonstrado que extratos de intestino delgado e fígado humanos apresentavam a capacidade de remover a glicose de vários flavonóides glicosilados (Day, DuPont et al. 1998). Em particular a LPH, a única  $\beta$ -glicosidase que apresenta atividade no lúmen intestinal, pode ser primeiramente responsável pela hidrólise (Day, Canada et al. 2000).

Um estudo *in vitro*, reporta o envolvimento do transportador de glicose GLUT2 no transporte de antocianinas ao nível intestinal (Faria, Pestana et al. 2009).

### 2.5.1. Distribuição nos tecidos

As propriedades das antocianinas, assim como de todos os flavonóides ingeridos da dieta alimentar, estão diretamente relacionadas com a sua metabolização no organismo. No entanto, tanto a distribuição das antocianinas como dos respetivos metabolitos nos diversos tecidos ainda está longe de estar caracterizada, sendo

reduzidos os dados disponíveis na literatura sobre esta matéria. Dois problemas principais prendem-se com esta dificuldade: a) por um lado, a dificuldade em detetar estas moléculas nas matrizes biológicas dada a sua baixa concentração e os processos de purificação; b) por outro lado, a dificuldade em obter padrões de metabolitos e conjugados de modo a facilitar a sua posterior deteção.

Um estudo *in vivo* realizado em humanos permitiu identificar antocianinas nativas no estômago, enquanto nos restantes órgãos analisados (jejuno, fígado e rins) foram detetadas antocianinas na forma nativa, antocianinas metiladas e antocianidinas glicuroniladas (Talavera, Felgines et al. 2005). Estes resultados confirmam a absorção e metabolização de antocianinas ao nível do gastrointestinal, adicionalmente, dois estudos em modelos animais e em humanos, detetaram antocianinas de uvas tintas e frutos silvestres no cérebro (Passamonti, Vrhovsek et al. 2005; Talavera, Felgines et al. 2005).

Mais recentemente, num estudo com porcos suplementados com mirtilos durante 4 semanas, não foram detetadas antocianinas no plasma e urina dos animais, no entanto foram identificadas antocianinas intactas no fígado, nos olhos, e no cérebro (Kalt, Blumberg et al. 2008). Estes resultados sugerem que as antocianinas podem-se acumular nos tecidos, incluindo em locais que implicam a passagem pela barreira hemato-encefálica.

Num estudo de Felgines e colaboradores, foram identificados em diferentes órgãos (bexiga, próstata, testículos, coração e tecido adiposo) conjugados metilados e glicuronilados de antocianinas em ratos alimentados durante 12 dias com amoras (Felgines, Texier et al. 2009). Neste estudo a bexiga, seguida da próstata foram os órgãos que apresentaram os níveis de antocianinas mais elevados. Na próstata, testículos e coração foi detetada Cy3glc e uma pequena quantidade de cianidina conjugada com ácido glicurónico. No tecido adiposo foi detetada Cy3glc e conjugados metilados (Felgines, Texier et al. 2009).

## **2.6. Metabolismo de fase II**

As antocianinas que são absorvidas podem sofrer algumas formas de metabolização intracelular. Os intermediários reativos produzidos durante a fase I sofrem posteriormente conjugação (com grupos tiol, em particular com a glutatona reduzida (GSH), com ácido glicurónico ou grupos sulfato) e metilação (Figura 10).

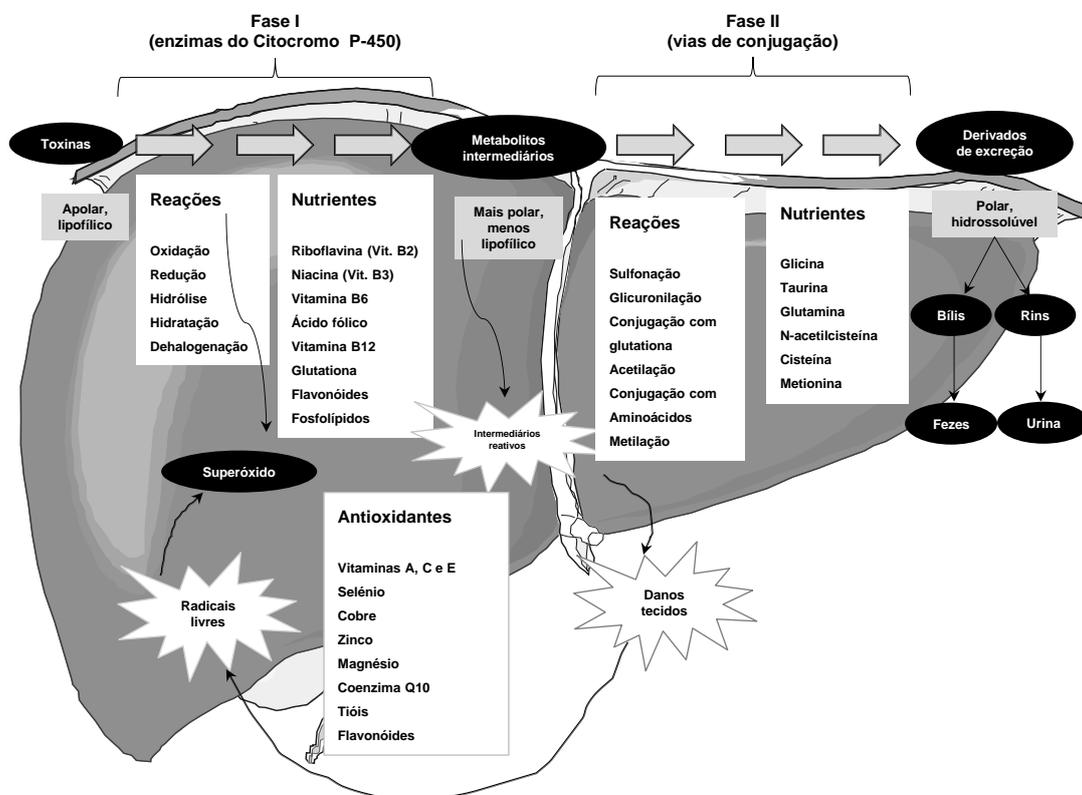


Figura 10. Vias hepáticas de detoxificação, adaptado de Liska e colaboradores (Liska, Lyon et al. 2006).

Os primeiros estudos relacionados com a sua absorção reportavam a presença de antocianinas em amostras de urina na forma como existem nos alimentos (Tsuda, Horio et al. 1999; Matsumoto, Inaba et al. 2001; McGhie, Ainge et al. 2003). Contudo, na maioria destes estudos outros compostos foram igualmente detetados por HPLC e foram identificados como derivados glicuronilados e metilados das antocianinas parentais, indicando que, à semelhança de outros flavonóides, esta classe de compostos está sujeita a extensa conjugação *in vivo* (Kay, Mazza et al. 2004; Prior and Wu 2006).

Em oposição a outros órgãos não hepáticos, como o intestino delgado e os rins, o estômago tem sido ignorado como um órgão capaz de metabolizar, no entanto a contribuição da mucosa gástrica para o metabolismo das antocianinas não deve ser desprezada, uma vez que foram já identificadas no estômago as enzimas catecol-O-metil-transferase, UDP-glicuroniltransferase e sulfotransferase (Karhunen, Tilgmann et

al. 1994; Strassburg, Oldhafer et al. 1997; Strassburg, Nguyen et al. 1998; Harris, Picton et al. 2000). Além disso, estudos *in vitro* mostram que alguns flavonóides podem ser metabolizados a conjugados glicuronilados ou sulfatados na cavidade gástrica (Déchelotte, Varrentrapp et al. 1993; Murota and Terao 2005).

A metilação é uma das reações enzimáticas mais estudadas do metabolismo de fase II de flavonóides (Walle 2004). Esta reação foi particularmente bem estudada para a quercetina *in vivo* e *in vitro* (Walle 2004). Este tipo de metabolização ocorre principalmente no fígado e é catalisado pela catecol-O-metil-transferase (COMT), sendo o grupo catecol essencial para a atividade da enzima.

Os metabolitos metilados de Cy3glc nas posições em C3' e C4' foram identificados na urina de suínos, o que demonstra que os grupos hidroxilo das posições 3' e 4' podem ser conjugados com um grupo metilo (Wu, Pittman et al. 2004). No entanto a substituição na posição 3' é a predominante (Wu, Pittman et al. 2004). Estudos recentes identificaram metabolitos metilados de Dp3glc, apenas na posição 4' do anel B (Ichiyangi, Rahman et al. 2004; Matsumoto, Ichiyangi et al. 2006).

A conjugação de antocianinas com o ácido glicurónico está bem documentada (Wu, Cao et al. 2002; Felgines, Talavera et al. 2003; Kay, Mazza et al. 2004; Bitsch, Netzel et al. 2004b; Kay, Mazza et al. 2005; Tian, Giusti et al. 2006). Contudo, o local de glicuronilação e a isoforma da enzima UDP-glicuroniltransferase não estão bem caracterizados. Dois mecanismos principais foram descritos para a formação de metabolitos monoglicuronilados da Cy3glc: reação direta da Cy3glc com o ácido glicurónico por ação da UDP-glicose desidrogenase ou hidrólise da Cy3glc ou da Pn3glc à forma aglicona seguida de glicuronilação no intestino. Contudo, um estudo recente com base na razão entre a quantidade de Cy3glc e de Cy3glc glicuronilada detetada na urina suporta a segunda possibilidade (Wu, Pittman et al. 2005). Adicionalmente, um outro estudo identificou Cy e Pn na forma aglicona no plasma de ratos, o que mais uma vez suporta a segunda hipótese (Talavera, Felgines et al. 2005).

A formação de sulfoconjugados de antocianidinas requer a hidrólise da molécula de glicose e a conjugação da antocianidina com um grupo sulfato por ação de sulfotransferases, presentes em vários tecidos incluindo intestino e fígado (Runge-Morris 1997). No entanto, um metabolito sulfonado da Cy3glc foi identificado em amostras de urina humana após consumo de morangos (Felgines, Talavera et al. 2003) e amoras (Felgines, Talavera et al. 2005). Esta reação foi reconhecida como

uma importante via de destoxificação de xenobióticos e produtos endógenos hidroxilados (Runge-Morris 1997).

As reações de conjugação com sulfato e glicuronilação são mecanismos importantes de excreção destes compostos do organismo através da urina. Contudo, atualmente, com as metodologias existentes, a dificuldade de deteção e quantificação destes compostos nos fluidos biológicos é ainda uma realidade.

As elevadas concentrações de glutathione (GSH) no interior das células assegura a exposição do organismo a conjugados de glutathione com polifenóis (Monks and Lau 1997). A reatividade biológica dos conjugados glutathione-polifenol resulta da manutenção das propriedades eletrofílicas e redox do polifenol (Monks and Lau 1998). Certamente, a atividade redox dos polifenóis é aumentada após a conjugação com glutathione. A conjugação de polifenóis com GSH fornece um mecanismo de transporte de metabolitos entre órgãos (Monks and Lau 1997).

A capacidade de algumas células de expulsar estes metabolitos do seu interior irá limitar a sua toxicidade. Contudo, após a entrada na circulação sistémica estes metabolitos podem ser transportados para tecidos capazes de os acumular e aí exercerem a sua ação.

## **2.7. Estabilidade gastrointestinal e microbiota**

As antocianinas presentes nos alimentos apresentam diferentes estruturas moleculares em resultado da biossíntese e acumulação nos tecidos das plantas. Muitos frutos possuem monoglicósidos das seis agliconas principais (Tabela 2), no entanto alguns alimentos, nomeadamente vegetais possuem também antocianinas aciladas. Estas antocianinas de origem natural podem ser modificadas antes de serem consumidas, principalmente durante o processamento e armazenamento dos alimentos. Por exemplo, as antocianinas presentes no vinho tinto sofrem diversas modificações estruturais durante a sua maturação (Mateus and de Freitas 2001; Mateus, Carvalho et al. 2003). Consequentemente, nos alimentos processados, as antocianinas existentes podem não ser as mesmas que estavam originalmente presentes nas plantas.

Após a ingestão pelo organismo humano, os componentes dos alimentos experienciam vários ambientes e condições físico-químicas diferentes que podem conduzir à sua modificação molecular. O trato gastrointestinal é composto por vários

órgãos distintos que incluem o estômago, o intestino delgado e o cólon, após a absorção no trato gastrointestinal, os compartimentos fisiológicos e tecidos apresentam diferentes ambientes físico-químicos.

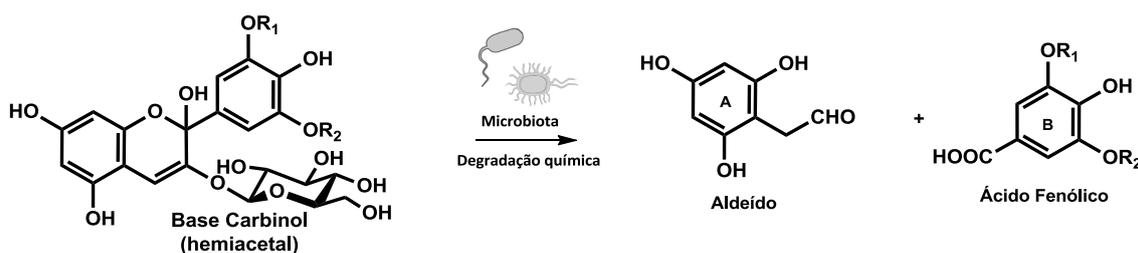
O trato gastrointestinal é caracterizado por regiões com diferentes pHs e diferentes populações microbianas, fatores que podem modificar as antocianinas. O pH no estômago é baixo o que assegura que as antocianinas se mantêm na forma de catião flavílio, que é a sua forma mais estável.

Em contraste com o estômago, o ambiente no intestino delgado e cólon é basicamente neutro, nestas condições as antocianinas apresentam uma menor estabilidade e múltiplas estruturas moleculares das antocianinas podem coexistir.

Estes e outros estudos revelaram que as antocianinas sofrem uma reduzida modificação química nas condições fisiológicas do trato gastrointestinal, mas são provavelmente extensivamente modificadas pela flora intestinal.

As antocianinas que atingem o microbioma são as que não são absorvidas no trato gastrointestinal, e também os seus metabolitos excretados na bÍlis e na recirculação enterohepática. O microbioma exerce um papel importante no metabolismo, sendo o organismo humano hospedeiro de um ecossistema de cerca de  $10^{13}$ - $10^{14}$  células bacterianas (Cani and Delzenne 2009).

A metabolização das antocianinas inclui a clivagem das ligações glicosídicas e a quebra do anel heterocíclico C, nos correspondentes ácidos fenólicos e aldeídos (Goldberg, Yan et al. 2003; Rechner, Smith et al. 2004; Keppler and Humpf 2005; Felgines, Talavera et al. 2006; Fleschhut, Kratzer et al. 2006) (Figura 11).



Antocianina	Ácido Fenólico
Cy3glc	Ácido Protocatechúico
Pn3glc	Ácido Vanílico
Pg3glc	Ácido 4-Hidroxibenzóico
Mv3glc	Ácido Siringico
Dp3glc	Ácido Gálgico
Pt3glc	Ácido dihidroxi-3-metoxibenzóico

Figura 11. Vias de degradação das antocianinas a compostos fenólicos monoméricos, adaptado de *Kepler, Felgines, Fleischhut* e colaboradores (Kepler and Humpf 2005; Felgines, Talavera et al. 2006; Fleischhut, Kratzer et al. 2006).

*Tsuda* e colaboradores reportam a presença no plasma de uma concentração de ácido protocatechúico, produto da degradação da Cy3glc, oito vezes superior à da Cy3glc (*Tsuda, Horio et al. 1999*). De acordo com *Vitaglione* e colaboradores o ácido protocatechúico é o principal metabolito da Cy3glc detetado em humanos (*Vitaglione, Donnarumma et al. 2007*). Mais concretamente, este metabolito é responsável por cerca de 73 % das antocianinas ingeridas. Este metabolito foi detetado no plasma 2 h após a ingestão oral de antocianinas, indicando que a sua formação é resultado de degradação química nas condições fisiológicas da circulação sistémica ou da mucosa intestinal. Este metabolito foi igualmente detetado em amostras de fezes o que sugere que o intestino também é um local de metabolização de antocianinas (*Riso, Visioli et al. 2005*).

O metabolismo de antocianinas de bagas com conseqüente formação de ácidos fenólicos foi recentemente estudado, tendo sido detetados os ácidos vanílico e homovanílico como principais metabolitos (*Nurmi, Mursu et al. 2009*).

Num outro estudo, realizado em ratos com antocianinas de mirtilos, o principal metabolito detetado na urina foi o ácido hipúrico, o qual pode ser produzido no fígado

através da conjugação da glicina com ácidos fenólicos aromáticos (Bò, Ciappellano et al. 2009).

Uma vez que apenas uma reduzida percentagem das antocianinas consumidas por humanos ou animais é excretada, existe a possibilidade da maioria das antocianinas permanecer no trato gastrointestinal e serem transformadas em novos compostos que podem não ser detetados pelos correntes métodos analíticos.

Existe uma variedade enorme de produtos da degradação das antocianinas no trato gastrointestinal, o que representa uma limitação para a deteção e quantificação destes compostos em estudos que pretendam avaliar a absorção e biodisponibilidade dos mesmos.

À medida que as evidências dos efeitos terapêuticos dos polifenóis, e em particular das antocianinas, se continuam a acumular, torna-se fundamental compreender a natureza da sua absorção e metabolismo *in vivo*.

Um maior conhecimento destes processos permitirá o desenvolvimento de novos produtos alimentares, frescos ou processados, com elevada eficiência terapêutica. Atualmente, pouco se sabe sobre a forma como antocianinas e compostos antociânicos derivados entram no organismo, são distribuídos nos tecidos e finalmente exercem os seus efeitos benéficos. Um conhecimento mais profundo conduzirá a um ganho acrescido do contributo benéfico destes compostos para a saúde humana.

## OBJETIVOS

O conhecimento da forma como as antocianinas e pigmentos derivados são absorvidos, interagem com os vários tipos de células e a metabolização que sofrem em resultado dessa interação, tem assumido uma importância crescente em resultado do seu papel protetor em diferentes patologias.

Neste trabalho, pretendeu-se estudar e caracterizar algumas propriedades biológicas de flavonóides, em particular de antocianinas, antocianinas conjugadas com grupos metilo e de pigmentos derivados de antocianinas.

Assim, este trabalho teve como principais objetivos:

- Sintetizar, purificar e caracterizar conjugados metilados de antocianinas. Avaliar a biodisponibilidade e algumas propriedades biológicas destes compostos, nomeadamente propriedades antioxidantes e antitumorais em três linhas celulares tumorais humanas;
- Pesquisar a potencial atividade antitumoral de diferentes classes de compostos polifenólicos (antocianinas, vinilpiranoantocianina-catequinas, flavonóis, ácidos fenólicos e fenóis simples) e analisar eventuais relações estrutura-atividade. Investigar mais detalhadamente o mecanismo de ação antiproliferativa de antocianinas, nomeadamente ao nível de alterações na expressão proteica;
- Desenvolver um modelo de barreira gástrica e avaliar o respetivo transporte transmembranar de antocianinas;
- Avaliar a biodisponibilidade de pigmentos antociânicos num modelo *in vitro* de barreira intestinal.



PARTE 1 - HEMI-SÍNTESE, PROPRIEDADES  
ANTIOXIDANTES E BIOLÓGICAS DE PIGMENTOS  
ANTOCIÂNICOS E METABOLITOS

### Sinopse:

- Capítulo I: Hemi-síntese, purificação e caracterização estrutural de conjugados metilados de antocianinas. Avaliação da sua biodisponibilidade e propriedades biológicas.
- Capítulo II: Pesquisa da potencial atividade antitumoral de diferentes classes de compostos polifenólicos (antocianinas, vinilpiranoantocianina-catequinas, flavonóis, ácidos fenólicos e fenóis simples) e análise de eventuais relações estrutura-atividade.

CAPÍTULO I - HEMI-SÍNTESE DE METABOLITOS METILADOS DE  
ANTOCIANINAS: BIODISPONIBILIDADE E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS



## 1. Introdução

As referências na literatura ao metabolismo de antocianinas em humanos são escassas, não havendo qualquer estudo dos efeitos biológicos dos seus metabolitos. As antocianinas são absorvidas no estômago (Passamonti, Vrhovsek et al. 2003; Talavera, Felgines et al. 2003) e no intestino delgado (Talavera, Felgines et al. 2004), aparecendo na circulação sanguínea e na urina na forma parental ou conjugadas (metiladas, glicuroniladas, sulfatadas) (Wu, Cao et al. 2002; Felgines, Talavera et al. 2003; Kay, Mazza et al. 2004; Talavera, Felgines et al. 2004; Kay, Mazza et al. 2005). No entanto, a identificação destes metabolitos está limitada em resultado da sua diversidade, baixa concentração plasmática e ausência comercial de padrões.

Os derivados glicuronilados e sulfatados parecem ser desconjugados antes de entrarem nas células alvo, o que torna a avaliação da atividade dos derivados metilados particularmente relevante (O'Leary, Day et al. 2001).

É de prever que estas alterações estruturais possam alterar as propriedades antioxidantes e biológicas das antocianinas ingeridas na sua forma original, assim sendo, de forma a compreender os efeitos *in vivo* das antocianinas da dieta, é necessário avaliar as propriedades dos seus conjugados.

De facto, as propriedades antioxidantes dos flavonóides parecem ser dependentes do número de grupos hidroxilo livres na molécula, conseqüentemente a metilação desses grupos deverá ter influência nessa atividade. Estudos recentes observaram um decréscimo na capacidade antioxidante de metabolitos metilados de quercetina (Lemańska, Van Der Woude et al. 2004), catequina (Cren-Olivé, Teissier et al. 2003) e epicatequina (Pollard, Kuhnle et al. 2006).

### 1.1. Propriedades antioxidantes

Os organismos vivos possuem um sistema redox que continuamente funciona no sentido de manter um balanço saudável. O funcionamento das várias vias de sinalização celular está no entanto dependente da formação de radicais livres. O stresse oxidativo corresponde a um estado não equilibrado em que existe um excesso de radicais livres comparativamente com as capacidades antioxidantes endógenas.

Um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada com o substrato oxidável, evita ou retarda significativamente a oxidação

desse substrato (Halliwell 1990), e que após oxidação deve ser suficientemente estável de forma a não desencadear novas reações de oxidação (Shahidi and Wanasundara 1992). As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas (catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase, ...) ou não enzimáticas (glutathione, algumas vitaminas e metais, fitoquímicos, ...).

As espécies reativas de oxigénio (ROS) e as espécies reativas de azoto (RNS), tais como o radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o anião superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), o óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ), o anião peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), entre outros, são as principais causas de stresse oxidativo em células, estando associadas a danos em proteínas, lípidos e DNA. Os danos oxidativos no DNA são considerados uma das causas de cancro (Kryston, Georgiev et al. 2011), envelhecimento e doenças neurodegenerativas, tais como Alzheimer e Parkinson (Santos, Correia et al. 2012) e doenças cardiovasculares (Malik and Herbert 2012). Assim sendo, a redução do stresse oxidativo causado por ROS e RNS tem importantes implicações na prevenção e tratamento de diferentes patologias.

O cancro está associado a um estado oxidativo elevado e a uma ativação das vias de sinalização envolvidas na proliferação e sobrevivência celular. Muitos estudos têm sugerido que os efeitos anticarcinogénicos dos polifenóis devem-se às suas características antioxidantes, no entanto estudos sugerem igualmente a sua capacidade para modular vias de sinalização celular (Figura 12) (Kang, Shin et al. 2011). De facto, compostos com atividades antioxidantes semelhantes podem ter efeitos distintos em vias de sinalização associadas à carcinogénese.

A ativação do fator de transcrição nuclear eritróide (Nrf2) e a sua repressão pela proteína Keap1 durante o stresse oxidativo está bem documentada (Ramos 2008). A expressão basal e a indução de genes que codificam para enzimas de fase II são mediadas por elementos de resposta antioxidante (ARE). O ARE é uma sequência promotora que regula a transcrição de genes necessários para manter o estado redox e para proteger dos danos oxidativos. O Nrf2 está envolvido na regulação da expressão de genes mediada pelo ARE. O Nrf2 é essencial para coordenar a expressão de genes de resposta a condições de stresse ou enzimas protetoras como catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase. Em condições fisiológicas normais, o Nrf2 forma um complexo inativo com o regulador negativo, Keap1 que controla a sua localização subcelular. Os resíduos de cisteína presentes na Keap1 funcionam como sensores redox. A oxidação ou modificação química de alguns dos resíduos de cisteína facilita a dissociação do Nrf2 da Keap1 e conseqüentemente a

sua translocação para o núcleo. Assim sendo o Nrf2 constitui um regulador redox único que pode ser modulado em resposta a desequilíbrios causados por stresse oxidativo.

Os fatores de transcrição nuclear, NFκB encontram-se ativados em vários tipos de tumores (Ramos 2008). A sua ativação promove o desenvolvimento e/ ou progressão dos tumores através da regulação da expressão de genes envolvidos no crescimento e proliferação celular, anti-apoptose, angiogénese e metástase. Os fatores de transcrição NFκB são compostos por homo ou heterodímeros das proteínas REL as quais interagem com proteínas inibidoras, membros da família IκB. Como consequência da ligação às proteínas citoplasmáticas IκBs, a localização nuclear do dímero NFκB é mascarada e o NFκB é mantido no citoplasma (Figura 12). Em resposta a citosinas pro-inflamatórias tais como o fator de necrose tumoral (TNF) a interleucina-1 (IL-1), lipossacarídeo bacteriano (LPS) ou RNA viral de cadeia dupla (dsRNA), as IκBs são rapidamente fosforiladas e sofrem ubiquitinação e proteólise pelo proteossoma, o que permite a libertação e translocação para o núcleo do NFκB, onde este vai ativar a transcrição de genes alvo. Pensa-se que a atividade do NFκB é regulada pelos níveis intracelulares de ROS, no entanto o mecanismo exato permanece por elucidar.

As vias de sinalização de MAP cínases (cínases de proteínas ativadas por mitogénios) desempenham um papel fundamental no controlo da proliferação, diferenciação e apoptose. Estas vias são geralmente ativadas por estímulos extracelulares, como fatores de crescimento e stresse oxidativo (Huang, Han et al. 2010). O mecanismo pelo qual os polifenóis modulam estas vias ainda não está bem esclarecido. Alguns polifenóis podem ligar-se diretamente a alguns componentes das vias de sinalização e assim alterar a sua atividade e/ou dependendo da dose, tempo de tratamento e do tipo celular, os polifenóis também podem ter um efeito prooxidante, aumentando o stresse oxidativo e ativando vias de sinalização ativadas por espécies reativas de oxigénio, como as vias mediadas pelas MAP cínases, contribuindo para o seu efeito apoptótico em células tumorais (Seifried, Anderson et al. 2007; Hou and Kumamoto 2010). Este efeito parece depender das características bioquímicas da célula já que parece existir uma seletividade dos efeitos citotóxicos dos polifenóis para as células tumorais quando comparado com as células normais (Nair, Li et al. 2007). Torna-se importante realizar estudos para perceber a relação entre o estado redox celular e o estado de ativação de vias de sinalização no efeito anticarcinogénico dos polifenóis.

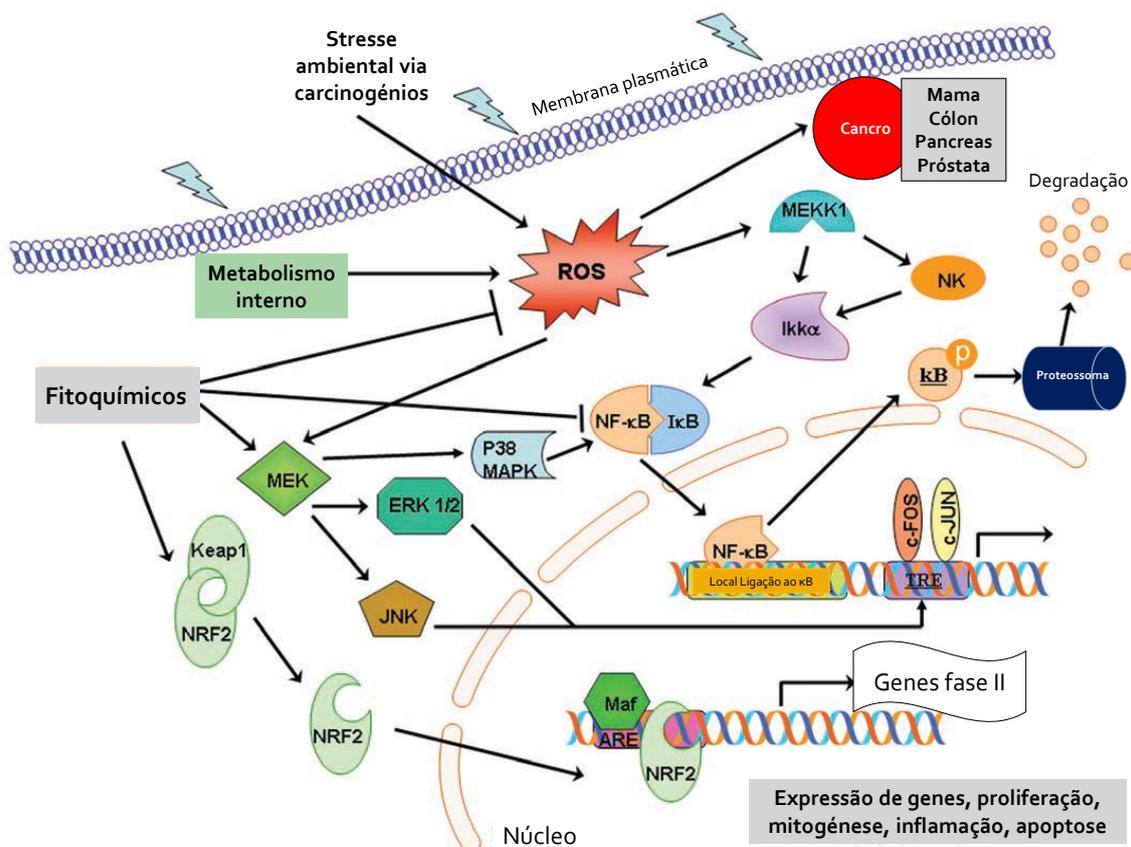


Figura 12. Interligação de vias de sinalização celular ativadas por stress oxidativo, adaptado de Acharya e colaboradores (Acharya, Das et al. 2010).

A formação de radicais livres era inicialmente vista como nefasta para a saúde humana, contudo atualmente sabe-se que os radicais livres desempenham um papel crucial em vários processos fisiológicos normais.

Atualmente, os radicais livres não são apenas vistos como fatores nefastos, mas também, como mensageiros envolvidos na sinalização intra e intercelular (Halliwell 2006). Adicionalmente, considera-se que um certo nível de espécies reativas é essencial para estimular muitos desses processos e que a sua remoção em demasia pode ter implicações nefastas para o organismo – Teoria de Hormesis (Finley, Kong et al. 2011).

Não obstante os seus efeitos benéficos, a utilização de antioxidantes é um tema que tem recebido bastante atenção por um lado porque parece existir uma ligação entre o

consumo de alguns antioxidantes e o aumento da mortalidade e por outro lado a ausência de evidências, *in vivo*, que comprovem o efeito protetor de antioxidantes no surgimento e progressão de cancro e doenças cardiovasculares.

A atividade antioxidante de antocianinas foi comprovada através da captação de espécies reativas de oxigénio e da inibição da oxidação de lipoproteínas e agregação de plaquetas (Miguel 2011). Estes factos sugerem que estas podem ter um papel importante na proteção de doenças cardiovasculares (Lila 2004). Antocianinas purificadas e misturas ricas em antocianinas podem evitar a quebra de DNA (Acquaviva, Russo et al. 2003) e inibir a peroxidação lipídica (Satué-Gracia, Heinonen et al. 1997).

Estes compostos têm a capacidade de atuar como antioxidantes através de um mecanismo de sequestração de radicais livres com a formação de espécies pouco reativas, e posteriormente quinonas (Figura 10) (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández et al. 2009).

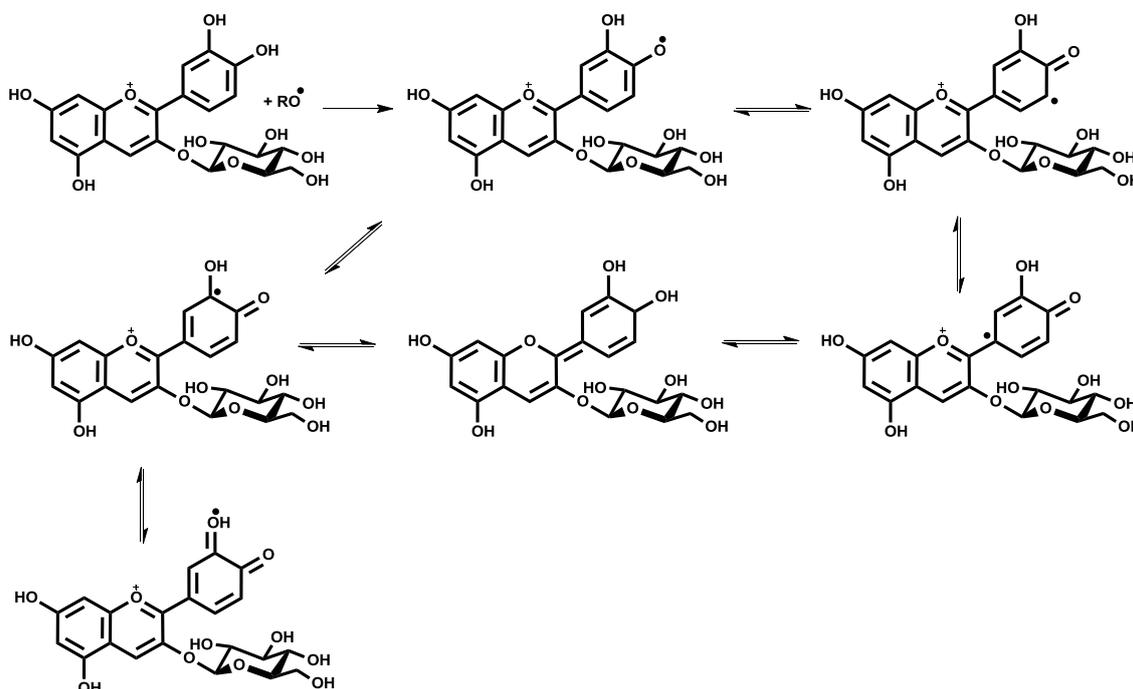


Figura 13. Mecanismo de estabilização da forma semiquinona, formada por oxidação da Cy3glc (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández et al. 2009).

A capacidade antioxidante das antocianinas é determinada pela sua estrutura, especialmente pela presença de anéis aromáticos, que concedem a capacidade de suportar um elétron desemparelhado como resultado da deslocalização do sistema eletrónico (Figura 13).

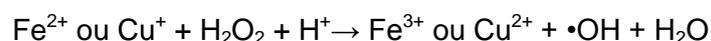
Outro aspeto importante na estrutura das antocianinas é a presença de grupos hidroxilo. Em geral a atividade antioxidante das antocianinas aumenta com o aumento do número de grupos hidroxilo livres no anel B (Tabela 2).

As antocianinas com grupos catecol podem rapidamente quelatar iões metálicos e formar complexos estáveis, inibindo a formação de  $\bullet\text{OH}$  (Sarma, Sreelakshmi et al. 1997). O número e posição dos grupos metoxilo presentes no anel B também parecem influenciar a estabilidade e reatividade destes pigmentos e consequentemente a sua atividade antioxidante (Muselík, García-Alonso et al. 2007).

## **1.2. Stresse oxidativo, danos no DNA e a Reação de Fenton**

### *1.2.1. Papel do ferro na formação de ROS*

A formação de peróxidos, tais como  $\text{H}_2\text{O}_2$ , é um processo que ocorre naturalmente durante a respiração celular. Durante os mecanismos de sinalização celular também se formam ROS ou RNS. Estas espécies podem formar potentes oxidantes se esses processos não forem controlados, conduzindo a danos celulares e ao stresse oxidativo. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é reduzido in vivo por  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$ , resultando na formação de  $\bullet\text{OH}$  via reação de Fenton:



Os danos no DNA podem ocorrer ao nível da cadeia fosfodiéster (cadeia simples) quer ao nível dos nucleótidos. Os danos no DNA podem originar mutações genéticas, cancro ou morte celular.

Sendo a cadeia de DNA composta por grupos fosfato e por nucleótidos carregados negativamente, os iões metálicos podem-se ligar à cadeia de DNA por ligações eletroestáticas ou por ligações covalentes aos nucleótidos, tornando a cadeia de DNA mais estável.

A formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em resposta a um stresse permite que os iões metálicos localizados próximos da cadeia de DNA reajam com este formando radicais  $\bullet\text{OH}$ .

### 1.2.2. Efeito prooxidante dos complexos polifenol-ferro

Vários estudos descrevem o efeito prooxidante dos polifenóis, não podendo esta atividade ser menosprezada. Na presença de ferro, os polifenóis são facilmente desprotonados a pH fisiológico ou a pH mais ácido formando complexos estáveis (Moran, Klucas et al. 1997).

As estruturas catecol ou pirogalhol podem quelatar o  $\text{Fe}^{3+}$ , reduzindo-o a  $\text{Fe}^{2+}$ , sendo o polifenol oxidado a semiquinona (Figura 14). Na forma de semiquinona o polifenol pode reduzir uma segunda molécula de  $\text{Fe}^{3+}$ , com simultânea oxidação a quinona (Figura 14).

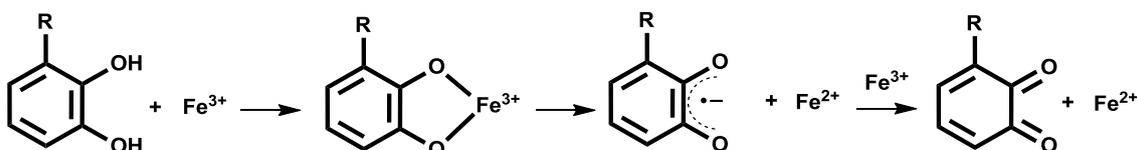


Figura 14. Quelatação do  $\text{Fe}^{3+}$  por grupos catecol ou pirogalhol, com subsequente formação de quinonas e semiquinona. Catecol, R= H, Pirogalhol, R= OH

A redução do  $\text{Fe}^{3+}$  ocorre a pH baixos podendo este efeito ser relevante durante o processo de digestão no estômago (Schweigert, Zehnder et al. 2001). A pH mais elevado, a formação de complexos com o  $\text{Fe}^{3+}$  (dois ou três polifenóis ligados a um ião ferro) inibe o processo de redução do  $\text{Fe}^{3+}$  (Jameson and Linert 2001). O  $\text{Fe}^{2+}$  forma complexos com polifenóis muito menos estáveis (Schweigert, Zehnder et al. 2001).

Este processo de redução do ferro é normalmente atribuído à atividade antioxidante e prooxidante destes compostos (Pulido, Bravo et al. 2000; Ryan and Hynes 2007), uma vez que a redução de  $\text{Fe}^{3+}$  origina  $\text{Fe}^{2+}$  que pode participar na reação de Fenton originando formação de ROS (Puppo 1992).

As catequinas do chá verde, EGCG e ECG, estão descritas como capazes de reduzir quatro moléculas de  $\text{Fe}^{3+}$  (Ryan and Hynes 2007). O ácido gálico e as catequinas do

chá verde, EGCG e ECG, foram já descritos como capazes de provocar danos em cadeias de DNA por formação de complexos polifenol-ferro (Moran, Klucas et al. 1997; Ohashi, Yoshinaga et al. 2002). Outros polifenóis, como a miricetina, a quercetina e a catequina estiveram associados a um aumento na formação de  $\bullet\text{OH}$  (Puppo 1992).

### **1.3. Métodos de análise da atividade antioxidante de polifenóis**

#### *1.3.1. Métodos de quantificação do efeito dos polifenóis nos danos do DNA induzidos pelo ferro*

Os ensaios com modelos celulares envolvem muitas variáveis e podem dificultar a associação do efeito antioxidante de um polifenol à sua capacidade de ligação ao ião metálico. Por este motivo, muitos ensaios *in vitro* têm sido realizados para compreender se o mecanismo de atividade antioxidante dos polifenóis implica ou não a ligação destes a iões ferro.

Os dois métodos mais comuns para avaliar o efeito protetor dos polifenóis nos danos no DNA induzidos pelo ferro incluem: análise do DNA por eletroforese em gel de agarose e a degradação oxidativa da desoxirribose.

Este último, embora permita uma análise rápida de diferentes compostos, não é realizado em condições semelhantes às biológicas (o substrato não é a molécula de DNA). Por outro lado apresenta um problema técnico inerente que se prende com o comprimento de onda a que são medidos os produtos de degradação da desoxirribose, 532 nm, é o comprimento de onda de absorção de muitos complexos polifenol- $\text{Fe}^{3+}$ .

De acordo com o que foi referido, a análise do DNA por eletroforese parece a técnica mais indicada. Em termos gerais os polifenóis protegem o DNA dos danos resultantes de sistemas contendo  $\text{Fe}^{2+}$ , em concentrações biológicas relevantes, na ordem dos micromolar (Perron and Brumaghim 2009).

Muitos mecanismos têm sido propostos para o efeito protetor dos polifenóis do stresse oxidativo e da formação de ROS/RNS *in vitro* e *in vivo*. Vários métodos espectrofotométricos têm sido usados para avaliar a capacidade dos polifenóis de sequestrar radicais livres e avaliar o seu poder redutor, incluindo o método DPPH (*Diphenyl-1-picrylhydrazily assay*) e o método FRAP (*The Ferric Reducing Ability Power assay*).

### 1.3.2. DPPH

Em 1997, *Bondet* e colaboradores descreveram um método envolvendo a utilização de um radical livre e estável, o DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Figura 15), que reage com o antioxidante numa solução de metanol (Bondet, Brand-Williams et al. 1997).

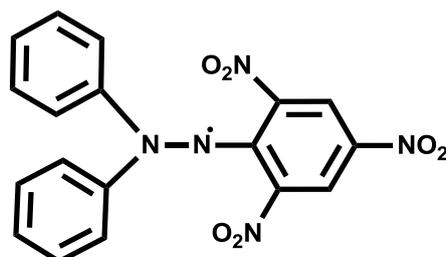


Figura 15. Estrutura química do 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

A redução da concentração do DPPH• é monitorizada pelo decréscimo da absorvância no comprimento de onda característico, durante a reação. Na sua forma radical, o DPPH• absorve a 515 nm, mas após a redução por um antioxidante ou uma espécie radical a absorção desaparece. A capacidade de neutralizar radicais livres pode ser avaliada usando o DPPH como radical livre.

### 1.3.3. FRAP

O método FRAP (Ferric Reducing Ability Power) tem sido utilizado com frequência na avaliação dos componentes antioxidantes dos polifenóis da dieta. Este método foi desenvolvido para avaliar a capacidade redutora do plasma a pH reduzido. Esta técnica depende da redução do complexo de tripiridiltriazina férrica [Fe(III)-TPTZ2]<sup>3+</sup> a tripiridiltriazina ferrosa [Fe(II)-TPTZ2]<sup>2+</sup>, por um antioxidante, normalmente em condições não fisiológicas, com pH a cerca de 3,6 (Figura 16).

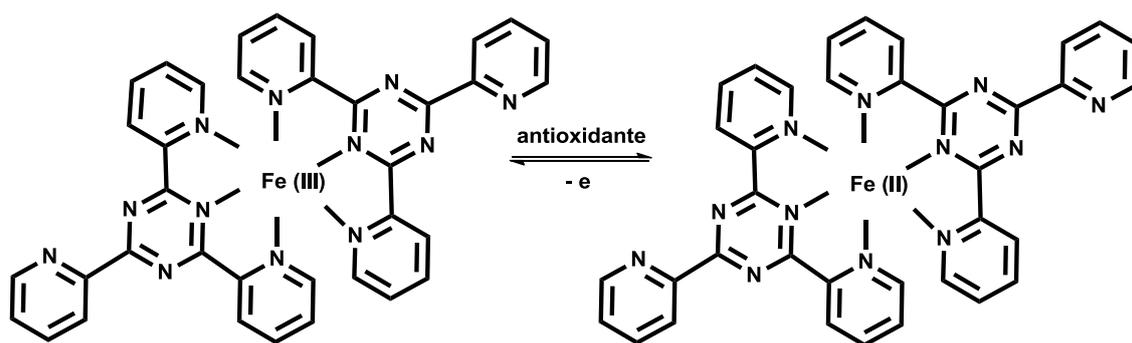


Figura 16. Redução do complexo de tripiridiltriazina férrica  $[\text{Fe}(\text{III})\text{-TPTZ}]^{3+}$  a tripiridiltriazina ferrosa  $[\text{Fe}(\text{II})\text{-TPTZ}]^{2+}$ .

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

## 2. Objetivos

O objetivo deste capítulo prende-se com o desenvolvimento da hemi-síntese enzimática em grande escala de metabolitos metilados das antocianinas: Dp3glc, Cy3glc e Pt3glc, e sua posterior caracterização estrutural por HPLC-DAD-MS e RMN. Para tal o objetivo inicial deste trabalho consistiu na extração, isolamento e purificação de antocianinas a partir de películas de uvas tintas, que serão usadas para a hemi-síntese de outros compostos derivados e para os estudos das suas propriedades biológicas.

A avaliação das propriedades antioxidantes e biológicas foi precedida pelo estudo da biodisponibilidade intestinal dos conjugados num modelo *in vitro*.

No primeiro capítulo desta parte do trabalho selecionaram-se técnicas para determinar a capacidade antirradicalar e o poder redutor dos metabolitos sintetizados em comparação com as antocianinas nativas (DPPH e FRAP respetivamente). Foi igualmente avaliado o efeito dos compostos na manutenção da integridade do DNA na presença de radicais hidroxilo.

Por outro lado, foi avaliada a capacidade antitumoral dos metabolitos caracterizados e purificados frente a três linhas celulares tumorais humanas.



### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Reagentes

O acetonitrilo, o dimetilsulfóxido (DMSO), gel sílica 100 C-18 de fase reversa (China), a resina de poliamida (60-80 Mesh) e o TPTZ (2,4,6-tripiridil-triazina) foram adquiridos à Fluka<sup>®</sup> Chemika (Buchs, Suíça). O gel Toyopearl HW-40S foi da marca Tosoh<sup>®</sup> (Tokyo, Japão). O ácido tricloroacético foi adquirido à Merck<sup>®</sup> (Darmstadt, Alemanha). O ácido fórmico, o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), o FeCl<sub>3</sub>, o Hepes, o metanol e a s-adenosil-L-metionina (SAM), o trolox, e todos os restantes reagentes foram adquiridos à Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Madrid, Espanha).

#### 3.2. Obtenção dos extratos de antocianinas

As antocianinas de películas de uvas tintas (*Vitis vinifera*) foram extraídas com uma solução hidroalcoólica a 50 % (v/v) (pH = 1,5) durante 48 h à temperatura ambiente. O extrato foi filtrado em lã de vidro de modo a remover as partes sólidas e de seguida purificados por cromatografia em coluna em resina de poliamida (60-80 Mesh). Inicialmente, eluindo com água, removeram-se as oses e os ácidos fenólicos presentes no extrato. Com uma solução água/metanol a 10 % (v/v) acidulada recolheu-se a fração contendo as antocianinas e uma fração com uma solução água/metanol a 30 % (v/v) acidulada, para eluir as antocianinas aciladas presentes no extrato de uva. As frações foram concentradas num evaporador rotativo sob vácuo (30 °C) e congeladas em água.

#### 3.3. Preparação das frações microssomal e citosólica de fígado de rato

Ratos *Wistar* (Iberian Harlan, S.L., Barcelona, Espanha), mantidos sob condições ambientais controladas (22-24 °C, 12 h ciclos de escuridão/luz), foram anestesiados com 300 mg/kg de peso corporal de pentobarbital sódico e posteriormente perfundidos (artéria aorta) com uma solução salina (NaCl 0,9 % p/v). O fígado foi extraído, pesado e homogeneizado em solução A (62,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4) (2 mL/g de tecido), utilizando um homogeneizador Thomas-type Teflon<sup>®</sup>

(DuPont, Wilmington, DE), tendo sido sempre mantido em gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 12000 g, durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi ultracentrifugado a 100000 g, durante 60 min a 4 °C, para isolar os microssomas (Pfohl-Leskowicz, Pinelli et al. 1998). Recolheu-se o sobrenadante (proteína citosólica) e lavou-se o sedimento de microssomas com solução A e efetuou-se uma nova ultracentrifugação a 100000 g, durante 30 min a 4 °C. Rejeitou-se o sobrenadante e suspenderam-se os microssomas por sonicação em solução B (100 mM Hepes, 100 mM sacarose, pH 7,2). Quantificaram-se as proteínas citosólicas e dos microssomas pelo método de Bradford (Bradford 1976), utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão. Ambas as frações foram aliquoteadas e armazenadas a -80 °C.

### **3.4. Hemi-síntese enzimática de metabolitos metilados de antocianinas**

As antocianinas: Dp3glc, Cy3glc e Pt3glc foram incubadas com a fração citosólica de fígado de rato num volume final de 5 mL de tampão Tris-HCl (40 mM), a pH 7,4. A mistura reacional continha 10 mg/mL de proteína citosólica, à qual foi inicialmente adicionado MgCl<sub>2</sub> (10 mM), SAM (2,5 mM), e finalmente o substrato dissolvido em água (1,5 mM). A mistura foi incubada a 37 °C durante 2 h com agitação constante, em microtubos fechados. O controlo negativo foi realizado na ausência do cofator, SAM.

A reação foi terminada por adição à mistura de metanol acidificado com HCl (2 %) para precipitar as proteínas presentes em solução e posteriormente centrifugada a 7000 g durante 5 min. A identificação dos metabolitos formados foi realizada primeiramente por injeção de 20 µL do sobrenadante num HPLC-DAD e posteriormente por LC-DAD-MS em modo positivo. O sobrenadante restante foi armazenado a -18 °C para posterior utilização. Os metabolitos obtidos nestas condições experimentais foram posteriormente purificados por HPLC preparativo tal como se descreve adiante.

### 3.5. Análise dos compostos por HPLC

#### 3.5.1. HPLC-DAD

O extrato de antocianinas de uvas tintas e os metabolitos metilados foram analisados por HPLC, tendo-se usado o sistema *Elite Lachrom* (L-2130) equipado com uma coluna (250 x 4,6 mm i.d.) C-18 de fase reversa (Merck®, Darmstadt); a deteção foi realizada a 520 nm usando um detetor com barra de díodos (DAD) (L-2455). Os solventes foram, A: H<sub>2</sub>O/HCOOH (9:1) e B: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/HCOOH (6:3:1). O gradiente consistiu em 26-45 % de B durante 50 min, 45-85 % de B durante 25 min e 85-0 % de B durante 10 min, com um fluxo de 1,0 mL/min. A coluna foi lavada com 100 % de B durante 20 min e depois estabilizada com as condições iniciais durante 20 min. O varrimento dos picos foi realizado entre os 200 e os 700 nm. Os compostos foram inicialmente identificados de acordo com o tempo de retenção e com o espectro de UV-Vis.

#### 3.5.2. HPLC-DAD-MS

As antocianinas do extrato de uvas tintas e os metabolitos metilados foram analisados por HPLC acoplado a um espectrómetro de massa (LC-MS), tendo-se usado um cromatógrafo líquido Hewlett-Packard 1100 Series com uma coluna de fase reversa AQUA® (*Phenomenex, Torrance, CA, USA*) (150 x 4,6 mm, 5 µm, C18) termostaticada a 35 °C. Os solventes usados foram, A: H<sub>2</sub>O/HCOOH (9,9:0,1) e B: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/HCOOH (6,9:3:0,1), usando o mesmo gradiente descrito anteriormente para a análise por HPLC-DAD. O detetor de massa foi um Finnigan LCQ (*Finnigan Corporation, San Jose, USA*) equipado com uma fonte API, usando uma interface de ionização *electrospray* (ESI). O gás utilizado foi uma mistura de azoto e hélio. A voltagem capilar foi de 3 V e a temperatura capilar de 190 °C. Os espectros foram obtidos em modo positivo entre *m/z* 120 e 1500. O espectrómetro foi programado de forma a realizar três séries de varrimentos consecutivos: um de massa total, uma ampliação dos iões mais intensos do primeiro varrimento, e um MS-MS do ião mais intenso usando uma energia de colisão relativa de 30 e 60%, respetivamente.

### **3.6. Purificação dos compostos por HPLC preparativo**

Cada uma das 5 antocianinas monoglicósidas e os metabolitos metilados da Dp3glc, Cy3glc e Pt3glc foram purificados por HPLC preparativo, tendo-se usado o sistema Knauer (K-1001) equipado com uma coluna (250 x 4,6 mm i.d.) C-18 de fase reversa (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt); a deteção foi efetuada a 520 nm usando um detetor DAD, Knauer (K-2800). Os solventes e o gradiente foram os mesmos descritos anteriormente para a análise por HPLC-DAD.

Cada pigmento foi recolhido, concentrado sobre vácuo e submetido a uma última purificação em gel de sílica 100 C-18 (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt) de fase reversa usando um sistema de filtração por vácuo. A amostra foi aplicada no topo do funil de filtração e eluída inicialmente com água destilada de modo a remover sais inorgânicos e outras impurezas orgânicas. Os pigmentos purificados foram recuperados com metanol destilado acidulado com HCl. A esta purificação seguiu-se uma extração líquido-líquido (água-acetato etilo) para remover possíveis contaminações orgânicas. A fase aquosa foi liofilizada e armazenada a -18 °C para posterior caracterização estrutural e avaliação das propriedades biológicas.

### **3.7. Caracterização estrutural dos metabolitos metilados de antocianinas por RMN**

Os espetros de RMN dos pigmentos foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance III <sup>1</sup>H RMN (400,15 MHz) e <sup>13</sup>C RMN (100,62 MHz) em CD<sub>3</sub>OD/DCl (95:5) para o metabolito 4'Me-Dp3glc e CD<sub>3</sub>OD/TFA (98:2) para a mistura 3'Me-Cy3glc/4'Me-Cy3glc, a 303 K (os desvios químicos ( $\delta$ ) foram calculados em parte por milhão, as constantes de acoplamento (J) em Hertz). Os protões foram atribuídos por <sup>1</sup>H-RMN mono e bidimensional (gCOSY, NOESY), enquanto os carbonos foram atribuídos apenas por técnicas de <sup>13</sup>C-RMN bidimensional (gHMBC e gHSQC) (Bax and Subramanian 1986; Bax and Summers 1986). O atraso para a constante de acoplamento C/H de longa distância foi otimizado para 7,2 Hz.

### **3.8. Avaliação da capacidade antirradicalar dos metabolitos metilados de antocianinas**

A avaliação da capacidade antirradicalar foi determinada utilizando o radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) segundo o método descrito na literatura com algumas modificações (Bondet, Brand-Williams et al. 1997). A reação foi efetuada em placas de 96 poços a uma temperatura de 25 °C. Preparou-se uma solução 60 µM de radical DPPH• em metanol. Colocaram-se 270 µL desta solução em cada poço. O branco foi efetuado usando metanol e o controlo foi a solução de DPPH• sem a presença de qualquer antioxidante. Adicionaram-se 30 µL de cada composto a testar à placa. Efetuaram-se leituras da absorvância a 515 nm, com intervalos de 5 min durante um período de 20 min num leitor de placas (Bio-tek Instruments Inc., Powerwave XS, Winooski, USA). Os compostos foram dissolvidos em metanol e utilizados numa concentração final de 10 µM. Após a realização de uma curva de calibração utilizando soluções de Trolox (uma análogo da vitamina E solúvel em água), com diferentes concentrações (2,5 -50 µM) (Psarra, Makris et al. 2002), os ensaios foram efetuados em triplicado e os resultados expressos em µM equivalentes de Trolox de acordo com a seguinte curva de calibração:

$$\% \text{ atividade antirradicalar} = 3,43 \times \text{equivalentes trolox } (\mu\text{M}) - 8,7461, R^2 = 0,9957$$

### **3.9. Avaliação do poder redutor dos metabolitos metilados de antocianinas**

A avaliação do poder redutor foi realizada segundo o método FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) desenvolvido por *Benzie & Strain*, com algumas modificações (Benzie and Strain 1996). Uma cor azul intensa é formada quando o complexo tripiridiltriazina férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) é reduzido a tripiridiltriazina ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

Preparou-se o reagente FRAP do seguinte modo: 10 volumes de tampão acetato 300 mM, pH 3,6 + 1 volume de solução 10 mM de TPTZ (2,4,6- tripiridiltriazina) em 40 mM de HCl + 1 volume de solução de  $\text{FeCl}_3$  20 mM. Este reagente foi aquecido numa estufa a 37 °C e foi diluído a 1/3 com tampão acetato. O branco foi efetuado com tampão acetato e para controlo utilizou-se o reagente FRAP. Numa placa de 96 poços colocaram-se 270 µL de reagente e adicionou-se 30 µL do composto a testar. Após a adição, fizeram-se leituras de absorvância a 593 nm ao tempo 0 e aos 4 min, a 37 °C, num leitor de placas (Bio-tek Instruments Inc., Powerwave XS, Winooski, USA). Os

compostos antioxidantes foram dissolvidos em metanol e foram testadas concentrações finais de 10  $\mu\text{M}$ . Os ensaios foram efetuados em triplicado e os resultados também foram expressos em  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox por regressão linear de uma curva de calibração utilizando soluções deste composto com diferentes concentrações (2,5 -50  $\mu\text{M}$ ).

Após a realização de uma curva de calibração utilizando soluções de Trolox (uma análogo da vitamina E solúvel em água), com diferentes concentrações (2,5 -50  $\mu\text{M}$ ) (Psarra, Makris et al. 2002), os ensaios foram efetuados em triplicado e os resultados expressos em  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox de acordo com a seguinte curva de calibração:

$$\% \text{ poder redutor} = 0,0388 \times \text{equivalentes trolox } (\mu\text{M}) - 0,0065, R^2 = 0,9956$$

### **3.10. Avaliação da capacidade protetora dos metabolitos metilados de antocianinas nos danos no DNA**

Os radicais hidroxilo são capazes de degradar moléculas de DNA, libertando-se os respetivos nucleótidos ou moléculas de DNA mais pequenas. O grau de proteção de cada composto foi avaliado por quantificação das moléculas de DNA de timo de vitelo que se mantiveram intactas após incubação com o oxidante.

A mistura reacional (40  $\mu\text{L}$ ) continha 5  $\mu\text{L}$  de solução de DNA de timo de vitelo (0,25 unidades/mL) (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha), à qual foi inicialmente adicionado 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (25  $\mu\text{M}$ ), 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeSO}_4$  (25  $\mu\text{M}$ ), e finalmente 5  $\mu\text{L}$  de antioxidante dissolvido em água (10  $\mu\text{M}$ ). A mistura foi incubada durante 15 min à temperatura ambiente, em microtubos fechados. A reação foi terminada por adição de tampão de carregamento (6x) (Prolabo, VWR International, Leuven, Bélgica).

O controlo continha apenas a solução de DNA de timo de vitelo. O controlo negativo continha todos os componentes da mistura reacional, com exceção do antioxidante. As amostras (10  $\mu\text{L}$ ) foram carregadas em gel de agarose (0,8 %) contendo 1 % de marcador de DNA, *Gel green<sup>TM</sup>* (Biotium, VWR International, Leuven, Bélgica). A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Acetato-EDTA (10 mM, pH 7,4) durante 15 min a 20 mA e depois durante mais 1 h a 40 mA. A quantificação das bandas foi realizada utilizando o *software Image J*.

### 3.11. Culturas celulares

Todas as manipulações que envolveram culturas celulares foram realizadas em câmara de fluxo laminar vertical nível de biossegurança 2A (ADS Laminaire). As culturas celulares foram sempre incubadas a uma temperatura de 37 °C em estufa (BINDER) contendo uma atmosfera humidificada e 5 % de CO<sub>2</sub>.

Foram utilizadas as seguintes linhas celulares tumorais humanas:

- MKN-28 – adenocarcinoma gástrico
- Caco-2 – adenocarcinoma do colon
- MCF-7 – adenocarcinoma da mama

A linha celular tumoral MKN-28 originária de epitélio gástrico humano foi gentilmente cedida pelo Professor Doutor Celso Reis do IPATIMUP (Porto, Portugal) tendo inicialmente sido adquirida à *Cell Bank, Riken BioResource Center* (JCRB0253, Ibaraki, Japão). A linha celular MCF-7 foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC22-HTB Rockville, M.D., EUA), tendo sido cedida pela Professora Doutora Conceição Calhau FMUP (Porto, Portugal).

As células cresceram em monocamada tendo sido mantida em frascos de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> com 5 mL de meio de cultura. O meio de cultura foi feito com RPMI-1640 AQMedia, suplementado com 10 % de SFB inativado (por aquecimento durante 1 h a 56 °C em banho de água), 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Madrid, Espanha).

A linha celular Caco-2 foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC37-HTB Rockville, M.D., EUA), tendo sido cedida pela Professora Doutora Conceição Calhau FMUP (Porto, Portugal). Estas células (passagens 41-58) cresceram em MEME (*Minimum Essential Medium Eagle*) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Madrid, Espanha) suplementado com 15 % de SFB, 25 mM HEPES, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Madrid, Espanha).

As células foram mantidas em crescimento exponencial, tendo-se para tal procedido à sua subcultura, por tripsinização, uma ou duas vezes por semana.

Para a manutenção da divisão das células em cultura após remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS), tendo-se sido destacadas do frasco de cultura com 0,25 % de tripsina-EDTA, diluídas a 1:3 e

cultivadas em placas de petri com 21 cm<sup>2</sup> de área de crescimento (Corning Costar, Badhoevedorp, The Netherlands).

### 3.11.1. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada com o corante vital, azul de tripano. Após tripsinização foi determinado, em todas as suspensões celulares, o número total de células viáveis tendo-se para tal adicionado a 50 µL de suspensão celular, 50 µL de azul de tripano e procedido à contagem, em câmara de *Neubauer*, das células que apresentaram capacidade de excluir o azul de tripano (incolores) que corresponderam às células viáveis. O número de células viáveis foi dado por mL de suspensão celular.

### 3.12. Ensaio SRB para avaliação do efeito antitumoral dos compostos

De cada um dos compostos foram preparadas soluções-mãe em água na concentração de 200 mM. Estas soluções foram conservadas a -18 °C, o que permitiu obter uma amostragem uniforme nos vários ensaios ao longo de todo o trabalho. Antes de cada ensaio as soluções-mãe foram descongeladas e sonicadas durante 5 min de modo a obter uma boa solubilização dos compostos. Procedeu-se, imediatamente antes de cada ensaio, à diluição apropriada dos compostos. O efeito dos compostos no crescimento das linhas celulares tumorais humanas foi avaliado segundo o método adotado pelo NCI (Bethesda, EUA) no programa “*In vitro Anticancer Drug Discovery Screen*” (Skehan, Storeng et al. 1990; Monks, Scudiero et al. 1991). Trata-se de um micrométodo que utiliza placas de 96 poços e que avalia o efeito de compostos sobre células em crescimento exponencial após uma exposição contínua de 48 h, através da quantificação do conteúdo proteico celular pelo corante de proteínas sulforodamina B (SRB).

Este método permite avaliar, simultaneamente, o efeito de dois compostos em 3 linhas celulares diferentes, no entanto neste ensaio testou-se apenas uma linha celular por placa. Na Figura 17 encontra-se uma representação esquemática da placa com distribuição das diferentes concentrações dos dois compostos pela placa.

Cada linha celular foi inoculada em placas de 96 poços de fundo plano (100 µL/poço) na densidade que assegurou o crescimento exponencial ( $1,5 \times 10^5$  células viáveis/mL),

em meio de cultura e incubada durante 24 h antes da adição dos compostos, a fim de permitir a aderência e estabilização das células. Foi testada uma gama de concentrações de cada composto, tal como descrito nos resultados e discussão (100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ), as quais foram preparadas por diluição seriada (1:2 ou 1:3) em meio de cultura.

Em cada ensaio os compostos foram testados em sextuplicado. As colunas 6 e 7 funcionaram como controlo do crescimento das várias linhas celulares. Por cada ensaio foi preparada uma placa idêntica, a qual foi designada por placa T0 (tempo zero), que serviu para determinar o conteúdo proteico celular no momento de adição dos compostos. Esta placa foi fixada imediatamente antes da adição dos compostos às placas teste com uma solução de ácido tricloroacético (TCA) durante 60 min a 4 °C.

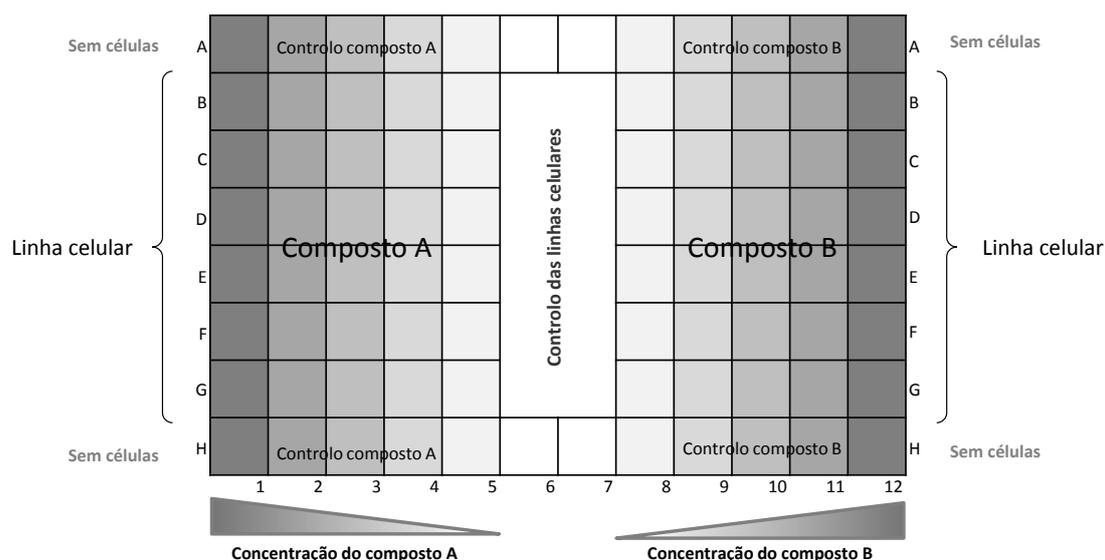


Figura 17. Representação esquemática da placa de 96 poços mostrando a distribuição da linha celular e das cinco concentrações dos dois compostos A e B ao longo da placa. Representados estão também o controlo das linhas celulares (não expostas aos compostos) e o controlo dos compostos A e B (sem células).

Após 48 h de exposição aos compostos, as células foram fixadas com uma solução de TCA 50 % durante 60 min a 4 °C, à qual se seguiu uma lavagem com  $\text{H}_2\text{O}$ . Depois de totalmente secas as células foram coradas com uma solução de SRB (0,4 % em 1 % de ácido acético glacial) (50  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) por 30 min, à temperatura ambiente. O excesso de SRB foi removido por lavagem da placa com solução de ácido acético a 1 %.

SRB foi posteriormente solubilizado com tampão Tris-HCl (1 M em H<sub>2</sub>O, pH 8,0) (100 µL/poço). Procedeu-se à leitura da absorvância a 492 nm em espectrofotómetro de placas (Bio-tek Instruments Inc., Powerwave XS, Winooski, EUA).

A proliferação celular foi expressa em termos de percentagem de densidade ótica (DO) relativamente à densidade ótica apresentada pelas células controlo.

### 3.13. Estudos de transporte transepitelial

Os estudos de transporte foram realizados de acordo com um procedimento descrito na literatura (Yi, Akoh et al. 2006). Para as experiências de transporte transepitelial as células foram semeadas em *inserts* (membrana de policarbonato, poro com 0,4 µm, 24 mm de diâmetro, Corning Costar, Badhoevedorp, The Netherlands) (Figura 18). Os *inserts* foram colocados em placas de 6 poços nas quais cresceram e diferenciaram durante 21 dias. No período de 24 h anterior a cada experiência, as células foram mantidas em meio de cultura sem SFB. A resistência elétrica transepitelial (TEER) das células que cresceram em *transwell* foi medida utilizando um voltímetro epitelial com eletródios planos (MILLICELL-ERS, Millipore Co., Bedford, MA). As experiências foram efetuadas em monocamadas com TEER > 230 Ω. Removeu-se o meio de cultura e lavaram-se as células com meio Hanks. A solução de antocianinas e metabolitos (em meio Hanks com 5,5 mM de glicose ou com 1 mM butirato, 100 µM) foi adicionada ao lado apical das células e Hanks com 2 % de SFB foi adicionado ao compartimento basolateral. O transporte transepitelial foi seguido em função do tempo. Recolheram-se alíquotas (150 µL) do lado basolateral e repôs-se o volume com meio Hanks aos 30, 60 e 120 min. As amostras foram acidificadas com HCl (0,06 M) e congeladas (-18 °C) por forma a garantir que a quantidade cumulativa de cada composto não sofria alteração até análise por HPLC-DAD (de acordo com o procedimento descrito acima). As antocianinas, o metabolito 3', 4'-Me-Cy3glc e o metabolito 4'-Me-Dp3glc foram quantificados utilizando as seguintes curvas de calibração:

Curva calibração da Mv3glc (µM): Concentração = 52573 x área, λ = 520 nm, R<sup>2</sup> = 0,9993

Curva calibração da 4'-Me-Dp3glc (µM): Concentração = 32974 x área, λ = 503 nm, R<sup>2</sup> = 0,9918

A eficiência de transporte foi calculada de acordo com a seguinte equação:  
(concentração de composto no lado basolateral a um determinado tempo/concentração de composto no lado apical ao tempo 0) x 100

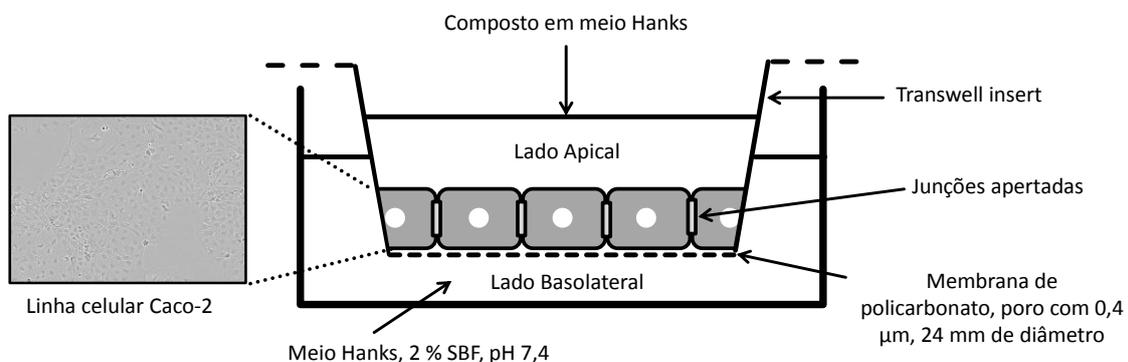


Figura 18. Representação esquemática de um poço de um transwell de 6 poços contendo um *insert* com membrana de policarbonato, 0,4 µm de poro e 24 mm de diâmetro, mostrando a localização da monocamada de células. Representados estão também o lado apical contendo o composto em meio Hanks com glicose ou butirato e o lado basolateral contendo meio Hanks com 2 % SFB, ambos os lados a pH 7,4.



## 4. Resultados

### 4.1. Extração e purificação de antocianinas

A partir de fontes naturais, películas de uvas tintas (*Vitis vinifera*), foi obtido por extração hidroalcoólica um extrato contendo antocianinas. As antocianinas obtidas neste primeiro capítulo serão usadas na hemi-síntese de metabolitos metilados, derivados pirúvicos e portisinas (Parte I - Capítulo 2). As cinco antocianinas purificadas serão igualmente avaliadas quanto às suas propriedades antitumorais frente a três linhas celulares tumorais (Parte I – Capítulo 2), bem como à sua absorção gástrica e intestinal (Parte II – Capítulo 1 e 2).

Recorreu-se a análise cromatográfica por HPLC-DAD para avaliar o conteúdo em pigmentos do extrato. Após análise da fração de água/metanol a 10 % (v/v) do extrato de uva tintas verificou-se que era composta por 5 antocianinas que diferem entre si no padrão de hidroxilação e metoxilação do catião flavílio, sendo a Mv3glc a antocianina maioritária, estando presentes as restantes quatro antocianinas não aciladas e em menor quantidade a Mv3glc acetilada (Mv3acetglc) (Figura 19, Tabela 5). A fração de água/metanol a 30 % (v/v) não foi utilizada neste trabalho.

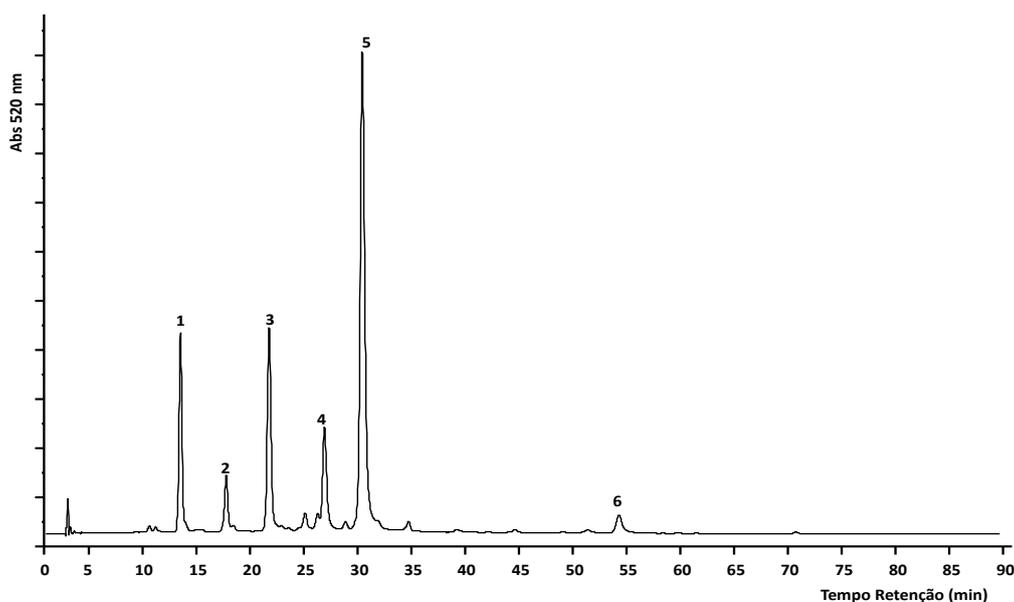


Figura 19. Cromatograma de HPLC a 520 nm, da fração água/metanol a 10 % (v/v) obtida após purificação de um extrato de uva em resina de poliamida, 1) Dp3glc, 2) Cy3glc, 3) Pt3glc, 4) Pn3glc, 5) Mv3glc e 6) Mv3acetglc.

A identificação de cada um dos picos referentes às antocianinas foi confirmada por análise LC-MS, de acordo com o que se encontra descrito na Tabela 5. Os dados de LC-MS dos extratos revelaram um íão  $[M]^+$  para cada antocianina presente e um fragmento do íão  $[M-162]^+$  correspondente à perda de uma molécula de glicose.

Tabela 5. Identificação estrutural por LC-MS das antocianinas presentes no extrato de uvas tintas.

Pico	Antocianina	$m/z$ $[M]^+$	Fragmento
1	Dp3glc	465	303 (-glc)
2	Cy3glc	449	287 (-glc)
3	Pt3glc	479	317 (-glc)
4	Pn3glc	463	301 (-glc)
5	Mv3glc	493	331 (-glc)

Após a sua identificação, as antocianinas foram isoladas por HPLC preparativo. Deste modo, a partir do extrato de uva conseguiu-se isolar: a Dp3glc (1), a Cy3glc (2), a Pt3glc (3), a Pn3glc (4) e a Mv3glc (5).

#### 4.2. Hemi-síntese enzimática metabolitos metilados das antocianinas

Ao contrário dos restantes flavonóides, a síntese química de metabolitos de antocianinas está limitada em resultado da sua baixa estabilidade nas condições de pH e temperatura das reações químicas envolvidas no processo de obtenção dos metabolitos. No sentido de ultrapassar essa limitação, o grupo de investigação propôs a obtenção de alguns metabolitos de antocianinas por via enzimática.

A hemi-síntese de metabolitos metilados das antocianinas foi conseguida por ação de enzimas hepáticas de rato. As antocianinas Dp3glc, Cy3glc e Pt3glc, foram incubadas com a fração de proteína citosólica hepática, como fonte da enzima de fase II catecol-O-metiltransferase (COMT), que catalisa a transferência de um grupo metilo da S-adenosil-L-metionina (SAM) para os hidroxilos de várias substâncias contendo orto-

difenóis. A utilização de frações subcelulares hepáticas apresenta várias vantagens em comparação com outras fontes enzimáticas, nomeadamente, custo reduzido, facilidade de utilização e constituem os sistemas *in vitro* melhor caracterizados para o estudo de biotransformação de fármacos.

Das cinco antocianinas purificadas do extrato inicial, foram utilizadas apenas três de acordo com as especificidades da enzima para o grupo catecol. De acordo com a estrutura da antocianina, percebe-se facilmente que o grupo metilo poderá apenas ser inserido no anel B do núcleo flavânico, originando isómeros posicionais com a mesma massa mas diferentes tempos de retenção no cromatograma registado por HPLC. Uma vez que a inserção de grupos metilo na molécula aumenta a sua hidrofobia, os tempos de retenção destes novos compostos deverão ser mais elevados que o da antocianina não conjugada.

#### 4.2.1. Metilação da delphinidina-3-glicose (Dp3glc)

No que se refere à incubação com a antocianina Dp3glc, apenas um novo pico cromatográfico foi detetado no cromatograma de HPLC a 520 nm (Figura 20).

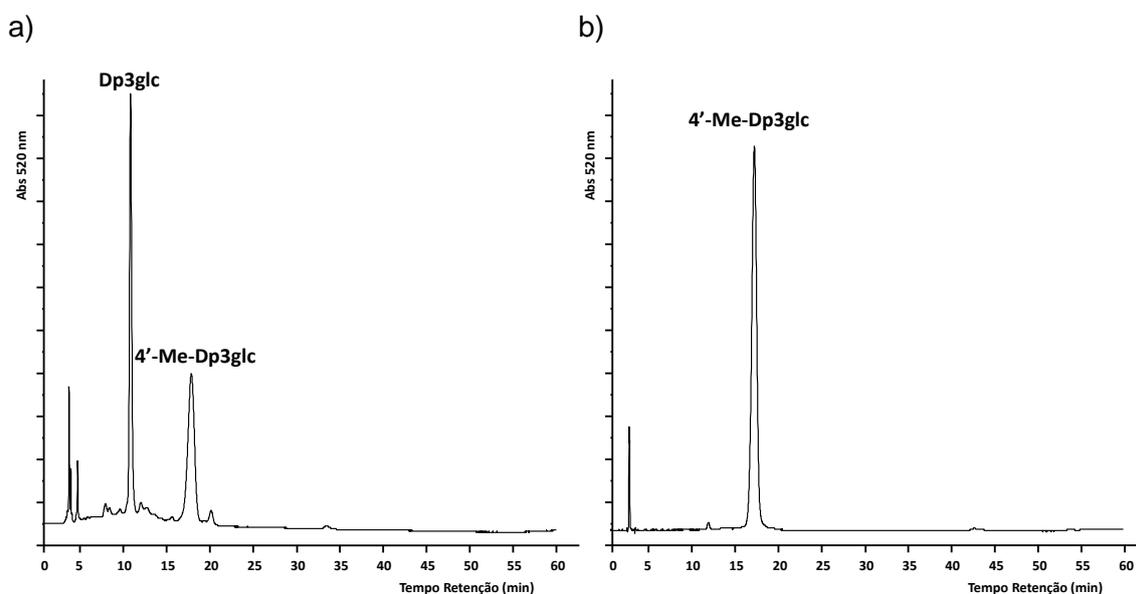
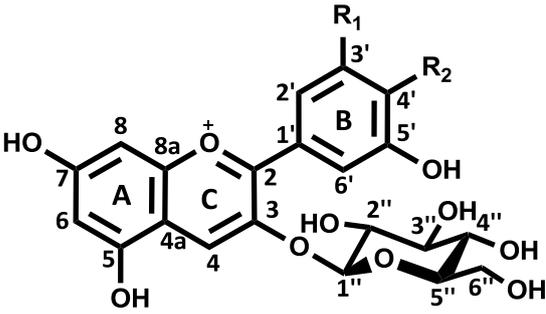


Figura 20. Cromatograma salientando os picos referentes à Dp3glc e ao seu conjugado com grupos metilo (Me-Dp3glc), obtido por HPLC-DAD a 520 nm, a) antes e b) após purificação por HPLC preparativo.

Os dados de massa do composto formado estão de acordo com a formação de um novo metabolito monometilado da Dp3glc a  $m/z$  479 e um fragmento  $[M^+ - 162]$  a  $m/z$  317 correspondendo à estrutura da aglicona o que permite afirmar que a metilação ocorreu na estrutura da aglicona (Tabela 9). Os dados de MS<sup>3</sup> apresentam um ião a  $m/z$  303 (-14) correspondente à perda de um grupo metilo da estrutura da aglicona. Contudo, o tempo de retenção no cromatograma de HPLC a 520 nm apresentado por este metabolito monometilado não está de acordo com o da antocianina petunidina-3-glicose (Pt3glc) (3'-Me-Dp3glc), indicando que a posição de metilação foi provavelmente a posição 4' do anel B da antocianina (Tabela 6).

Tabela 6. Estrutura química da antocianina Dp3glc e dos conjugados com grupo metilo. Sistema de numeração da antocianina.

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	OH	OH
<b>Pt3glc (3'-Me-Dp3glc)</b>	OCH <sub>3</sub>	OH
<b>4'-Me-Dp3glc</b>	OH	OCH <sub>3</sub>

O espectro de UV-Vis do metabolito mostra que este composto apresenta  $\lambda_{\text{máx}}$  de 503 nm, enquanto o  $\lambda_{\text{máx}}$  da Pt3glc, nas mesmas condições experimentais, é de 526 nm (Figura 21).

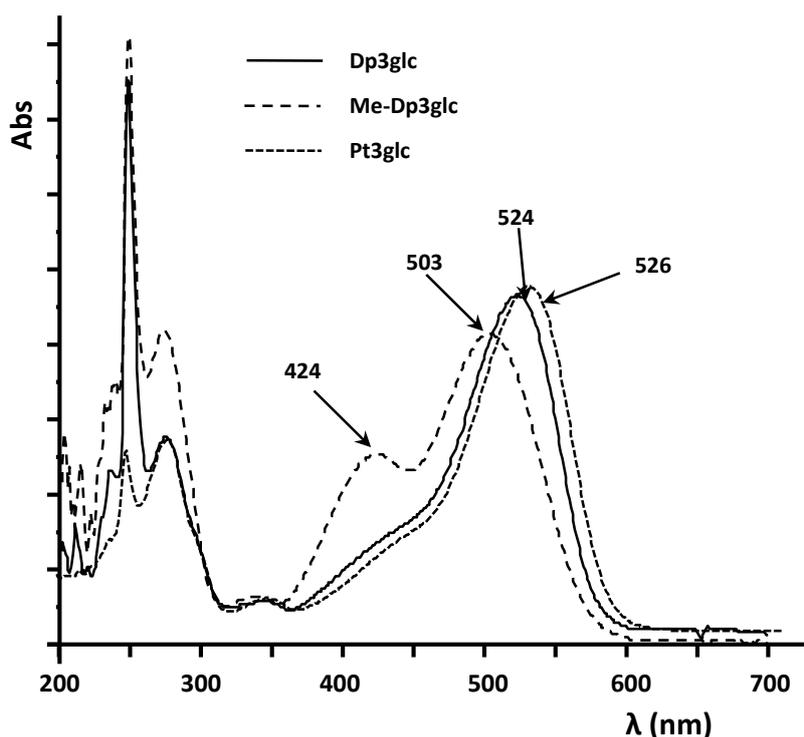


Figura 21. Espectros de UV-Vis salientando os  $\lambda_{\text{máx}}$  da Dp3glc, da Pt3glc e do conjugado com grupo metilo, registado por DAD.

Os resultados obtidos permitem identificar o local de metilação como sendo a posição 4' do anel B e estão de acordo com o que ocorre *in vivo*. A metilação na posição 4' do anel B da antocianina Dp3glc é a principal via de metabolização da Dp3glc em ratos (Ichiyanagi, Rahman et al. 2004). Este metabolito foi já identificado em diversos tecidos como o principal produto do metabolismo da Dp3glc, especialmente no fígado. Contudo, a metilação nas posições 3' ou 5' não foi observada (Ichiyanagi, Rahman et al. 2004). Por outro lado, o derivado 4'-metilado do ácido gálgico, que é o ácido fenólico resultante provavelmente da clivagem da 4'Me-Dp3glc pela flora intestinal, foi já detetado em amostras de urina humana (Shahrzad and Bitsch 1998).

#### 4.2.2. Metilação da cianidina-3-glicose (Cy3glc)

No caso da incubação com a antocianina Cy3glc, identificaram-se dois metabolitos metilados associados ao aparecimento de dois novos picos no cromatograma

registrado por HPLC-DAD, a 520 nm com tempos de retenção muito próximos (Figura 22; Tabela 7). A reação não foi completa, pelo que foi possível identificar o pico da antocianina não conjugada.

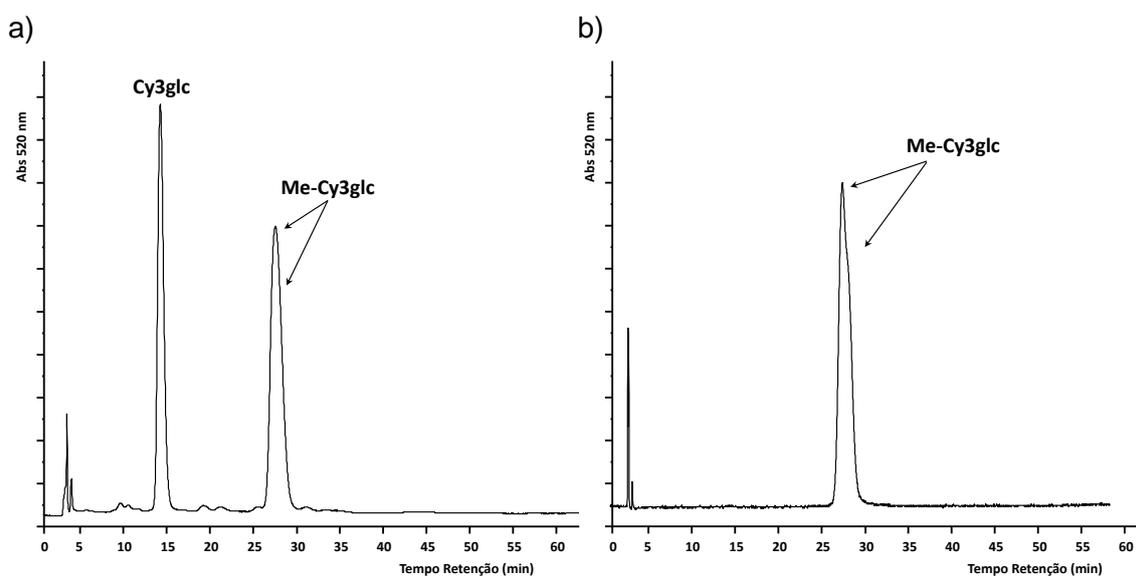
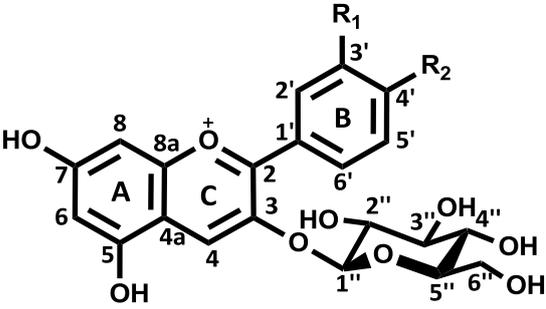


Figura 22. Cromatograma salientando os picos referentes à Cy3glc e aos seus conjugados com grupos metilo (Me-Cy3glc), obtido por HPLC-DAD a 520 nm, a) antes e b) após purificação por HPLC preparativo.

A análise destes novos picos foi realizada por HPLC-DAD-MS. A cada um dos picos correspondeu a massa  $m/z$  463 equivalente ao ião pseudomolecular  $[M+H]^+$  da antocianina com a massa do grupo metilo (Tabela 9).

A fragmentação do ião  $m/z$  463 deu origem a um fragmento de massa  $m/z$  301 correspondendo à perda de uma glicose (Tabela 9). Esta observação permite concluir que a metilação ocorreu na estrutura da aglicona. Os dados de  $MS^3$  confirmam que os compostos correspondem a metabolitos monometilados da Cy3glc, em resultado do fragmento a  $m/z$  287 (-14) correspondente à perda de um grupo metilo da estrutura da aglicona.

Tabela 7. Estrutura química da antocianina Cy3glc e dos conjugados com grupos metilo. Sistema de numeração da antocianina.

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	OH	OH
<b>Pn3glc (3'-Me-Cy3glc)</b>	OCH <sub>3</sub>	OH
<b>4'-Me-Cy3glc</b>	OH	OCH <sub>3</sub>

Por comparação entre o tempo de retenção, espectro de massa e de absorção ( $\lambda_{\text{máx}} = 517 \text{ nm}$ ) da Pn3glc nas mesmas condições de análise, não foi possível determinar inequivocamente a posição de substituição de cada isómero (Figura 23).

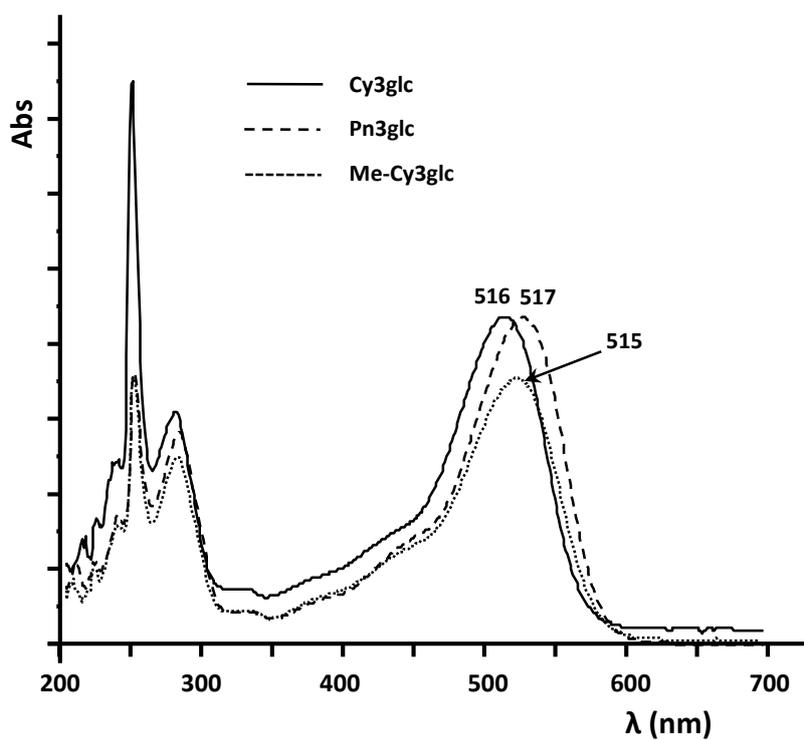


Figura 23. Espectros de UV-Vis salientando os  $\lambda_{\text{máx}}$  da Cy3glc e dos conjugados com grupos metilo, registado por DAD.

No entanto após análise por HPLC de uma amostra contendo a mistura dos dois isómeros e Pn3glc purificada, foi possível observar um aumento da área do isómero com menor tempo de retenção. Os resultados obtidos estão de acordo com trabalhos anteriores que foram capazes de identificar, *in vivo*, metabolitos metilados de Cy3glc nas posições 3' e 4', sendo o derivado metilado na posição 3' a forma predominante (Wu, Pittman et al. 2004; Ichiyanagi, Shida et al. 2005).

#### 4.2.3. Metilação da Petunidina-3-glicose (Pt3glc)

A Pt3glc purificada foi analisada por HPLC-DAD, apresentando um tempo de retenção de 18,29 min, com comprimento de onda de absorvância máxima no espectro visível ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) nos 526 nm. A Pt3glc foi incubada com fração citosólica de fígado de rato como fonte de COMT, na presença de SAM. No que se refere à incubação com a antocianina Pt3glc, apenas um novo pico cromatográfico foi detetado no cromatograma de HPLC a 520 nm (Figura 24), ao contrário do que seria de prever, uma vez que esta antocianina apresenta um grupo catecol à semelhança da Cy3glc, e no caso desta observou-se a formação de 2 novos picos. O metabolito metilado da Pt3glc foi analisado por HPLC-DAD.

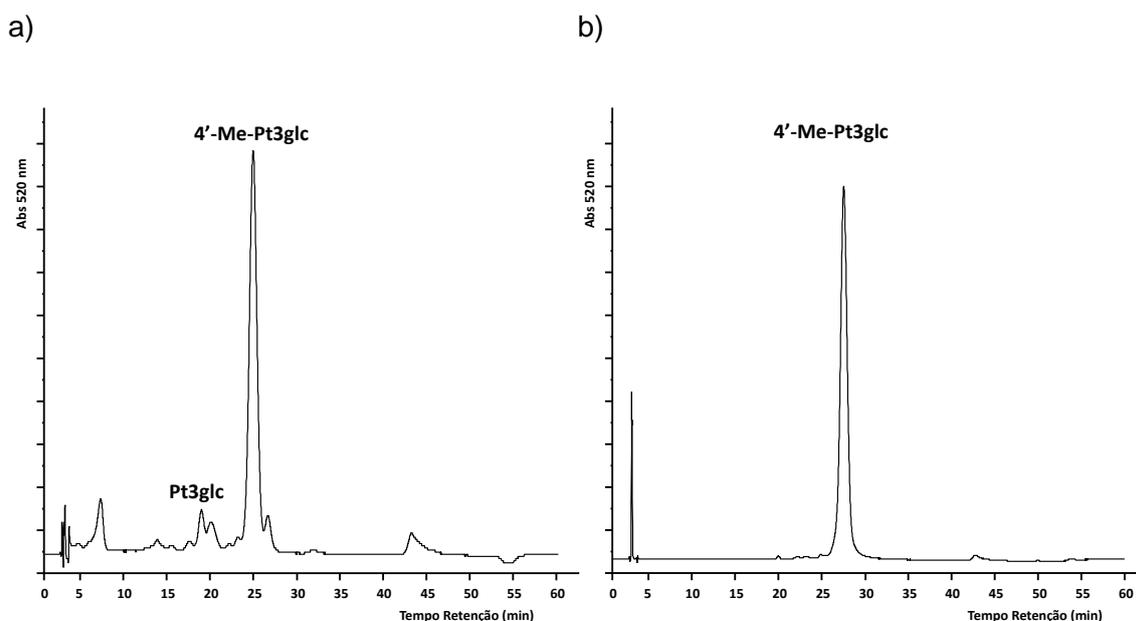


Figura 24. Cromatograma salientando os picos referentes à Pt3glc e ao seu conjugado com grupo metilo (Me-Pt3glc), obtido por HPLC-DAD a 520 nm, a) antes e b) após purificação por HPLC preparativo.

A Me-Pt3glc apresentou um tempo de retenção de 27,61 min, indicando uma maior hidrofobicidade, e foram observados novos  $\lambda_{\text{máx}}$ , aos 421 e 505 nm, verificando-se um deslocamento hipsocrômico de 21 nm face ao composto inicial (Figura 25).

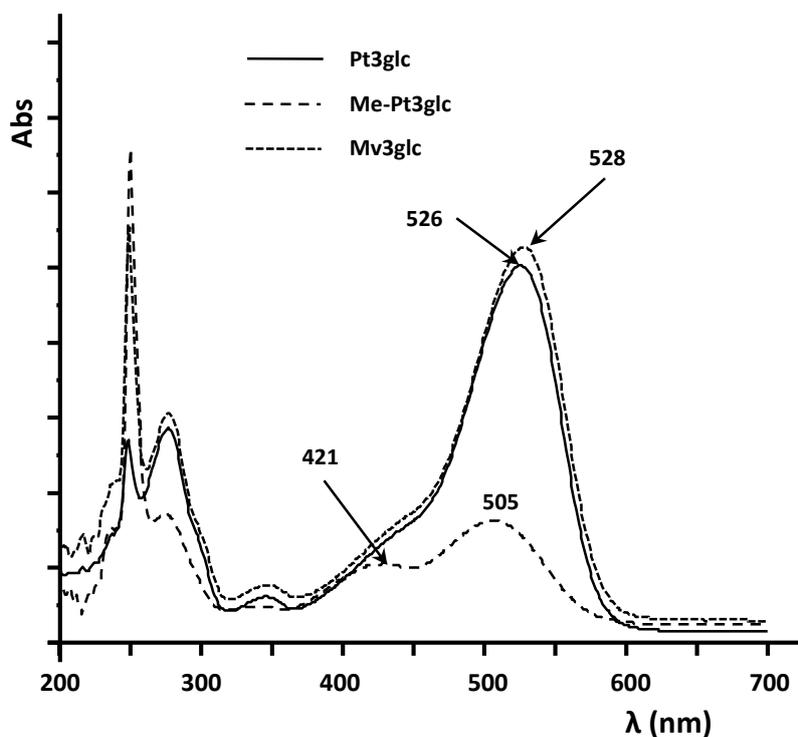
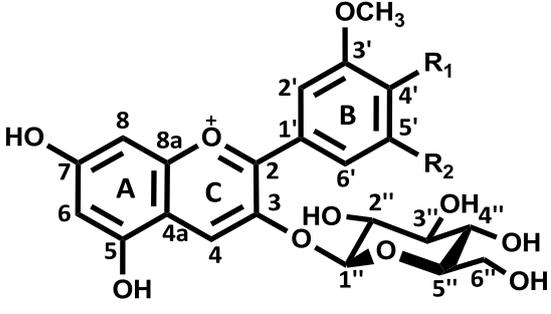


Figura 25. Espectros de UV-Vis salientando os  $\lambda_{\text{máx}}$  da Pt3glc, da Mv3glc e do conjugado com grupo metilo, registado por HPLC-DAD.

Por comparação do espectro de UV-vis do metabolito formado e do espectro UV-vis da antocianina Mv3glc é evidente que o metabolito formado é a 4'-Me-Pt3glc (Tabela 8). O metabolito 4'-Me-Pt3glc foi já identificado no fígado e rins de ratos após administração oral de um extrato de mirtilos (Ichiyanagi, Shida et al. 2006).

Tabela 8. Estrutura química da antocianina Pt3glc e do conjugado com grupo metilo. Sistema de numeração da antocianina.

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	OH	OH
<b>Pt3glc</b>	OH	OH
<b>4'-Me-Pt3glc</b>	OCH <sub>3</sub>	OH
<b>Mv3glc (5'-Me-Pt3glc)</b>	OH	OCH <sub>3</sub>

O espectro de massa da Me-Pt3glc (MS) revelou um aumento de 14  $m/z$  face à Pt3glc, correspondendo à entrada de um grupo metilo em substituição de um hidrogénio (Tabela 9). A molécula de glicose não sofreu modificações, tendo-se observado em MS<sup>2</sup> um ião de razão ( $m/z$ ) 162. Em MS<sup>3</sup>, o maior dos picos apresentou uma diferença de  $m/z$  correspondente à saída de um grupo metilo, o qual poderá ter sido retirado da posição 3', onde já se encontrava na Pt3glc, ou da posição 4' do anel B, onde presumivelmente terá sido colocado na hemi-síntese. A hipótese de que a metilação tivesse ocorrido no grupo hidroxilo ligado à posição 5' foi considerada; neste caso, obter-se-ia outra antocianina, a malvidina-3-glicose (Mv3glc). Porém, a Mv3glc, que ocorre naturalmente nas plantas, está descrita com um tempo de retenção e  $\lambda_{\text{máx}}$  nestas condições cromatográficas de cerca de 27 min e 527 nm, respetivamente.

Tabela 9. Identificação estrutural por HPLC-MS das cinco antocianinas monoglicósidas presentes na espécie *Vitis Vinifera* e dos metabolitos formados a partir das diferentes antocianinas precursoras.

Composto	$m/z$ [M] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> ( $m/z$ )	MS <sup>3</sup> ( $m/z$ )	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	T <sub>R</sub> (min)
Dp3glc	465	303 (-162)	257 (-46)	524	11,51
4'-Me-Dp3glc	479	317 (-162)	302 (-15)	503; 424	16,85
Cy3glc	449	287 (-162)	-	516	15,43
Pt3glc	479	317 (-162)	302 (-15)	526	19,32
3', 4' -Me-Cy3glc	463	301 (-162)	286 (-15)	517 515	23,88 24,35
Pn3glc	463	301 (-162)	286 (-15)	517	23,80
4'-Me-Pt3glc	493	331 (-162)	316 (-15)	505; 421	27,08
Mv3glc	493	331 (-162)	-	528	27,33

Estes resultados são deveras interessantes uma vez que até ao momento não foram identificadas antocianinas de origem natural metiladas na posição 4' do anel B. A Cy3glc, a Dp3glc e a Pt3glc podem ser encontradas em diferentes fontes naturais, no entanto a metilação destas normalmente ocorre nos grupos hidroxilo das posições 3' ou 5' originando a Pn3glc (3'-Me-Cy3glc), Pt3glc (3'-Me-Dp3glc) e a Mv3glc (3', 5'-Me-Dp3glc ou 5'-Me-Pt3glc). Foi interessante constatar que no caso da Cy3glc a metabolização ocorre em 3' e 4', enquanto no caso da Pt3glc (que também possui um grupo catecol), não foi possível por síntese enzimática formar a Mv3glc (5'-Me-Pt3glc), mas apenas a 4'-Me-Pt3glc. É interessante constatar que *in vivo* apenas a Cy3glc pode sofrer conversão a Pn3glc por metilação, todas as restantes antocianinas detetadas em amostras biológicas não podem ser resultado de processos de metabolização (Wu, Pittman et al. 2004).

Foi também curioso verificar que os metabolitos metilados na posição 4' do anel B da antocianina possuem um deslocamento hipsocrómico do  $\lambda_{\text{máx}}$  (cor laranja) que não ocorre na metilação nas posições 3' (Pt3glc) ou 3', 5' (Mv3glc) da Dp3glc. No entanto, no que se refere à 4'-Me-Cy3glc (IsoPn3glc) esse deslocamento não foi tão acentuado. Fica assim subentendido que os metabolitos (4'-Me-Dp3glc e 4'-Me-Pt3glc) deverão ter propriedades físico-químicas bastante diferentes das restantes antocianinas de origem natural, conferindo a estes compostos um crescente valor nutricional e biológico.

### **4.3. Caracterização estrutural dos metabolitos metilados das antocianinas por RMN**

A análise de LC-MS não permitiu atribuir a posição de metilação de forma inequívoca (C3', C4' ou C5'). Por conseguinte, os compostos sintetizados foram analisados por RMN mono e bidimensional de forma a identificar as posições dos grupos metilo na estrutura de cada antocianina.

Os desvios químicos foram atribuídos por  $^1\text{H}$ -RMN mono e bidimensional (COSY), enquanto os carbonos foram atribuídos apenas por técnicas de  $^{13}\text{C}$ -RMN bidimensional: HSQC que mostra correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  diretas, e HMBC que mostra correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância.

Alguns dos prótons da estrutura da antocianidina e da glicose foram facilmente atribuídos por comparação com uma análise da antocianina original, na forma de cátion flavílio, anteriormente publicada (Jordheim, Fossen et al. 2006).

Os resultados obtidos para a análise de RMN do conjugado Me-Dp3glc estão apresentados na Tabela 10. Este metabolito foi caracterizado como sendo 4'-Me-Dp3glc de acordo com a correlação entre o carbono C4' (142,2 ppm) e os prótons H-2' (7,65 ppm) e H-6' (7,65 ppm) e os prótons do grupo metoxilo (4,00 ppm).

O próton H-4 foi atribuído a um singleto situado a  $\delta$  9,11 ppm. Os prótons H-6 e H-8 do anel A foram respetivamente atribuídos a dois singletos situados a  $\delta$  6,70 ppm e 6,94 ppm. O próton H-2' foi atribuído a um singleto situado a  $\delta$  7,65 ppm. O próton H-6' foi atribuído a um singleto a  $\delta$  7,65 ppm.

No que diz respeito ao prótons da glicose, o próton anomérico (1'') apareceu por volta de  $\delta$  5,35 ppm sob a forma de duplete com constante de acoplamento característica ( $J=7,7$  Hz) que sugere uma configuração  $\beta$  para a molécula de glicose (Bakker and Timberlake 1997). Os carbonos da glicose foram detetados no espetro de HSQC e atribuídos através da correlação direta  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Os prótons da glicose foram detetados a  $\delta$  3,46-3,92 ppm.

A correlação direta com o H-2' permitiu atribuir a  $\delta$  110,4 ppm ao carbono C-2'. Do mesmo modo, através da correlação direta do H-6' se atribuiu o carbono C-6' a  $\delta$  110,4 ppm. Os carbonos C-4, C-6 e C-8 foram atribuídos respetivamente a  $\delta$  137,1 ppm,  $\delta$  102,2 e 93,6 ppm por correlação direta com os respetivos prótons H-4, H-6 e H-8. O carbono C-8a foi atribuído a  $\delta$  156,8 ppm por correlação com H-8.

Através de correlação com o H-8 foi atribuída a  $\delta$  170,3 ppm o carbono C-7. O sinal detetado a  $\delta$  158,1 ppm no espectro de HMBC, correspondente à correlação com o H-6, foi atribuído ao carbono C-5. O carbono C-2 foi atribuído a  $\delta$  161,5 ppm por correlação no espectro de HMBC com os prótons H-2' e H-6'. O carbono C-3 foi atribuído a  $\delta$  144,5 ppm por correlação no espectro de HMBC com o próton H-1". O carbono C-1' foi atribuído a  $\delta$  123,3 ppm. O carbono C-3' foi atribuído a  $\delta$  150,6 ppm, enquanto que se atribuiu  $\delta$  142,2 ppm ao carbono C-4' por correlação no espectro de HMBC com H-2' e H-6'.

De acordo com os resultados de RMN a identidade do conjugado sintetizado 4'-Me-Dp3glc foi confirmada.

Tabela 10. Desvios químicos ( $\delta$ ) dos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e correlações HMBC e HSQC obtidas para a 4'-Me-Dp3glc, analisados em  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{DCI}$  (95:5).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm); j (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC	HSQC
<b>Antocianidina</b>				
2		161,5		
3		144,5	H-1"	
4	9,11, s	137,1		
4a		113,4	H-8; H-6	
5		158,1	H-6	
6	6,70, s	102,2		
7		170,3	H-8	
8	6,94, s	93,6		
8a		156,8	H-8	
1'		123,3		
2'	7,65, s	110,4	H-6'; -OCH <sub>3</sub>	H-6'
3'		150,6		
4'		142,2	H-2', H-6', -OCH <sub>3</sub>	
5'		150,6		
6'	7,65, s	110,4	H-2'; -OCH <sub>3</sub>	H-2'
-OCH <sub>3</sub>	4,00, s	59,7	H-4'	

<b>Glicose</b>				
<b>1''</b>	5,35; d; 7,7	101,8	H-3	
<b>2''</b>	3,71	73,3	H-1''; H-3''	H-6''
<b>3''</b>	3,59	76,8	H-2''; H-4'', H-5''	H-5''
<b>4''</b>	3,46	69,4	H-3'', H-6'', H-2''	H-3''
<b>5''</b>	3,60	69,6	H-1'', H-3'', H-4''	
<b>6a''</b>	3,92; d; 10,63	60,8	H-4''; H-3	H6b''
<b>6b''</b>	3,74	60,8	H-3''; H-4''	H6a''

s, singleto; d, duplete; na, não atribuído

Os dois isómeros posicionais da Cy3glc não podem ser distinguidos por HPLC-DAD-MS, em resultado da sua única diferença ser o local de ligação ao núcleo flavânico (3' ou 4'). A estrutura de cada isómero foi determinada por RMN (Tabela 11).

O conjugado 4'-Me-Cy3glc foi caracterizado com base na correlação entre o carbono C-4' (154,5 ppm) e os prótons H-2' (8,02 ppm) e H-6' (8,35 ppm) e os prótons do grupo metoxilo (4,04 ppm) (Tabela 11a).

A correlação direta com o H-2' permitiu atribuir a  $\delta$  116,2 ppm ao carbono C-2'. Do mesmo modo, através da correlação direta do H-6' se atribuiu o carbono C-6' a  $\delta$  126,2 ppm. Os carbonos C-4, C-6 e C-8 foram atribuídos respetivamente a  $\delta$  136,5 ppm,  $\delta$  101,8 e 93,7 ppm por correlação direta com os respetivos prótons H-4, H-6 e H-8. O carbono C-8a foi atribuído a  $\delta$  156,6 ppm por correlação com H-8.

Através de correlação com o H-6 foi atribuída a  $\delta$  169,1 ppm o carbono C-7. O sinal detetado a  $\delta$  157,9 ppm no espectro de HMBC, correspondente à correlação com o H-6, foi atribuído ao carbono C-5. O carbono C-2 foi atribuído a  $\delta$  162,3 ppm por correlação no espectro de HMBC com os prótons H-2', H-6' e H-4. O carbono C-3 foi atribuído a  $\delta$  144,2 ppm por correlação no espectro de HMBC com o próton H-1'' e H-4. O carbono C-1' foi atribuído a  $\delta$  120,7 ppm. O carbono C-3' foi atribuído a  $\delta$  147,0 ppm, enquanto que se atribuiu  $\delta$  154,5 ppm ao carbono C-4' por correlação no espectro de HMBC com H-2' e H-6'.

De forma análoga, o grupo metoxilo foi atribuído à posição 3' por correlação HMBC entre o C-3' (148,0 ppm) com os prótons H-2' (8,24 ppm) e H-5' (7,07 ppm) bem como com os prótons do grupo metoxilo (4,03 ppm) (Tabela 11b). Alguns dos prótons da

estrutura da antocianidina foram facilmente atribuídos por comparação com uma análise da desoxipeonidina, na forma de catião flavílio, anteriormente publicada (Sousa, Mateus et al. 2012). Os dados de RMN permitiram confirmar que o metabolito 3'-Me-Cy3glc que apresentava o mesmo tempo de retenção e o mesmo  $\lambda_{\text{máx}}$  da antocianina Pn3glc é o que apresenta menor tempo de retenção no cromatograma a 520 nm (Figura 22).

Tabela 11. Desvios químicos ( $\delta$ ) dos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e correlações HMBC e HSQC obtidas para a a) 4'-Me-Cy3glc e a b) 3'-Me-Cy3glc, analisados em  $\text{CD}_3\text{OD/TFA}$  (98:2).

a)

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm); j (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC	HSQC
<b>Antocianidina</b>				
2		162,3	H-4, H-2', H-6'	
3		144,2	H-4, H-1''	
4	9,09; s	136,5		
4a		112,8	H-6, H-8	
5		157,9	H-4; H-6	
6	6,68, s	101,8		H-6
7		169,1	H-6, H-8	
8	6,94, s	93,7		
8a		156,6	H-4; H-8	
1'		120,7	H-5'; H-4	
2'	8,02	116,2		H-2'
3'		147,0	H-2', H-5'	
4'		154,5	H-2', H-6', -OCH <sub>3</sub>	
5'	7,21; d, 8,30	111,3		H-5'
6'	8,35; d; 8,32	126,2		H-6'
-OCH <sub>3</sub>	4,04; s	55,27		
<b>Glicose</b>				
1''	5,32, d, 7,46	102,2	H-3	
2''	3,65	73,4	H-1''; H-3''	H-6''
3''	3,55; d, 8,23	77,1	H-2''; H-4'', H-5''	H-5''

4''	3,42	69,5	H-3'', H-6'', H-2''	H-3''
5''	3,66	69,7	H-1'', H-3'', H-4''	
6a''	3,92; d; 12,175	60,9	H-4''; H-3	H6b''
6b''	3,71	60,9	H-3''; H-4''	H6a''

b)

Posição	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm); j (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C	HMBC	HSQC
<b>Antocianidina</b>				
2		162,9	H-4, H-2', H-6'	
3		144,0	H-4, H-1''	
4	9,06; s	135,1		
4a		111,9	H-6, H-8	
5		157,7	H-4; H-6	
6	6,68, s	101,8		H-6
7		169,1	H-6, H-8	
8	6,95, s	93,7		
8a		156,4	H-4; H-8	
1'		119,7	H-5'; H4	
2'	8,24	113,7		H-2'
3'		148,0	H-2', H-5', -OCH <sub>3</sub>	
4'		155,1	H-2', H-5', H-6'	
5'	7,07; d, 8,41	116,2		H-5'
6'	8,28; d; 9,60	127,5		H-6'
-OCH <sub>3</sub>	4,03; s	55,27		
<b>Glicose</b>				
1''	5,32, d, 7,21	102,2	H-3	
2''	3,65	73,4	H-1''; H-3''	H-6''
3''	3,55; d, 8,23	77,1	H-2''; H-4'', H-5''	H-5''
4''	3,42	69,5	H-3'', H-6'', H-2''	H-3''
5''	3,66	69,7	H-1'', H-3'', H-4''	
6a''	3,92; d; 12,175	60,9	H-4''; H-3	H6b''
6b''	3,71	60,9	H-3''; H-4''	H6a''

s, singlete; d, duplete; na, não atribuído

Os dois possíveis isómeros posicionais da Pt3glc não podem ser distinguidos por HPLC-DAD-MS, em resultado da sua única diferença ser o local de ligação ao núcleo flavânico (4' ou 5'). A estrutura do conjugado Me-Pt3glc foi determinada por RMN (Tabela 12).

Os resultados de RMN indicaram a presença de dois grupos metilo no anel B: um aos 4,00 ppm e outro aos 3,98 ppm. A técnica de  $^{13}\text{C}$ -RMN bidimensional gHMBC revelou que o sinal  $^1\text{H}$  dos 4,00 ppm só apresentava um acoplamento significativo com C-2', ao passo que o sinal aos 3,98 ppm estava acoplado de igual modo a C-2' e a C-6'. Tal evidência sugere que a metilação por hemi-síntese ocorreu no hidroxilo do C-4' (142,8 ppm), equidistante de C-2' e C-6'. Os prótons H-2' (7,85 ppm) e H-6' (7,70 ppm) apresentam sinais diferentes, e dos tabelados para a precursora Pt3glc (Jordheim, Fossen et al. 2006), apontando vizinhanças diferentes e excluindo deste modo a hipótese de que o produto formado tenha sido a Mv3glc, este metabolito foi caracterizado como sendo 4'-Me-Pt3glc.

O carbono C-3' foi atribuído a  $\delta$  153,13 ppm por correlação com o próton H-2' (7,85 ppm) e os prótons do grupo metoxilo (4,00 ppm).

O próton H-4 foi atribuído a um singleto situado a  $\delta$  9,16 ppm. Os prótons H-6 e H-8 do anel A foram respetivamente atribuídos a dois singletos situados a  $\delta$  6,73 ppm e 6,99 ppm. O próton H-2' foi atribuído a um duplete situado a  $\delta$  7,85 ppm com constante de acoplamento característica ( $J=2,19$  Hz). O próton H-6' foi atribuído a um duplete a  $\delta$  7,70 ppm com constante de acoplamento característica ( $J=2,18$  Hz).

A correlação direta com o H-2' permitiu atribuir a  $\delta$  107,31 ppm ao carbono C-2'. Do mesmo modo, através da correlação direta do H-6' atribuiu-se o carbono C-6' a  $\delta$  111,8 ppm. Os carbonos C-4, C-6 e C-8 foram atribuídos respetivamente a  $\delta$  137,58 ppm,  $\delta$  102,23 e 93,63 ppm por correlação direta com os respetivos prótons H-4, H-6 e H-8. O carbono C-8a foi atribuído a  $\delta$  156,98 ppm por correlação com H-4.

O sinal detetado a  $\delta$  158,07 ppm no espectro de HMBC, correspondente à correlação com o H-4, foi atribuído ao carbono C-5. O carbono C-2 foi atribuído a  $\delta$  161,44 ppm por correlação no espectro de HMBC com os prótons H-2' e H-6'. O carbono C-3 foi atribuído a  $\delta$  144,14 ppm por correlação no espectro de HMBC com o próton H-1''. O carbono C-1' foi atribuído a  $\delta$  123,25 ppm.

Tabela 12. Desvios químicos ( $\delta$ ) dos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e correlações HMBC e HSQC obtidas para a 4'-Me-Pt3glc, analisados em  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{DCI}$  (95:5).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm); j (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC	HSQC
<b>Antocianidina</b>				
2		161,44	H-2'; H-6'	
3		144,14	H-1''	
4	9,16, s	137,08		
4a		113,38		
5		158,07		
6	6,73, s	102,23		
7		170,43	H-6	
8	6,99, s	93,63		
8a		156,98		
1'		123,25		
2'	7,85, d, 2,19	107,31	H-6'; -OCH <sub>3</sub> ; H-1'; H-3'; H-2	
3'		153,13		
4'		142,8		
5'		150,43		
6'	7,70, d, 2,18	111,8	H-2'; -OCH <sub>3</sub> ; H-1'; H-5'; H-2	
3'-OCH <sub>3</sub>	4,00	60,04		
4'-OCH <sub>3</sub>	3,98	55,54		
<b>Glicose</b>				
1''	5,36; d; 7,65	102,03	H-3	
2''	3,71	73,51	H-1''; H-3''	H-6''
3''	3,59	76,83	H-2''; H-4''	
4''	3,46	69,41	H-3'', H-6'', H-2''	H-3''
5''		na		
6a''	3,94; d; 10,63	60,82	H-4''; H-3	H6b''
6b''	3,74	60,82	H-3''; H-4''	H6a''

s, singlete; d, duplete; na, não atribuído

A obtenção e isolamento destes metabolitos permitiram a caracterização da sua estrutura, reservando ainda a possibilidade de estudos funcionais. Estes metabolitos surgem sistemicamente no corpo humano em resultado de uma dieta alimentar naturalmente rica em antocianinas (Kay, Mazza et al. 2005). Assim, os ensaios biológicos afiguram-se como o próximo passo para esclarecer se estes metabolitos são responsáveis pelos benefícios para a saúde associados às antocianinas.

#### **4.4. Transporte dos compostos através das células Caco-2**

Cada um dos compostos (100  $\mu$ M) foi aplicado no lado apical de células Caco-2 cultivadas em *inserts*. Os compostos foram dissolvidos em Hanks com 5,5 mM glicose (concentração fisiológica) ou com 1 mM de butirato, de forma a possibilitar a avaliação do efeito da glicose na absorção destes compostos. Embora o butirato não seja o substrato ideal para as células Caco-2, a sua viabilidade nestas condições, não foi alterada. De acordo com resultados anteriormente publicados pelo nosso grupo é de esperar que a glicose iniba a passagem da(o)s antocianinas/conjugados, em resultado de um processo de competição pelo mesmo transportador (Faria, Pestana et al. 2009). As amostras foram recolhidas do lado basolateral e substituídas por meio Hanks com 2 % de SFB aos 30, 60 e 120 min de incubação. O tempo máximo de incubação de 2 h foi selecionado para mimetizar o tempo que os componentes ingeridos na dieta permanecem no intestino, tal como é habitualmente aceite. O meio basolateral foi acidificado com HCl, numa concentração final de 0,06 M, no momento imediatamente seguinte à recolha, e armazenado a -18 °C até posterior quantificação por HPLC-DAD. Este passo de acidificação é crucial para estabilizar a estrutura de catião flavílio da antocianina e conseqüentemente permite uma correta quantificação baseada na área dos picos detetados no HPLC, tal como pode ser constatado na Figura 50. Esta conversão da antocianina para a forma de catião flavílio em resultado da acidificação do pH ocorre porque estes compostos podem apresentar diferentes formas de equilíbrio em solução aquosa (Figura 5). Do mesmo modo, o armazenamento a -18 °C é essencial para que os compostos não sofram degradação térmica, tal como pode ser observado na Figura 63.

De facto, o transporte de antocianinas e metabolitos através das células Caco-2 foi dependente do tempo de incubação e da presença de glicose no tampão Hanks

(Figura 26). A presença de glicose reduziu a absorção dos compostos, tendo apresentado um efeito mais pronunciado para os metabolitos. Pode-se ainda concluir que de uma forma geral, e independentemente da presença de glicose no tampão Hanks, os compostos atravessam a barreira de acordo com a sua polaridade, sendo favorecida a absorção aos compostos mais lipofílicos (Figura 26).

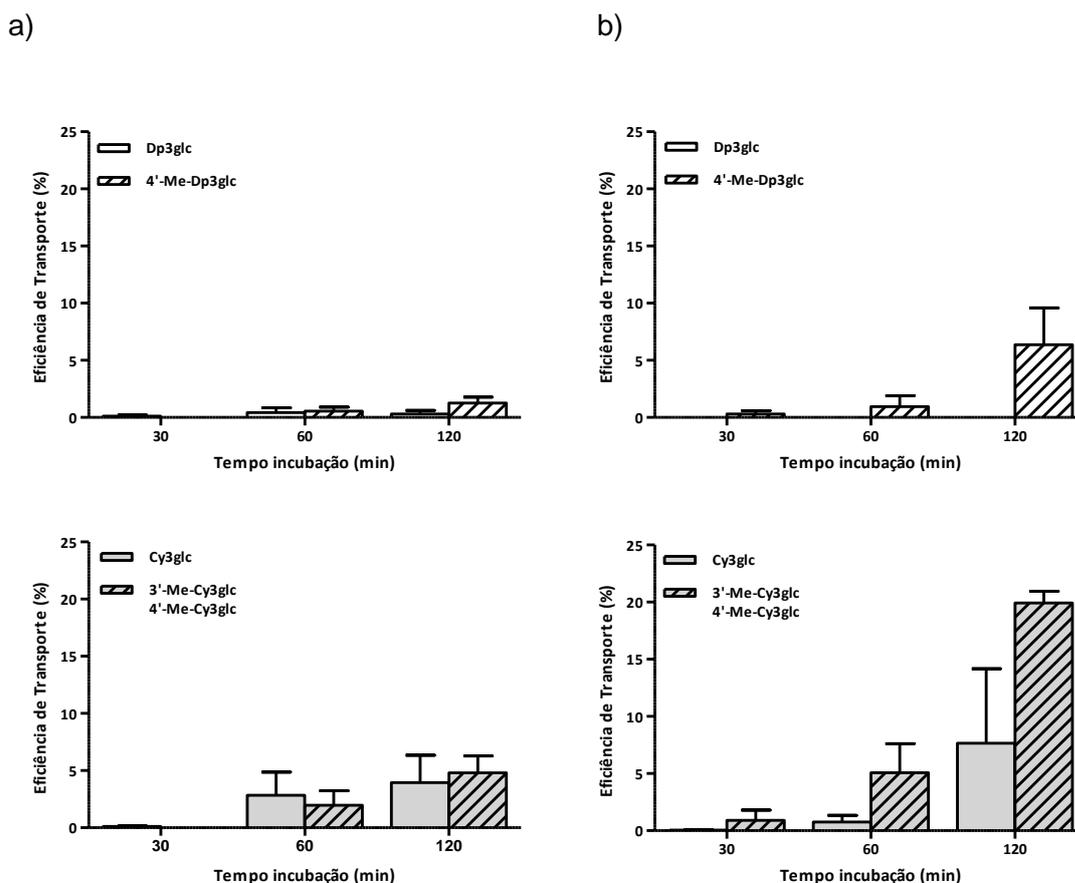


Figura 26. Eficiência de transporte das antocianinas Dp3glc e Cy3glc e respetivos conjugados metilados (100  $\mu$ M) através das células Caco-2 (Apical  $\rightarrow$  Basolateral). Os resultados são apresentados como eficiência de transporte (%) (média  $\pm$  EPM). A eficiência de transporte é apresentada sob a forma de percentagem, calculada de acordo com a seguinte equação: (concentração de composto no lado basolateral a um determinado tempo/concentração de composto no lado apical ao tempo 0 h)  $\times$  100. Ensaio de transportes realizados em meio Hanks com a) 5,5 mM glicose ou b) 1 mM de butirato.

#### 4.5. Propriedades antioxidantes dos metabolitos metilados de antocianinas

##### 4.5.1. Avaliação da capacidade antirradicalar

A avaliação da capacidade sequestradora de radicais de antocianinas e respetivos derivados metilados foi efetuada utilizando o radical estável DPPH•. A sua forma radicalar absorve a 515 nm mas quando reduzido por um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R•) a absorção cessa.

Os resultados foram obtidos com 10  $\mu\text{M}$  de cada um dos compostos e expressos em  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox para facilitar a interpretação de resultados.

Os compostos que dão origem a radicais mais estáveis, terão mais facilidade de doar os seus hidrogénios ao radical DPPH•. De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que a antocianina Cy3glc, se destacou em relação à Dp3glc (Figura 27) (diferenças significativas  $p < 0,001$ ). A presença de um grupo hidroxilo na posição 5' do anel B na Dp3glc tem sido associada a um aumento da capacidade antioxidante em relação à Cy3glc que apenas possui grupos hidroxilo nas posições 3' e 4' do anel B (Kähkönen and Heinonen 2003; Azevedo, Fernandes et al. 2009). No entanto, esta diferença não foi verificada por outros autores (Rice-Evans, Miller et al. 1996).

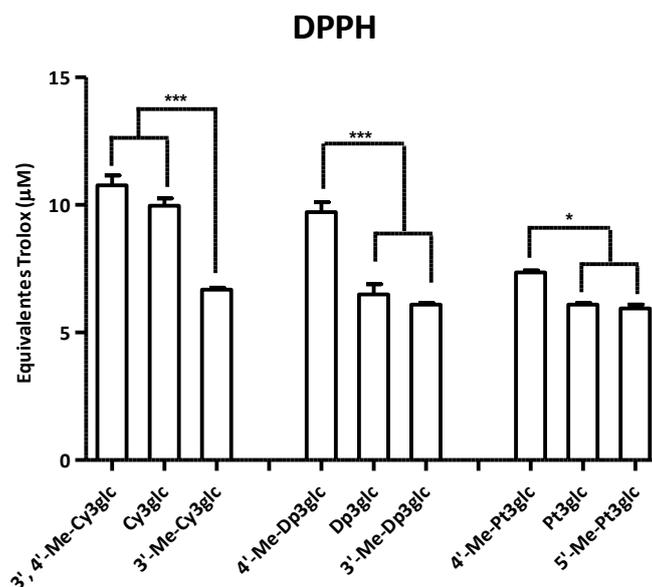


Figura 27. Capacidade antirradicalar de 10  $\mu\text{M}$  de antocianina e conjugado metilado, avaliada pelo método DPPH. Resultados expressos em  $\mu\text{M}$  de Trolox. \*\*\*  $p < 0,001$  (diferença significativa vs respetivo conjugado metilado).

Em termos gerais os metabolitos metilados apresentaram maior ou igual poder antirradicalar comparativamente com os resultados obtidos para as antocianinas originais (Figura 27).

No entanto, foi possível verificar que a mistura dos conjugados metilados (3' e 4'-Me-Cy3glc) não apresentou diferenças na atividade antirradicalar observada para a antocianina original, contudo a Pn3glc apresentou uma capacidade antirradicalar significativamente inferior ( $p < 0,001$ ), o que pode ter contribuído para que neste caso não tenha sido observada uma maior capacidade antirradicalar do metabolito metilado da Cy3glc na posição 4' (Figura 27).

Os conjugados na posição 4' apresentaram maior atividade antirradicalar do que os metilados na posição 3', este resultado está de acordo com o efeito observado para a quercetina metilada na posição 4' em relação ao isómero 3'-Me-quercetina (Dueñas, González-Manzano et al. 2010). Este facto pode ser resultado de uma ativação do grupo 3'-OH quando existe um grupo metoxilo na posição 4' (van Acker, van den Berg et al. 1996).

É de prever que a capacidade de captar radicais livres destes compostos seja aumentada quando em condições de pH próximas das fisiológicas, em resultado do aumento da capacidade de doar eletrões após desprotonação, tal como foi recentemente verificado para os derivados metilados da catequina e epicatequina (Dueñas, González-Manzano et al. 2010). No entanto, é essencial realçar que ao contrário dos restantes flavonóides, as antocianinas apresentam diferentes frações molares de cada forma de equilíbrio em solução aquosa dependendo do pH, conseqüentemente a pH fisiológico é necessário ter em consideração a contribuição das várias formas de equilíbrio para o efeito antioxidante global.

#### 4.5.2. Avaliação do poder redutor

Para avaliar o poder redutor dos compostos utilizou-se o método FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power). A pH baixo, a redução de [Fe(III)-TPTZ2] a [Fe(II)-TPTZ2] dá origem a uma coloração azul intensa, cujas variações podem ser medidas a 593 nm. A redução deste composto é afetada por ação de antioxidantes presentes na solução. Quanto maior a ação antioxidante, maior a extensão da reação e por isso maior o valor de absorvância lido.

Foi descrita uma relação entre a redução do metal e o número de grupos hidroxilo presentes nas moléculas (Pulido, Bravo et al. 2000).

Os resultados obtidos para os compostos testados estão ilustrados na Figura 28.

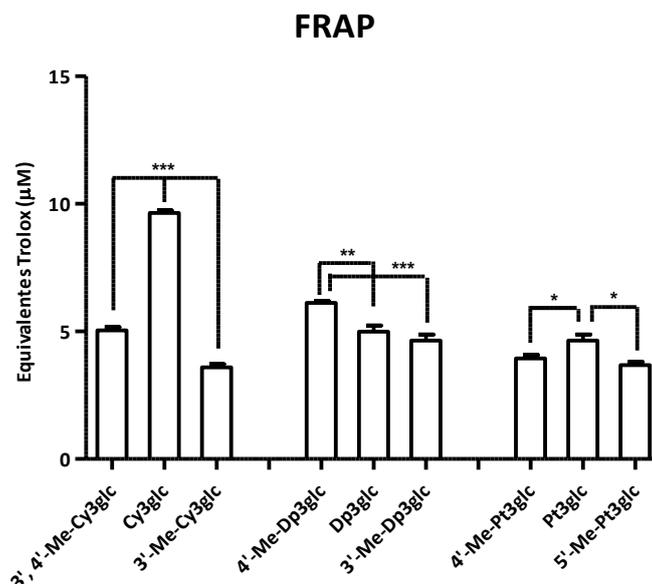


Figura 28. Poder redutor de 10 µM de antocianina e conjugado metilado, avaliada pelo método FRAP. Resultados expressos em µM de Trolox. \*\*\*  $p < 0,001$  (diferença significativa vs respetiva antocianina).

De acordo com os resultados obtidos a inserção de um grupo metilo nas posições 3' ou 4' do anel B da Cy3glc alterou de forma significativa o poder redutor do metabolito em comparação com a antocianina original (Figura 28).

No entanto no que se refere ao derivado metilado da Dp3glc verificou-se um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) em comparação com a respetiva antocianina precursora (Figura 28).

De acordo com a literatura seria de esperar que a inserção de grupos metilo no anel B da antocianina reduzisse o poder redutor dos compostos, tal como foi verificado quando se observa para a inserção de um grupo metilo na posição 4' da Pt3glc ou nas posições 3' e 5' (Mv3glc) (Kähkönen and Heinonen 2003).

No entanto, as características físico-químicas observadas para o conjugado 4'-Me-Dp3glc comparativamente com a antocianina Dp3glc parecem conferir a esta molécula propriedades antioxidantes únicas. É curioso verificar que esta via de metabolização,

só presente em mamíferos, parece ser benéfica para o organismo. A metilação da Dp3glc na posição 4' parece diminuir o seu efeito prooxidante originando um novo composto que apresenta um maior poder antioxidante.

Interessa salientar que este método é realizado a pH 3,6, um valor muito diferente do pH dos fluidos biológicos, no entanto como o potencial redox dos compostos fenólicos é mais eletronegativo a pH mais elevado (Jovanovic and Simic 2000) e quanto mais baixo o potencial redox, mais eficiente é o antioxidante, é de prever que estes compostos mantenham a sua capacidade antioxidante a pH fisiológico (Jovanovic and Simic 2000).

#### *4.5.3. Avaliação da capacidade protetora dos metabolitos metilados nos danos no DNA induzidos por Fe<sup>2+</sup>*

A avaliação do efeito protetor dos polifenóis nos danos no DNA induzidos pelo ferro foi realizada por quantificação das moléculas de DNA de timo de vitelo que se mantiveram intactas após incubação com o oxidante.

Para isso DNA de timo de vitelo foi incubado na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 µM), FeSO<sub>4</sub> (25 µM), e antioxidante dissolvido em água (10 µM). A mistura foi incubada durante 15 min à temperatura ambiente, em microtubos fechados. O efeito da glutathiona, antioxidante natural, foi avaliado tendo-se observado um efeito protetor nos danos no DNA induzidos pelo Fe<sup>2+</sup> (Figura 29).

Todas as antocianinas testadas e respetivos metabolitos foram capazes de aumentar os danos no DNA em comparação com o controlo positivo (Figura 29). No tratamento com as antocianinas Dp3glc, Cy3glc e Pt3glc foi observada uma maior fragmentação da banda de DNA em comparação com o controlo negativo, tendo as diferenças sido estatisticamente significativas para a Dp3glc (\*p < 0,05). Pode-se constatar que a característica comum às três antocianinas é a presença de um grupo catecol ou pirogalol na sua estrutura, o que parece estar relacionado com o efeito prooxidante. Estes resultados sugerem que o efeito antitumoral das antocianinas pode ser mediado por danos no DNA. No entanto todas suas formas metiladas (obtidas de fonte natural ou obtidas por via enzimática) não foram capazes de potenciar o efeito observado no controlo negativo (ausência de antioxidante) (Figura 29).

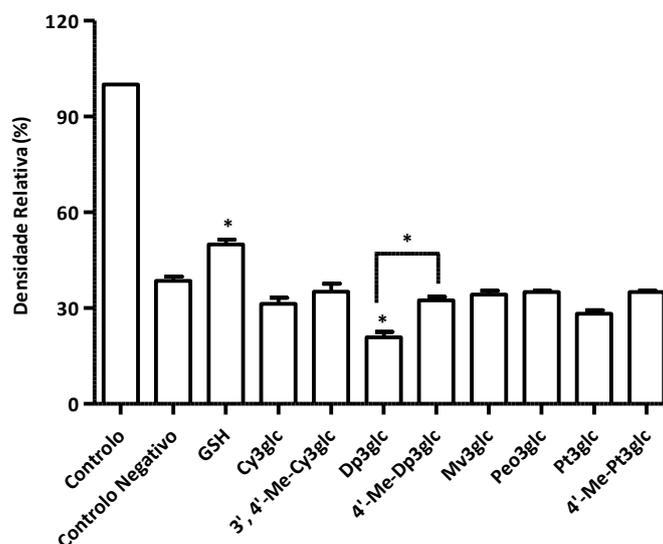


Figura 29. Efeito das antocianinas e dos respetivos conjugados metilados na proteção de danos de DNA. O controlo continha apenas a solução de DNA de timo de vitelo. O controlo negativo continha todos os componentes da mistura reacional, com exceção do antioxidante. \* $p < 0,05$  (diferença significativa vs controlo negativo).

Um estudo *in vitro* semelhante propõe que a formação do complexo Cy-DNA antes da exposição ao radical hidroxilo é capaz de proteger os danos induzidos pelo radical hidroxilo em ambas as moléculas (Sarma and Sharma 1999). A corroborar este estudo surge um outro que propõe a capacidade protetora da Cy e da Cy3glc de danos no DNA induzidos por fotólise do  $H_2O_2$  com radiação UV (Acquaviva, Russo et al. 2003). A não concordância dos resultados obtidos com alguns dados da literatura pode ser devida a vários fatores, nomeadamente o tipo de método utilizado, as concentrações do antioxidante, o pH dos sistemas reacionais e as características duais destes compostos (anti ou prooxidantes).

Vários estudos descrevem a capacidade genotóxica da quercetina associada à atividade prooxidante de algumas quinonas que resultam da sua oxidação (van der Hoeven, Bruggeman et al. 1984; Walle, Vincent et al. 2003), no entanto a sua atividade carcinogénica não foi demonstrada *in vivo*. Foi recentemente comprovado que a metilação dos grupos hidroxilo ao nível do catecol atenua consideravelmente as implicações celulares dos efeitos prooxidantes da quercetina (van der Woude, Boersma et al. 2006). Sendo as características prooxidantes da quercetina dependentes da sua capacidade de doar eletrões, o decréscimo dessa capacidade associado com a metilação pode constituir uma explicação para a atenuação da sua

capacidade genotóxica *in vivo* (van der Woude, Boersma et al. 2006). A metilação pode contribuir para reduzir a toxicidade *in vitro* destes compostos sem alterar a sua capacidade antioxidante.

Se o efeito genotóxico pode ser um mecanismo essencial para inibir a proliferação de células tumorais, a sua não especificidade pode torná-lo indesejável quando se trata de células normais, o que mais uma vez reforça a importância da metabolização pelo organismo destes compostos da dieta.

#### **4.6. Propriedades antiproliferativas dos metabolitos metilados de antocianinas**

Uma vez que é ainda inexistente qualquer informação referente às atividades biológicas de metabolitos metilados de antocianinas, pretende-se avaliar e comparar a atividade citotóxica das antocianinas e dos conjugados metilados frente a três linhas celulares tumorais humanas: adenocarcinoma gástrico (MKN-28), adenocarcinoma da mama (MCF-7) e adenocarcinoma do colon (Caco-2).

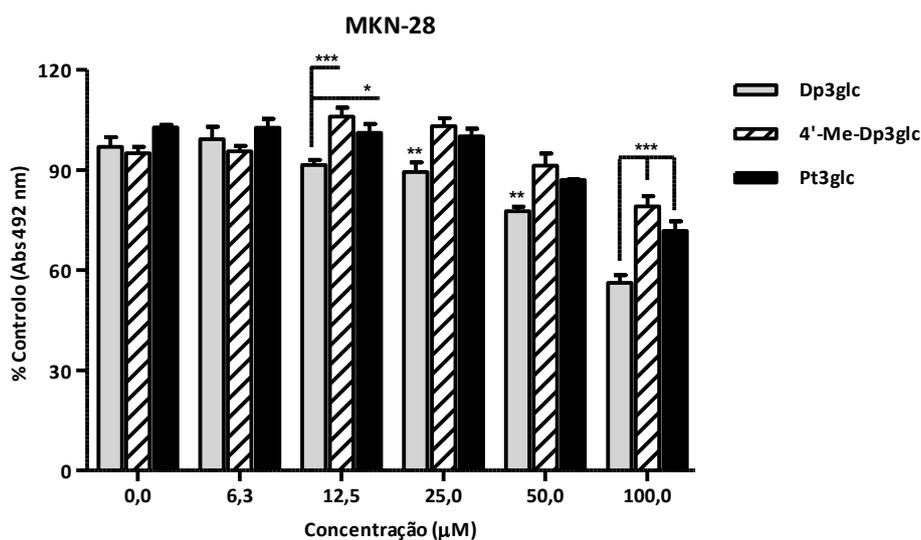
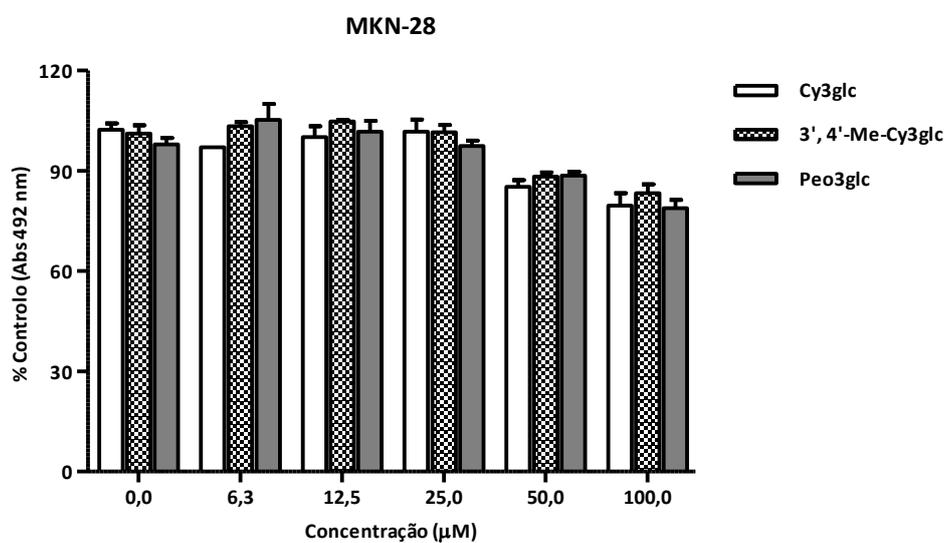
Embora possa parecer inconsistente avaliar a atividade antiproliferativa de metabolitos de antocianinas numa linha celular tumoral de adenocarcinoma gástrico, dada a inexistência de evidências da presença de metabolitos de antocianinas na cavidade gástrica, é no entanto facto, que o epitélio gástrico expressa as enzimas de fase II essenciais à metabolização destes compostos (Karhunen, Tilgmann et al. 1994). Adicionalmente foram detetados metabolitos metilados de ácidos hidroxicinâmicos na mucosa gástrica (Farrell, Dew et al. 2011), assim como conjugados glicuronilados da quercetina (Terao, Murota et al. 2011).

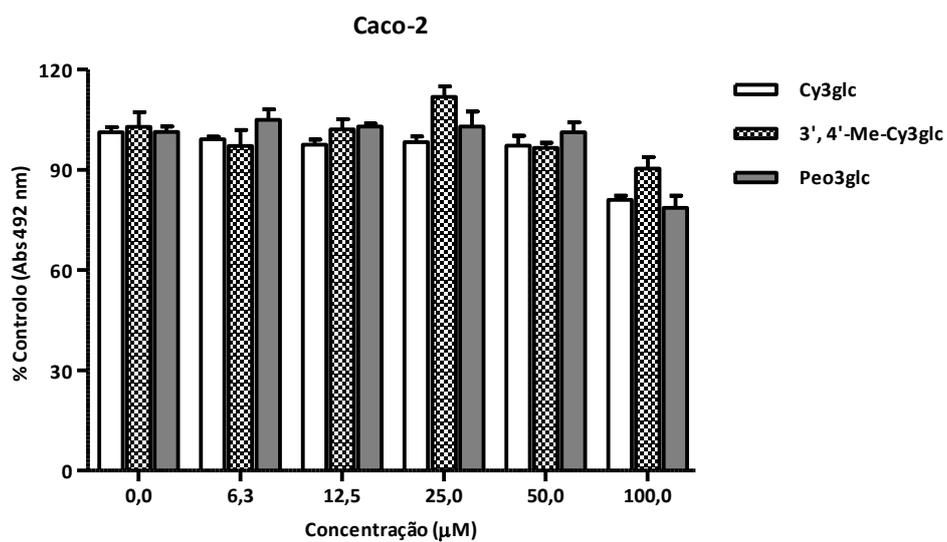
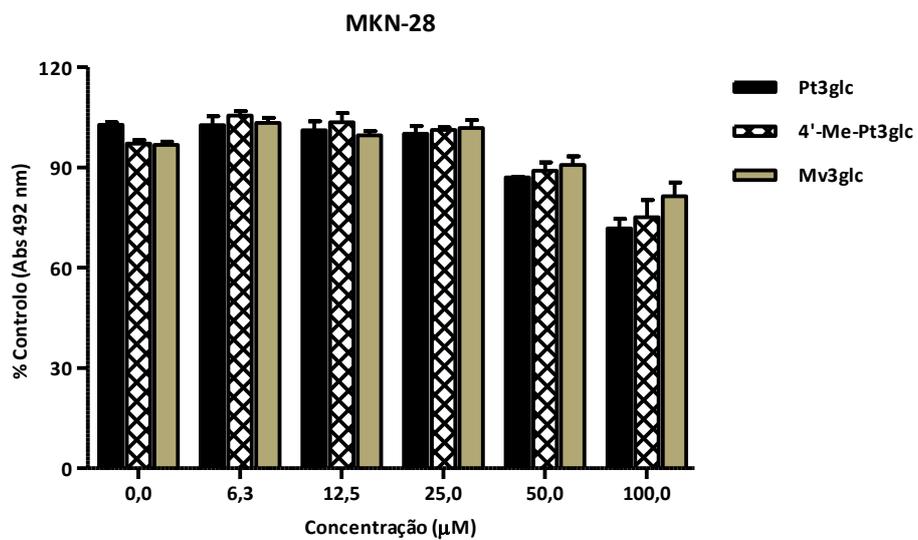
Para tal, células em crescimento exponencial, crescendo em meio de cultura, foram tratadas durante 48 h com cinco concentrações dos compostos (Figura 30). Usou-se para o efeito a técnica correntemente utilizada pelo NCI (EUA) na pesquisa de compostos com atividade antiproliferativa, a qual avalia o efeito dos compostos após uma exposição contínua de 48 h através da quantificação do conteúdo proteico celular.

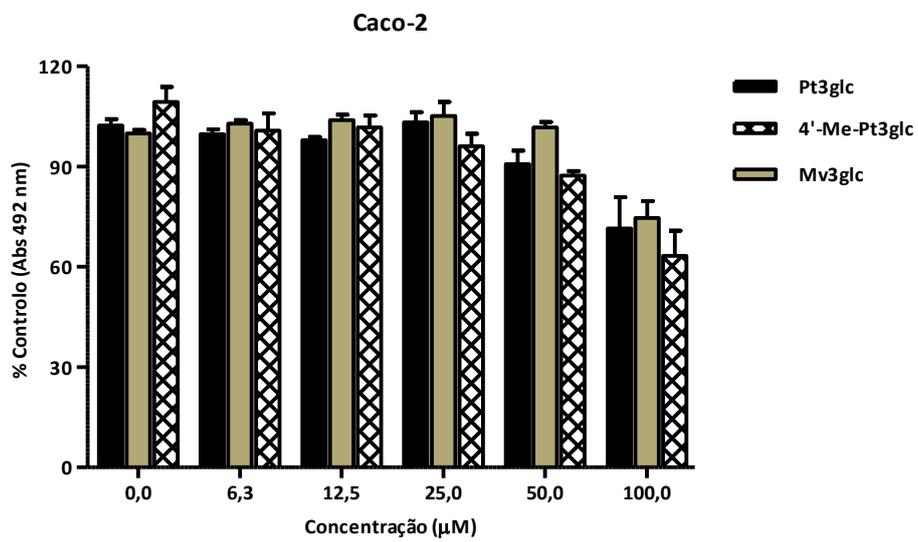
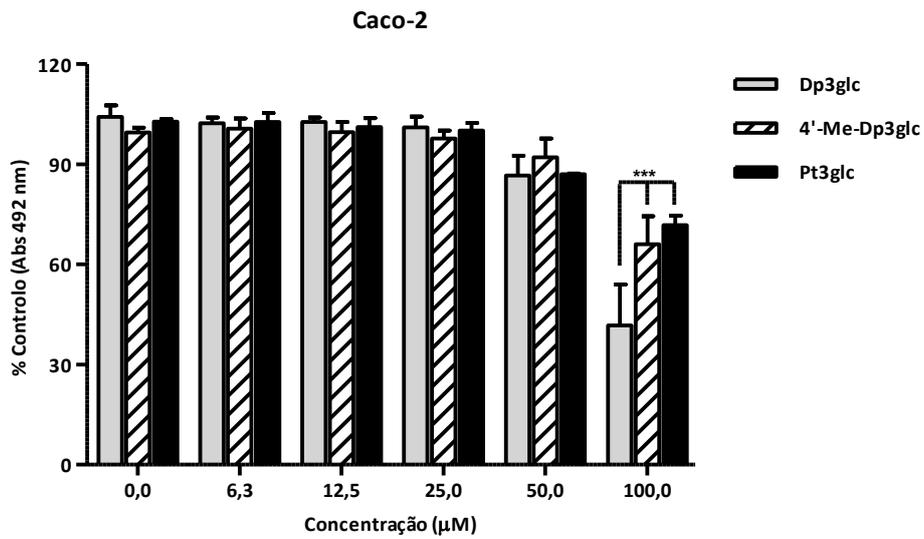
Em termos gerais, todos os compostos inibiram, de forma dependente da concentração, o crescimento das linhas celulares tumorais humanas testadas. Nas três linhas celulares foi observado um efeito mais intenso para a antocianina Dp3glc. A

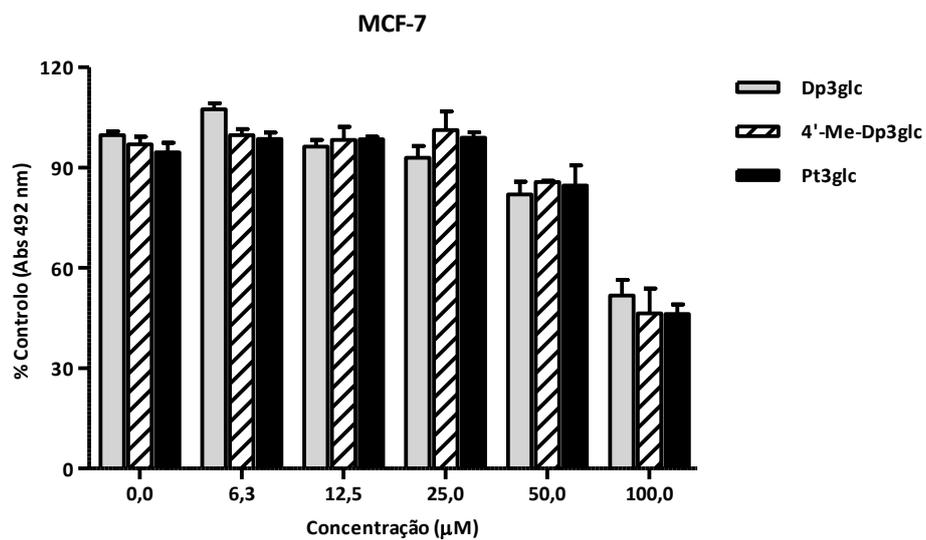
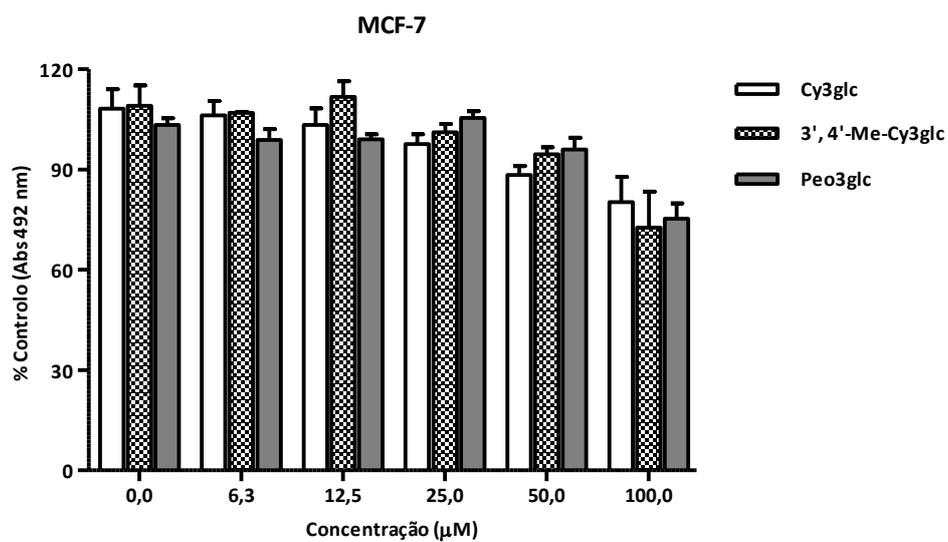
atividade inibidora observada poderá estar relacionada com a presença do grupo pirogalhol na sua estrutura.

Comparando os resultados obtidos com as antocianinas e os respetivos conjugados pode-se verificar que a conjugação com grupos metilo mantém, reduz e em alguns casos aumenta o efeito antiproliferativo observado para as antocianinas precursoras (Figura 30).









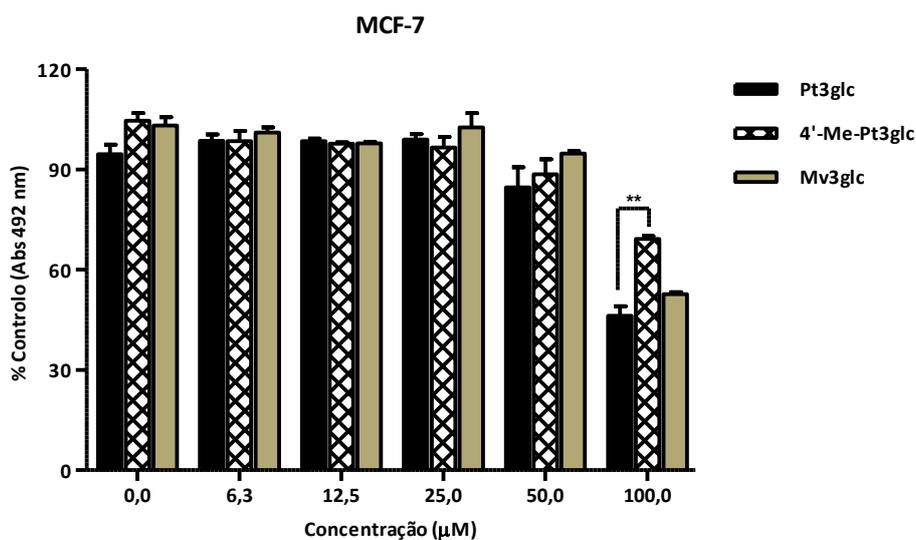


Figura 30. Efeito de antocianinas e respetivos conjugados metilados na proliferação de células MKN-28, Caco-2 e MCF-7 avaliado através do conteúdo celular proteico pelo método SRB. As células foram tratadas com uma gama de concentrações (6,3 – 100,0 µM) de cada composto durante 48 h. Cada valor representa a média ± EPM (n = 6 a 12). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Uma total e completa avaliação dos efeitos biológicos das antocianinas deverá ter em consideração os seus metabolitos, mas também os seus possíveis produtos de degradação. Estudos adicionais serão necessários para elucidar os mecanismos de ação destes compostos. É de todo o interesse perceber a seletividade do mecanismo de ação destes compostos, realizando ensaios de avaliação das propriedades antiproliferativas em linhas celulares normais.

## 5. Conclusão

Os resultados deste capítulo podem ser resumidos da seguinte forma:

- A metabolização de fase II das antocianinas origina novas estruturas nunca antes identificadas como produtos do metabolismo secundário das plantas;
- A metabolização do grupo pirogalhol ocorre de forma diferente em animais e plantas;

- As antocianinas contendo um grupo pirogalhol no anel B são metabolizadas de forma diferente das antocianinas contendo um grupo catecol, Cy3glc e Pt3glc.
- Os metabolitos metilados apresentaram um poder antirradicalar e redutor semelhante ao das antocianinas originais;
- A metilação das antocianinas a conjugados parece reduzir os seus efeitos genotóxicos;
- A absorção intestinal dos conjugados metilados apresenta uma maior eficiência em relação às antocianinas originais;
- A absorção intestinal das antocianinas e conjugados metilados é diminuída pela presença de concentrações fisiológicas de glicose;
- Todos os compostos inibiram a proliferação das linhas celulares tumorais testadas, tendo a Dp3glc sido o composto mais ativo.

CAPÍTULO II - HEMI-SÍNTESE DE PIGMENTOS ANTOCIÂNICOS E  
PROPRIEDADES ANTITUMORAIS: RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE



## 1. Introdução

### 1.1. *Propriedades biológicas de antocianinas*

Nos últimos anos, considerável atenção tem sido dispensada à capacidade das antocianinas de inibir o stresse oxidativo, de inibir a carcinogénese e de induzir apoptose em células malignas.

Muitas têm sido as antocianidinas e extratos antociânicos que têm demonstrado capacidade de inibir o crescimento de uma grande variedade de linhas celulares tumorais, representativas de diferentes tipos de cancro, nomeadamente: cancro do cólon (Lala, Malik et al. 2006), cancro da mama (Zhang, Vareed et al. 2005), cancro do pulmão (Seeram, Zhang et al. 2003), cancro do fígado (Seeram, Zhang et al. 2003) cancro do sistema nervoso central (Zhang, Vareed et al. 2005) e cancro do estômago (Shih, Yeh et al. 2005).

A indução da apoptose tem sido um dos mecanismos atribuídos ao efeito antitumoral de certas antocianinas como a Cy e a Dp (Lazze, Savio et al. 2004). Outros mecanismos de ação tais como a interferência com o ciclo celular (Lazze, Savio et al. 2004), modulação da atividade de enzimas (Singletary, Jung et al. 2007), modulação de vias de transformação e proliferação de células tumorais (Hou, Kai et al. 2004) e a ação prooxidante (Hou, Ose et al. 2003) têm sido apontados como responsáveis pelo efeito antitumoral destes compostos.

A interessante atividade antitumoral exibida por algumas das antocianidinas e antocianinas tem levado alguns investigadores a elucidar o seu mecanismo de ação, mas em nenhum caso esta atividade foi relacionada com um efeito antiestrogénico.

A atividade estrogénica associada a baixas concentrações descrita para as antocianidinas (Schmitt and Stopper 2001) levou a colocar-se a hipótese da existência de uma possível atividade antiestrogénica *in vitro* por parte das antocianinas e de pigmentos antociânicos.

#### 1.1.1. *Atividade estrogénica/antiestrogénica de flavonóides*

Recentemente, os flavonóides têm despertado grande interesse devido ao facto de muitos compostos desta família química exibirem atividade estrogénica (Harris, Costa et al. 2003), a qual poderá ficar a dever-se à semelhança estrutural com o estrogénio

natural 17- $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), bem como com outras hormonais e antagonistas de hormonas esteróides (Price and Fenwick 1985). As propriedades estrogénicas de algumas plantas são reconhecidas há mais de 60 anos, designando-se estes compostos por fitoestrogénios. Em meados da década de 1940, um síndrome de infertilidade em ovelhas na Austrália foi atribuído à ingestão de um tipo particular de trevo (*Trifolium pratense*) que mostrou conter elevadas concentrações de isoflavonas, particularmente de daidzeína (Shutt 1976). Hoje sabe-se que as isoflavonas estão presentes em grandes quantidades nos produtos de soja, como *miso* (pasta de semente de soja fermentada) e *tofu* (coalhada de semente de soja).

Os estrogénios, incluindo os fitoestrogénios, atuam via dois recetores de estrogénios específicos ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ , membros da família dos recetores nucleares. O esquema geral da ação dos estrogénios envolve a difusão para o citoplasma, a ligação aos ERs e a ativação da expressão genética (Katzenellenbogen, Choi et al. 2000). A importância dos estrogénios na regulação homeostática de muitos eventos celulares e bioquímicos é bem ilustrada pelas mudanças patofisiológicas que ocorrem em situação de deficiência de estrogénios. O cancro da mama é o mais comum nas mulheres ocidentais e nas últimas décadas as taxas de incidência têm crescido constantemente (Parkin 2001). Estudos epidemiológicos têm mostrado existir uma distribuição geográfica na incidência do cancro de mama, apresentando os países asiáticos taxas de incidência muito baixas comparativamente aos países ocidentais (Ziegler, Hoover et al. 1993). Não tem sido possível estabelecer uma relação entre a distribuição geográfica da incidência de cancro de mama e os fatores genéticos, já que os estudos têm mostrado que o risco de cancro da mama aumenta em mulheres asiáticas que emigram para países ocidentais, por diminuição do consumo de dieta rica em soja (This, De La Rochefordiere et al. 2001). Além das evidências epidemiológicas, estudos com animais e estudos com modelos celulares têm demonstrado que certos fitoestrogénios inibem a iniciação e a sua progressão do tumor (Fournier, Erdman et al. 1998). Foi também demonstrada a prevenção da proliferação tumoral de adenocarcinoma mamário em ratinhos tratados com genisteína (Constantinou, Krygier et al. 1998) e a inibição da carcinogénese mamária induzida pelo dimetilbenzantraceno (DMBA), em fêmeas de ratinho Sprague-Dawley, pelo fenoxtiol, um derivado de isoflavona (Constantinou, Mehta et al. 2003). Estas evidências parecem paradoxais, já que, como fitoestrogénios, estes compostos ao exibirem uma atividade estrogénica deveriam estimular o crescimento e desenvolvimento dos tumores dependentes de estrogénios, como o cancro da mama.

Os efeitos dos fitoestrogénios são muito complexos na medida em que, para além de dependerem da sua própria concentração, dependem fortemente da concentração de 17- $\beta$ -estradiol (This, De La Rochefordiere et al. 2001). Estudos *in vitro*, que têm utilizado células de cancro de mama, têm mostrado que os fitoestrogénios estimulam, de facto, o crescimento destas células tumorais quando em baixas concentrações, mas inibem a sua proliferação quando em concentrações elevadas (Wang, Sathyamoorthy et al. 1996; Zava and Duwe 1997; Dixon-Shanies and Shaikh 1999; Wang, Lin-Shiau et al. 1999). A genisteína, uma isoflavona da soja, apresenta quer um efeito proliferativo (estrogénico) quer um efeito antiproliferativo (antiestrogénico) em linhas celulares tumorais humanas consoante a concentração utilizada (Wang, Sathyamoorthy et al. 1996). Na linha celular MCF-7 de cancro da mama com recetores de estrogénios (ER+), o efeito da genisteína é bifásico e dependente da concentração, apresentando uma estimulação do crescimento celular a baixas concentrações e uma inibição a altas concentrações (Wang, Sathyamoorthy et al. 1996). Os efeitos antiproliferativos descritos para a genisteína ocorrem em linhas celulares com e sem recetores de estrogénios (ER) e portanto parecem não ser mediados pela presença destes recetores (Wang, Sathyamoorthy et al. 1996). Assim, como agonistas dos estrogénios, os fitoestrogénios mimetizam os estrogénios endógenos e causam efeitos estrogénicos enquanto, como antagonistas os fitoestrogénios podem bloquear ou alterar os recetores de estrogénios e prevenir a atividade estrogénica, causando efeitos antiestrogénicos (Brzezinski and Debi 1999).

### 1.1.2. Mecanismo clássico de ativação dos ERs

Os estrogénios, incluindo os fitoestrogénios, atuam via dois recetores de estrogénios específicos ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ , membros da família dos recetores nucleares. O esquema geral da ação dos estrogénios envolve a difusão para o citoplasma, a ligação aos ERs e a ativação da expressão genética (Katzenellenbogen, Choi et al. 2000).

Os ERs estão predominantemente localizados no núcleo, contudo podem movimentar-se entre o núcleo e o citoplasma onde se encontram complexados com proteínas de choque térmico (hsps) como a hsp56, hsp90 e hsp70, até serem ativados pelo ligando correcto (Smith and Toft 1993; Buchner 1999). Os complexos ligando/ER dissociam-se das hsps, dimerizam e sofrem uma alteração conformacional, que permite o “*switch*” para o estado ativo. Um dos aspetos chave da estrutura do ER é a capacidade do

ligando se encaixar no bolso hidrofóbico, o qual é posteriormente fechado por alteração conformacional do recetor (Brzozowski, Pike et al. 1997; Moras and Gronemeyer 1998; Kushner, Agard et al. 2000). Esta alteração conformacional é essencial para o posicionamento de certos aminoácidos críticos para a ligação de co-ativadores ao recetor e subsequente iniciação da atividade da enzima RNA polimerase.

Os ERs ativados apresentam uma elevada afinidade de ligação para locais específicos do DNA, denominados elementos de resposta estrogénica (EREs) (Figura 31), que estão situados em regiões promotoras localizadas imediatamente anteriores aos genes de resposta estrogénica (Klein-Hitpass, Ryffel et al. 1988; Sriram, Surendranath et al. 1999).

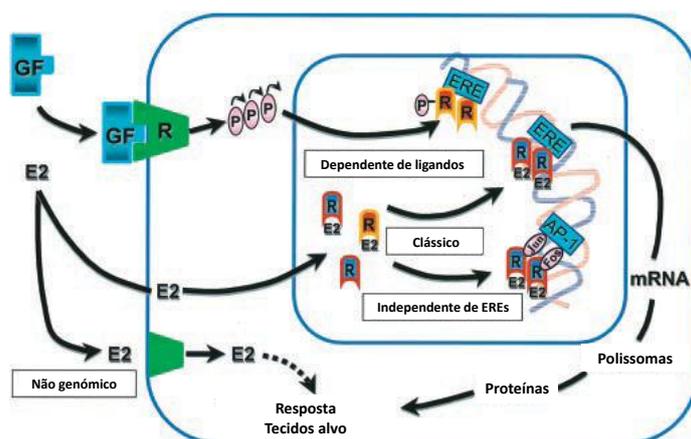


Figura 31. Mecanismos de sinalização do 17-β-estradiol e do recetor de estrogénios (Hall, Couse et al. 2001).

Proteínas conhecidas como co-ativadores ou co-repressores, parecem ser essenciais para a ação do ER e influenciar o nível de expressão de genes de resposta estrogénica. A ligação ao ERE resulta na iniciação ou repressão da transcrição de genes alvo e consequente resposta biológica (Diel, Smolnikar et al. 1999; Fitzpatrick 1999).

Para além deste mecanismo clássico de ligação direta ao DNA, os ERs podem também ativar outras vias de sinalização por ligação a outros fatores de transcrição ou por ligação a EREs independente de ligandos.

### 1.1.3. Acções genómicas do ER

#### 1.1.3.1. Independente de ligandos

Para além da ativação mediada por hormonas, é também aceite que a função genómica do ER pode ser modulada por sinais extracelulares na ausência de  $E_2$  (Figura 31). Estas descobertas focam-se principalmente na capacidade que fatores de crescimento como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento - 1 (IGF-1), que possui estrutura e função semelhante à insulina, possuem de ativar o ER e aumentar a expressão de genes de resposta estrogénica (Smith 1998). Muitas destas descobertas foram apoiadas com estudos *in vivo*, tais como a capacidade do EGF de mimetizar o efeito do  $E_2$  no trato reprodutivo feminino (Curtis, Washburn et al. 1996). Este mecanismo pode permitir a ativação do ER, mesmo na presença de níveis baixos de  $E_2$  ou pode servir para amplificar as vias de ação de fatores de crescimento e conseqüentemente aumentarem a mitogénese em tecidos ER+.

Domínios específicos do ER são críticos para a ativação independente de  $E_2$ . Em particular a ativação por fatores de transcrição necessita do domínio AF-1 do terminal amino do recetor (El-Tanani and Green 1997). A maioria das evidências indica que modificações no estado de fosforilação do ER por cínases celulares pode servir como um importante passo na ativação do ER independente de ligando (Tsuda, Kato et al. 2000).

#### 1.1.3.2. Independente de EREs

Para além do mecanismo clássico de ligação direta ao DNA, as duas isoformas de ER podem também ativar outras vias, por ligação a outros fatores de transcrição como a proteína ativadora-1 (AP-1) (Figura 31). Os elementos de resposta ao AP-1 são regulados indiretamente por interações entre ER e os fatores de transcrição do AP-1, c-fos e c-jun (Kushner, Agard et al. 2000). Estes fatores de transcrição regulam genes como, por exemplo, o gene da colagenase, envolvidos em muitos processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, mobilidade celular e apoptose. Assim, a interação ER/AP-1 parece ser importante em termos clínicos. Sabe-se que o tamoxifeno pode atuar como agonista em genes sob o controlo de elementos de resposta ao AP-1, quando o ER- $\alpha$  ou o ER- $\beta$  são expressos (Paech, Webb et al. 1997). Pelo contrário o  $E_2$  não é capaz de ativar estes genes quando apenas o ER- $\beta$  é expresso (Paech,

Webb et al. 1997). Estas descobertas podem ter importantes implicações nos efeitos diferenciais dos SERMs.

#### *1.1.4. Acções não-genómicas do 17- $\beta$ -estradiol*

Os rápidos efeitos biológicos do E<sub>2</sub> observados no tecido ósseo, mamário, vascular e sistema nervoso sugerem que os estrogénios podem ter efeitos não genómicos (Figura 31), possivelmente através de recetores de estrogénios (ERs) presentes na superfície celular que estão associadas a proteínas intracelulares transdutoras de sinais. Sabe-se que o ER e as vias de transdução de sinal associadas a tirosina cínases de membrana estão interligados, em resultado da capacidade do E<sub>2</sub> em ativar a via de transdução de sinal das proteínas cínases ativadas por mitogénios (MAPK) em vários tipos de células (Migliaccio, Di Domenico et al. 1996; Mendelsohn 2000; Simoncini, Hafezi-Moghadam et al. 2000; Kousteni, Bellido et al. 2001). Os ER de membrana estão associados a proteínas G e são capazes de originar uma variedade de eventos de transdução de sinal, incluindo indução da proliferação celular (Razandi, Pedram et al. 1999). Em resultado deste e de outros estudos, é essencial definir a natureza precisa das proteínas de ligação ao estrogénio envolvidas nestas vias, para que os fármacos possam ser produzidos, tendo em consideração os efeitos genómicos e não genómicos do E<sub>2</sub>.

## **1.2. Pigmentos derivados de antocianinas**

O vinho tinto constitui uma excelente fonte de antocianinas e flavan-3-óis que irão sofrer inúmeras transformações químicas ao longo do seu envelhecimento.

Durante a maturação e envelhecimento, a cor do vinho altera-se para vermelho-alaranjado como resultado de várias reações químicas, incluindo reações de oxidação, redução e de polimerização entre as antocianinas coradas e os flavan-3-óis (incolores), como as catequinas (Bakker and Timberlake 1986). Deste modo, as antocianinas das uvas vão dar origem a outros pigmentos.

Ao longo do envelhecimento de um vinho, ocorrem reações de condensação que levam à origem de novas estruturas químicas. O acetaldeído presente no vinho pode derivar da oxidação do etanol (Wildenradt and Singleton 1974) ou da aguardente

vínica usada durante o processo de vinificação (no caso do Vinho do Porto), na medida em que as aguardentes são conhecidas por possuir grandes quantidades de aldeídos, especialmente acetaldeído (Rogerson and Freitas 2002). No vinho, existem polímeros da (+)-catequina e da (-)-epicatequina, que são responsáveis por diversas características organolépticas. Durante o envelhecimento, pode ocorrer rutura das ligações interflavanólicas destes polímeros. Os produtos resultantes desta reação irão afetar a cor dos vinhos tintos quando na presença de antocianinas (Timberlake and Bridle 1976), ou em estados mais avançados da evolução da cor dos vinhos, na presença de derivados pirúvicos das antocianinas (Mateus, Oliveira et al. 2004).

### *1.2.1. Derivados Pirúvicos e Portisinas*

A reação das antocianinas e/ou flavan-3-óis com moléculas mais pequenas, como o ácido pirúvico (Bakker and Timberlake 1997; Fulcrand, Benabdeljalil et al. 1998; Mateus, Silva et al. 2001) foram também demonstradas, e novas famílias de pigmentos (nomeadamente piranoantocianinas) foram identificadas. Na família das piranoantocianinas incluem-se as carboxipiranoantocianinas (derivados pirúvicos) formadas na fase inicial de maturação dos vinhos (Mateus and de Freitas 2001).

Estes pigmentos de cor laranja resultam da reação das antocianinas com o ácido pirúvico através de uma reação de cicloadição. A antocianina reage através do grupo OH no C5 e do OH do C4 com a ligação dupla do ácido pirúvico, segundo o mecanismo apresentado na Figura 32. O ácido pirúvico é um produto da glicólise das leveduras e forma-se sobretudo durante a maturação do vinho.

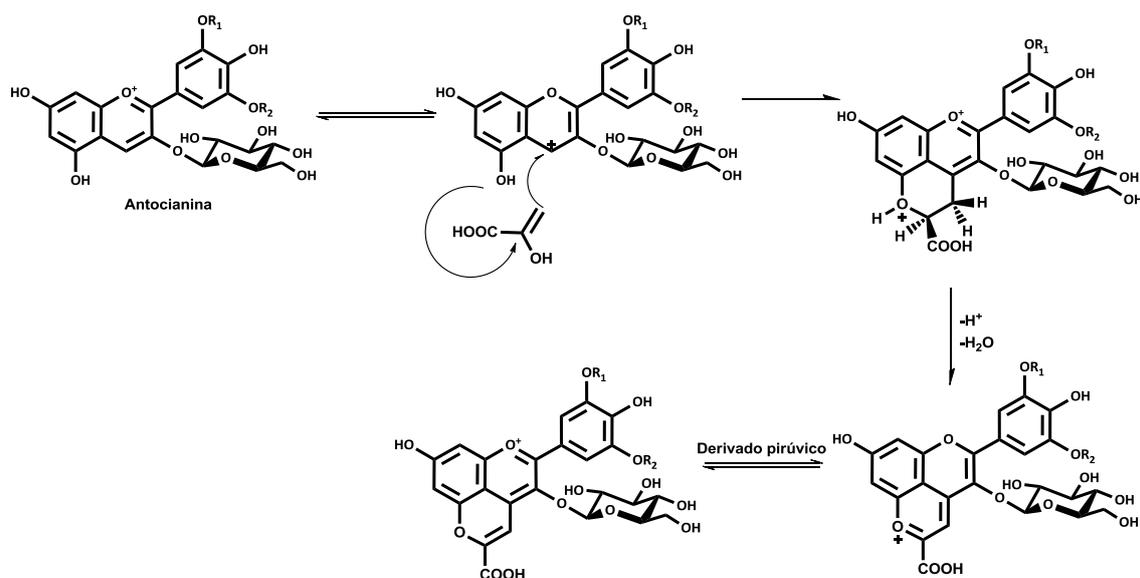


Figura 32. Mecanismo proposto para a formação dos derivados pirúvicos das antocianinas monoglicósido, (Fulcrand, Benabdeljalil et al. 1998). R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>= H, OH, ou OMe

Estes pigmentos apresentam características espectroscópicas únicas, uma vez que o  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorção no espectro UV-Vis apresenta um deslocamento hipsocrómico ( $\lambda_{\text{máx}} \approx 511$  nm) relativamente ao das antocianina-3-glicósido ( $\lambda_{\text{máx}} \approx 521$  nm), que lhes confere a cor laranja.

Recentemente, foi identificada uma nova classe de pigmentos antociânicos azuis. Estes compostos foram denominados portisinas por terem sido detetados pela primeira vez no vinho do Porto (Figura 33). Estes pigmentos resultam da reação entre os derivados pirúvicos das antocianinas e os vinil-flavanóis (Mateus, Oliveira et al. 2004).

Apesar destes pigmentos apenas terem sido detetados em pequenas quantidades nos vinhos, eles apresentam características espectroscópicas únicas, uma vez que o  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorção no espectro UV-Vis apresenta um deslocamento batocrómico ( $\lambda_{\text{máx}} \approx 570$  nm) muito acentuado relativamente ao das antocianina-3-glicósido ( $\lambda_{\text{máx}} \approx 521$  nm), podendo deste modo contribuir para a evolução da cor dos vinhos tintos envelhecidos.

O mecanismo proposto para a formação destes pigmentos sugere a participação do aduto 8-vinil-flavanol como intermediário (Figura 33). Os derivados pirúvicos das antocianinas sofrem um ataque nucleófilo no C10 através do grupo vinilo do aduto 8-vinil-flavanol. O último passo de formação das portisinas envolve a perda de um grupo de ácido fórmico e uma oxidação.

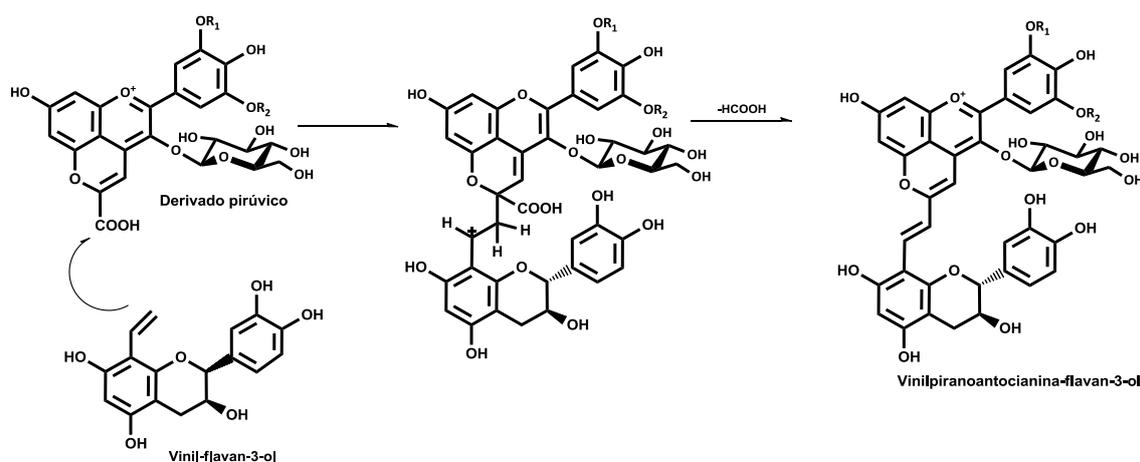


Figura 33. Mecanismo proposto para a formação das portisinas – vinilpiranoantocianina-catequina (Mateus, Silva et al. 2003).  $R_1$  e  $R_2 = H, OH,$  ou  $OMe$

A extensa conjugação dos eletrões  $\pi$  nestas novas estruturas formadas confere provavelmente uma maior estabilidade à molécula e poderá estar na origem da sua cor azul (Mateus, Silva et al. 2003).

Além destas características cromáticas, estes compostos têm uma maior estabilidade à variação do pH do meio e uma maior resistência ao ataque nucleofílico do bissulfito em relação às antocianinas originais. Estes pigmentos também revelaram possuir um poder corante muito superior ao das antocianinas.

O interesse dos derivados pirúvicos e das portisinas vai por isso além da química dos vinhos, abrindo novas perspectivas para possíveis aplicações destes pigmentos (laranja e azul) na Indústria Alimentar (para serem usados como corantes naturais). Consequentemente, e em parte como resultado da sua aplicação em produtos alimentares, é essencial avaliar as suas propriedades biológicas.



## 2. Objetivos

O objetivo deste capítulo prende-se com a obtenção de diferentes classes de compostos, estruturalmente relacionados, por extração de fontes naturais, obtidos por hemi-síntese química e comerciais, permitirá realizar um estudo comparativo do seu efeito antiproliferativo numa linha de adenocarcinoma da mama com recetores de estrogénios.

No sentido de elucidar o mecanismo molecular envolvido no efeito antiproliferativo, foi efetuada uma análise proteómica global das alterações da expressão proteica e mais detalhadamente a expressão do recetor de estrogénios.



### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Reagentes

O acetaldeído, o acetonitrilo, o dimetilsulfóxido (DMSO), gel sílica 100 C-18 de fase reversa (China), e o foram adquiridos à Fluka<sup>®</sup> Chemika (Buchs, Suíça). O gel Toyopearl HW-40S foi da marca Tosoh<sup>®</sup> (Tokyo, Japão). O ácido tricloroacético foi adquirido à Merck<sup>®</sup> (Darmstadt, Alemanha). O ácido fórmico e o metanol foram adquiridos à Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Madrid, Espanha).

Todo o material de cultura celular foi adquirido à TPP<sup>®</sup> (Trasadingen, Switzerland), a não ser que indicado em contrário.

#### 3.2. Hemi-síntese química de pigmentos antocianicos

##### 3.2.1. Derivados pirúvicos

A formação dos derivados pirúvicos das antocianinas foi conseguida através da reação dos extratos de antocianinas obtidos anteriormente (ver Capítulo 1) com o ácido pirúvico. Para cada extrato de antocianinas, preparou-se 1 litro de solução aquosa de antocianina (312,5  $\mu$ M) à qual se adicionaram 23 mL de ácido pirúvico ( $\rho = 1,267$ ; 97%) de modo a obter um rácio molar ácido pirúvico/antocianina de 50:1, pH 2,60. As misturas reacionais foram colocadas numa estufa a 35 °C e foram deixadas a reagir até ao máximo de formação dos derivados pirúvicos das antocianinas. A formação dos compostos foi monitorizada por HPLC. Os pigmentos foram posteriormente purificados e isolados.

Todos os extratos de derivados pirúvicos obtidos anteriormente por reação das antocianinas de uvas tintas com o ácido pirúvico foram purificados por cromatografia em coluna em resina de poliamida. Esta purificação teve como finalidade, por um lado, remover o ácido pirúvico em excesso que não reagiu e por outro lado, separar as antocianinas dos respetivos derivados pirúvicos (a reação de síntese dos derivados pirúvicos não é completa e deste modo, no final da reação ainda existem antocianinas em solução). Cada mistura reacional foi aplicada numa coluna com resina de poliamida (60-80 Mesh) e eluída inicialmente com água, sendo possível desta forma remover o ácido pirúvico. Com uma solução água/metanol a 10 % (v/v) acidulada são

recuperadas as antocianinas que não reagiram (no caso do extrato de antocianinas aciladas, estas apenas são recuperadas com uma solução hidroalcoólica a 30 % (v/v)). A fração que contém os derivados pirúvicos é eluída com uma solução água/metanol a 30 % (v/v) acidulada (no caso dos derivados pirúvicos obtidos a partir de antocianinas aciladas, estas são recuperadas com uma solução a 50 % (v/v) água/metanol). As frações contendo os derivados pirúvicos das antocianinas foram concentradas num evaporador rotativo sob vácuo (30 °C) e congeladas em água para posterior utilização. Com a síntese dos derivados pirúvicos das antocianinas pretendia-se obter precursores para a síntese das respetivas portisinas.

### 3.2.2. *Portisinas*

As portisinas foram obtidas a partir da reação dos derivados pirúvicos das antocianinas com a (+)-catequina na presença de acetaldeído. Cada uma das misturas de derivados pirúvicos das antocianinas (692 µM) obtidas anteriormente foi dissolvida em 500 mL de uma solução água/etanol a 20 % (v/v), pH 1,5, à qual se adicionaram 2,81 g de (+)-catequina (razão molar (+)-catequina/derivados pirúvicos de 1:100) e 625 µL de uma solução de acetaldeído ( $\rho = 0,78$ ) (rácio molar catequina/acetaldeído de 2:1). As reações foram mantidas a 35 °C até se atingir o máximo de formação das respetivas portisinas, que posteriormente foram purificadas. As amostras foram monitorizadas ao longo da reação por HPLC.

Cada mistura reacional dos pigmentos foi purificada num funil de Büchner com gel TSK Toyopearl HW-40S e eluída inicialmente com uma solução água/metanol a 20 % (v/v) de modo a recuperar os derivados pirúvicos que não reagiram (a reação de formação das portisinas não é completa). De seguida, eluiu-se com soluções água/metanol com percentagens crescentes de metanol, sendo eluídos outros compostos que se formam paralelamente durante a reação. A fração das portisinas é recolhida com água/metanol a 80 % (v/v). Esta fração foi concentrada num evaporador rotativo sob vácuo (30 °C) de modo a remover o metanol. De seguida, esta fração foi aplicada diretamente numa coluna de gel TSK Toyopearl HW-40S (250 x 16 mm i.d.) e as portisinas eluídas com uma solução aquosa de metanol a 80 % (v/v). Os pigmentos foram recolhidos e posteriormente isolados por HPLC preparativo.

### **3.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

A composição do extrato de uvas tintas em antocianinas foi inicialmente analisado por HPLC (Knauer K-1001) numa coluna (250 x 4,6 mm i.d.) C-18 de fase reversa (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt); a deteção foi realizada a 520 nm usando um detetor com barra de díodos (DAD) (Knauer K-2800). Os solventes foram, A: H<sub>2</sub>O/HCOOH (9:1) e B: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/HCOOH (6:3:1). O gradiente consistiu em 20-85 % de B durante 70 min com um fluxo de 1,0 mL/min. A coluna foi lavada com 100 % de B durante 20 min e depois estabilizada com as condições iniciais durante 20 min.

### **3.4. Purificação dos compostos por HPLC preparativo**

Cada antocianina do extrato de uvas tintas foi purificada por HPLC (Knauer K-1001) numa coluna (250 x 25 mm, 10 µm) C-18 de fase reversa (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt); a deteção foi realizada a 520 nm usando um detetor UV-Vis (Hitachi, L-2420) (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt). Os solventes foram, A: H<sub>2</sub>O/HCOOH (9:1) e B: H<sub>2</sub>O/MeOH/HCOOH (4:5:1). O gradiente consistiu em 65-15 % de B durante 70 min com um fluxo de 10 mL/min. A coluna foi lavada com 100 % de B durante 20 min e depois estabilizada com as condições iniciais durante 20 min.

Os pigmentos isolados foram depois submetidos a uma última purificação em gel de sílica 100 C-18 de fase reversa usando um sistema de filtração por vácuo. Cada amostra foi aplicada no topo do funil de filtração e eluída inicialmente com água destilada de modo a remover sais inorgânicos e outras impurezas orgânicas. Os pigmentos purificados foram recuperados com metanol destilado acidulado com HCl. A esta purificação seguiu-se uma extração líquido-líquido (água-acetato etilo) para remover possíveis contaminações orgânicas. A fase aquosa contendo a respetiva antocianina foi liofilizada e armazenada a -18 °C para posterior utilização nos ensaios biológicos.

### **3.5. Compostos fenólicos estudados**

Foram testados diferentes compostos de origem natural e sintética, pertencentes a diferentes famílias químicas (Tabela 13). De cada um dos compostos foram

preparadas soluções-mãe em DMSO na concentração de 200 mM. Estas soluções foram conservadas a -20 °C, o que permitiu obter uma amostragem uniforme nos vários ensaios ao longo de todo o trabalho. Antes de cada ensaio as soluções-mãe foram descongeladas e sonicadas durante 5 min de modo a obter uma boa solubilização dos compostos. Procedeu-se, imediatamente antes de cada ensaio, à diluição apropriada dos compostos.

Tabela 13. Compostos ensaiados listados por família química.

Classe	Composto	Origem
Antocianinas	Cianidina-3 glicose (Cy3glc)	Isolados de <i>Vitis Vinifera</i>
	Delfinidina-3-glicose (Dp3glc)	
Portisinas	Vinilpiranocy3glc-catequina (Vinilpiranocy3glc-cat)	Hemi-síntese química
	Vinilpiranodp3glc-catequina (Vinilpiranodp3glccat)	
Flavonóis	Quercetina	Sigma-Aldrich (Q-0125)
	Miricetina	Fluka Chemika (70050)
Ácidos Hidroxibenzóicos	Ácido Gálico	Sigma-Aldrich (G-7384)
	Ácido Protocatechúico	Sigma-Aldrich (P-5630)
Fenóis Simples	Pirogalhol	Sigma-Aldrich (P-0381)
	Floroglucinol	Fluka Chemika (79330)
	Catecol	Sigma-Aldrich (C-9510)

### 3.5.1. Culturas celulares

#### 3.5.1.1. Condições de cultura

Todas as manipulações que envolveram culturas celulares foram realizadas em câmara de fluxo laminar vertical nível de biossegurança 2A (ADS Laminaire). As culturas celulares foram sempre incubadas a uma temperatura de 37 °C em estufa (BINDER) contendo uma atmosfera humidificada e 5% de CO<sub>2</sub>.

Foi utilizada a linha celular tumoral humana de adenocarcinoma da mama (MCF-7, ER+). As células cresceram em monocamada tendo sido mantida em frascos de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> com 5 mL de meio de cultura. O meio de cultura foi feito com RPMI 1640, suplementado com 10 % de SFB inativado, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Madrid, Espanha). As células foram mantidas em crescimento exponencial, tendo-se para tal procedido à sua subcultura, por tripsinização, uma ou duas vezes por semana. A tripsinização consistiu no destacamento das células em monocamada por ação da tripsina. Resumidamente, após remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com PBS, tendo-se adicionado de seguida a solução de tripsina-EDTA. Seguiu-se uma incubação de cerca de 2 min a 37 °C, até se obter a separação das células e o seu destacamento do frasco de cultura. A ação da tripsina foi terminada pela adição de meio de cultura através dos inibidores presentes no SFB.

#### 3.5.1.2. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada com o corante vital, azul de tripano. Após tripsinização foi determinado, em todas as suspensões celulares, o número total de células viáveis tendo-se para tal adicionado a 50 µL de suspensão celular, 50 µL de azul de tripano e procedido à contagem, em câmara de Neubauer, das células que apresentaram capacidade de excluir o azul de tripano (incolores) que corresponderam às células viáveis. O número de células viáveis foi dado por mL de suspensão celular.

### **3.6. Ensaio SRB para avaliação do efeito citotóxico dos compostos**

O efeito dos compostos no crescimento da linha celular tumoral humana foi avaliado segundo o método adotado pelo NCI (Bethesda, EUA) no programa “*In vitro Anticancer Drug Discovery Screen*” (Skehan, Storeng et al. 1990; Monks, Scudiero et al. 1991). Trata-se de um micrométodo que utiliza placas de 96 poços e que avalia o efeito de compostos sobre células em crescimento exponencial após uma exposição contínua de 48 h. Neste método o conteúdo proteico celular é quantificado após ligação eletrostática e dependente do pH do corante sulforodamina B (SRB) aos aminoácidos com carácter básico de células fixadas com ácido tricloroacético. Em

condições básicas o corante é extraído das células e solubilizado permitindo a sua quantificação.

A linha celular foi inoculada em placas de 96 poços de fundo plano (100  $\mu\text{L}$ /poço) na densidade que assegurou o crescimento exponencial ( $1,5 \times 10^5$  células viáveis/mL), em meio de cultura e incubada durante 24 h antes da adição dos compostos, a fim de permitir a aderência e estabilização das células. Foi testada uma gama de concentrações de cada composto, tal como descrito nos resultados e discussão (100  $\mu\text{L}$ /poço), a qual foi preparada, fora da placa, por diluição seriada (1:2 ou 1:3) em meio de cultura. Nas células controlo a adição do composto foi substituída pela adição de meio de cultura contendo 0,1 % de DMSO (100  $\mu\text{L}$ /poço), concentração essa que correspondeu à máxima concentração de DMSO (veículo) presente na maior concentração de composto testada. Ao fim de 24 h de exposição aos compostos, procedeu-se à renovação do meio de cultura das células controlo e das tratadas. Este passo foi realizado a fim de evitar a possível oxidação dos compostos, resultante da exposição continuada com o meio de cultura.

Após 48 h de exposição aos compostos, as células foram fixadas com uma solução de TCA 50 % durante 60 min a 4 °C, à qual se seguiu uma lavagem com  $\text{H}_2\text{O}$ . Depois de totalmente secas as células foram coradas com uma solução de SRB (0,4 % em 1 % de ácido acético glacial) (50  $\mu\text{L}$ /poço) por 30 min, à temperatura ambiente. O excesso de SRB foi removido por lavagem da placa com solução de ácido acético a 1 %. O SRB foi posteriormente solubilizado com tampão Tris-HCl (1 M em  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 8,0) (100  $\mu\text{L}$ /poço). Procedeu-se à leitura da absorvância a 492 nm em espectrofotómetro de placas (Bio-tek Instruments Inc., Powerwave XS, Winooski, EUA).

A proliferação celular foi expressa em termos de percentagem de densidade ótica relativamente à densidade ótica apresentada pelas células controlo.

### ***3.7. Ensaio BrdU para avaliação do efeito antiproliferativo dos compostos***

O efeito antiproliferativo foi avaliado pelo Kit BrdU (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, as células MCF-7, foram inoculadas em placas de 12 poços, contendo lamelas ajustadas à densidade de  $1,5 \times 10^5$  células/mL. Seguiu-se uma incubação de 24 h antes da adição do composto, a fim de permitir a aderência e estabilização das células. O meio de cultura foi então removido, e as células foram

tratadas, durante 48 h, com 100  $\mu\text{M}$  das antocianinas Dp3glc e Cy3glc. As células controlo foram tratadas de igual modo tendo a adição do composto sido substituída pela adição de meio de cultura contendo 0,1 % de DMSO (veículo). Ao fim de 24 h de exposição aos compostos, procedeu-se à renovação do meio de cultura das células controlo e das tratadas, tendo sido substituído pela adição de meio de cultura contendo 0,1 % de DMSO e a concentração de 100  $\mu\text{M}$  de cada composto, respetivamente. Este passo foi realizado a fim de evitar a possível oxidação dos compostos resultantes da exposição continuada com o meio de cultura.

Decorrido o tempo de incubação com os compostos, foi adicionado novo meio de cultura contendo 10  $\mu\text{M}$  de solução de BrdU. As células foram incubadas a 37 °C e 5 %  $\text{CO}_2$  durante 60 min. Seguiram-se 3 lavagens com tampão de lavagem, de 5 min cada, com agitação. As células foram posteriormente fixadas com solução de etanol/glicina durante 20 min a -18 °C. Seguiram-se 3 lavagens com tampão de lavagem, de 5 min cada, com agitação.

Procedeu-se à incubação com o anticorpo primário anti-BrdU (clone BMG 6H8 IgG1), 30 min a 37 °C. Seguiram-se 3 lavagens com tampão de lavagem, de 5 min cada, com agitação. As células foram posteriormente incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse-Ig-fluoresceína. Seguiram-se 3 lavagens com tampão de lavagem, de 5 min cada, com agitação.

As lamelas foram montadas em meio de montagem (vectashield com DAPI). A observação das lâminas a microscópio de fluorescência foi realizada a  $\lambda_{\text{exc}} = 450\text{-}500$  nm (488 nm) e  $\lambda_{\text{em}} = 515\text{-}565$  nm (verde).

A percentagem de células em proliferação foi calculada como a razão entre o número de células marcadas com BrdU e o número total de células (núcleos marcados com DAPI) num total de 1000 células por lamela. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM de 3 experiências independentes.

### **3.8. Análise do recetor de estrogénios (ER) por RT – PCR**

As células MCF-7 foram cultivadas em frascos de 25  $\text{cm}^2$  (5 mL/frasco), na concentração inicial de  $1,5 \times 10^5$  células/mL, a qual assegurou o conteúdo celular proteico suficiente para o ensaio. O tratamento com o composto foi realizado tal como anteriormente descrito em 3.6.

### 3.8.1. Extração e quantificação de RNA

Decorrido o tempo de incubação com os compostos, o sobrenadante das culturas foi removido e as células lavadas com PBS. Adicionou-se 1 mL de *Tripure Isolation Reagent* (Roche, Indianapolis, USA) por frasco de cultura, tendo-se procedido à ressuspensão das células com micropipeta e transferência para respetivo microtubo. O procedimento subsequente foi realizado de acordo com as instruções do fornecedor. O ácido ribonucleico (RNA) foi dissolvido em H<sub>2</sub>O (tratada com dietilpirocarbonato, inibidor de RNAses) e armazenado a -80 °C.

A quantificação do RNA foi feita com as amostras diluídas 1:50. A recuperação e a qualidade do RNA foram verificadas medindo a relação da densidade ótica (260/280 nm) num espectrofotómetro (Bio-Rad 680 Microplate Reader, Califórnia, EUA).

### 3.8.2. Reação em Cadeia da Polimerase Reversa

Utilizaram-se 5 µg de RNA para a síntese de ácido 2-desoxiribonucleico complementar (cDNA) através da incubação, na presença de transcriptase reversa (Reverase, Bioron GmbH); 10 µM de *primers* aleatórios; 0,375 mM por dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 10 mM ditiotreitol e 40 unidades de inibidor de RNase (RNaseOUTTM; Gibco BRL, Barcelona, Espanha) durante 1 h a 45 °C, seguida de aquecimento a 95 °C, durante 10 min, para inativar a enzima.

As amostras foram incubadas durante 30 min a 37 °C com 0,1 mg/mL de RNase (Sigma, St. Louis, MO). A amplificação da cadeia de DNA foi efetuada na presença de 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de cada *primer* (Tabela 14), 0,2 mM dNTPs, 2 unidades de polimerase do DNA (DFS-Taq DNA polymerase, Bioron GmbH) e 4 µL do produto da transcriptase reversa num volume final de 50 µL. Foi também efetuada a amplificação simultânea do gene conservado da enzima desidrogenase do fosfato-3 de gliceraldeído (GAPDH), como padrão interno.

Tabela 14. Condições de PCR.

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>	<b>Produto PCR, bp</b>	<b>Referência</b>
<b>ER-<math>\alpha</math></b>			
sense	5'-CCACCAACCAGTGCACCATT-3'	108	(Bieche, Parfait et al. 2001)
antisense	5'-GGTCTTTTCGTATCCCACCTTTC-3'		
<b>ER-<math>\beta</math></b>			
sense	5'-AAAAGAATCATTCAATGACA-3'	300-400	(Jiang, Davies et al. 2005)
antisense	5'-ATTAACACCTCCATCCAACA-3'		
<b>GAPDH</b>			
sense	5'-ACTGGCGTCTTCACCACCAT-3'	682	
antisense	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'		

Para todos os *primers*, a amplificação iniciou-se com uma desnaturação a 94 °C durante 5 min, seguiram-se 30 ciclos de desnaturação, emparelhamento e extensão (Tabela 15) e uma extensão final a 72 °C durante 10 min.

Tabela 15. Programa de PCR.

<b>Primer</b>	<b>Condições de PCR</b>	
ER- $\alpha$	94 °C	1 min 30 s
	56 °C	1 min 30 s
	72 °C	1 min 30 s
ER- $\beta$ e GAPDH	94 °C	1 min 30 s
	58 °C	1 min 30 s
	72 °C	1 min 30 s

Os produtos foram visualizados em gel de 1,6 % de agarose e corado com brometo de etídio. A expressão de todos os recetores foi normalizada e comparada com a expressão do GAPDH em cada amostra utilizando para tal o *software Gel Pro Analyser* (Media Cybernetics, Silver Spring, MS).

### 3.9. PCR em tempo real (RT<sup>2</sup>-PCR)

As células MCF-7, foram tratadas, tal como anteriormente descrito para o RT-PCR. O RNA foi extraído das células MCF-7 com *Tripure Isolation Reagent* (Roche, Indianapolis, IN), de acordo com as instruções do fabricante e tal como descrito para o RT-PCR.

Antes da síntese do cDNA, o RNA total foi tratado com DNase I (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Utilizaram-se 0,5 µg de RNA para a síntese de ácido 2-desoxiribonucleico complementar (cDNA) através da incubação, na presença de transcriptase reversa II *Superscript* e *primers* aleatórios (Invitrogen Corporation) num volume final de 20 µL de volume final, de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi tratado com *Resulting RNase H* (Invitrogen Corporation) de forma a degradar o RNA que não reagiu. Para o RT<sup>2</sup>-PCR foram usados 2 µL dos 20 µL de mistura total. A curva de calibração foi realizada utilizando cinco concentrações de cDNA padrão extraído das células MCF-7.

O RT<sup>2</sup>-PCR foi realizado num termociclador *LightCycler* (Roche, Nutley, NJ). Aos capilares foram adicionados, num volume final de 20 µL, 0,5 µM de cada primer e 4 µL da mistura *SYBRGreen (LightCycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I, Roche)*. As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação (95 °C durante 5 min), amplificação e quantificação [95 °C durante 10 s, temperatura de *annealing* (TA) durante 5 s, e 72 °C durante 10 s, com uma única quantificação da fluorescência no final deste período] repetida 45 ciclo, curva fusão [(TA 10)°C durante 15 s e 95 °C com uma velocidade de aquecimento de 0,1 °C/s e medição contínua da fluorescência], e arrefecimento a 40 °C. Os resultados foram analisados utilizando o *software LightCycler*. Para o ER-α (TA 64° C) os *primers* foram os seguintes: sense 5'-GAAGAGGGTGCCAGGCTTTGT-3' e *primer* antisense 5'-CGCCAGACGAGACCAATCATC-3'. Para o ER-β (TA 65 °C) os *primers* foram os seguintes: *primer* sense 5'-GTTCGACCAAGTGCGGCTCTT-3' e *primer* antisense 5'-TCCCCTCATCCCTGTCCAGAA-3'.

### **3.10. Análise da expressão proteica das células MCF-7 por eletroforese bidimensional**

O tratamento com os compostos foi realizado tal como anteriormente descrito em 2.6. O sobrenadante das culturas foi removido e as células lavadas com PBS. As células foram tripsinizadas e transferidas para microtubos. Seguiram-se duas lavagens com PBS a 4 °C.

O *pellet* celular foi ressuspenso em tampão com inibidores de proteases (Complete™ Mini EDTA-free tablets, Roche) (5 µL / 100 µL de tampão (0,25 M Tris-HCl, pH 7,4)). A extração proteica foi realizada por sonicação das células (3 x 10 s) em gelo. O sobrenadante foi recolhido após centrifugação a 14000 rpm durante 15 min (Biofuge pico Heraeus Instruments). A concentração de proteína foi determinada pelo método do BCA usando BSA como padrão.

Um volume equivalente a 200 µg de proteína foi tratado com um kit de limpeza de extratos proteicos, o 2D Clean-Up Kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. O *pellet* de proteínas obtido foi solubilizado em 350 µL de solução IEF (9 M Ureia, 2 % (m/v) CHAPS, 2 % (v/v) β-mercaptoetanol, 0,8 % (v/v) Pharmalytes pH 3 a 10) e separado por eletroforese bidimensional, usando tiras (GE Healthcare) de 17 cm com um gradiente não linear de pH imobilizado (pH 4 a 7) na primeira dimensão. As tiras foram depois incubadas em tampão de equilíbrio (6 M Ureia, 2 % SDS, 0,1 mM EDTA, 30 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol, 50 mM Tris pH 6,8) contendo 10 mg/mL ditioneitol (DTT) (20 min) e 48,1 mg/mL iodoacetamida (mais 20 min). As tiras foram aplicadas em cima de um gel com 12,5 % de poliacrilamida e correu-se a segunda dimensão.

Os marcadores de peso molecular usados foram: β-fosforilase, 97 kDa; albumina, 66 kDa; ovalbumina, 45 kDa; anidrase carbónica, 30 kDa; inibidor da tripsina, 20,1 kDa; α-lacto-albumina, 14,4 kDa (GE Healthcare). O tampão de eletroforese usado foi 0,025 M Tris pH 8,3 0,921 M glicina 0,1 % SDS.

Depois da eletroforese, os géis foram mantidos em solução de fixação (50 % etanol, 12 % ácido acético, 0,05 % formalina), durante a noite.

### 3.10.1. Coloração com prata

Os géis foram corados por coloração de prata de acordo com (Gromova, Celis et al. 2006). Resumidamente, os géis foram lavados com uma solução de 20 % de etanol durante 20 min. À qual se seguiu uma incubação com a solução de sensibilização (0,02 % (m/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) durante 2 min com agitação. Esta solução é posteriormente removida e os géis são lavados duas vezes, 1 min cada com água desionizada. Segue-se uma incubação com a solução de nitrato de prata (0,2 % (m/v)  $\text{AgNO}_3$  e 0,076 % formalina) durante 20 min a 4 °C, com agitação.

A solução de nitrato de prata é rejeitada e os géis são lavados, 2 vezes, 20-60 s cada com água desionizada para remover o excesso de iões prata não ligados.

Os géis são posteriormente mantidos em solução de desenvolvimento, com agitação, até que as bandas apresentam a intensidade desejada. Esta reação é parada por adição de solução de ácido acético 12 %. Os géis são selados e mantidos em água desionizada.

### 3.11. Tratamento estatístico

Os valores são expressos como média aritmética  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O significado estatístico das diferenças entre os vários grupos foi avaliado por análise de variância de 1 fator (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Nos ensaios de RT-PCR e RT<sup>2</sup>-PCR os resultados são expressos como média de três experiências independentes com observação idênticas. Para comparações entre dois grupos, utilizou-se o teste *t-Student*. As diferenças foram consideradas significativas para \*p < 0,05.

## 4. Resultados e Discussão

### **4.1. Efeito de antocianinas e portisinas no crescimento da linha celular MCF-7 (ER+): relação estrutura-atividade**

Atendendo à atividade citotóxica que tem sido descrita para algumas antocianinas em várias linhas celulares tumorais (Kamei, Kojima et al. 1995; Koide, Hashimoto et al. 1997; Katsube, Iwashita et al. 2003; Lala, Malik et al. 2006) decidiu-se avaliar a atividade citotóxica de duas antocianinas isoladas de fontes naturais. A selecção das antocianinas foi feita com base na sua abundância relativa nos frutos e nas atividades biológicas já descritas para estes compostos. A Dp3glc e a Cy3glc representam as antocianinas mais abundantes em frutos e foram as que se revelaram mais potentes nos estudos anteriormente referidos na literatura.

A descoberta, isolamento e caracterização estrutural de novos compostos polifenólicos no vinho, nomeadamente, derivados pirúvicos e de vinilpiranoantocianina-catequinas (portisinas), associada às suas cores invulgares (laranja e azul, respetivamente) suscitou o interesse por este tipo de compostos e pela sua possível aplicação como corantes na indústria alimentar (Mateus, Oliveira et al. 2004).

A maior estabilidade a valores de pH próximos da neutralidade por parte destes pigmentos derivados será igualmente uma mais valia tendo em vista a sua aplicação industrial e biológica (Oliveira, Santos-Buelga et al. 2006).

As acrescidas propriedades antioxidantes que estes compostos demonstraram *in vitro* comparativamente com os seus precursores antociânicos reforçam o interesse da sua possível utilização e da necessidade de conhecer os seus efeitos na saúde humana (Faria, Oliveira et al. 2005).

Uma vez que é ainda inexistente qualquer informação referente às atividades biológicas de portisinas, pretende-se avaliar e comparar a atividade citotóxica das antocianinas Cy3glc e Dp3glc e das respetivas portisinas frente a uma linha celular tumoral humana de adenocarcinoma da mama, MCF-7 (ER+) (Figura 34).

As antocianinas foram extraídas de fontes naturais, purificadas e caracterizadas tal como descrito na secção material e métodos do capítulo I, da parte 1. As portisinas foram obtidas por hemi-síntese tal como descrito na secção material e métodos deste capítulo e de acordo com o procedimento descrito anteriormente (Mateus, Oliveira et al. 2004).

Para tal, células em crescimento exponencial, crescendo em meio de cultura (MEM), foram tratadas durante 48 h com quatro concentrações dos compostos (12,5; 25,0; 50,0 e 100,0  $\mu\text{M}$ ). Usou-se para o efeito a técnica correntemente utilizada pelo NCI (EUA) na pesquisa de compostos antitumorais, a qual avalia o efeito dos compostos após uma exposição contínua de 48 h através da quantificação do conteúdo proteico celular. A gama de concentrações foi selecionada tendo como base estudos de avaliação das propriedades citotóxicas de antocianidinas em diferentes linhas celulares, descritos por outros autores (Lazze, Savio et al. 2004).

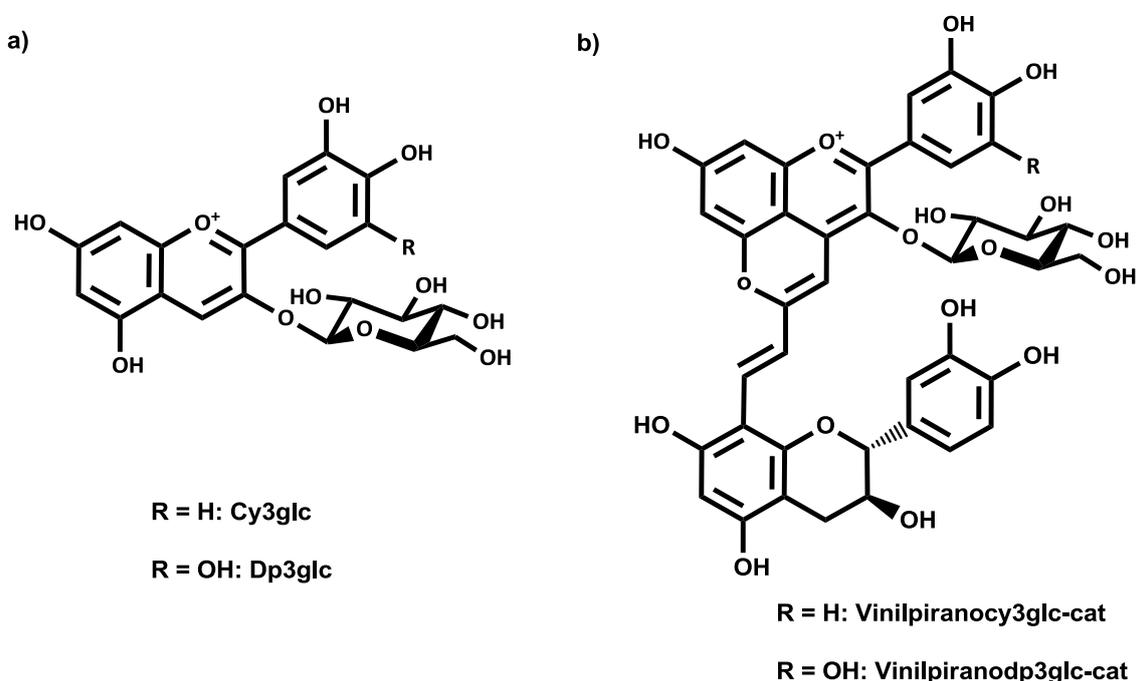


Figura 34. Estrutura química de a) antocianinas e b) vinilpiranoantocianinas-catequina.

Os resultados mostram que a antocianina Cy3glc não foi capaz de inibir o crescimento de células MCF-7, nem mesmo na mais alta concentração testada (100,0  $\mu\text{M}$ ) (95,83 %  $\pm$  1,82), resultado que está de acordo com estudos prévios (Zhang, Vareed et al. 2005) (Figura 35).

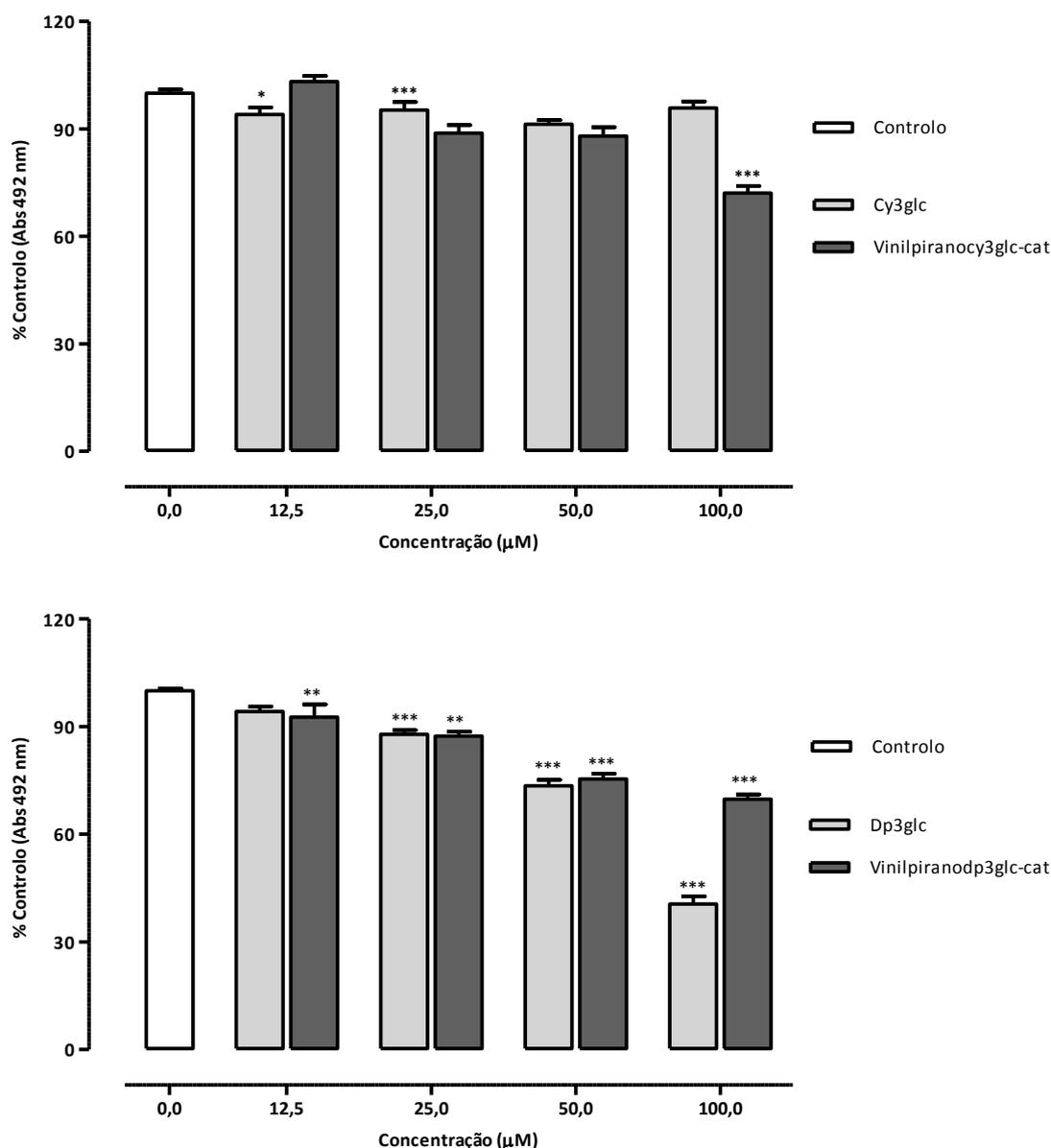


Figura 35. Efeito das antocianinas Cy3glc e Dp3glc e das respetivas portisinas na proliferação de células MCF-7 (ER+), avaliado através do conteúdo celular proteico pelo método SRB. As células MCF-7 foram tratadas com uma gama de concentrações (12,5 – 100,0 µM) de cada composto durante 48 h. Cada valor representa a média ± EPM (n = 6-32). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$  (diminuição significativa vs respetivo controlo).

A portisina vinilpiranocy3glc-cat revelou um efeito antiproliferativo mais intenso do que a respetiva antocianina para a mais alta concentração testada (100,0 µM) (Figura 35). Para a mesma concentração o inverso foi observado quando as células MCF-7 foram

tratadas com Dp3glc (40,60 %  $\pm$  2,08) e vinilpiranodp3glc-cat (69,76 %  $\pm$  1,33) (Figura 35). A presença do grupo pirogalhol na estrutura da antocianinas Dp3glc e da respetiva portisina, já anteriormente descrito como capaz de sofrer auto-oxidação (Cos, Ying et al. 1998; Hodnick, Ahmad et al. 1998) sugere a implicação de espécies reativas de oxigénio ou intermediários reativos no efeito citotóxico observado para estes compostos.

Ainda que não tenham sido realizados estudos de elucidação do mecanismo de ação, estes compostos merecem ser mais estudados não só devido ao facto de poderem vir a fazer parte de uma dieta alimentar normal, como também em resultado do seu efeito citotóxico. É necessário uma avaliação cuidada dos possíveis mecanismos de metabolização destes compostos para melhor compreender se os seus efeitos biológicos devem ou não ser atribuídos aos metabolitos que deles possam resultar.

#### ***4.2. Efeito do grau de hidroxilação e configuração do anel B no efeito antiproliferativo dos diferentes compostos: relação estrutura-atividade***

Atendendo a este efeito antagónico das antocianinas Dp3glc e Cy3glc, procedeu-se à avaliação da inibição do crescimento da linha celular tumoral humana, MCF-7 (ER+) de ácidos fenólicos (ácido protocatechúico e ácido gálico) e fenóis simples (catecol e pirogalhol), bem como de flavonóis (quercetina e miricetina) com os mesmos parâmetros estruturais, nomeadamente o mesmo grau de hidroxilação do anel B, no sentido de estabelecer uma possível relação estrutura-atividade (Figura 36).

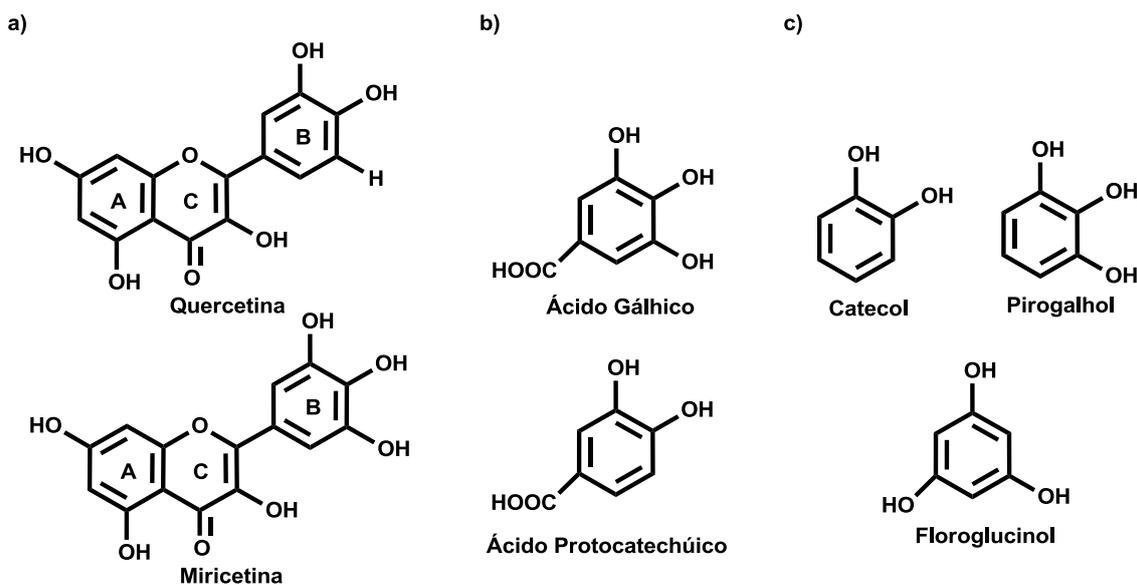
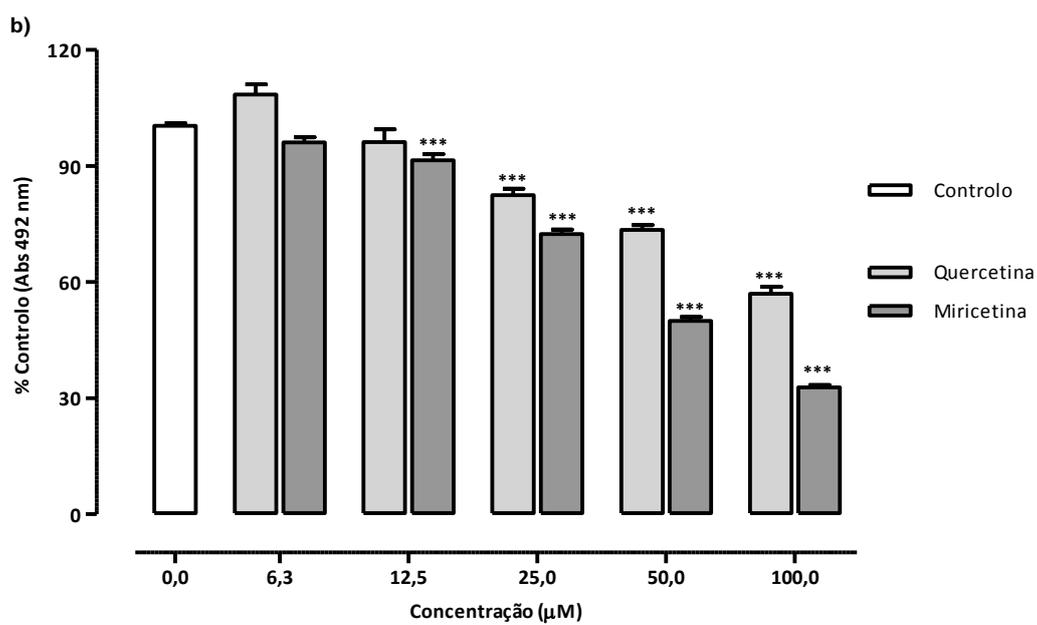
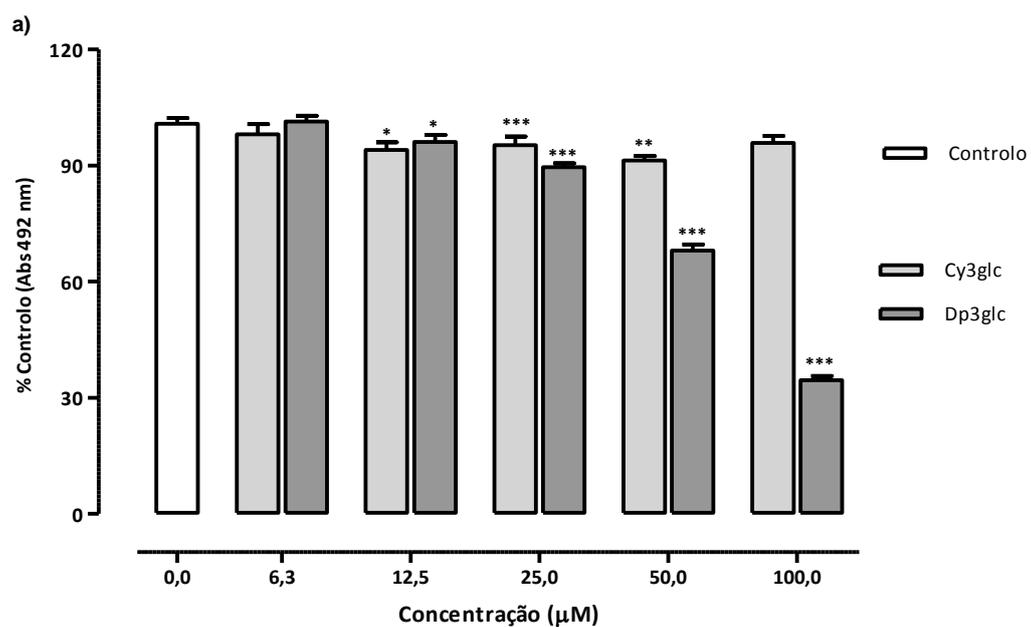


Figura 36. Estrutura química de a) flavonóis (quercetina e miricetina) b) ácidos fenólicos (ácido protocatechúico e ácido gálgico) e c) fenóis simples (catecol, pirogalhol e floroglucinol).

O efeito dos compostos foi avaliado no crescimento de uma linha de adenocarcinoma da mama, MCF-7 com recetores de estrogénios (ER+). Para tal, células em crescimento exponencial, crescendo em meio de cultura (MEM), foram tratadas durante 48 h com uma gama de concentrações (6,3 – 100,0  $\mu\text{M}$ ) de cada composto, tendo o crescimento celular sido avaliado através da quantificação do conteúdo celular proteico pelo corante SRB.

Todas as classes de compostos testados mostraram a mesma tendência, os compostos tri-hidroxilados do anel B nas posições 3', 4' e 5' (posição *orto*) foram responsáveis por uma atividade significativamente superior ( $***p < 0,0001$ ) à apresentada por moléculas da mesma classe com um grupo di-hidroxilo, tendo este efeito sido mais pronunciado para altas concentrações (Figura 37).

Em geral, e independentemente das características estruturais, os ácidos fenólicos e os fenóis (moléculas mais pequenas) foram os mais ativos na capacidade de inibição da proliferação de células MCF-7 comparativamente com os restantes flavonóides testados.



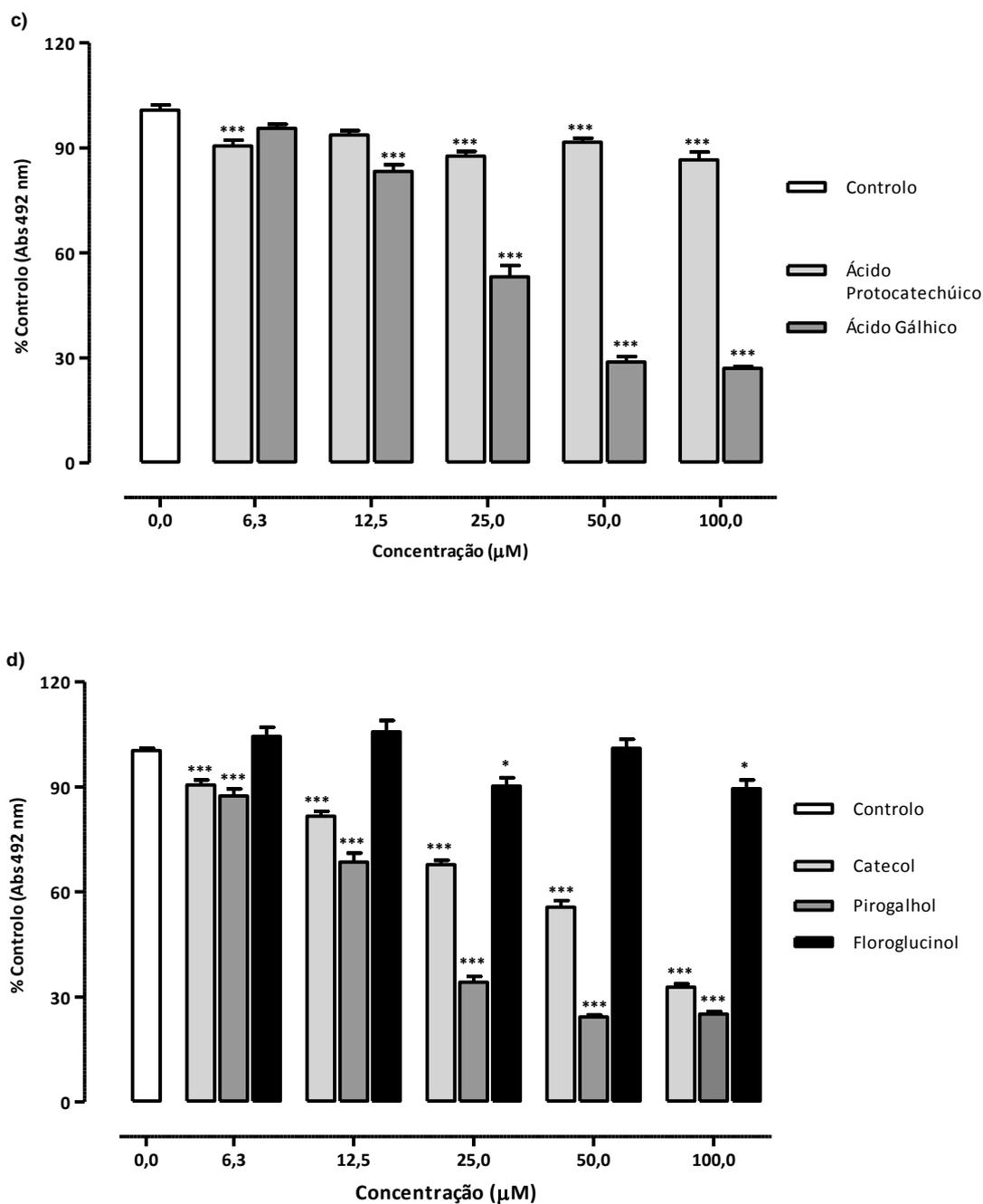


Figura 37. Efeito de a) antocianinas, b) flavonóis, c) ácidos fenólicos e d) fenóis na proliferação de células MCF-7 (ER+), avaliado através do conteúdo celular proteico pelo método SRB. As células MCF-7 foram tratadas com uma gama de concentrações (6,3 – 100,0 µM) de cada composto durante 48 h. Cada valor representa a média ± EPM (n = 6-22). \*p < 0,05, \*\*p < 0,001, \*\*\*p < 0,0001 (diminuição significativa vs respetivo controlo).

Estudos referem que a configuração pirogalhol em flavonóides é importante para as atividades biológicas associadas a estes compostos (Cao, Sofic et al. 1997). A Dp3glc possui a mesma estrutura pirogalhol no anel B que a flavona, miricetina, que se mostrou um composto mais potente. O mesmo estudo refere ainda, que a ligação dupla C2-C3 e o grupo oxo na posição C4 das flavonas podem promover a formação de ROS induzidas por cobre divalente, na presença de oxigénio o que pode justificar o seu efeito antiproliferativo mais intenso observado para a miricetina (Cao, Sofic et al. 1997).

Por outro lado, o grupo pirogalhol pode sofrer auto-oxidação, logo um possível mecanismo que explica a atividade da Dp3glc pode envolver a produção de ROS ou outros intermediários reativos por auto-oxidação da Dp3glc (Hodnick, Ahmad et al. 1998).

#### **4.3. Efeito de antocianinas na proliferação celular**

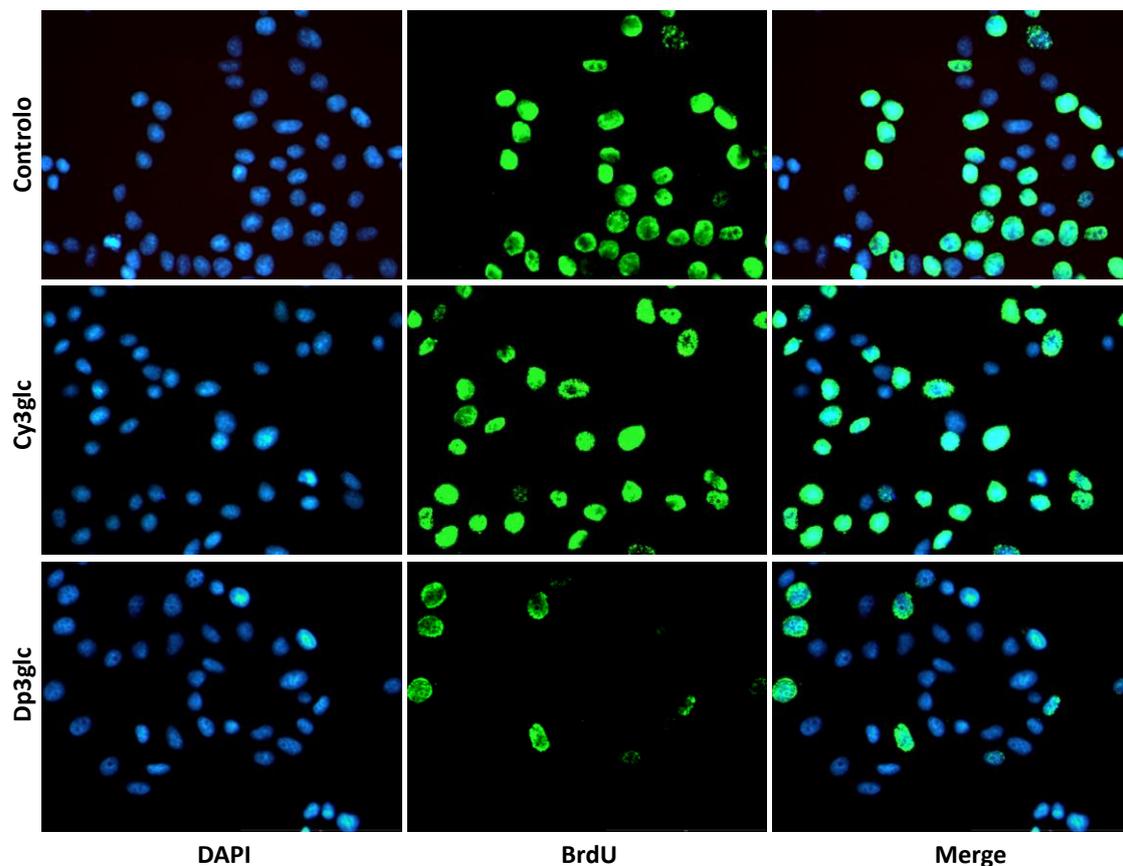
O decréscimo da viabilidade celular, anteriormente observado pode ser interpretado como um efeito citotóxico dos compostos. No entanto, este tipo de ensaio não permite distinguir se as células estão em divisão celular ou se estão quiescentes. Pelo contrário, os ensaios de avaliação da proliferação celular permitem quantificar o número de células em divisão.

Esta quantificação pode ser feita por incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina no DNA sintetizado, no entanto existem métodos alternativos que recorrem a material potencialmente menos perigoso. O 5-bromo-2'-deoxi-uridina (BrdU) é um nucleótido análogo da timidina que pode ser incorporado no DNA durante a fase S da divisão celular, sendo posteriormente facilmente detetado com um anticorpo monoclonal contra o BrdU e um anticorpo secundário conjugado com uma sonda fluorescente.

Este ensaio foi utilizado para quantificar o número de células em fase S após tratamento das células MCF-7 durante 48 h com 0,1% DMSO (veículo), 100 µM de Dp3glc e 100,0 µM de Cy3glc.

De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que o tratamento com Dp3glc induz uma redução significativa ( $*p < 0,05$ ) do número de células em fase S comparativamente com o controlo. Pelo contrário no tratamento com a antocianina Cy3glc não se observam diferenças significativas comparativamente com o controlo (Figura 38).

A diminuição do número de células anteriormente observada para o método SRB, nas mesmas condições experimentais, com a antocianina Dp3glc poderá estar associada uma diminuição da proliferação celular. Contudo, e uma vez que as diferenças comparativamente com o controlo não são tão notórias pode-se especular que a diminuição da proliferação celular esteja ainda associada a um possível aumento da morte celular eventualmente por um processo apoptótico, que interessa posteriormente avaliar.



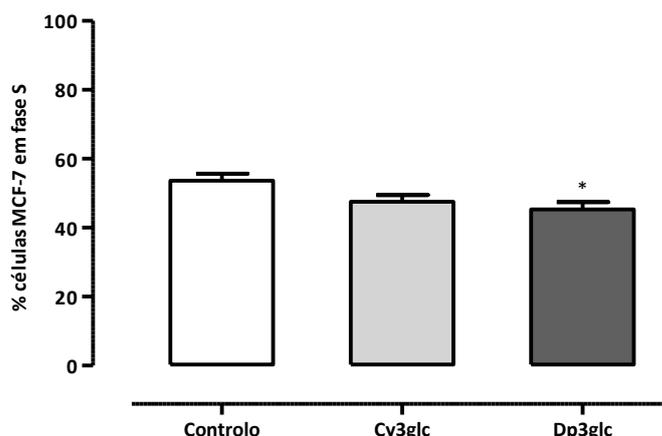


Figura 38. Efeito das antocianinas Dp3glc e Cy3glc na proliferação de células MCF-7 avaliado pelo ensaio do BrdU. Ensaio de imunofluorescência (400x) de células MCF-7 tratadas durante 48 h com: 0,1 % DMSO (veículo), 100,0  $\mu$ M de Dp3glc e 100,0  $\mu$ M de Cy3glc. Células em proliferação são visualizadas com coloração verde quando marcadas com BrdU. O DNA está marcado com DAPI. É apresentada uma experiência representativa (de três experiências independentes com resultados similares). Cada valor representa média  $\pm$  EPM (n = 3). A quantificação do número de células em fase S é apresentada no gráfico. \* $p < 0,05$  (diminuição significativa vs respetivo controlo).

#### 4.4. Efeito das antocianinas Dp3glc e Cy3glc na expressão do ER

##### 4.4.1. RT-PCR

A semelhança estrutural entre as antocianinas estudadas e o  $E_2$ , ligando natural dos recetores de estrogénios (ERs), e a sua já descrita atividade estrogénica, permitiu colocar a hipótese de que o efeito antiproliferativo possa ser mediado por um mecanismo antiestrogénico (Schmitt and Stopper 2001).

A ser observado, esse efeito permitirá associar a este tipo de compostos um efeito bifásico caracterizado por um efeito proliferativo (estrogénico) a baixas concentrações e um efeito antiproliferativo (antiestrogénico) a altas concentrações, já anteriormente descrito para outros flavonóides (Zava and Duwe 1997). Enquanto o efeito proliferativo dos fitoestrogénios parece ser mediado via ERs, o efeito antiproliferativo parece envolver mecanismos independentes do ER (Collins-Burow, Burow et al. 2000). De facto um estudo recente descreve a capacidade inibição da viabilidade de células de adenocarcinoma da MDA-MB-231, sem recetores de estrogénios (ER-) de altas concentrações de Dp3glc (Syed, Afaq et al. 2008). Adicionalmente, Schmitt e colaboradores associam atividade estrogénica a antocianidinas (Schmitt and Stopper

2001), o que pode sugerir que estes compostos apresentam um efeito bifásico neste tipo de células.

No sentido de elucidar o mecanismo subjacente ao efeito antiproliferativo observado, uma potencial implicação do recetor de estrogénios foi investigada.

O efeito antiproliferativo observado nas células MCF-7 (ER+) após tratamento com altas concentrações da antocianina Dp3glc, ausente nas mesmas condições para a antocianina Cy3glc, conduziu à avaliação do efeito na expressão do ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  da exposição contínua a 100,0  $\mu$ M das duas antocianinas durante 48 h.

A expressão das isoformas ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  nas células MCF-7 foi determinada por RT-PCR. A concentração de 100,0  $\mu$ M foi escolhida uma vez que mostrou, anteriormente, induzir o efeito antiproliferativo máximo de aproximadamente 60% para a Dp3glc. O tempo de tratamento de 48 h foi escolhido tendo como base estudos de avaliação da atividade antiproliferativa pelo método do SRB.

As células MCF-7 expressam ambas as isoformas do recetor após incubação com as antocianinas Dp3glc e Cy3glc (Figura 39). A antocianina Dp3glc não alterou a expressão da isoforma ER- $\alpha$ , no entanto uma ligeira redução da expressão da isoforma ER- $\beta$  foi observada, embora sem significado estatístico.

Curiosamente, o efeito antiproliferativo de células MCF-7, anteriormente observado com esta antocianina, não foi acompanhado de uma modificação na expressão do ER. De alguma forma estas duas características poderão estar relacionadas e poderão indicar que o mecanismo antiproliferativo pode ou não implicar uma ligação direta ao ER. A corroborar estes resultados surge um estudo recente com células MCF-7 sujeitas a uma exposição contínua durante 48 h ao antiestrogénio tamoxifeno, um modulador seletivo do recetor de estrogénios (SERM) usado na terapêutica e prevenção do cancro da mama, o qual não provocou alteração dos níveis de mRNA do ER- $\alpha$ , pelo contrário este antiestrogénio é capaz de estabilizar esta forma nuclear ER- $\alpha$  (Wijayarathne and McDonnell 2001). A Dp3glc pode estar a atuar como antagonista, ligando-se diretamente ao ER e impedindo a ligação de outros compostos com atividade estrogénica.

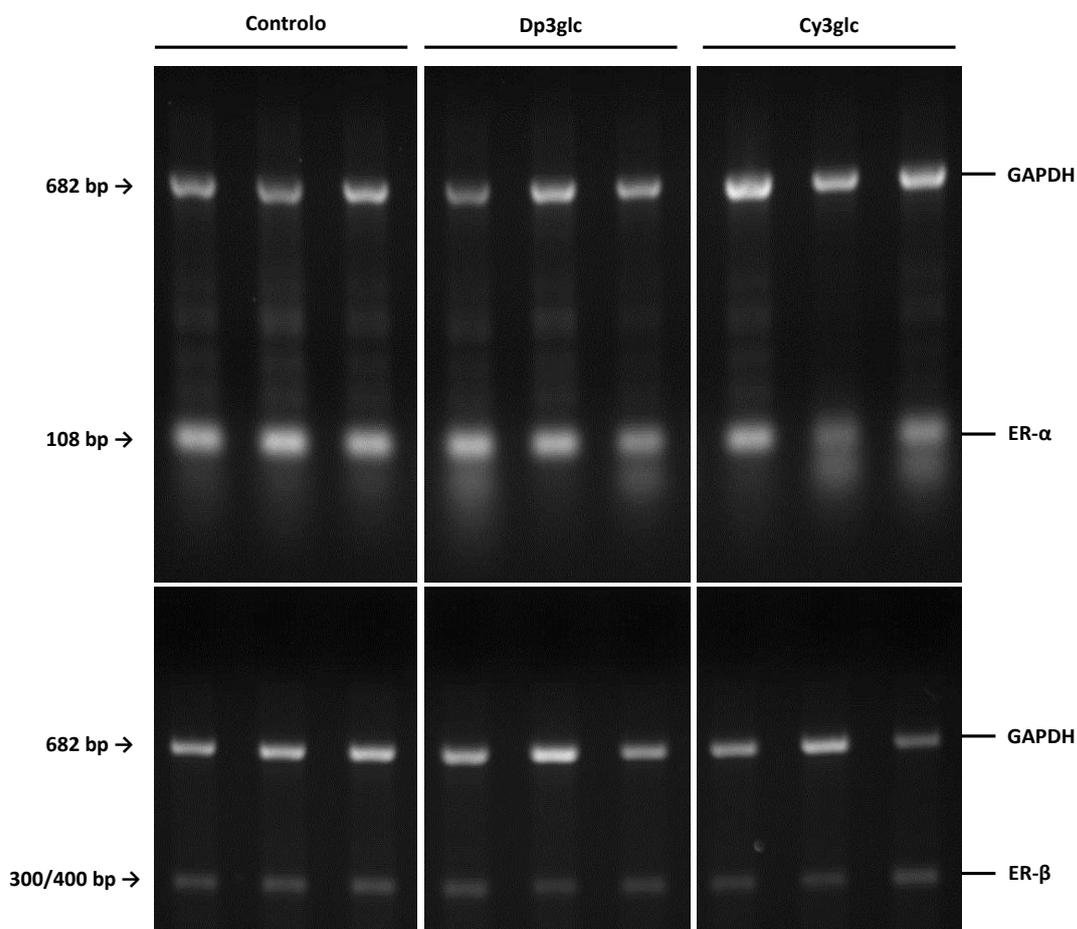
Outro possível mecanismo atuação da Dp3glc pode ser considerado tendo por base a ativação do ER por sinais extracelulares, na ausência de E<sub>2</sub>. A ligação de fatores de crescimento hormonal como o fator de crescimento epidérmico (EGF) a recetores de membrana, podem conduzir à fosforilação por MAPK do ER e à sua consequente ativação (Hall, Couse et al. 2001). Um estudo recente reporta a capacidade da Dp de

inibir o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e conseqüentemente as MAPK (Meiers, Kemeny et al. 2001).

Com base nos dados anteriores a Dp3glc pode estar a atuar por inibição da ativação do ER via EGFR.

A Dp contribui para a inibição da carcinogénese por bloquear a ativação da via de sinalização das MAPK, que é necessária para a ativação da AP-1, cuja ativação resulta na transformação de células neoplásicas (Hou 2003). A Dp3glc pode atuar como agente quimiopreventivo por ligação direta ao ER ou por outros mecanismos que podem envolver inibição de MAPK.

Conseqüentemente o efeito antiproliferativo observado para a Dp3glc pode resultar de uma sinergia entre vários mecanismos, nomeadamente efeito antiestrogénico, indução de apoptose, atividade pro-oxidante, etc. Estudos complementares são necessários para elucidar o(s) mecanismo(s) molecular(es) subjacente(s) ao efeito antiproliferativo observado.



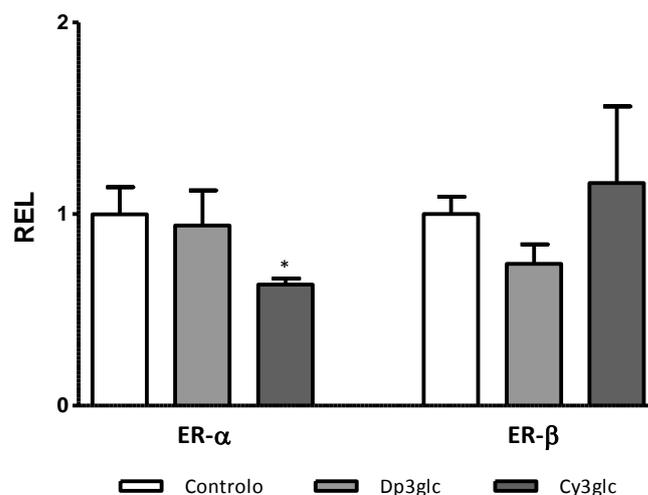


Figura 39. Efeito das antocianinas Dp3glc e Cy3glc na expressão das isoformas ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  em células MCF-7 (ER+) avaliado por RT-PCR. Células MCF-7 foram tratadas com: 0,1 % DMSO (veículo), 100,0  $\mu$ M de Dp3glc e 100,0  $\mu$ M de Cy3glc durante 48 h, sendo apresentada uma experiência representativa de três experiências independentes com resultados idênticos. Cada valor representa a média  $\pm$  EPM ( $n = 3$ ). A expressão relativa de cada banda (REL) foi normalizada e comparada com a expressão do gene GAPDH para cada amostra. \* $p < 0,05$  (diminuição significativa vs respetivo controlo).

Os resultados documentados na Figura 39, para a antocianina Cy3glc mostram uma redução significativa dos níveis de mRNA da isoforma ER- $\alpha$  (\* $p < 0,05$ ), quando comparado com a densidade da banda das células controlo. Este decréscimo da expressão do ER- $\alpha$  observado para a Cy3glc pode ser explicado por um mecanismo similar ao já descrito para o 17- $\beta$ -estradiol. Este ligando natural do recetor de estrogénios é capaz de provocar uma redução dos níveis de mRNA da isoforma ER- $\alpha$  por inibição da transcrição do gene ou por um efeito pos-transcricional no mRNA do recetor (Saceda, Lippman et al. 1988; Pink and Jordan 1996). Estes resultados estão de acordo com um estudo anterior que reporta a atividade estrogénica da Cy (Schmitt and Stopper 2001).

Adicionalmente, efeitos não genómicos do E<sub>2</sub> são atribuídos à ligação a ERs à superfície das células, podendo a Cy3glc atuar à semelhança deste por ligação a ER de membrana.

O padrão de substituição dos anéis aromáticos das antocianinas pode ter influência na afinidade para o ER- $\alpha$ , sendo que a presença de mais de dois grupos hidroxilo no anel B diminui a afinidade das antocianidinas para o ER- $\alpha$  (Schmitt and Stopper 2001). A

mesma relação foi observada com outra classe de flavonóides, os flavonóis (canferol, quercetina e miricetina), para os quais a afinidade para o recetor também diminui com o aumento do número de grupos hidroxilo substituídos no anel B (Zava and Duwe 1997). Esta diferente afinidade pode justificar os efeitos antagónicos observados para as antocianinas Cy3glc e Dp3glc.

Por outro lado, um estudo recente reporta a capacidade da Cy de inibir o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e conseqüentemente as MAPK (Meiers, Kemeny et al. 2001), podendo o efeito observado resultar do balanço entre dois efeitos opostos.

#### 4.4.2. PCR em tempo real ( $RT^2$ -PCR)

A avaliação dos níveis de mRNA das duas isoformas do ER após tratamento com as antocianinas Dp3glc e Cy3glc foi também realizada por  $RT^2$ -PCR. Os níveis de mRNA do ER- $\alpha$  e do ER- $\beta$  de células tratadas com Dp3glc foram muito semelhantes aos das células controlo (Figura 40). No entanto, os níveis de mRNA do ER- $\beta$  de células tratadas com Cy3glc foram significativamente reduzidos (\* $p < 0,05$ ) em comparação com as células controlo (Figura 40).

Embora ambas as técnicas tenham mostrado um decréscimo na expressão do ER, o tratamento com Cy3glc reduziu seletivamente a expressão do ER- $\beta$ , não tendo tido qualquer efeito na expressão do ER- $\alpha$  (Figura 40).

De acordo com a literatura o ER- $\beta$  está associado ao efeito antiproliferativo, podendo antagonizar a função do ER- $\alpha$  (Hartman, Ström et al. 2009). Em células MCF-7, que apresentam predominância do ER- $\alpha$  em relação em ER- $\beta$ , a redução dos níveis de ER- $\beta$  induzida pelo tratamento com Cy3glc está associada a um aumento da razão ER- $\alpha$ : ER- $\beta$ , o que está de acordo com a ausência de efeito antiproliferativo observado para o tratamento com esta antocianina.

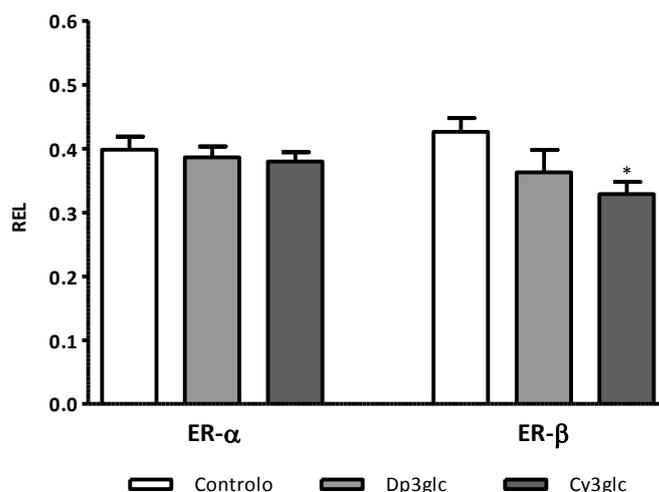


Figura 40. Efeito das antocianinas Dp3glc e Cy3glc na expressão das isoformas a) ER-α e b) ER-β em células MCF-7 (ER+) avaliado por RT<sup>2</sup>-PCR. Células MCF-7 foram tratadas com: 0,1 % DMSO (veículo), 100,0 μM de Dp3glc e 100,0 μM de Cy3glc durante 48 h, sendo apresentada uma experiência representativa de três experiências independentes com resultados idênticos. Cada valor representa a média ± EPM (n = 3). A expressão relativa de cada banda (REL) foi normalizada e comparada com a expressão do gene GAPDH para cada amostra. \**p* < 0,05 (diminuição significativa vs respetivo controlo).

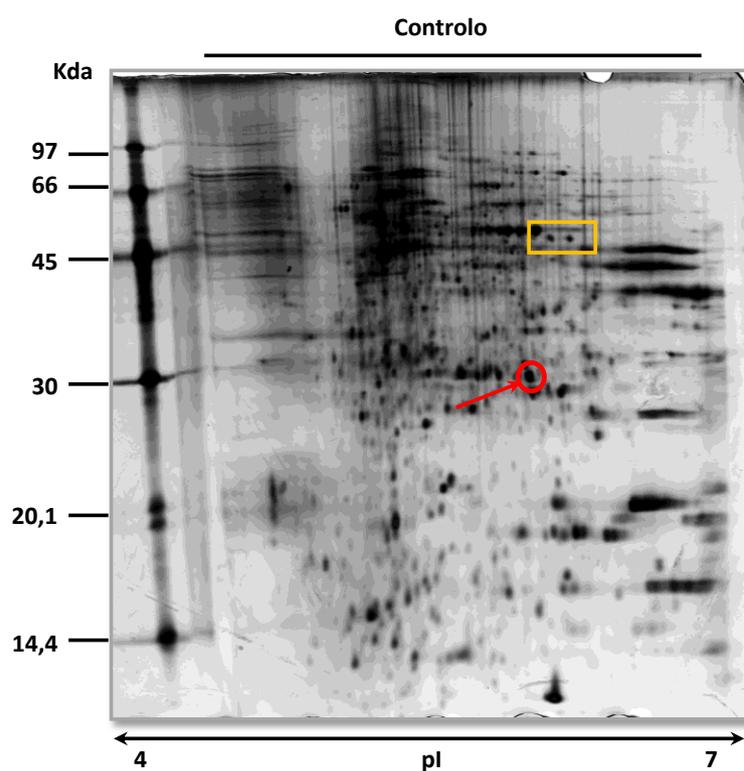
#### **4.5. Efeito das antocianinas Dp3glc e Cy3glc na expressão proteica de células MCF-7**

O efeito antiproliferativo dos polifenóis tem sido associado a uma possível interação direta ou modulação entre estes e as proteínas participantes de vias de sinalização celular, afetando assim a expressão genética. Com o objetivo de identificar outras proteínas diferencialmente expressas em células tratadas com as antocianinas Cy3glc e Dp3glc, efectuou-se uma análise proteómica, usando a técnica de eletroforese bidimensional. Este estudo pretende avaliar a possível implicação de outras vias de sinalização no efeito antagónico observado em células MCF-7 tratadas com as antocianinas Cy3glc e Dp3glc. Para tal, foram extraídas proteínas de células controlo tratadas com 0,1 % DMSO e de células tratadas com 100,0 μM de cada antocianina durante 48 h.

Os resultados obtidos mostram que, em termos gerais, nas células tratadas com Cy3glc e Dp3glc o conteúdo de algumas proteínas é menor (Figura 41, rectângulo

amarelo), enquanto a expressão de outras permanece inalterada (Figura 41, seta vermelha).

O decréscimo mais acentuado da expressão de proteínas participantes em diferentes de vias de sinalização celular observado para o tratamento com a Dp3glc pode ser indicativo da implicação de diferentes mecanismos de ação, para além dos anteriormente avaliados, no efeito antiproliferativo desta antocianina.



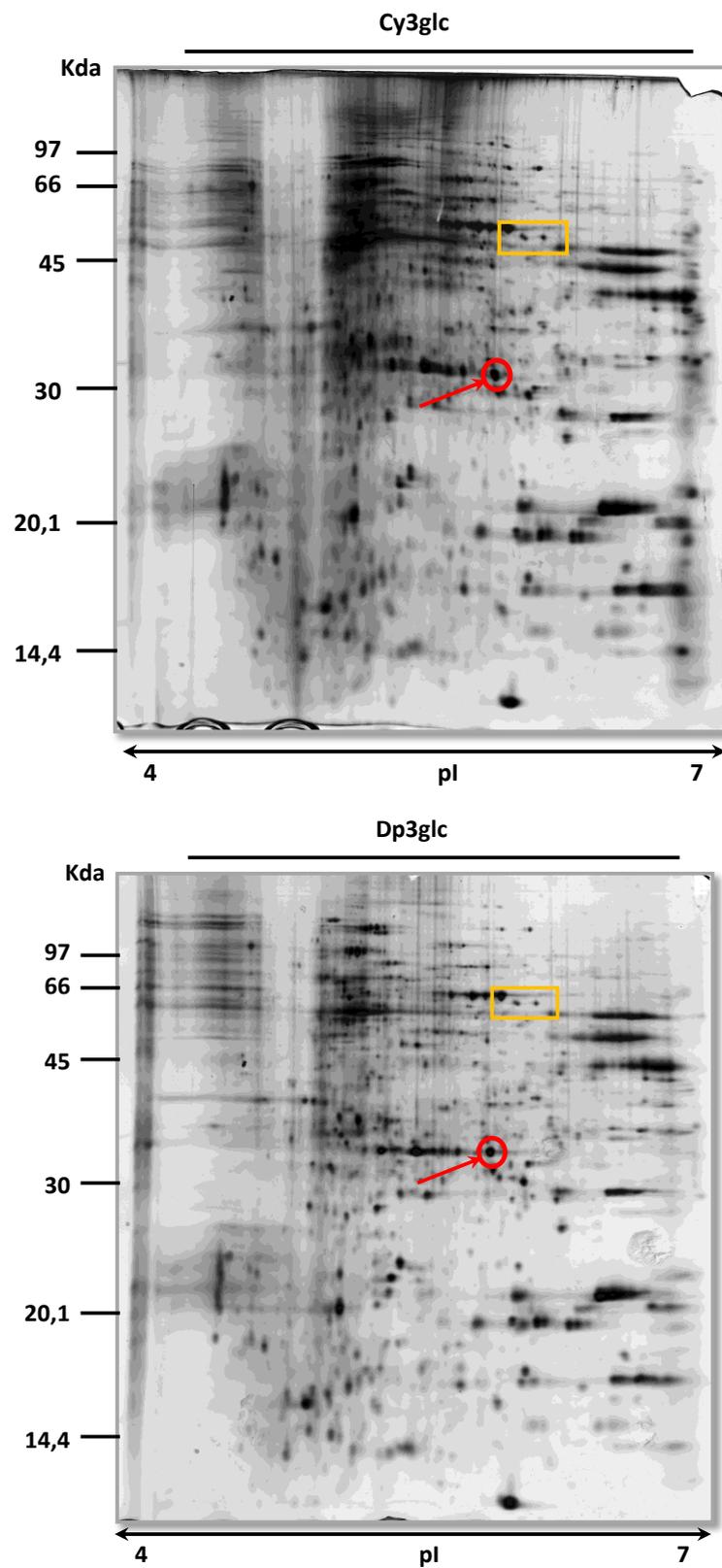


Figura 41. Análise de alterações no proteoma de células MCF-7 tratadas com as antocianinas Cy3glc e Dp3glc. As células MCF-7 foram tratadas com 100,0  $\mu\text{M}$  de Cy3glc e Dp3glc durante 48 h. As proteínas foram extraídas das

células controlo e das células tratadas com antocianinas, separadas por eletroforese bidimensional, e coradas com prata como descrito em material e métodos. É apresentada uma experiência representativa (de duas experiências independentes com resultados similares).

As alterações observadas serão identificadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS). As proteínas cuja expressão sofreu alteração serão identificadas por comparação com um mapa proteómico anteriormente publicado para esta linha celular e associadas a uma determinada via de sinalização celular (Ou, Yu et al. 2008). Estes resultados são apenas preliminares e é necessário efectuar mais experiências semelhantes para caracterizar totalmente as alterações no proteoma de células tratadas com as antocianinas Cy3glc e Dp3glc.

As antocianinas são compostos polifenólicos abundantes em muitos alimentos e bebidas e, como tal, foi importante conhecer e caracterizar as suas capacidades biológicas. O interesse na síntese e avaliação das propriedades biológicas de derivados antociânicos prende-se quer com a sua presença em bebidas, nomeadamente vinhos tintos, quer na possibilidade de serem utilizados como corantes na indústria alimentar, uma vez que apresentam cores interessantes e invulgares (laranja e azul). As propriedades biológicas que estes compostos demonstraram *in vitro* reforçam o interesse de uma possível utilização. De facto, as propriedades biológicas de compostos ingeridos na dieta normal como componentes naturais de um alimento ou bebida são uma importante questão na indústria alimentar na perspectiva da saúde do consumidor.

## 5. Conclusão

Os resultados deste capítulo podem ser resumidos da seguinte forma:

- A natureza do substituinte na posição C3 (-glicose ou -OH) influenciou de modo significativo a atividade citotóxica dos flavonóides. Verificou-se que a substituição de uma molécula de glicose por um grupo hidroxilo, associada à inserção de um grupo oxo na posição C4 e de uma ligação dupla C2-C3 foi responsável pelo aumento de atividade, quando se compararam a Cy3glc e a quercetina com a Dp3glc e a miricetina, respetivamente;

- A tri-hidroxilação do anel B nas posições 3', 4' e 5' foi responsável por uma atividade significativamente superior ( $***p < 0,0001$ ) à apresentada por moléculas da mesma classe com um grupo di-hidroxilo, quando comparamos a Cy3glc e a quercetina com a Dp3glc e a miricetina, respetivamente;
- A presença do grupo carboxílico no anel fenólico não influenciou de modo significativo a atividade antitumoral, quando se compararam as atividades do ácido gálgico com o pirogalhol;
- A posição dos substituintes tri-hidroxilados no anel fenólico influenciou de modo significativo a atividade citotóxica ( $***p < 0,0001$ ). Assim quando se comparam a atividade do floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzeno) com o pirogalol (1,2,3-trihidroxibenzeno) verifica-se que distribuição em posição orto dos grupos hidroxilo foi responsável pelo aparecimento de atividade;
- Os fenóis, catecol e pirogalhol apresentaram um aumento significativo da atividade comparativamente com os flavonóides e ácidos fenólicos com características estruturais similares, sendo os compostos mais potentes do grupo de moléculas com um anel di e tri-hidroxilado;
- O efeito antiproliferativo da Dp3glc esteve associado a uma redução do número de células MCF-7 em fase de síntese;
- O tratamento de células MCF-7 com Dp3glc não foi acompanhado por modificação na expressão do ER, no entanto esta antocianina foi capaz de alterar a expressão de outras proteínas;
- A antocianina Cy3glc reduziu a expressão do ER na linha celular MCF-7.



## PARTE 2 - BIODISPONIBILIDADE DE ANTOCIANINAS E PIGMENTOS ANTOCIÂNICOS

Esta parte do trabalho está dividida em 2 capítulos:

- Capítulo I: Desenvolvimento de um modelo de barreira gástrica e avaliação do respetivo transporte transmembranar de antocianinas;
- Capítulo II: Avaliação da biodisponibilidade de antocianinas e pigmentos antociânicos num modelo *in vitro* de barreira intestinal.

CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DO MODELO DE BARREIRA GÁSTRICA:  
TRANSPORTE DE ANTOCIANINAS



## 1. Introdução

A permeabilidade gastrointestinal de fármacos e nutrientes é normalmente avaliada utilizando modelos de barreira intestinal, sendo a absorção a nível do estômago desprezada. Até ao momento pouca atenção tem sido atribuída à absorção gástrica de componentes alimentares, com excepção do etanol (Hogben, Schanker et al. 1957). No entanto é com este epitélio que os componentes ingeridos por via oral entram em contacto em primeiro lugar, estando já descrita a absorção de alguns fármacos (Truitt and Morgan 1960).

A quantidade absorvida depende principalmente da solubilidade do composto nas condições gástricas, do tempo que o composto permanece na cavidade gástrica e do volume. O tempo de permanência do composto após uma refeição normal pode atingir as 3-4 h. Algumas moléculas como a água, pequenas moléculas não-eletrólitos lipossolúveis e fármacos de natureza ácida fraca são absorvidas pela mucosa gástrica por difusão facilitada (Hogben, Schanker et al. 1957).

O estômago está coberto por um epitélio colunar de células de mucosa (Motoyama, Hojo et al. 1986). A análise das funções de transporte do estômago está dificultada devido à presença de uma população celular muito heterogénea e uma geometria morfológica complexa (Figura 42).

Em termos gerais, os procedimentos metodológicos para isolar e trabalhar com culturas primárias de células gástricas são consideravelmente mais difíceis do que a relativa simplicidade de usar linhas celulares tumorais humanas de estômago, para efectuar estudos de transporte.

É primordial o desenvolvimento de um modelo de cultura celular da superfície gástrica adequado para pesquisar a biodisponibilidade de nutracêuticos, como polifenóis e os seus metabolitos. Em concreto, é necessário um modelo que permita avaliar simultaneamente a permeabilidade de compostos e os seus efeitos na barreira gástrica e que apresente uma característica fundamental a resistência à presença de um pH luminal muito ácido.

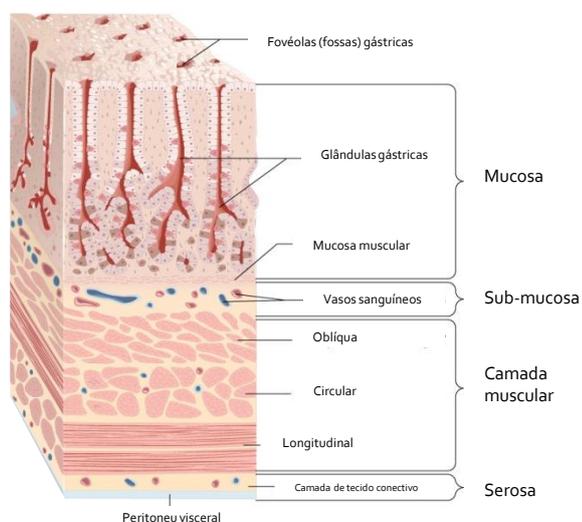


Figura 42. Estruturas do estômago humano. O estômago apresenta 3 camadas de músculo: uma camada exterior longitudinal, uma camada central circular e uma camada interna oblíqua. A camada interna é formada por quatro sub-camadas: a serosa, a muscular, a submucosa e a mucosa. A mucosa é formada por glandulas gástricas, que contêm células produtoras de enzimas digestivas, ácido clorídrico e muco (<http://www.britannica.com/>).

Desta forma será possível avaliar o efeito de pH reduzido na absorção de nutrientes, em particular a possibilidade de absorção de polifenóis através do epitélio gástrico.

Os poucos estudos que avaliaram a absorção gástrica de fármacos recorreram a células de porquinho-da-índia como modelo da superfície do estômago (Schwenk, Linz et al. 1992; Kavvada, Murray et al. 2005). Embora este seja um bom modelo da superfície do epitélio gástrico, apresenta algumas limitações, nomeadamente por não ser um modelo de células humanas e por exigir um processo moroso e trabalhoso de extração e cultura das células de estômago de um número significativo de animais.

A absorção de antocianinas é um assunto de extrema importância uma vez que estes compostos representam componentes importantes da dieta para consumidores que ingerem frutos vermelhos e vinho tinto como base da sua alimentação, e estão descritas propriedades benéficas para a saúde relacionadas com o seu consumo (Prior and Wu 2006). Diversos estudos, *in vivo* e *in vitro*, têm associado o consumo de antocianinas e alimentos ricos em antocianinas com efeitos benéficos para a saúde, nomeadamente ao nível da melhoria de capacidades cognitivas e memória, inibição da proliferação celular tumoral e indução da apoptose e inibição de acumulação de gordura (Ren, Qiao et al. 2003; Andres-Lacueva, Shukitt-Hale et al. 2005; Rayalam,

Della-Fera et al. 2008; Spencer 2009). No entanto, a questão específica da biodisponibilidade destes compostos ainda continua por esclarecer. A biodisponibilidade de antocianinas a nível intestinal é considerada muito baixa (<1 %) (Faria, Pestana et al. 2009), no entanto o seu consumo pode ser bastante superior ao dos restantes flavonóides dependendo do tipo de dieta. A literatura aponta para uma baixa e rápida absorção das antocianinas, mas na sua forma intacta (glicosídica) sugerindo a sua absorção a nível gástrico (Cao and Prior 1999; Cao, Muccitelli et al. 2001; Milbury, Cao et al. 2002; Mulleder, Murkovic et al. 2002; Ichiyanagi, Shida et al. 2006; Felgines, Texier et al. 2009).

Entre as várias classes de polifenóis, as antocianinas são as únicas que existem em diferentes formas de equilíbrio de acordo com o pH do meio, o que dificulta o estudo da sua biodisponibilidade. Alguns aspetos analíticos parecem ser responsáveis para a baixa biodisponibilidade das antocianinas descrita até ao momento. De facto, a maior parte dos estudos de avaliação da biodisponibilidade e absorção intestinal de antocianinas recorreram a métodos de deteção baseados na quantificação de antocianinas por HPLC, com deteção apenas da estrutura de catião flavílio. Consequentemente, todas as determinações realizadas desta forma apresentam resultados subestimados.

Adicionalmente, e ao contrário dos restantes flavonóides (Piskula, Yamakoshi et al. 1999; Crespy, Morand et al. 2001), são absorvidas como glicósidos, apesar do seu mecanismo de absorção ainda não ser plenamente conhecido provavelmente requer um transporte ativo (Talavera, Felgines et al. 2003).

De facto, as antocianinas podem ser absorvidas através da mucosa gástrica, possivelmente por um mecanismo que envolve a bilitranslocase (Passamonti, Vrhovsek et al. 2003).

*Passamonti* e colaboradores (Passamonti, Vrhovsek et al. 2002) mostram que as antocianinas são ligandos da bilitranslocase, um transportador de aniões orgânicos presente nas células epiteliais da mucosa gástrica e, segundo estes autores, a bilitranslocase pode desempenhar um papel na biodisponibilidade das antocianinas. Os resultados de *Mulleder* e colaboradores (Mulleder, Murkovic et al. 2002) são bastante interessantes: mostram que a adição de sacarose ao sumo de baga de sabugueiro leva à redução e atraso na excreção de antocianinas. Isto significa que os açúcares podem interferir com o mecanismo de transporte de antocianinas. Diferentes estudos demonstram que as antocianinas provenientes de diferentes fontes alimentares são absorvidas intactas e aparecem no plasma e na urina (Mazza, Kay et

al. 2002; Kay, Mazza et al. 2004; Talavera, Felgines et al. 2005; Ichihayashi, Shida et al. 2006; Frank, Janssen et al. 2007). Apesar de não existirem dados disponíveis acerca da quantidade exacta de antocianinas que são absorvidas, o perfil cinético e a recuperação de antocianinas na urina sugerem que apenas uma pequena parte é efectivamente absorvida. No entanto, a excreção urinária não transmite uma medida exacta da biodisponibilidade já que a biotransformação pela microflora intestinal, que origina ácidos fenólicos (Aura, Martin-Lopez et al. 2005), e a excreção biliar podem alterar estes valores.

A contribuição da mucosa gástrica para o metabolismo das antocianinas não deve ser excluída, uma vez que este órgão possui as enzimas de fase II, UDP-glicuronosiltransferase, sulfotransferase, e catecol-O-metil transferase) (Karhunen, Tilgmann et al. 1994; Strassburg, Oldhafer et al. 1997; Strassburg, Nguyen et al. 1998; Harris, Picton et al. 2000). Estudos *in vitro* já mostraram que alguns flavonóides podem ser metabolizados a conjugados glicuronilados ou sulfatados na cavidade gástrica (Déchelotte, Varrentrapp et al. 1993; Piskula, Yamakoshi et al. 1999).

Um estudo recente com um modelo epitelial gástrico de células de porquinho da Índia, confirma a rápida absorção de ácidos hidroxicinâmicos na sua forma intacta e conjugados com grupos metilo, após ingestão de café (Farrell, Dew et al. 2011).

Torna-se desta forma claro que é necessária mais pesquisa para desvendar o paradoxo entre os efeitos benéficos das antocianinas e a sua aparente reduzida biodisponibilidade.

## 2. Objetivos

O objetivo deste capítulo prende-se com o estudo da absorção e metabolismo de antocianinas através de células do epitélio gástrico.

As investigações nesta área estão limitadas à inexistência de um modelo de epitélio gástrico humano que forme uma barreira funcional.

Assim, foram objetivos do trabalho relatado neste capítulo:

- (i) desenvolver um modelo epitélio gástrico humano adequado às condições ácidas do estômago;
- (ii) estudar a biodisponibilidade das antocianinas nesse modelo celular;



### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Reagentes

O 2-(N-ácido morfolinoetanosulfónico (MES), o PBS e o tris-HCl foram adquiridos à Sigma-Aldrich® (Madrid, Spain). O ácido acético glacial e o dimetilsufóxido foram adquiridos à Fluka (Madrid, Spain). Todo o material de cultura celular foi adquirido à TPP (Trasadingen, Switzerland), a não ser que indicado em contrário.

#### 3.2. Células e condições de cultura

A linha celular tumoral MKN-28 originária de epitélio gástrico humano foi gentilmente cedida pelo Professor Doutor Celso Reis do IPATIMUP (Porto, Portugal) tendo inicialmente sido adquirida à *Cell Bank, Riken BioResource Center* (JCRB0253, Ibaraki, Japão). As células foram mantidas em atmosfera com 5 % CO<sub>2</sub>-95 % ar, à temperatura de 37 °C. Estas células (passagens 6-20) cresceram em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 AQmedia (Sigma-Aldrich®, Madrid, Espanha) suplementado com 10 % de soro fetal de bovino, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich®, Madrid, Espanha). O meio de cultura foi renovado a intervalos de 48 h e as células atingiram a confluência ao fim de 5-6 dias de cultura. Para a manutenção da divisão das células em cultura, estas foram dissociadas com 0,25 % de tripsina-EDTA, diluídas a 1:3 e cultivadas em placas de petri com 21 cm<sup>2</sup> de área de crescimento (Corning Costar, Badhoevedorp, The Netherlands). Para as experiências de transporte transepitelial as células foram semeadas em *inserts* (membrana de policarbonato, poro com 0,4 µm, 12 mm de diâmetro, Corning Costar, Badhoevedorp, The Netherlands). Os *inserts* foram colocados em placas de 12 poços nas quais cresceram durante 7 dias.

A resistência eléctrica transepitelial (TEER) das células foi medida utilizando um voltímetro epitelial com eléctrodos planos (Millipore Co., Bedford, MA). As experiências foram efetuadas em monocamadas com TEER > 150 Ω.cm<sup>2</sup>.

A TEER foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$TEER(\Omega.cm^2) = R \times A$$

$R$  = resistência e  $A$  = área do filtro ( $cm^2$ ).

### 3.3. Ajuste do pH apical

Nos estudos de transporte o lado basolateral continha meio Hanks (Sigma-Aldrich®, Madrid, Espanha) pH 7,4 com 2 % SFB. O pH do lado apical foi ajustado de forma a mimetizar as condições ácidas do estômago, de acordo com Kavvada e colaboradores (Kavvada, Murray et al. 2006), com algumas alterações. O pH gástrico é aproximadamente 2,0, em condição não alimentado, enquanto após uma refeição atinge o valor de 5,0 (Dressman, Berardi et al. 1990; Russell, Berardi et al. 1993). O pH 5,0 foi conseguido por adição de 2-(N-ácido morfolinoetanosulfónico (25 mM) e posterior ajuste do pH ao valor desejado com HCl (5 M). O pH 3,0 foi ajustado por diferentes métodos: i) adição de HCl (6 M); ii) adição de ácido cítrico (25 mM,  $pK_a = 3,1$ ) e posterior ajuste do pH com NaOH e iii) adição a cada 30 min durante 3 h de HCl (concentração final 0,3 %). Os valores de pH das soluções mantiveram-se estáveis na ausência de células.

### 3.4. Permeabilidade do marcador fluorescente amarelo Lucifer

O marcador fluorescente amarelo Lucifer (100  $\mu M$ , MW 457,2) foi adicionado ao lado apical em meio Hanks pH 3,0 ou 5,0 e ao lado basolateral foi adicionado meio Hanks pH 7,4. Os *transwells* foram colocados a 37 °C durante 3 h. Durante este período recolheram-se alíquotas (150  $\mu L$ ) do lado basolateral e repôs-se o volume com meio Hanks a cada 30 min. A fluorescência foi determinada num fluorímetro Perkin-Elmer LS 45 (Massachusetts, USA), usando um  $\lambda_{exc}$  485 nm e um  $\lambda_{em}$  530 nm. Todas as determinações foram efetuadas com uma fenda de 10 nm e uma voltagem de 650 V. Curva calibração amarelo lucifer ( $\mu M$ ): Concentração = 1,0226 x fluorescência ( $R^2 = 0,9973$ )

A permeabilidade aparente (Papp) do marcador amarelo lucifer foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$P_{app}(cm/s) = \frac{VR}{A \times CD0} \times \frac{\Delta CR}{\Delta t}$$

$P_{app}$  = coeficiente de permeabilidade aparente; VR = volume basolateral ( $cm^3$ ); A = area membrana ( $cm^2$ ); CD0 = concentração no lado apical no tempo 0;  $\Delta CR/\Delta t$  = variação da concentração de composto no lado basolateral ao longo do tempo (segundos).

### **3.5. Estudos de transporte transepitelial**

Os estudos de transporte foram realizados de acordo com um procedimento descrito na literatura (Yi, Akoh et al. 2006). Removeu-se o meio de cultura e lavaram-se as células com meio Hanks pH 7,4 no lado basolateral e com meio Hanks pH 3,0 ou 5,0 no lado apical. A solução de antocianinas (em meio Hanks pH 3,0 ou 5,0; 500  $\mu M$ ) foi adicionada ao lado apical das células e Hanks com 2 % de SFB foi adicionado ao compartimento basolateral. O transporte transepitelial foi seguido em função do tempo, a 37 °C. Recolheram-se alíquotas (150  $\mu L$ ) do lado basolateral e repôs-se o volume com meio Hanks aos 30, 60, 120 e 180 min. As amostras foram acidificadas com HCl (0,06 M) e congeladas (-18 °C) por forma a garantir que a quantidade cumulativa de cada composto não sofria alteração até análise por HPLC-DAD (de acordo com o procedimento descrito acima). As antocianinas e o ácido acetilsalicílico foram quantificados utilizando as seguintes curvas de calibração:

Curva calibração Mv3glc ( $\mu M$ ): Concentração = 52573 x área ( $R^2 = 0,9993$ ),  $\lambda = 520$  nm

Curva calibração AAS ( $\mu M$ ): Concentração = 4545 x área ( $R^2 = 0,9992$ ),  $\lambda = 276$  nm

A eficiência de transporte foi calculada de acordo com a seguinte equação: (concentração de composto no lado basolateral a um determinado tempo/concentração de composto no lado apical ao tempo 0) x 100.

### **3.6. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

As amostras foram analisadas por HPLC, tendo-se usado o sistema Elite Lachrom (L-2130) equipado com uma coluna (250 x 4,6 mm i.d.) C-18 de fase reversa (Merck®,

Darmstadt); a detecção foi realizada a 520 ou a 276 nm usando um detector com barra de díodos (DAD) (L-2455). Os solventes foram, A: H<sub>2</sub>O/HCOOH (9:1) e B: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/HCOOH (6:3:1). O gradiente consistiu em 20-85 % de B durante 70 min com um fluxo de 1,0 mL/min. A coluna foi lavada com 100 % de B durante 20 min e depois estabilizada com as condições iniciais durante 20 min. O varrimento dos picos foi realizado entre os 200 e os 700 nm.

### **3.7. Imunofluorescência**

As células MKN-28 foram plaqueadas em lamelas estéreis de 18 mm de diâmetro e incubadas até atingirem confluência. As monocamada foram lavadas com meio Hanks pH 7,4 e com posteriormente com PBS. As células foram fixadas com 3% formaldeído/PBS (15 min) à temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavadas, 3 vezes com PBS e posteriormente permeabilizadas 0,1 % triton X-100 em PBS (15 min). A fluorescência do fundo foi removida por incubação com 3 % BSA em PBS (1 h). As células foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-occludina (Zymed, 33-1500), diluição 1:1000 em 3 % BSA em PBS (1 h). A monocamada foi lavada 3 vezes com PBS, seguindo-se a marcação com o anticorpo secundário de cabra anti-ratinho AlexaFluor 488 (Molecular probes, Invitrogen), usado na diluição 1:2000 em 3 % BSA em PBS (1 h) no escuro. A marcação foi seguida por um novo passo de lavagem 3 vezes com PBS. As lamelas foram colocadas em meio de montagem (Vectashield Mounting Medium) com DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol, 1,5 µg/mL) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

As imagens foram adquiridas num microscópio de fluorescência Axio Imager Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) e tratadas usando o software AxioVision 4.8.

### **3.8. Análise por LC-MS**

A análise dos metabolitos foi efetuada num cromatógrafo líquido (Hewlett-Packard 1100 series) equipado com uma coluna de fase reversa Thermo Finnigan (Hypersil Gold<sup>®</sup>) (150 x 4,6 mm, 5 µm, C18) termostaticada a 25 °C. Os solventes utilizados foram (A) solução aquosa 1 % de ácido fórmico e (B) acetonitrilo. O gradiente utilizado

foi o descrito para a análise de HPLC-DAD. Foi efetuada detecção dupla num espectrómetro com barra de díodos e num espectrómetro de massa. O detector de massa foi um Finnigan LCQ DECA XP MAX (Finnigan Corp., San Jose, CA., EUA) equipado com uma fonte API, utilizando uma interface de ionização de *electrospray* (ESI). O vaporizador e a voltagem capilar foram de 5 kV e 4 V, respetivamente. A temperatura capilar foi de 325 °C e o gás utilizado foi o azoto. O espetro foi gravado no modo de ião positivo com  $m/z$  entre 120 e 1500. O espectrómetro de massa foi programado para uma série de três varrimentos: um de massa total, um zoom dos iões mais intensos do primeiro varrimento, e um MS-MS do ião mais intenso utilizando uma energia de colisão relativa entre 30 e 60.

### **3.9. Análise estatística**

Todas as experiências foram efetuadas pelo menos em triplicado. Os valores estão expressos como médias aritméticas  $\pm$  EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas através da análise de variância a um fator (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, utilizando o software GraphPadPrism v5. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .



## 4. Resultados e Discussão

Vários modelos celulares gástricos têm sido usados para avaliar os danos da infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* na barreira gástrica. Idealmente estes estudos deveriam ser feitos recorrendo ao uso de preparações primárias de células epiteliais gástricas humanas. No entanto o acesso a tecido normal está limitado e restringe severamente o número e tipo de estudos a realizar. A maioria dos estudos utilizaram a linha celular humana de adenocarcinoma gástrico, AGS, como modelo. Contudo esta linha celular não forma um epitélio polarizado, e não expressa a proteína das junções aderentes E-caderina (Jawhari, Noda et al. 1999), nem forma junções apertadas (Amieva, Vogelmann et al. 2003).

A linha celular de adenocarcinoma gástrico, NCI-N87, tem sido usada na área da fisiologia e patologia gástrica, tendo recentemente sido aplicada no estudo da permeabilidade de fármacos (Lemieux, Bouchard et al. 2011).

De acordo com a investigação realizada até ao momento na área da biodisponibilidade nutricional, não existe nenhuma linha celular humana padrão estabelecida para prever a absorção gástrica de componentes da dieta.

Este trabalho propõe como modelo de células epiteliais gástricas humanas, a linha celular de epitélio humano MKN-28, originária de um adenocarcinoma do estômago (Motoyama, Hojo et al. 1986), moderadamente diferenciado que apresenta as características morfológicas e histoquímicas do tecido gástrico humano (Romano, Razandi et al. 1988). Esta linha celular foi anteriormente usada como modelo de barreira gástrica para avaliar o efeito de fármacos anti-inflamatórios não esteróides na disfunção gástrica (Oshima, Miwa et al. 2008) e para estimar a disfunção da barreira gástrica induzida por *Helicobacter pylori* (Wroblewski, Shen et al. 2009).

### 4.1. Variação da resistência eléctrica transepitelial das células MKN-28

Para otimização das condições de cultura, as células foram semeadas em inserts (membrana de policarbonato, poro com 0,4  $\mu\text{m}$ , 12 mm de diâmetro) com 75 % de confluência. Os *inserts* foram colocados em placas de 12 poços nas quais cresceram até atingiram a confluência.

A resistência eléctrica transepitelial (TEER) das células foi medida a 37 °C e à temperatura ambiente, em meio Hanks pH 7,4 ao longo dos vários dias de

crecimento, tendo-se observado um aumento progressivo da resistência o que sugere a formação de junções apertadas (Figura 43). Tal como pode ser constatado na Figura 43 os valores de TEER determinados à temperatura ambiente são bastante superiores aos determinados a 37 °C (Artursson 1991).

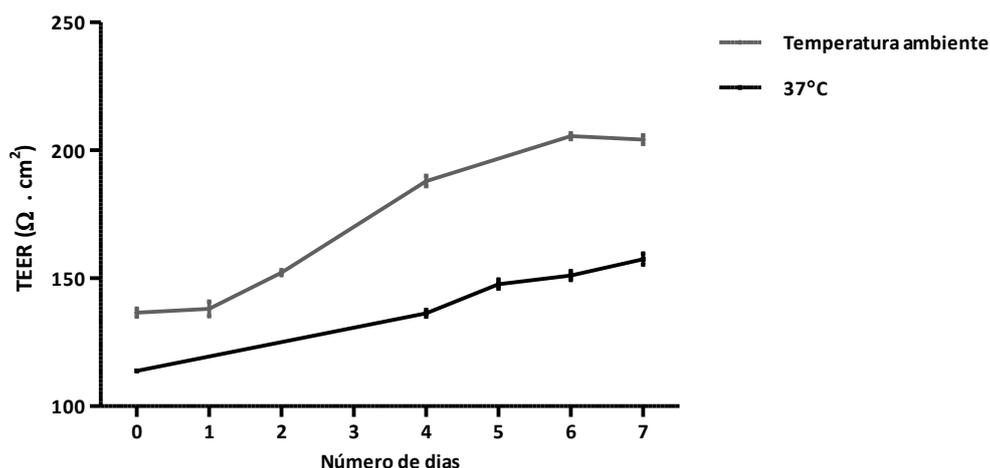


Figura 43. Variação da resistência eléctrica transepitelial (TEER) ao longo de 7 dias de cultura, à temperatura ambiente e a 37 °C.

#### 4.2. Ensaio de imunofluorescência

A presença de junções apertadas em células MKN-28 confluentes foi confirmada, no sentido de garantir que esta linha constitui um modelo adequado ao estudo da biodisponibilidade de componentes da dieta.

As junções apertadas separam a superfície apical do lado basolateral de forma a garantir a polaridade celular e a formação de uma barreira, inibindo a passagem de solutos e água através do espaço paracelular (Tsukita and Furuse 2000). Estes complexos são compostos por proteínas de membrana, tais como ocludinas, claudinas, moléculas de adesão e ainda proteínas associadas à membrana. As ocludinas estão associadas à regulação das funções de barreira (Chen, Merzdorf et al. 1997).

Esta linha celular expressa a claudina-3, claudina-4, claudina-7, *zonula occludens* (ZO)-1 e ocludinas essenciais para regular a permeabilidade (Oshima, Miwa et al.

2008). Assim sendo, a localização das ocludinas nas células MKN-28 confluentes foi determinada por imunofluorescência. Tal como pode ser confirmado na Figura 44, as ocludinas estão localizadas nas membranas celulares (setas brancas). De facto, as células MKN-28 expressam ocludinas e estas proteínas estão localizadas nos locais de contacto entre as células, o que está de acordo com os dados da literatura (Wroblewski, Shen et al. 2009).

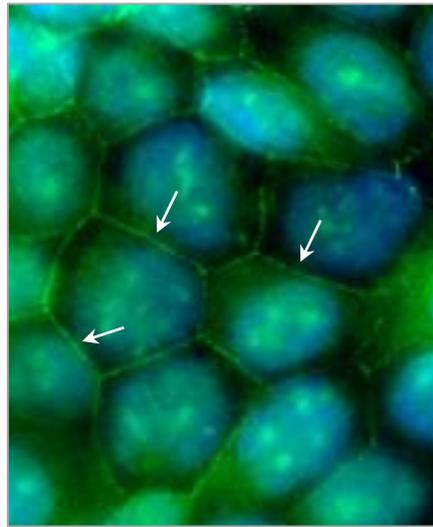


Figura 44. Imunocitoquímica de células MKN-28, marcação das ocludinas. Para a imunodeteção das junções apertadas, as células foram marcadas com o anticorpo anti-occludina (verde) e os núcleos com DAPI (azul). As setas indicam a presença de ocludinas na membrana celular.

### **4.3. Efeito do pH na integridade da barreira**

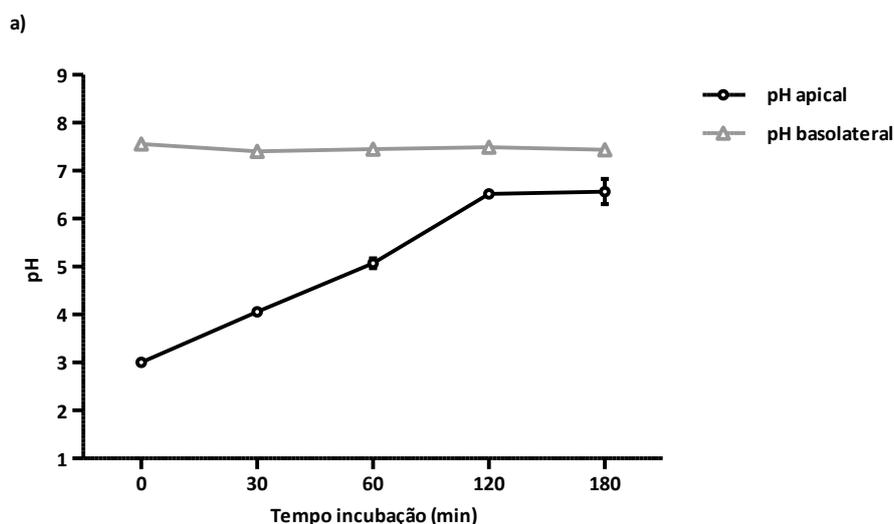
De acordo com Kavvada e colaboradores, a adição de HCl ao meio Hanks apical para ajustar o pH a 5 ou 6 permitia apenas uma acidificação transiente, observando-se o retorno do pH a 7,0 após incubação com as células durante 30 min, esta recuperação pode ser resultado da transferência de bicarbonato do lado basolateral para o lado apical (Kavvada, Murray et al. 2005). Numa primeira abordagem, o pH do meio Hanks foi ajustado a 3,0 com HCl 6 M e adicionado ao lado apical de inserts contendo células MKN-28 confluentes. O pH apical, nestas condições experimentais sofreu um aumento, atingindo ao fim de 2 h valores próximos do pH no lado basolateral (Figura 45a).

Por outro lado, quando o ajuste de pH foi conseguido por adição de ácido cítrico (25 mM, pKa = 3,1) ao meio Hanks, observou-se uma clara alteração da integridade da membrana, uma vez que o pH basolateral diminuiu ao longo do tempo (Figura 45b).

Com base no mecanismo fisiológico que, *in vivo*, mantém o pH gástrico em valores próximos de 3,0, foi realizada uma adição contínua de HCl (concentração final = 0,3 %) a cada 30 min durante as 3 h de incubação de forma a manter o pH apical constante. Desta forma foi possível manter o pH apical e basolateral praticamente constante durante todo o tempo de incubação (Figura 45c) e o valor da resistência praticamente sem alterações, o que é indicativo da manutenção da integridade da membrana.

Esta é a primeira vez que um modelo humano de barreira gástrica cultivado em *transwell* foi desenvolvido de forma a mimetizar as condições ácidas do estômago.

Curiosamente, num estudo recente realizado com a linha celular humana de adenocarcinoma gástrico, NCI-N87, cultivada em *transwell*, o pH apical foi ajustado a 3,0 com uma adição única de HCl (1 mM), não existindo nesse trabalho qualquer referência ao valor de pH apical no fim do período de incubação, podendo os resultados apresentados nessas condições estar comprometidos, com base no que foi exposto anteriormente (Lemieux, Bouchard et al. 2011).



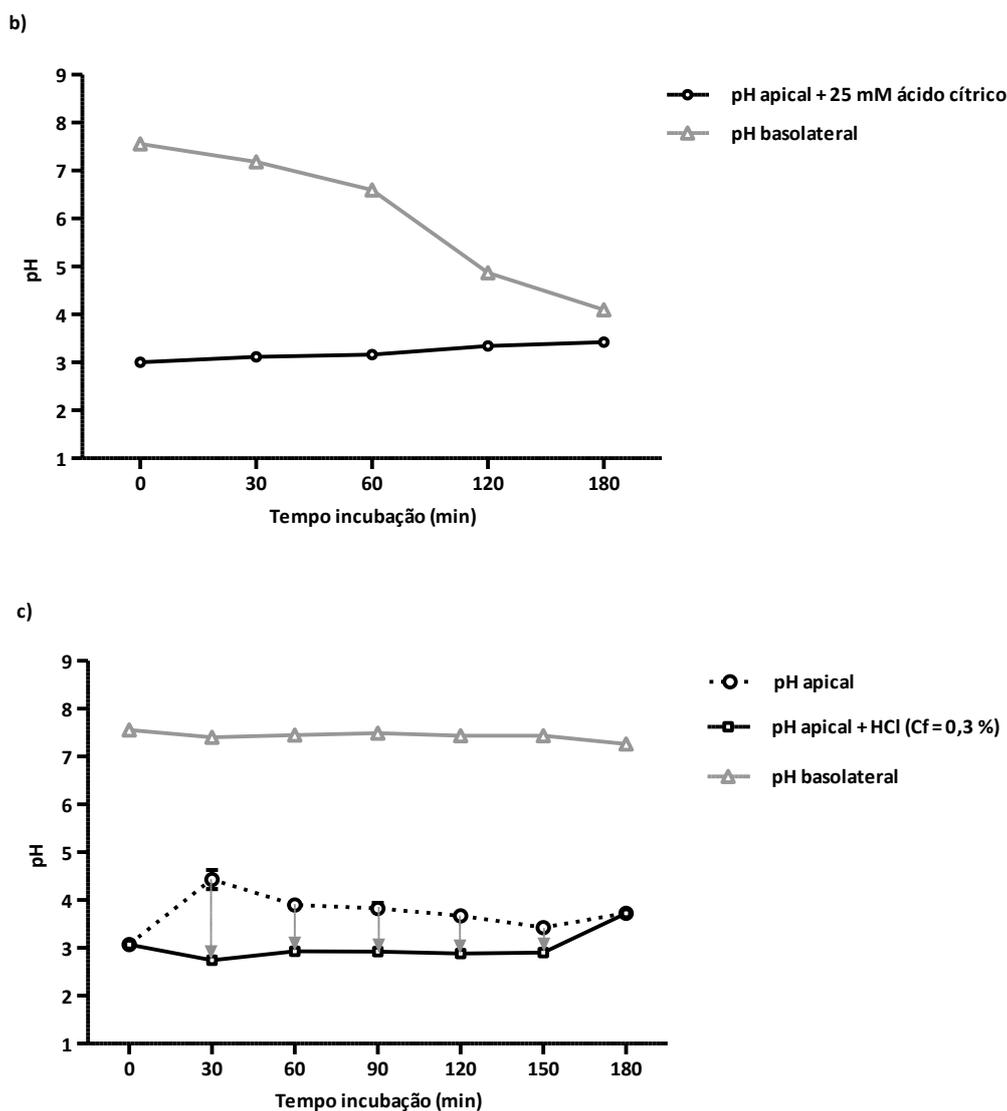


Figura 45. Variação do pH no lado apical e basolateral ao longo de 3 h: a) pH apical após adição de HCl 6 M; b) pH apical após adição de 25 mM ácido cítrico e c) pH apical após adição de HCl (concentração final = 0,3 %) a cada 30 min.

#### 4.4. Efeito do pH na resistência da membrana

Em resultado do reduzido pH observado a nível gástrico, e não sendo estas condições fisiológicas, é essencial avaliar o efeito do pH 3 na resistência da monocamada.

Durante o tempo da experiência (3 h), em ambas as condições de pH testadas, a TEER manteve-se praticamente constante (Figura 46), o decréscimo observado deve-

se à medição ter sido feita a 37 °C e não à temperatura ambiente. Num estudo realizado recentemente os valores de TEER nas condições pH apical 3,0 e pH basolateral 7,4 apresentam um decréscimo de 40 % no valor inicial de TEER, o qual só é recuperado quando as células são novamente colocadas em meio de cultura completo (Lemieux, Bouchard et al. 2011).

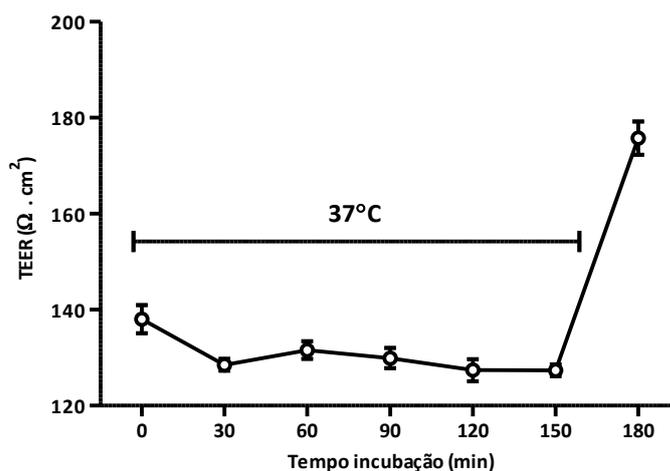


Figura 46. Variação da TEER ao longo de 3 h.

#### **4.5. Permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) da sonda de permeabilidade paracelular: amarelo de Lucifer**

A permeabilidade das monocamadas foi também controlada com amarelo lucifer (457,2 g/mol), um marcador da permeabilidade paracelular. A sonda (100  $\mu$ M) foi adicionada no lado apical de células MKN-28 cultivadas em *inserts*, e o meio do lado basolateral (150  $\mu$ L) foi recolhido a cada 30 min e quantificado por fluorescência, nas diferentes condições experimentais.

O valor de  $P_{app}$  foi obtido por cálculo do declive da reta que relaciona a quantidade cumulativa de amarelo lucifer transportado para o lado basolateral ao longo do tempo, tal como exemplificado para o gradiente de pH 5,0/ 7,4 (Tavelin, Gråsjö et al. 2002). Nas várias experiências realizadas o valor de  $P_{app}$  esteve compreendido entre  $8,0 \times 10^{-6}$  e  $1,5 \times 10^{-5}$  cm/s.

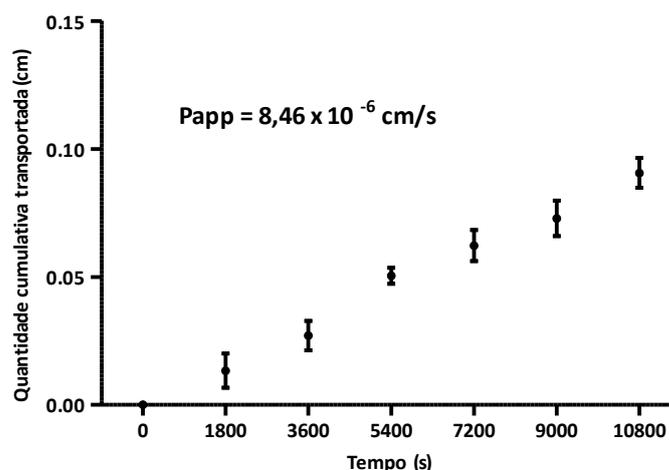


Figura 47. Gráfico exemplificativo da quantidade cumulativa de amarelo lucifer transportada através das células MKN-28 ao longo das 3 h de incubação, com o gradiente de pH 5,0/ 7,4. O valor de  $P_{app}$  apresentado corresponde ao cálculo do declive da reta.

De acordo com trabalhos anteriormente publicados a permeabilidade aparente da sonda paracelular FITCH-dextrano (4000 g/mol) em células MKN-28, varia entre  $1-10 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$  dependendo das condições experimentais (Hashimoto, Oshima et al. 2008; Oshima, Miwa et al. 2008), valores estes que estão acima dos valores obtidos, no entanto como não se trata da mesma sonda nem das mesmas condições experimentais não pode ser feita uma comparação direta.

A integridade da membrana, nos estudos realizados com células NCI-N87 em condições ácidas, foi igualmente avaliada por determinação do valor da permeabilidade aparente do amarelo lucifer, tendo apresentado valores na ordem dos  $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  (Lemieux, Bouchard et al. 2011).

#### **4.6. Transporte do ácido acetilsalicílico através das células MKN-28**

O ácido acetilsalicílico (AAS) é um fármaco rapidamente detetado na circulação sanguínea e conseqüentemente rapidamente absorvido a nível gástrico (Truitt and Morgan 1960). Sendo um ácido fraco, o AAS, pode doar prótons, ficando na forma aniônica. Apenas a fração não iônica pode atravessar as membranas por difusão. A

pH inferior a 3,5 (aproximadamente o valor de pH do estômago vazio), a forma não carregada predomina favorecendo a sua difusão através das membranas.

No sentido de servir como composto controlo, a eficiência de transporte do AAS (500  $\mu$ M) através das células MKN-28, na presença de dois gradientes de pH foi avaliada.

Com o gradiente, pH apical 3,0/ pH basolateral 7,4, a eficiência de transporte atinge um valor máximo de aproximadamente 30 % aos 30 min e mantém-se praticamente constante durante o decorrer da experiência (Figura 48).

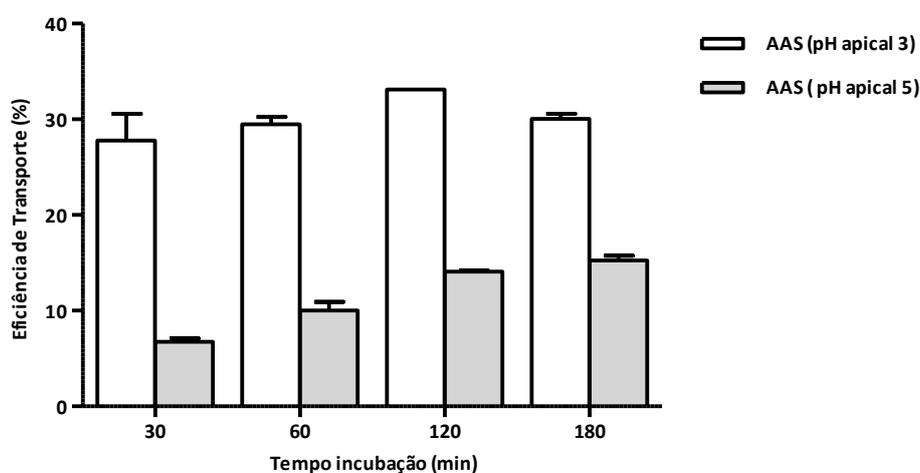


Figura 48. Eficiência de transporte do ácido acetilsalicílico (500  $\mu$ M) através das células MKN-28 (Apical→ Basolateral). Os resultados são apresentados como eficiência de transporte (%) (média  $\pm$  EPM). A eficiência de transporte é apresentada sob a forma de percentagem, calculada de acordo com a seguinte equação: (concentração de composto no lado basolateral a um determinado tempo/concentração de composto no lado apical ao tempo 0 h) x 100.

No entanto, na presença do gradiente de pH, pH apical 5,0 /pH basolateral 7,4, a eficiência de transporte do AAS foi dependente do tempo, atingindo um valor máximo de cerca de 15 % aos 180 min (Figura 48). A este valor de pH, a maior parte do fármaco está carregada, o que reduz a sua absorção por difusão passiva, no entanto outros mecanismos de transporte podem estar envolvidos que justifiquem o aumento da quantidade de fármaco absorvido no lado basolateral, ao longo do tempo de incubação. Um estudo de absorção intestinal do ácido salicílico sugere que este ácido na presença do mesmo gradiente de pH (pH apical 5,0 /pH basolateral 7,4) é transportado ativamente através de células Caco-2 por transportadores de ácidos

monocarboxílicos e transportadores de aniões orgânicos, expressos maioritariamente no intestino e fígado, mas também no estômago (Neuhoff, Ungell et al. 2005).

De forma similar ao AAS, também as antocianinas, em particular a Mv3glc, apresentam um pKa reduzido (3,7) (Lima, Vautier-Giongo et al. 2002). Contudo, e ao contrário do AAS, a pH inferior a 3,0 a forma predominante das antocianinas é a de catião flavílio. A pH superior a 4,0 as formas hemiacetal e chalcona são as predominantes (Figura 5). Se as antocianinas são absorvidas no estômago, como a sua rápida deteção no plasma sugere, diferentes mecanismos podem ocorrer dependendo da forma de equilíbrio predominante.

#### 4.7. Transporte das antocianinas através das células MKN-28: efeito do pH apical

Neste trabalho utilizaram-se três antocianinas comuns na dieta obtidas por extração de películas de uvas tintas, tal como descrito no capítulo I, Parte 1, de forma a tentar relacionar os seus efeitos com as particularidades da sua estrutura química (Figura 49).

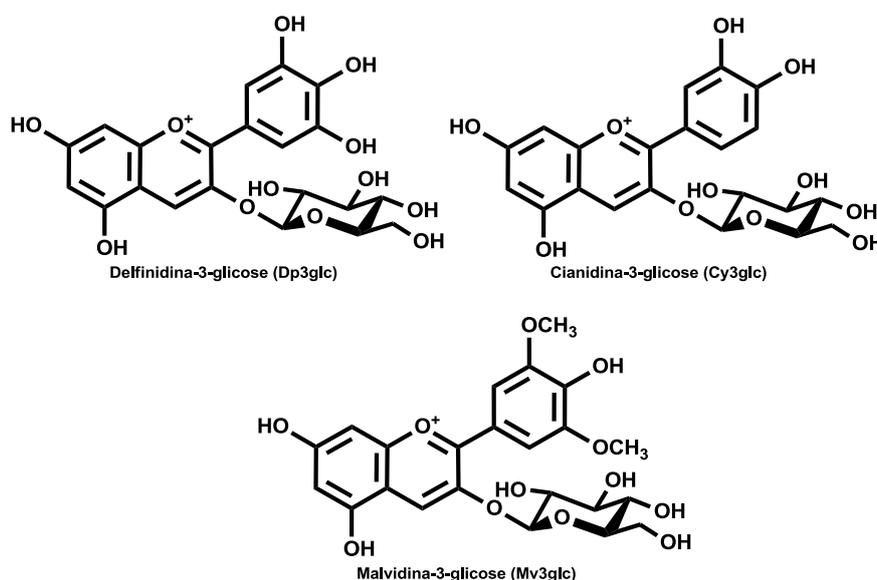


Figura 49. Estrutura química das antocianinas delfinidina-3-glicose (Dp3glc), cianidina-3-glicose (Cy3glc) e malvidina-3-glicose (Mv3glc).

Cada uma das três antocianinas (500  $\mu\text{M}$ ) foi adicionada no lado apical de células MKN-28 cultivadas em *inserts*, os *inserts* foram colocados em placas *transwell* e incubados durante 3 h a 37 °C.

A concentração de 500  $\mu\text{M}$  foi escolhida por este valor ser facilmente atingido no estômago com uma dieta normal, através do consumo, por exemplo, de 1 copo de vinho tinto, ou 2 cálices de vinho do Porto (Clifford 2000).

Este valor foi calculado assumindo um consumo diário por refeição de 12,5 mg (Wu, Beecher et al. 2006), estando este valor dependente de fatores socio-demográficos e de estilo de vida (Chun, Chung et al. 2007), e ainda da disponibilidade sazonal de frutos e vegetais ricos em antocianinas (Wu, Beecher et al. 2006) e considerando um volume de secreções digestivas totais de 3 L por refeição e uma massa molar média de 500 g/mol.

O estudo da biodisponibilidade gástrica das antocianinas foi realizado a 2 gradientes de pH que incluem o pH do estômago desprovido de alimento (pH apical 3,0/ pH basolateral 7,4) e o estado alimentado (pH apical 5,0/ pH basolateral 7,4) (Dressman, Berardi et al. 1990; Russell, Berardi et al. 1993).

De forma a realizar a quantificação da quantidade cumulativa de amostra transportada para o lado basolateral através das células MKN-28 foram recolhidas amostras do lado basolateral (150  $\mu\text{L}$ ).

Na Figura 50 são apresentados os cromatogramas referentes às amostras recolhidas do lado basolateral de células MKN-28 incubadas, no lado apical, com Cy3glc (500  $\mu\text{M}$ ) durante 3 h.

Pode-se constatar pela análise dos cromatogramas que as amostras que não foram pré-acidificadas, isto é que foram mantidas ao pH observado no lado basolateral 7,4, apresentam um decréscimo muito acentuado da área do pico cromatográfico correspondente à Cy3glc, que ao fim de cerca de 24 h à temperatura ambiente é praticamente inexistente (Figura 50).

No entanto, a pré-acidificação das amostras com 1 % de HCl (5 M) e posterior análise por HPLC-DAD nas mesmas condições, mostra a manutenção da quantidade de Cy3glc presente ao longo de 24 h de incubação à temperatura ambiente (Figura 50).

Interessa ainda referir que o armazenamento a -18 °C de amostras a pH fisiológico não é suficiente para manter as concentrações de antocianina estáveis.

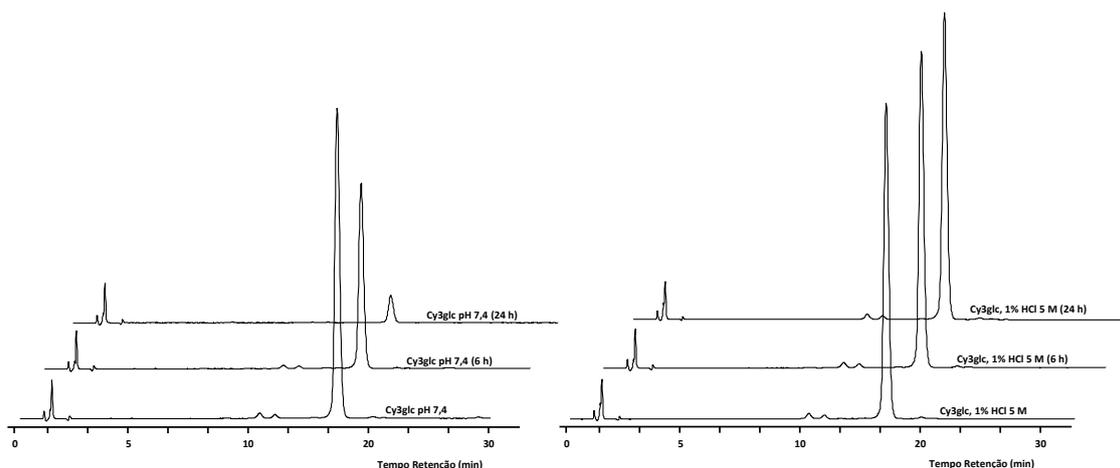


Figura 50. Cromatograma de HPLC da estabilidade da Cy3glc a diferentes pHs, registado a 520 nm. As amostras foram recolhidas do lado basolateral de células MKN-28 incubadas com Cy3glc (500  $\mu$ M) durante 3 h: a) amostras mantidas a pH 7,4 e analisadas aos tempos 0, 6 e 24 h e b) amostras mantidas acidificadas com 1% de HCl (5 M) e analisadas aos tempos 0, 6 e 24 h.

As amostras recolhidas no lado basolateral (pH 7,4) não apresentavam cor vermelha visível, o que é indicativo da ausência da forma de catião flavílio (cor vermelha) em solução, tal como seria de prever o equilíbrio químico das antocianinas estava deslocado para as formas hemiacetal e chalcona. No entanto, seria de prever que as condições ácidas da análise por HPLC (10 % de ácido fórmico em ambos os solventes) fossem suficientes para deslocar completamente o equilíbrio para a forma de catião flavílio.

De facto, a análise de amostras, sem pré-acidificação, por HPLC, permitiu detetar um pico com um tempo de retenção inferior ao do catião flavílio que apresenta um  $\lambda_{\text{máx}}$  de 343 nm e, que poderá ser a forma chalcona da antocianina, e mais precisamente a trans-chalcona, que apresenta um tempo de conversão mais lento (Figura 51).

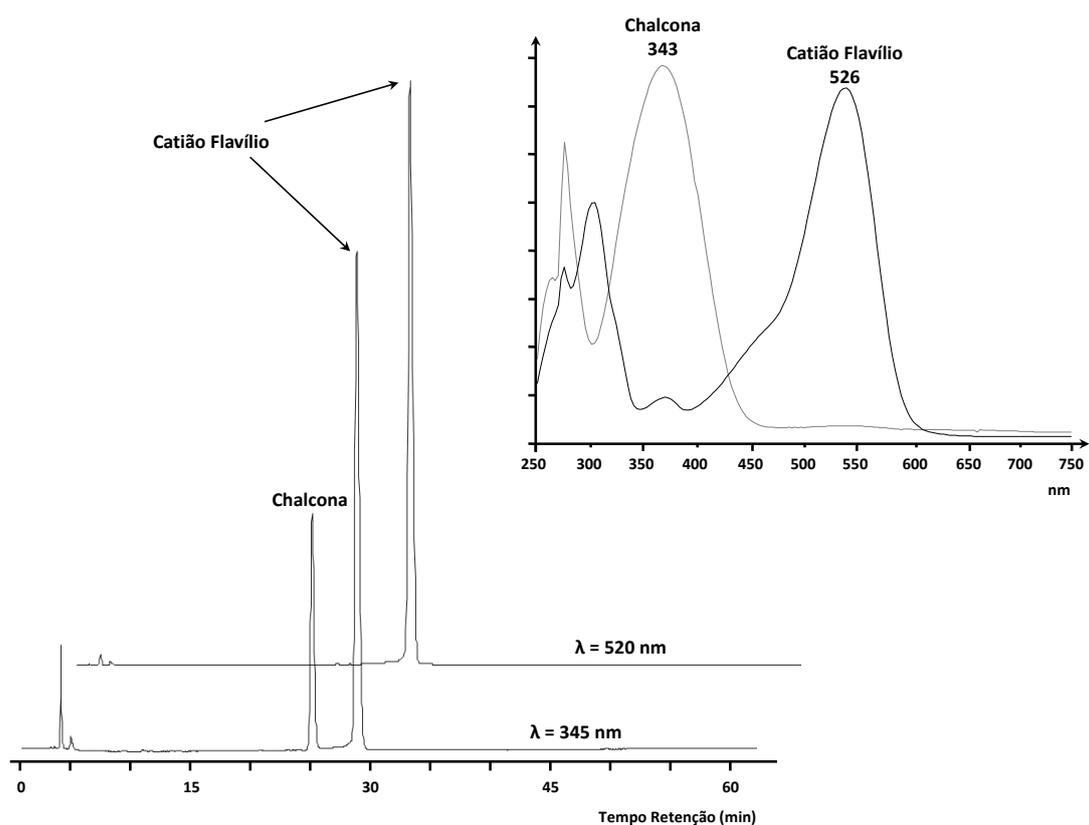


Figura 51. Cromatograma de HPLC da Mv3glc a pH 7,4, registado a 345 e 520 nm. O espetro de UV-vis das formas chalcona e catião flavílio é apresentado no canto superior direito.

A identificação deste pico foi confirmada com base no padrão de fragmentação obtido por LC-MS  $m/z$  511 ( $493 + 18$ ),  $MS^2$  349 ( $-162$ ),  $MS^3$  223 ( $-126$ ) (Figura 52).

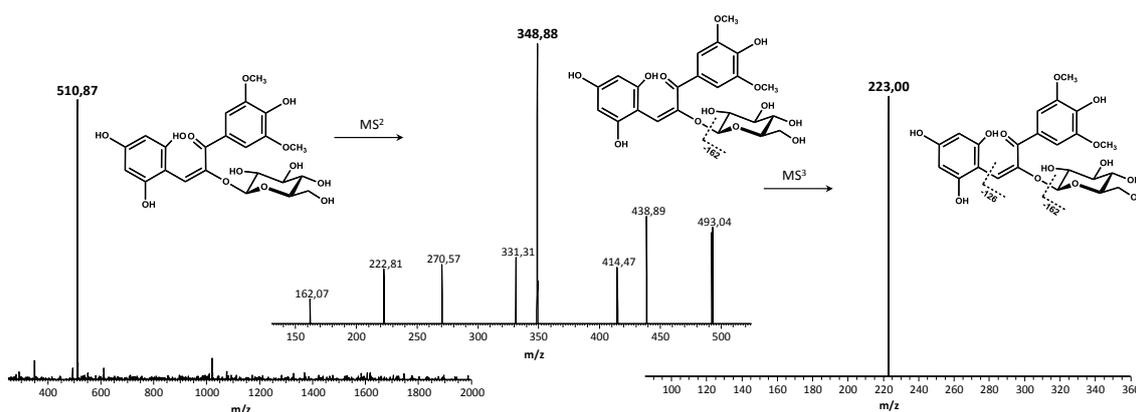


Figura 52. Espectros da análise por HPLC-DAD-MS da forma chalcona da Mv3glc. O varrimento de massa total (entre 400 e 2000) está à esquerda salientando a massa do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  511 correspondente à Mv3glc na forma chalcona. Ao centro e à direita estão os varrimentos de ampliação ( $MS^2$  e  $MS^3$ , respetivamente).

Este pré-tratamento das amostras permite quantificar a absorção de antocianinas de forma correta, a qual estaria a ser subestimada em resultado da degradação que estas sofrem quando mantidas à temperatura ambiente e a pH fisiológico e por outro lado em resultado da incompleta conversão das formas hemiacetal e chalcona à forma de cátion flavílio (Figura 5).

Como se pode verificar pela Figura 53 as três antocianinas testadas foram capazes de atravessar as células MKN-28. O transporte de antocianinas através das células MKN-28 foi dependente do tempo e todas as antocianinas apresentaram de uma forma geral a mesma eficiência de transporte (Figura 53).

Contudo, para as 3 h de incubação o transporte foi dependente do tipo de antocianina (substituição do anel B), sendo a Mv3glc a antocianina absorvida em maior percentagem (Figura 53a). A comparação visual da Figura 53a e Figura 53b sugere que uma maior taxa de absorção possa ocorrer a pH apical 3,0, no entanto comparando os dois gradientes pH apical 5,0 /pH basolateral 7,4 e pH apical 3,0 /pH basolateral 7,4, não se observam diferenças estatisticamente significativas na eficiência de transporte.

A taxa de transporte, ao fim de 3 h, para o gradiente de pH apical 3,0 /pH basolateral 7,4, foi a seguinte: a Dp3glc < Cy3glc < Mv3glc, apenas com diferenças estatisticamente significativas apenas para a Dp3glc vs Mv3glc ( $p < 0,05$ ). Analisando a estrutura química destas três moléculas (Figura 49), pode-se constatar que a sua hidrofobia varia da mesma forma: Dp3glc < Cy3glc < Mv3glc. A presença de grupos

metoxilo na estrutura da Mv3glc torna esta molécula mais hidrofóbica do que a Dp3glc. As diferenças de eficiência de transporte destas três moléculas poderão assim estar diretamente relacionadas com a sua hidrofobia.

A eficiência de transporte com o gradiente pH apical 5,0 /pH basolateral 7,4 foi independente do tipo de substituição do anel B, o que pode sugerir a relevância da presença da glicose no transporte de antocianinas. De facto esta linha celular, assim como o epitélio gástrico humano normal, são capazes de expressar transportadores de glicose (Noguchi, Sato et al. 1999) que poderão estar envolvidos no transporte de antocianinas à semelhança do que ocorre no intestino (Faria, Pestana et al. 2009).

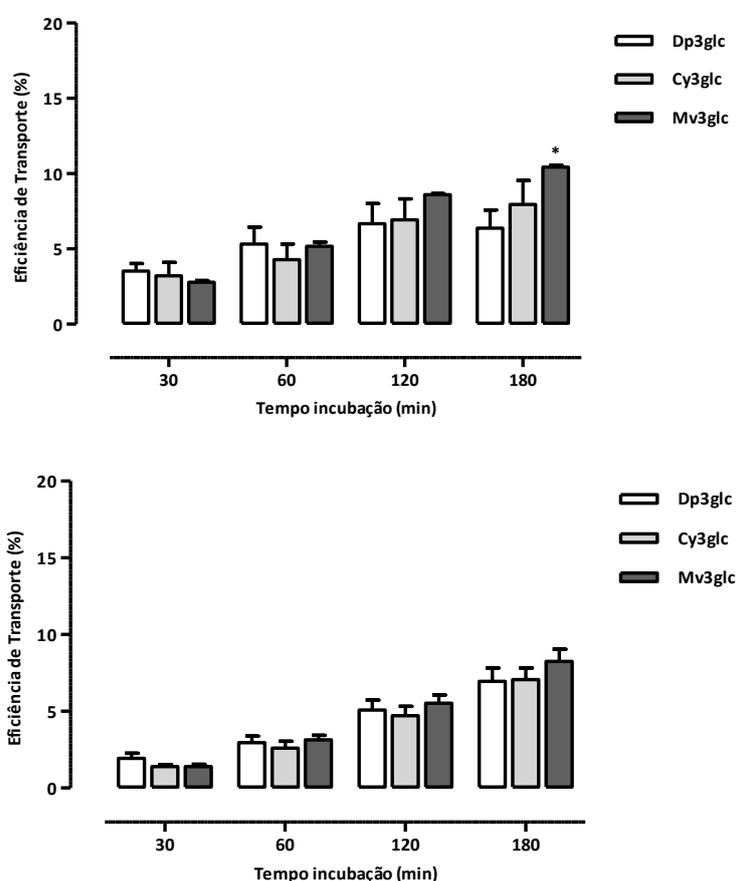


Figura 53. Eficiência de transporte das antocianinas (500  $\mu$ M) através das células MKN-28 (Apical  $\rightarrow$  Basolateral). Os resultados são apresentados como eficiência de transporte (%) (média  $\pm$  EPM). A eficiência de transporte é apresentada sob a forma de percentagem, calculada de acordo com a seguinte equação: (concentração de composto no lado basolateral a um determinado tempo/concentração de composto no lado apical ao tempo 0 h)  $\times$  100. a) pH apical 3,0 /pH basolateral 7,4; b) pH apical 5,0 /pH basolateral 7,4. \*p < 0,05 (Dp3glc vs Mv3glc, aos 180 min)

#### 4.8. Estudo cinético do transporte de Cy3glc através das células MKN-28

O estudo cinético do transporte de Cy3glc em células MKN-28 foi realizado na presença do gradiente de pH (pH apical 5,0 /pH basolateral 7,4), uma vez que se pretendia uma abordagem nutricional do transporte de antocianinas, e no intervalo de concentrações [50 a 2000  $\mu\text{M}$ ]. A curva hiperbólica de Michaelis-Menten para o tempo 180 min está apresentada na Figura 54. Os parâmetros cinéticos  $V_{\text{max}}$  e  $K_m$  calculados por regressão linear foram  $561,4 \pm 68,72 \mu\text{M}/\text{min}$  e  $5098 \pm 807,9 \mu\text{M}$ , respetivamente. Estes resultados sugerem que a Cy3glc é absorvida por um mecanismo saturável (Figura 54).

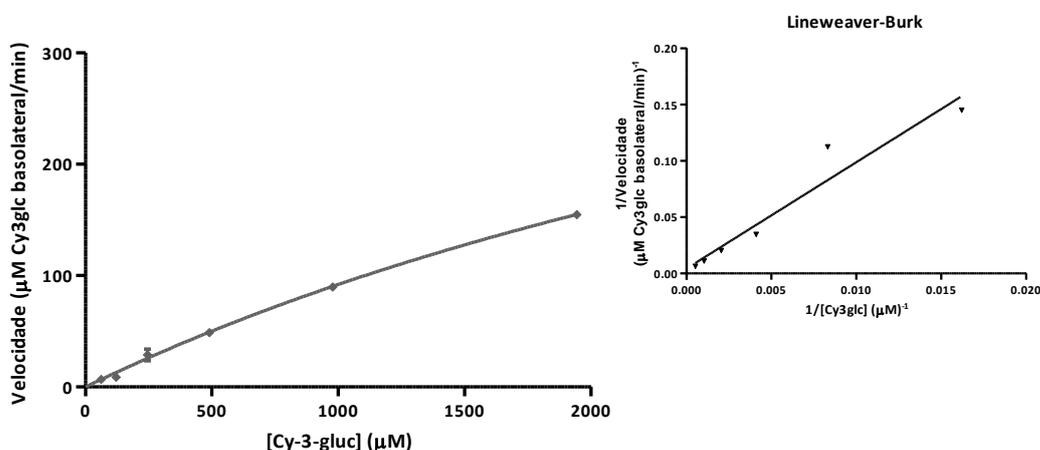


Figura 54. Gráfico de Michaelis–Menten da velocidade de absorção da Cy3glc em função da concentração. A Cy3glc foi adicionada às células MKN-28 num intervalo de concentrações que variava entre 50 e 2000  $\mu\text{M}$  (pH apical 5,0 /pH basolateral 7,4). Os parâmetros cinéticos foram calculados por regressão linear usando o software GraphPad v5. A inserção em cima à direita representa o gráfico de Lineweaver–Burk.

Em termos gerais, este trabalho descreve as condições ótimas de crescimento de um modelo celular gástrico humano, adequado ao estudo da biodisponibilidade de antocianinas e pigmentos antociânicos, bem como para o *screening* de outros compostos presentes na dieta alimentar e de diferentes fármacos direcionados para atuar a nível gástrico.

Inclui ainda uma abordagem crítica dos vários fatores físico-químicos que podem influenciar a biodisponibilidade das antocianinas permitindo uma correlação real entre saúde e nutrição.

## 5. Conclusão

Os resultados deste capítulo podem ser resumidos da seguinte forma:

- As células MKN-28 formam barreira e expressam proteínas de junções apertadas;
- O pH luminal não afeta a integridade da barreira gástrica;
- O pH luminal não sofre alterações ao longo do tempo;
- O AAS é absorvido através do modelo de barreira gástrica por diferentes mecanismos dependendo do pH apical;
- As antocianinas sofrem degradação quando mantidas à temperatura ambiente e a pH fisiológico;
- A inequívoca determinação da eficiência de transporte das antocianinas implica a pré-acidificação das amostras;
- As antocianinas são absorvidas através do modelo de barreira gástrica por um mecanismo saturável.

## CAPÍTULO II - ABSORÇÃO INTESTINAL DE PIGMENTOS ANTOCIÂNICOS



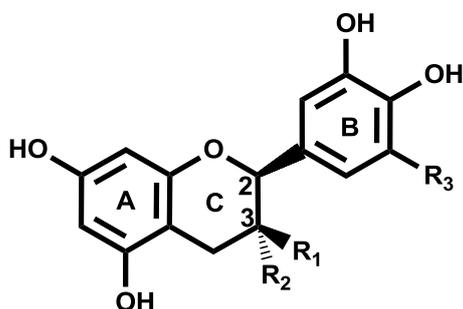
## 1. Introdução

### 1.1. Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis são dos grupos mais abundantes de flavonóides na natureza. As unidades monoméricas de flavan-3-óis diferem entre si no padrão de hidroxilação do anel A e B e na estereoquímica da posição C-3 (Figura 55).

A característica estrutural que permite diferenciar os flavan-3-óis das restantes subclasses, comum apenas com as antocianinas, é a ausência do grupo oxo na posição 4 do anel heterocíclico C (Figura 55). A ausência da ligação dupla entre as posições 2-3 e a presença de um grupo hidroxilo na posição 3 origina dois centros de assimetria (os carbonos das posições 2 e 3) constituindo centros quirais, dos quais resultam 4 isómeros: (+), (-)-catequina e (+), (-)-epicatequina. Nos isómeros (+)-catequina e (+)-epicatequina o grupo 3,4-di-hidrofenoilo ligado ao carbono C2 e o grupo hidroxilo no carbono C3 surgem em posição *trans* (2R, 3S) e nos restantes isómeros em posição *cis* (2R, 3R). Os monómeros mais comuns são os diastereoisómeros (+)-catequina/(-)-epicatequina, (-) galhocatequina/(-)-epigalhocatequina.

Estes compostos encontram-se frequentemente esterificados com o ácido gálico na posição C3, originando a (-)-epicatequina galhato (ECg) e a (-)-epigalhocatequina galhato (EGCg) (Figura 55). Os respetivos oligo- e polímeros são denominados de procianidinas e prodelfinidinas.



Flavan-3-ol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
(+)-catequina	OH	H	H
(-)-epicatequina	H	OH	H
(+)-galhocatequina	OH	H	OH
(-)-epigalhocatequina	H	OH	OH

Figura 55. Representação da estrutura química dos flavan-3-óis mais comuns.

### 1.1.1. Proantocianidinas

As proantocianidinas, também conhecidas por taninos condensados, podem dividir-se em procianidinas e prodelfinidinas. Desde 1960, ano em que a estrutura básica das proantocianidinas foi elucidada (Figura 56), já foram identificadas e completamente caracterizadas mais de 200 proantocianidinas oligoméricas, com um grau de polimerização até 5. Estes compostos distinguem-se entre eles pelo tamanho da cadeia e pela natureza da ligação interflavânica. O termo oligómero refere-se a proantocianidinas com um grau de polimerização de 2 a 5 unidades. O termo polímero refere-se às moléculas com um grau de polimerização maior que 5 (Haslam 1996). A polimerização de flavan-3-óis monoméricos pode resultar de um processo de autoxidação, mas mais frequentemente é catalizada pela enzima polifenol oxidase (PPO), presente nas plantas, durante o processamento dos alimentos.

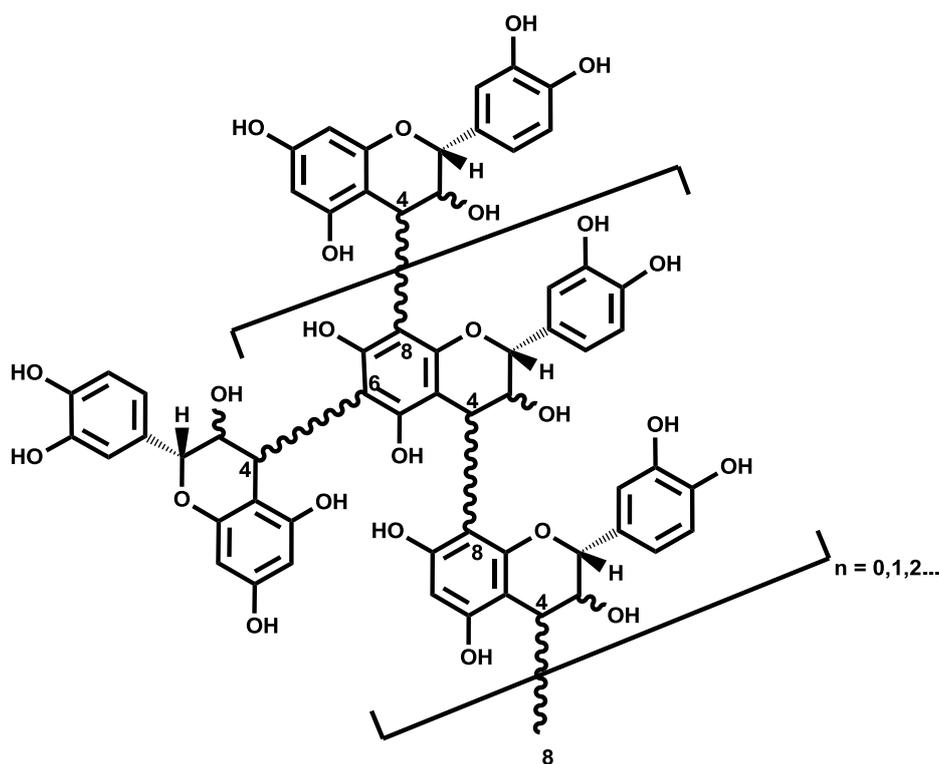


Figura 56. Estrutura química geral de uma procianidina oligomérica.

As proantocianidinas quando aquecidas em meio ácido decompõem-se em flavan-3-óis (catequina e galhocatequina) e antocianidinas (Figura 57). No caso das procianidinas, estas dão origem a catequina e a cianidina e as prodelfinidinas originam galhocatequina e delfinidina.

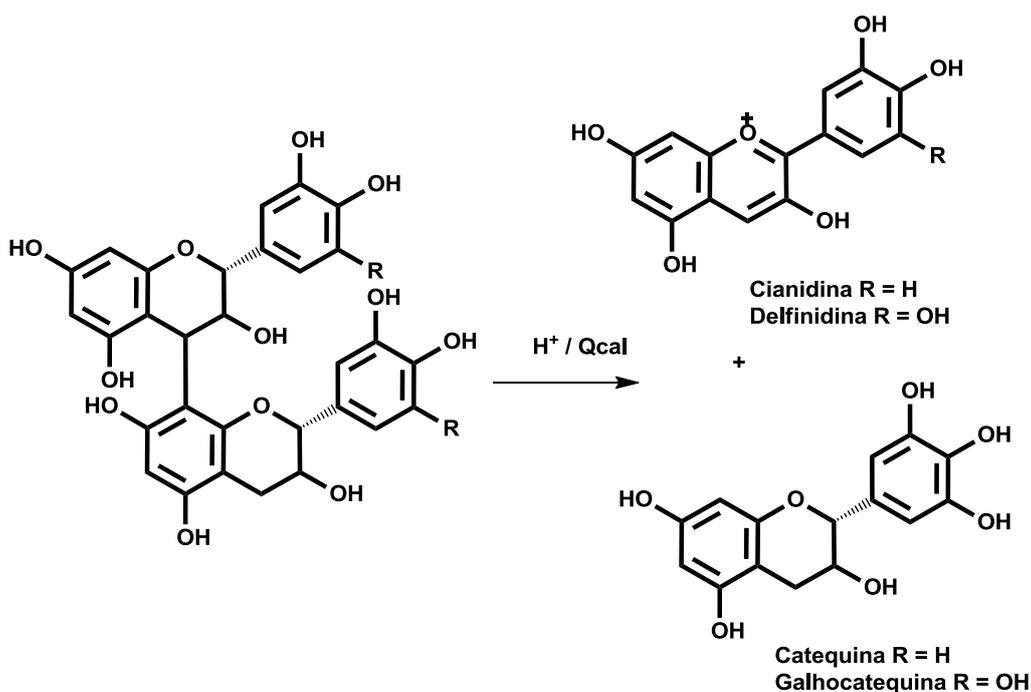


Figura 57. Decomposição das proantocianinas por aquecimento em meio ácido. Reação de Bate-Smith (Bate-Smith 1954).

As proantocianidinas podem ser divididas em grupos com base no tipo de ligação das unidades monoméricas. As ligações interflavanol mais comuns são ligações carbono-carbono nas posições 4→6 ou 4→8. As proantocianidinas diméricas com esta ligação são ditas do tipo B, e as triméricas pertencem ao tipo C. As proantocianidinas do tipo A surgem quando ocorre uma ligação éter C2→C7 adicional a procianidinas do tipo B. Fazem parte do tipo D as proantocianidinas triméricas que têm uma ligação do tipo B e outra do tipo A.

### **1.2. Ocorrência, biodisponibilidade e propriedades biológicas**

Os flavan-3-óis são abundantes no chá (Lee, Wang et al. 1995), no vinho tinto (270 mg/L) (Frankel, Waterhouse et al. 1995) e no chocolate (Arts, Hollman et al. 1999). As proantocianidinas são as principais responsáveis pela adstringência e amargor dos alimentos e bebidas. As fontes mais comuns destes compostos são as maçãs, as pêras, o vinho tinto e o chocolate (Santos-Buelga and Scalbert 2000). O consumo diário de flavan-3-óis, incluindo catequinas, dímeros e trímeros de procianidinas foi estimado em 18–50 mg/dia (Arts, van de Putte et al. 2000; Arts, van de Putte et al. 2000).

Os flavan-3-óis, a catequina e epicatequina são detetadas no plasma após ingestão de alimentos ou bebidas, no entanto são rapidamente eliminados do organismo (Manach, Williamson et al. 2005). No que se refere às proantocianidinas, a sua natureza polimérica e o elevado peso molecular podem contribuir para limitar a sua absorção no trato gastrointestinal. Os estudos *in vitro* de avaliação da absorção de flavan-3-óis e proantocianidinas em Caco-2 são escassos (Deprez, Mila et al. 2001; Vaidyanathan and Walle 2001). No que se refere aos estudos *in vivo*, na sua maioria concluíram que apenas os dímeros de procianidinas podem ser absorvidos (Baba, Osakabe et al. 2002; Tsang, Auger et al. 2005; Shoji, Masumoto et al. 2006; Prasain, Peng et al. 2009).

Os flavan-3-óis são moléculas biologicamente ativas, conhecidas pelo seu potencial antioxidante (Ricardo da Silva, Darmon et al. 1991; Saint-Cricq de Gaulejac, Provost et al. 1999). Podem igualmente estar envolvidas na prevenção de doenças cardiovasculares, provavelmente através da sua capacidade de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, de reduzir os níveis de colesterol plasmático e de prevenir a agregação de plaquetas (Jeong and Kong 2004). Adicionalmente existem evidências das propriedades antitumorais de catequinas e procianidinas (Santos-Buelga and Scalbert 2000; Jeong and Kong 2004).

### **1.3. Pigmentos antociânicos**

No vinho tinto, a antocianina mais abundante é a malvidina (uma vez que também é a antocianina mais abundante da uva tinta (*Vitis vinifera*)). O vinho tinto contém aproximadamente 200–350 mg antocianinas/L, mas estes valores podem variar com a

qualidade das uvas, o seu grau de amadurecimento aquando da vinificação e o estadio de envelhecimento do vinho. Muitas antocianinas são transformadas em várias outras estruturas mais complexas à medida que os vinhos envelhecem (Clifford 2000; Pissarra, Lourenco et al. 2004; Oliveira, de Freitas et al. 2007; Sousa, Mateus et al. 2007).

A reação direta entre antocianinas e flavan-3-óis foi demonstrada em soluções modelo (Vivar-Quintana, Santos-Buelga et al. 1999; Dueñas, Fulcrand et al. 2006) e em matrizes alimentares, especialmente no vinho tinto, no qual estes compostos contribuem para alterar as suas propriedades organoléticas, tais como a cor e o sabor (Remy, Fulcrand et al. 2000).

A formação dos pigmentos flavan-3-ol-antocianina resulta da reação entre as antocianinas e as proantocianidinas: primeiro ocorre a quebra da ligação interflavanólica das procianidinas originando um carbocátion em C4, que depois é sujeito ao ataque nucleófilo pelo C8 e/ou C6 da antocianina na forma hemiacetal, de acordo com o mecanismo proposto por Salas e colaboradores (Salas, Atanasova et al. 2004) (Figura 58).

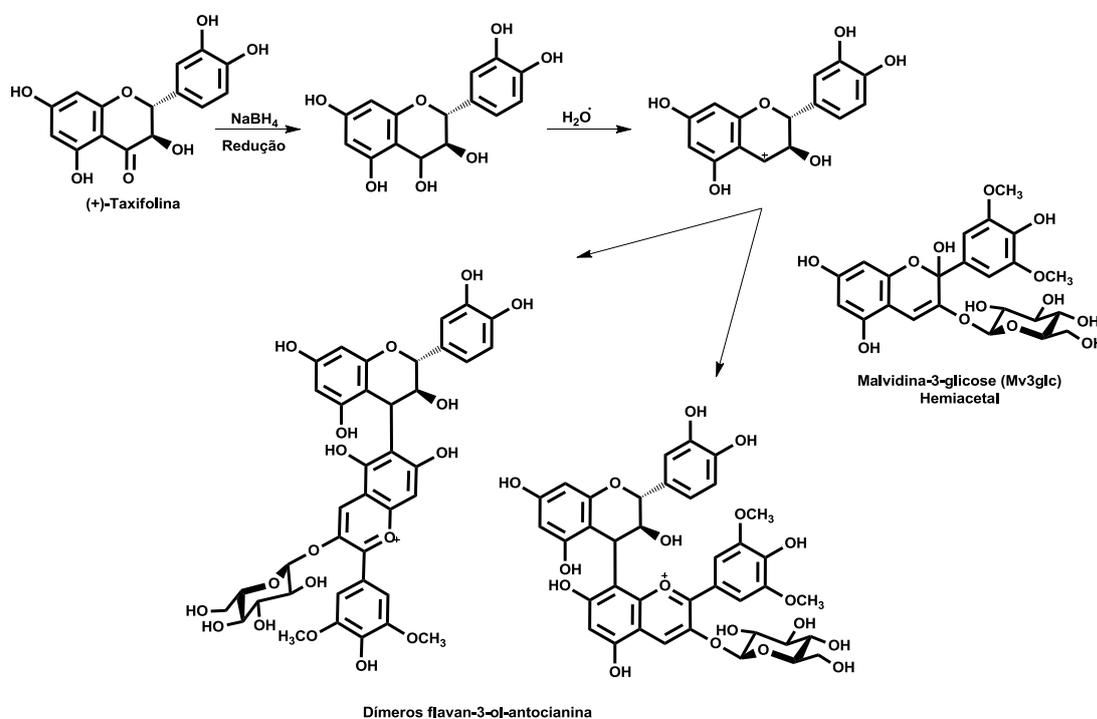


Figura 58. Mecanismo proposto para a formação do dímero Cat-Mv3glc de acordo com Salas e colaboradores (Salas, Atanasova et al. 2004).

Estes pigmentos são normalmente associados a reações que ocorrem durante o processamento e armazenamento de alimentos e bebidas. No entanto, estes compostos foram já identificados através de técnicas cromatográficas em morangos (Fossen, Rayyan et al. 2004), sumo de romã (Sentandreu, Navarro et al. 2010), feijão (González-Paramás, Lopes da Silva et al. 2006), películas de uvas (González-Paramás, Lopes da Silva et al. 2006) e milho roxo (González-Paramás, Lopes da Silva et al. 2006). A deteção destes pigmentos em extratos de plantas pode sugerir que estes são pigmentos naturais e não exclusivamente produtos formados durante o armazenamento e envelhecimento de alimentos e bebidas processadas, tal como inicialmente era assumido.

Sendo parte da dieta humana, estes pigmentos podem contribuir para aumentar a ingestão de antocianinas e flavan-3-óis. O estudo da biodisponibilidade de antocianinas e flavan-3-óis constitui um tema de crescente interesse, no entanto são escassos os estudos *in vitro* que avaliaram a absorção intestinal de antocianinas (Yi, Akoh et al. 2006; Steinert, Ditscheid et al. 2008; Pacheco-Palencia, Mertens-Talcott et al. 2010). Estudos em humanos envolvendo antocianinas individuais revelaram que o seu conteúdo no plasma é geralmente 1 % da quantidade consumida. Esta reduzida biodisponibilidade parece ser devida à sua reduzida absorção intestinal, no entanto outros fatores que podem contribuir para a quantidade de antocianinas que é absorvida podem estar a ser negligenciados (Vanzo, Terdoslavich et al. 2008).

## 2. Objetivos

O objetivo deste capítulo prende-se com a realização de um estudo comparativo da eficiência de transporte transepitelial através das células Caco-2 do dímero Cat-Mv3glc e de outros três compostos estruturalmente relacionados, a malvidina-3-glicose (Mv3glc), a (+)-catequina (Cat) e a procianidina B3 (Cat-Cat), obtidos por extração de fontes naturais, comercialmente e por hemi-síntese química, respetivamente.



### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Reagentes

A (+)-catequina, o Hepes, o NaCl, a (+)-taxifolina, o tetrahidroborato de sódio e o Tris-HCl foram adquiridos à Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, (Madrid, Espanha). Todos o material de cultura celular foi adquirido à TPP (Trasadingen, Switzerland), a não ser que indicado em contrário.

#### 3.2. Hemi-síntese química de pigmentos antociânicos

##### 3.2.1. Dímero: (+)-Catequina-(4,8)-malvidina-3-O-glicose

Todas as soluções foram desarejadas com árgon antes da utilização. Em 30 mL de solução água/etanol (2:1 v/v) foram dissolvidos 0,949 mmol de Mv3glc (usando agitação ultrassónica sempre que necessário) e deixado em repouso pelo menos 2 h antes da hemi-síntese. Num balão de três tubuladuras de 250 mL, a 20 mL de solução etanólica de 0,329 mmol de (+)-taxifolina foi adicionada, gota a gota, 10 mL de solução etanólica de 1,428 mmol de NaBH<sub>4</sub> sob atmosfera de árgon. Após a adição foi deixada em repouso por 15 min após o que foram adicionados 20 mL de água. De seguida adicionou-se a solução de Mv3glc e imediatamente após 10 mL de solução aquosa de ácido fórmico (6:4 v/v). Adicionam-se 50 mL de água e evaporou-se o etanol sob vácuo. Aqueceu-se a solução a 80 °C, 2 a 3 h e procedeu-se ao fracionamento em três etapas (ver a seguir). A fração de 100 % de metanol da 1<sup>a</sup> etapa de fracionamento foi evaporada sob vácuo e reaquecida a 80 °C por 3 h, sendo novamente fracionada em funil (como se descreve a seguir). A fração de 80 % de metanol foi adicionada à fração de 80% de metanol do fracionamento anterior e foram submetidas às duas etapas subsequentes do fracionamento. Os compostos (puros) obtidos foram evaporados, liofilizados e mantidos a -18 °C até utilização.

##### 3.2.2. Fracionamento

No fim do processo a fase orgânica foi evaporada para eliminar restos de solvente orgânico e purificada em três etapas.

- A primeira etapa, um fracionamento grosseiro consistiu em aplicar diretamente o produto a 50 g de Toyopearl HW-40S previamente aplicado num funil de vidro poroso (100 mm d.i.) posto sobre um sistema filtração de vácuo em vidro. A mistura foi eluída com soluções hidrometanólicas acidificadas de percentagem crescente (20 %, 80 % e 100 % v/v).
- A segunda etapa, um fracionamento refinado consistiu em aplicar a solução hidrometanólica de 80 % (v/v), previamente evaporada sob vácuo, numa coluna cromatográfica (16 mm d.i.) com 30 g de Toyopearl HW-40S como fase estacionária. A fase móvel consistiu numa série crescente de soluções hidrometanólicas (40 %, 75 % e 100 % v/v) acidificadas em fluxo de 0,8 mL/min. A recolha foi efetuada com base na deteção visual das bandas coradas.
- A terceira etapa consistiu no fracionamento por HPLC semi-preparativo de fase reversa. O sistema cromatográfico foi composto por uma bomba quaternária Knauer K-1001, um injetor manual Rheodyne 7125 com loop de 2 mL. A fase estacionária foi composta por uma coluna de fase reversa (C18) Thermofinnigan Hypersil Gold 250 mm x 10 mm d.i. (5 µm). A fase móvel, um sistema binário com o solvente A composto por solução aquosa de ácido fórmico (10 % v/v) e o solvente B composto por solução aquosa de ácido fórmico (10% v/v) e metanol (30 % v/v) com um fluxo de 4 mL/min. O gradiente utilizado iniciou-se com uma mistura com 20% de solvente B que sofreu aumento linear até 66% de solvente B em 50 min. Um segundo aumento linear de solvente B de 66% até 100% em 10 min precedeu um passo isocrático de limpeza (100 % de solvente B) de 10 min. Por fim, um passo de reequilíbrio de 20 % de solvente B por 15 min. As frações recolhidas foram evaporadas, liofilizadas e mantidas a -18 °C até utilização. As amostras foram analisadas por HPLC-DAD e por LC-MS.

### **3.3. Estabilidade dos compostos em condições acídicas**

Todos os compostos (100,0 µM) foram incubados em tampão fosfato (pH 2,0 ajustado com HCl 6 M) durante 3 h a 37 °C. A estabilidade dos monómeros e dímeros foi seguida a cada 60 min por HPLC-DAD, tal como descrito anteriormente.

### 3.4. Células e condições de cultura

A linha celular Caco-2 foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC37-HTB Rockville, M.D., EUA). As células foram mantidas em atmosfera com 5 % CO<sub>2</sub>-95 % ar, à temperatura de 37 °C. Estas células (passagens 41-58) cresceram em MEME (*Minimum Essential Medium Eagle*) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Madrid, Espanha) suplementado com 15 % de SFB, 25 mM Hepes, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Madrid, Espanha). O meio de cultura foi renovado a intervalos de 48 h e as células atingiram a confluência ao fim de 6-7 dias de cultura. Para a manutenção da divisão das células em cultura, estas foram dissociadas com 0,25 % de tripsina-EDTA, diluídas a 1:3 e cultivadas em placas de petri com 21 cm<sup>2</sup> de área de crescimento (Corning Costar, Badhoevedorp, The Netherlands). Para as experiências de transporte transepitelial as células foram semeadas em *inserts* (membrana de policarbonato, poro com 0,4 µm, 12 mm de diâmetro, Corning Costar, Badhoevedorp, The Netherlands). Os *inserts* foram colocados em placas de 12 poços nas quais cresceram e diferenciaram durante 21 dias. No período de 24 h anterior a cada experiência, as células foram mantidas em meio de cultura sem SFB.

### 3.5. Estudos de transporte transepitelial

Os estudos de transporte foram realizados de acordo com um procedimento descrito na literatura (Yi, Akoh et al. 2006). A resistência eléctrica transepitelial (TEER) das células que cresceram em *transwell* foi medida utilizando um voltímetro epitelial com eléctrodos planos (MILLICELL-ERS, Millipore Co., Bedford, MA). As experiências foram efetuadas em monocamadas com TEER > 230 Ω. Removeu-se o meio de cultura e lavaram-se as células com meio Hanks. A solução de antocianinas (em meio Hanks, 100 µM) foi adicionada ao lado apical das células e Hanks com 2 % de SFB foi adicionado ao compartimento basolateral. O transporte transepitelial foi seguido em função do tempo. Recolheram-se alíquotas (150 µL) do lado basolateral e repôs-se o volume com meio Hanks aos 30, 60 e 120 min. As amostras foram acidificadas com HCl (0,06 M) e congeladas (-18 °C) por forma a garantir que a quantidade cumulativa de cada composto não sofria alteração até análise por HPLC-DAD (de acordo com o procedimento descrito acima). A antocianina Mv3glc e o dímero Cat-Mv3glc foram

quantificados utilizando as seguintes curvas de calibração: Curva calibração da Mv3glc ( $\mu\text{M}$ ): Concentração =  $52573 \times \text{área}$ ,  $\lambda = 520 \text{ nm}$ ,  $R^2 = 0,9993$ ; Curva calibração do Cat-Mv3glc ( $\mu\text{M}$ ): Concentração =  $48655 \times \text{área}$ ,  $\lambda = 535 \text{ nm}$ ,  $R^2 = 0,9999$ .

O flavanol Cat e o dímero Cat-Cat foram quantificados utilizando a seguinte curva de calibração: Concentração ( $\mu\text{M}$ ) =  $15650 \times \text{área}$ ,  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ,  $R^2 = 0,9994$ .

A eficiência de transporte foi calculada de acordo com a seguinte equação: (concentração de composto no lado basolateral a um determinado tempo/concentração de composto no lado apical ao tempo 0)  $\times 100$

### 3.6. Análise por LC-MS

A análise dos metabolitos foi efetuada num cromatógrafo líquido (Hewlett-Packard 1100 series) equipado com uma coluna de fase reversa Thermo Finnigan (Hypersil Gold<sup>®</sup>) (150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , C18) termostaticada a 25 °C. Os solventes utilizados foram (A) solução aquosa 1 % de ácido fórmico e (B) acetonitrilo. O gradiente utilizado foi o descrito para a análise de HPLC-DAD. Foi efetuada deteção dupla num espectrómetro com barra de díodos e num espectrómetro de massa. O detector de massa foi um Finnigan LCQ DECA XP MAX (Finnigan Corp., San Jose, CA., EUA) equipado com uma fonte API, utilizando uma interface de ionização de *electrospray* (ESI). O vaporizador e a voltagem capilar foram de 5 kV e 4 V, respetivamente. A temperatura capilar foi de 325 °C e o gás utilizado foi o azoto. O espectro foi gravado no modo de ião positivo com  $m/z$  entre 120 e 1500. O espectrómetro de massa foi programado para uma série de três varrimentos: um de massa total, um zoom dos iões mais intensos do primeiro varrimento, e um MS-MS do ião mais intenso utilizando uma energia de colisão relativa entre 30 e 60.

### 3.7. Análise estatística

Todas as experiências foram efetuadas pelo menos em triplicado. Os valores estão expressos como médias aritméticas  $\pm$  EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas através da análise de variância a um fator (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, utilizando o software GraphPadPrism v5. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Hemi-síntese, purificação e caracterização estrutural dos compostos

Neste capítulo pretendeu-se estudar a biodisponibilidade do dímero flavan-3-ol-antocianina (Cat-Mv3glc), um derivado antociânico presente em películas de uva e em vinhos tintos, por avaliação do seu transporte transepitelial através do modelo de barreira intestinal Caco-2.

A eficiência de transporte do dímero Cat-Mv3glc através das células Caco-2 foi comparada com a da malvidina-3-glicose (Mv3glc), da (+)-catequina (Cat) e da procianidina B3 (Cat-Cat) de forma a avaliar a influência de algumas características estruturais na sua absorção (Figura 59).

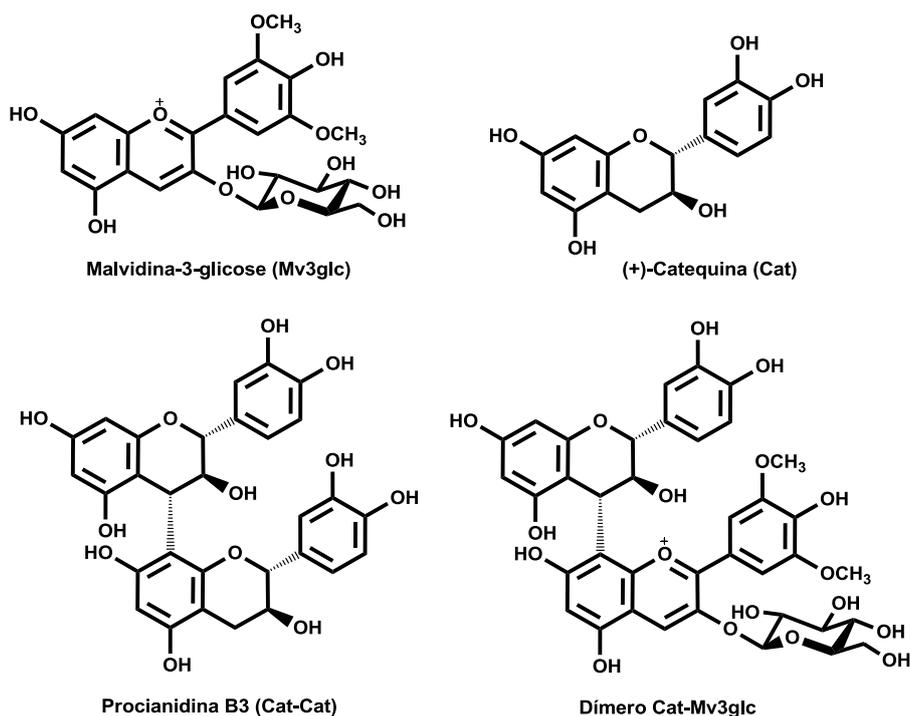


Figura 59. Estrutura química da malvidina-3-glicose (Mv3glc); da (+)-catequina (Cat); da procianidina B3 (Cat-Cat) e do dímero (+)-catequina-4,8-malvidina-3-glicose (Cat-Mv3glc).

A Mv3glc foi extraída, purificada e caracterizada tal como descrito na secção material e métodos do capítulo I. A (+)-catequina foi adquirida comercialmente.

O dímero Cat-Cat foi gentilmente cedido por um elemento do grupo de investigação tendo sido obtido por hemi-síntese química tal como descrito na literatura (Bras, Goncalves et al. 2010).

A hemi-síntese do aduto Cat-Mv3glc foi efetuada de acordo com o método da redução de (+)-taxifolina por tetrahidroborato de sódio com ligeiras alterações ao procedimento descrito no trabalho de Salas e colaboradores (Salas, Atanasova et al. 2004).

O cromatograma de HPLC obtido para a hemi-síntese do pigmento Cat-Mv3glc revelou o aparecimento de novos pigmentos com propriedades espectroscópicas muito semelhantes à da Mv3glc, obtendo-se dois novos picos cromatográficos: o dímero Cat-Mv3glc e o trímero (+)-catequina-(+)-catequina-4,8-malvidina-3-glicose (Cat-Cat-Mv3glc) (Figura 58).

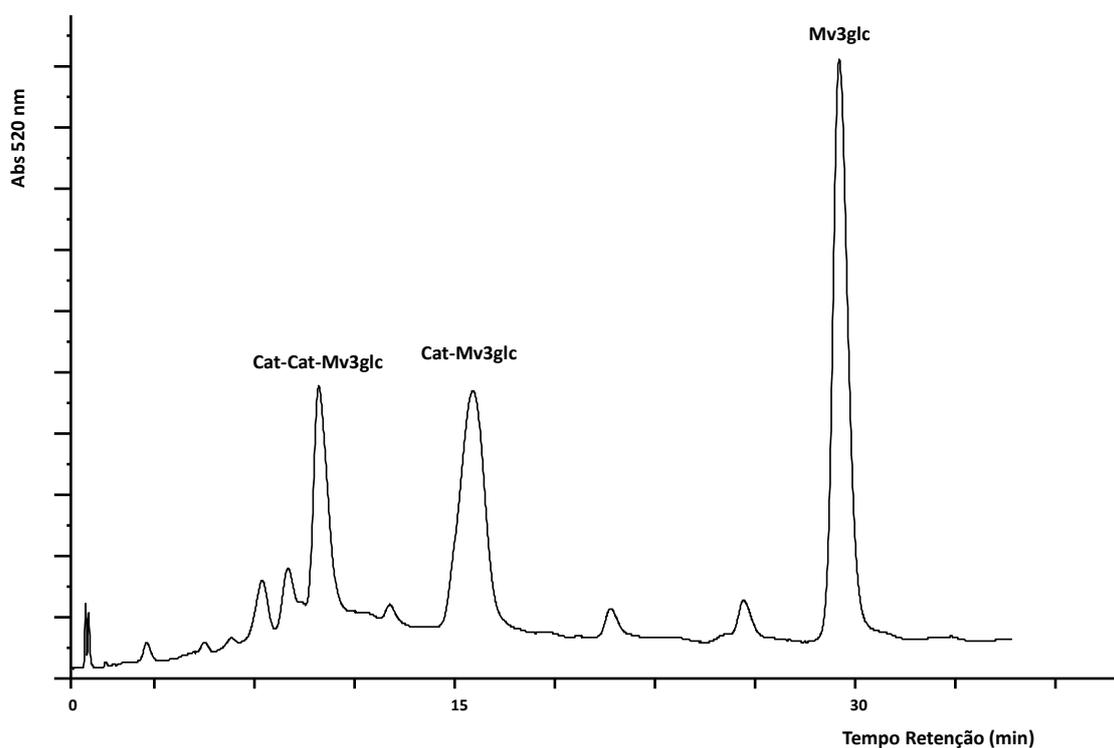


Figura 60. Cromatograma de HPLC-DAD, registado a 520 nm, da hemi-síntese de pigmentos antociânicos a partir de Mv3glc e (+)-taxifolina reduzida por tetrahidroborato de sódio.

A hemi-síntese do dímero Cat-Mv3glc foi confirmada por análise LC-MS, de acordo com o que se encontra descrito na Tabela 16. Os dados de LC-MS revelaram um ião  $[M]^+$  de massa  $m/z$  781 e dois fragmentos de ião  $[M-162]^+$  e  $[M-18]^+$  correspondente à perda de uma molécula de glicose e de uma molécula de água, respetivamente.

Tabela 16. Análise dos compostos estudados por LC-MS.

Composto	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$M^+$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	MS (m/z)
<b>Mv3glc</b>	528	493		331 (-162)
<b>Cat</b>	278		290	139; 123
<b>Cat-Cat</b>	278		577	425; 407
<b>Cat-Mv3glc</b>	535	781		763 (-18); 619 (-162)

O dímero Cat-Mv3glc apresenta um ligeiro deslocamento batocrómico do  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\lambda_{\text{máx}} \approx 535$  nm) e um deslocamento do tempo de retenção para tempos de retenção inferiores (15,32 min) em relação à antocianina original Mv3glc ( $\lambda_{\text{máx}} \approx 528$  nm e tempo de retenção 27,12 min) (Figura 61). No que se refere ao dímero Cat-Cat, um ião de massa  $m/z = 577$  (Tabela 16) foi detetado na análise de LC-MS com tempos de retenção superiores (15,32 min) ao do respetivo monómero Cat (8,13 min) (Figura 61). A caracterização estrutural e a pureza dos dímeros foram confirmadas por RMN e estão de acordo com os dados da literatura (Salas, Atanasova et al. 2004).

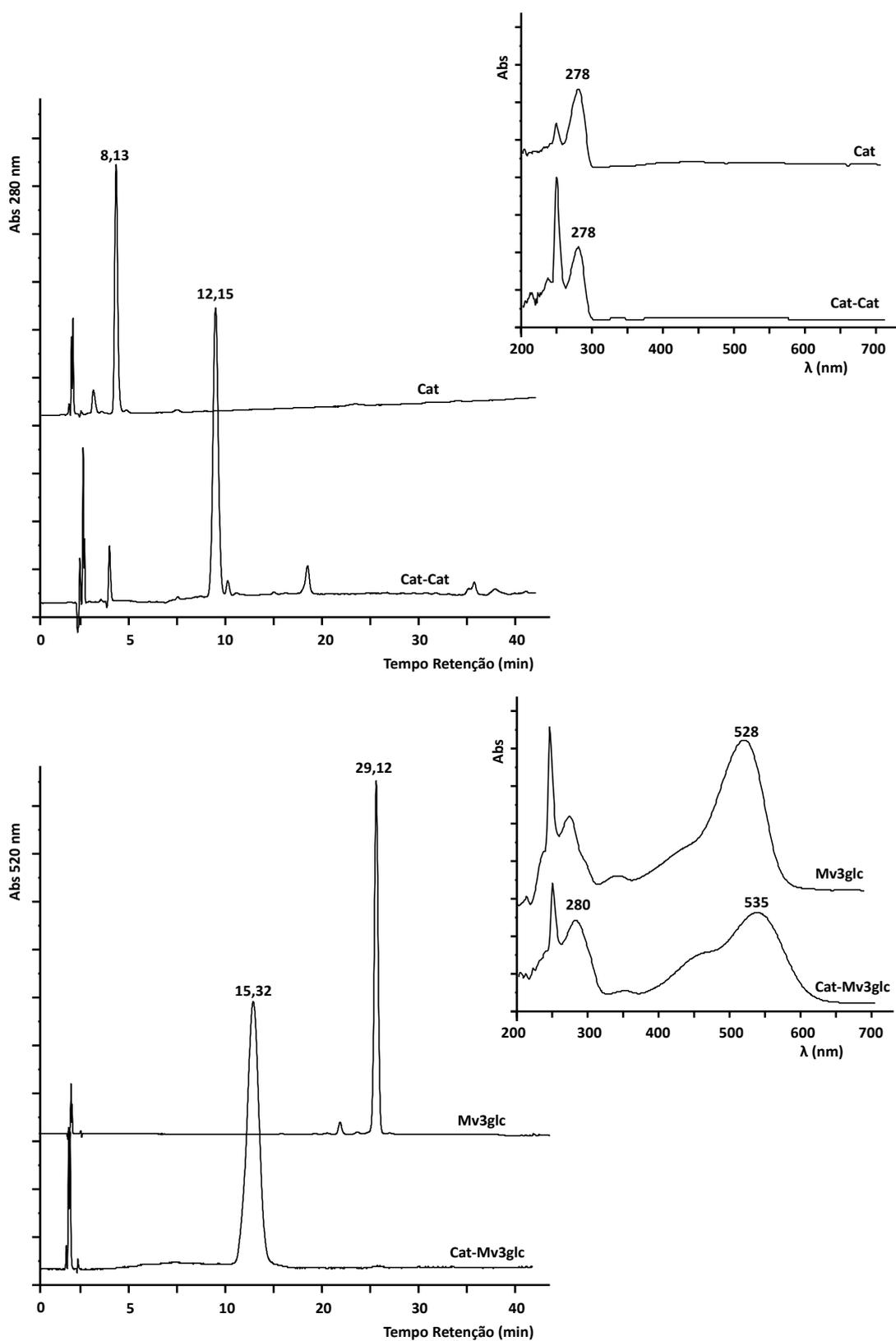


Figura 61. Cromatogramas de HPLC e espectros de UV-vis da malvidina-3-glicose (Mv3glc); da (+)-catequina (Cat); da procianidina B3 (Cat-Cat) e do dímero (+)-catequina-4,8-malvidina-3-glicose (Cat-Mv3glc).

#### **4.2. Estabilidade dos compostos em condições acídicas**

O efeito das condições acídicas do estômago na estabilidade de compostos da dieta tem ganho importância em resultado da necessidade de se conhecer a estrutura dos compostos que atingem o intestino delgado após a sua ingestão. Este estudo tem importantes implicações na natureza das formas potencialmente bioativas *in vivo*.

A estabilidade dos compostos em condições semelhantes às da cavidade gástrica foi avaliada por incubação destes em tampão fosfato pH 2,0, a 37 °C, durante 3 h.

Estudos prévios referem que as estruturas monoméricas de antocianinas e flavan-3-óis são estáveis nas condições acídicas da cavidade gástrica (Rios, Bennett et al. 2002; McDougall, Fyffe et al. 2005). Este facto foi confirmado, não tendo sido observada redução da área dos picos cromatográficos da Cat e da Mv3glc após incubação a pH 2, durante 3 h a 37 °C.

No que se refere às estruturas diméricas em estudo, foi possível verificar que após incubação da Cat-Cat e da Cat-Mv3glc nas mesmas condições acídicas durante 3 h, apenas se observa uma ligeira redução da área dos picos cromatográficos, confirmando assim a sua estabilidade (Figura 62). Estudos realizados em humanos sugerem que não existe clivagem de procianidinas no estômago após ingestão de sumo de maçã ou bebidas ricas em cacau (Rios, Bennett et al. 2002; Kahle, Huemmer et al. 2007).

No entanto, oligómeros de procianidinas (trímeros e hexâmeros) sofreram decomposição a misturas de monómeros e dímeros (Spencer, Chaudry et al. 2000). Tendo em consideração os resultados obtidos, pode-se afirmar que as estruturas diméricas chegam ao intestino delgado na sua forma original.

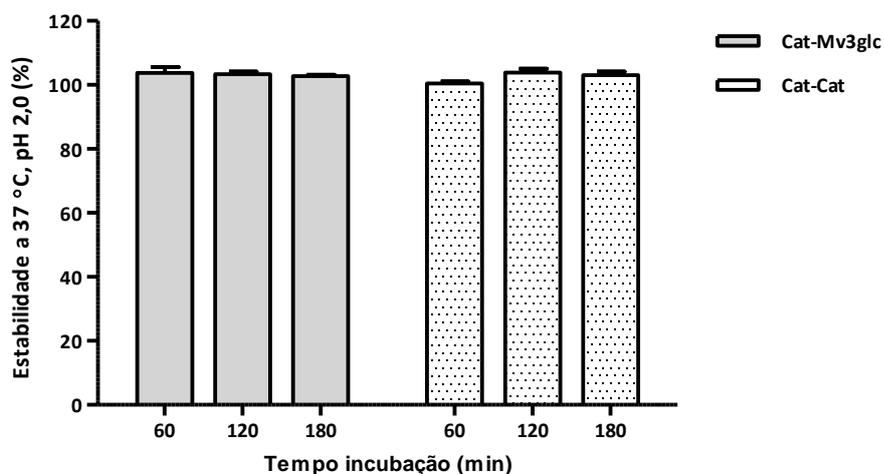


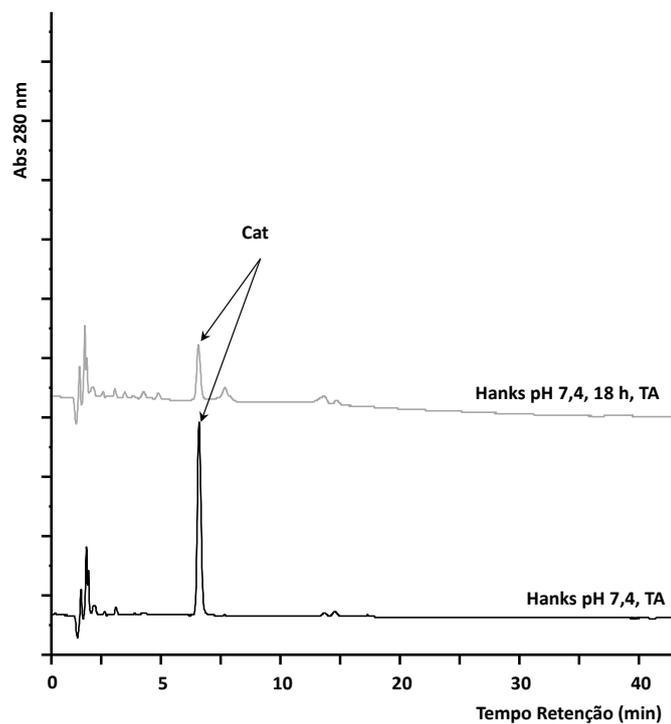
Figura 62. Estabilidade da Cat-Cat e da Cat-Mv3glc em condições ácidas (pH 2,0) durante 3 h a 37 °C. Os resultados são apresentados em estabilidade (%) (média  $\pm$  DP) de duas experiências realizadas em separado e analisadas por HPLC. As percentagens de estabilidade foram calculadas com base na seguinte equação (concentração composto a um determinado tempo/(concentração composto ao tempo 0 h) x 100.

### 4.3. Transporte dos compostos através das células Caco-2

Cada um dos compostos (100  $\mu$ M) foi aplicado no lado apical de células Caco-2 cultivadas em *inserts*. As amostras foram recolhidas do lado basolateral e substituídas por meio Hanks com 2 % de SFB aos 30, 60 e 120 min de incubação. O tempo máximo de incubação de 2 h foi selecionado para mimetizar o tempo que os componentes ingeridos na dieta permanecem no intestino, tal como é habitualmente aceite. O meio basolateral foi acidificado com HCl, numa concentração final de 0,06 M, no momento imediatamente seguinte à recolha, e armazenado a -18 °C até posterior quantificação por HPLC-DAD.

Este passo de acidificação é crucial para estabilizar a estrutura de catião flavílio da antocianina e consequentemente permite uma correta quantificação baseada na área dos picos detetados no HPLC, tal como pode ser constatado na Figura 50. Esta conversão da antocianina para a forma de catião flavílio em resultado da acidificação do pH ocorre porque estes compostos podem apresentar diferentes formas de equilíbrio em solução aquosa (Figura 5). Do mesmo modo, o armazenamento a -18 °C é essencial para os compostos é essencial para que os compostos não sofram degradação térmica, tal como pode ser observado na Figura 63.

a)



b)

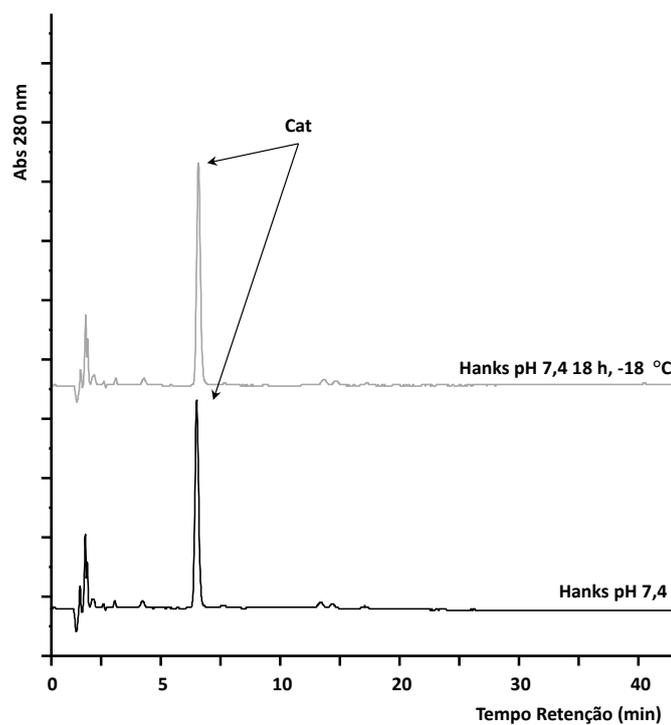


Figura 63. Cromatograma de HPLC-DAD, da estabilidade térmica da Cat em meio Hanks pH 7,4 ao fim de 18 h, registado a 280 nm. As amostras foram recolhidas do lado apical do *transwell* com células Caco-2 após 2 h de incubação com Cat (100  $\mu$ M): a) amostra mantida à temperatura ambiente (TA) e b) amostra armazenada a -18 °C.

De facto, o transporte de Mv3glc e Cat através das células Caco-2 foi dependente do tempo de incubação e atingiu uma eficiência de transporte de aproximadamente 4 % após 120 min (Figura 64).

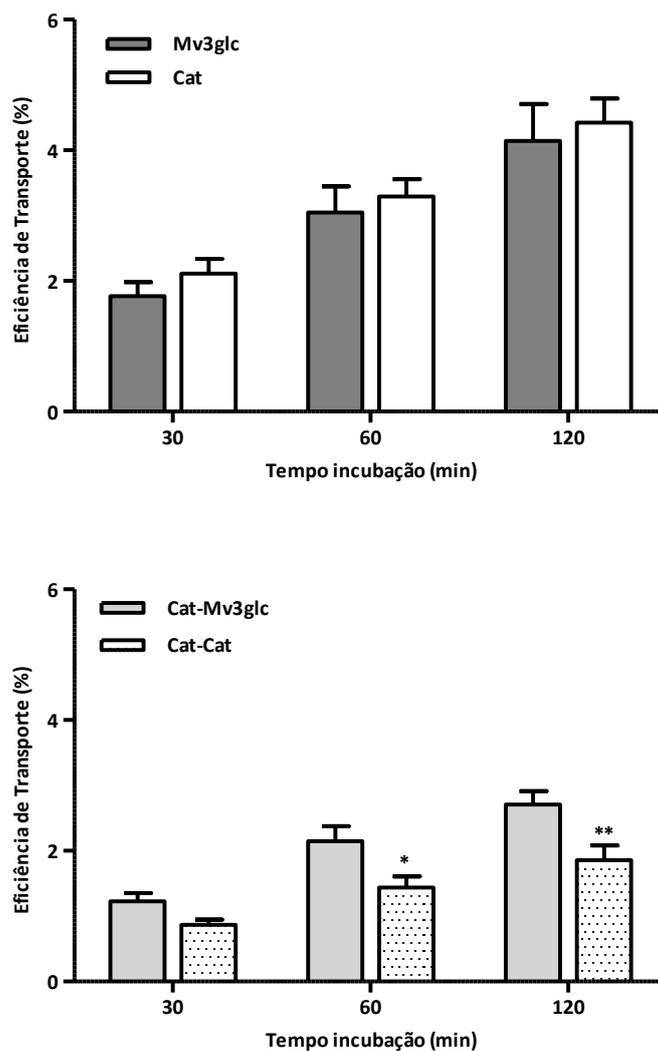


Figura 64. Eficiência de transporte da Mv3glc, da Cat, do Cat-Mv3glc e da Cat-Cat através das células Caco-2 (Apical→ Basolateral). Os resultados são apresentados como eficiência de transporte (%) (média ± EPM). A eficiência de transporte é apresentada sob a forma de percentagem, calculada de acordo com a seguinte equação: (concentração de composto no lado basolateral a um determinado tempo/concentração de composto no lado apical ao tempo 0) x 100, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 (diferenças significativas entre os compostos para o mesmo tempo de incubação).

As estruturas diméricas testadas, o dímero Cat-Mv3glc e a procianidina B3 (Cat-Cat) foram transportadas através do modelo de barreira intestinal Caco-2 (Figura 64). A eficiência de absorção do dímero Cat-Mv3glc, foi significativamente menor do que a dos monómeros que o constituem, os quais apresentam uma eficiência de absorção neste modelo de barreira intestinal semelhante à anteriormente descrita na literatura (3-4 %) (Deprez, Mila et al. 2001; Vaidyanathan and Walle 2001; Yi, Akoh et al. 2006). No entanto, foi interessante constatar que a eficiência de transporte do Cat-Mv3glc foi superior à da Cat-Cat (Figura 64). Este resultado está de acordo com estudos prévios que associam a dímeros de procianidinas uma absorção muito reduzida, utilizando células Caco-2 como modelo (Deprez, Mila et al. 2001; Spencer 2003), assim como estudos realizados com intestino delgado extraído de ratos (Spencer, Schroeter et al. 2001) e estudos em humanos (Holt, Lazarus et al. 2002; Sano, Yamakoshi et al. 2003). O Cat-Mv3glc apresenta uma percentagem de absorção significativamente maior, o que pode estar relacionado com a presença da fração antociânica na sua estrutura. Mais concretamente, a presença da glicose pode facilitar a absorção de Cat-Mv3glc através de um mecanismo diferente do da procianidinas B3.

Na literatura encontram-se trabalhos que sugerem que as formas glicosídicas dos flavonóides, como a quercetina-3-glicose, são transportadas para as células graças ao resíduo glicosídico, utilizando os transportadores de hexoses (Walgren, Lin et al. 2000). Os transportadores de hexoses descritos nas células Caco-2 são o SGLT1, o GLUT5 e o GLUT2. Embora todos se encontrem na membrana apical (Dyer, Wood et al. 2002), o GLUT2 na presença de grandes quantidades de glicose no lúmen intestinal é recrutado para a membrana apical numa forma mais marcada, sendo o principal responsável pela captação apical de glicose (Kellett and Brot-Laroche 2005). Um estudo recente do nosso grupo de investigação havia já comprovado a inibição da absorção de glicose através de células Caco-2 na presença de antocianinas de películas de uvas tintas, possivelmente por envolvimento do transportador de glicose GLUT2 (Faria, Pestana et al. 2009). Um estudo semelhante, com um extrato de morangos, rico em Pg3glc, foi igualmente capaz de inibir o transporte de glicose através de células Caco-2 (Manzano and Williamson 2010). Contudo, estes resultados são apenas estudos indiretos, permanecendo o mecanismo de absorção intestinal de antocianinas desconhecido. Mais do que um mecanismo pode estar envolvido.

Terminado o tempo de incubação, as amostras do lado apical foram igualmente analisadas, de forma a verificar se a quantidade absorvida correspondia ao decréscimo observado no lado apical aos 120 min comparativamente com a

quantidade inicial aplicada (Figura 65). A redução na concentração de todos os compostos, não pode ser justificada apenas com base na quantidade que tinha sido absorvida. Esta diferença poderá ser resultado de absorção intracelular, degradação química (pH = 7,4 e 37 °C) e/ ou metabolização. Os dados apresentados permitem ainda concluir que as formas diméricas (Cat-Mv3glc e Cat-Cat) são as mais instáveis nas condições fisiológicas do intestino, apenas após 2 h de incubação (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01, vs respetivo monómero) (Figura 65).

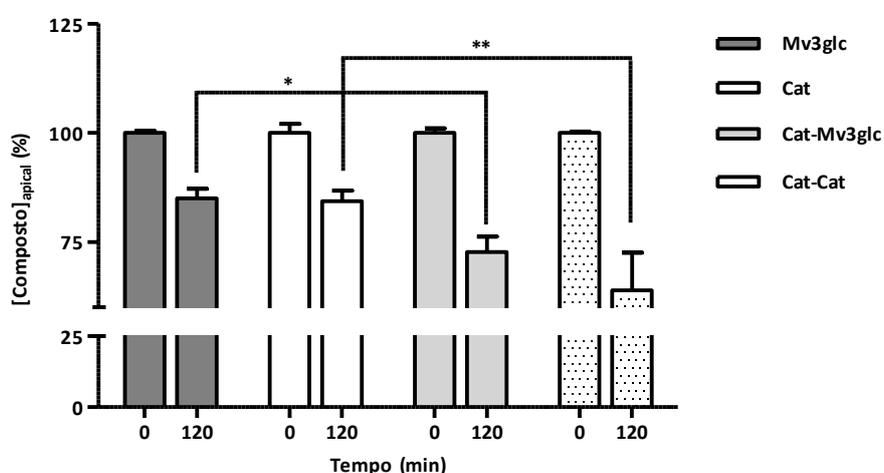


Figura 65. Concentração apical de composto em percentagem, ao tempo 0 min e após 120 min de incubação. Os resultados são apresentados como concentração de composto apical (%) (média ± EPM). A concentração de composto apical é apresentada sob a forma de percentagem, calculada de acordo com a seguinte equação: (concentração de composto no lado apical ao tempo 120 min/concentração de composto no lado apical ao tempo 0) x 100. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01

#### 4.4. Metabolismo intestinal

Após as 2 h de incubação com os compostos testados, o meio apical e basolateral foi analisado por HPLC-MS. A partir desta análise apenas foi possível identificar os compostos parentais. Nenhum pico correspondente a metabolitos, por comparação com a massa e com o tempo de retenção dos padrões que foram sintetizados neste trabalho ou por membros do grupo de investigação, foi detetado (Faria, Pestana et al.

2011). Assim, verificou-se que as células Caco-2 não foram capazes de metabolizar estes compostos nas condições experimentais utilizadas, no entanto é possível que alguns metabolitos estejam em concentrações abaixo do limite de deteção dos métodos de quantificação utilizados.

Este trabalho mostrou que não só antocianinas e flavan-3-óis atravessam a linha celular Caco-2 com eficiência similar, como estruturas diméricas compostas por ambos os monómeros também são absorvidas, no entanto com menor eficiência. Adicionalmente este estudo introduz uma nova área de investigação, até ao momento ignorada: a absorção de antocianinas como pigmentos derivados. Um trabalho preliminar já indicava que derivados pirúvicos de antocianinas atingem rapidamente o plasma de ratos após administração oral destes (Faria, Pestana et al. 2009). Contudo, este estudo representa a primeira referência da absorção de dímeros flavan-3-ol-antocianina.

## 5. Conclusão

- O dímero Cat-Mv3glc é absorvido através de células Caco-2;
- A eficiência de transporte do dímero Cat-Mv3glc é inferior à dos monómeros Cat e Mv3glc;
- A eficiência de transporte do dímero Cat-Mv3glc é superior à da procianidina Cat-Cat;
- A molécula de glicose presente na estrutura do dímero Cat-Mv3glc pode contribuir para o seu transporte.



## CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

No organismo humano, os flavonóides são metabolizados originando diferentes metabolitos que são posteriormente detetados no plasma e nos tecidos alvo e podem contribuir para os efeitos biológicos associados à ingestão dos compostos parentais.

A informação disponível dos efeitos *in vitro* de alguns metabolitos de flavonas e flavan-3-óis indica que estes podem ser mais ativos, menos ativos ou mesmo inativos em comparação com os seus precursores, dependendo do tipo de transformação que sofrem e da posição do(s) grupo(s) substituinte(s) (Lodi, Jimenez et al. 2009; Dueñas, González-Manzano et al. 2010; Terao, Murota et al. 2011). O conhecimento crescente das vias de síntese química/enzimática de metabolitos tem permitido a obtenção de padrões, não comercializados e um aumento dos estudos científicos nesta área.

Ao contrário dos restantes flavonóides a hemi-síntese química de metabolitos de antocianinas nunca foi descrita, estando limitada pela sua instabilidade nas condições de síntese (solvente, pH e temperatura) correntemente aplicadas com flavan-3-óis e flavonóis (Dueñas, González-Manzano et al. 2010; Dueñas, González-Manzano et al. 2012). Recentemente, o nosso grupo avançou com o desenvolvimento da hemi-síntese enzimática de metabolitos (metilados, glicuronilados e conjugados com glutatona) de antocianinas, a reação de metilação foi otimizada e aplicada neste projeto às três antocianinas passíveis de sofrer este tipo de metabolização *in vivo*.

Os resultados obtidos são deveras interessantes uma vez que até ao momento não foram identificadas antocianinas de origem natural metiladas na posição 4' do anel B. Este trabalho permitiu provar que as modificações de fase II das antocianinas ingeridas podem originar novas antocianinas nunca antes identificadas como produtos do metabolismo secundário das plantas. Fica assim comprovado que a metabolização do grupo pirogalhol ocorre de forma diferente em animais e plantas. Pode-se concluir que as antocianinas contendo um grupo pirogalhol no anel B são metabolizadas de

forma diferente das antocianinas contendo um grupo catecol. Foi também curioso verificar que os metabolitos metilados na posição 4' do anel B da antocianina possuem características cromáticas muito diferentes da antocianina original, embora semelhantes à da antocianina natural Pg3glc. Os resultados obtidos mostraram que o sistema *in vitro* utilizado constitui um modelo representativo do que ocorre *in vivo* e neste sentido podem apoiar um melhor conhecimento da absorção, biodisponibilidade e metabolismo destes compostos.

Neste projeto, foram igualmente avaliadas as propriedades biológicas de metabolitos de antocianinas em comparação com os compostos originais, uma vez que estas permaneciam totalmente desconhecidas. A avaliação das propriedades antioxidantes e antitumorais permitiu concluir que a metilação pode contribuir para reduzir a toxicidade *in vitro* de antocianinas sem alterar a sua capacidade antioxidante. No entanto, se o efeito genotóxico pode ser um mecanismo essencial para inibir a proliferação de células tumorais, a sua não especificidade pode torná-lo indesejável quando se trata de células normais, o que mais uma vez reforça a importância da metabolização destes compostos da dieta pelo organismo. Estudos adicionais serão necessários para elucidar os mecanismos de ação destes compostos.

Em termos gerais, associa-se o efeito benéfico dos antocianinas na saúde humana a aumento das defesas antioxidantes endógenas. No entanto o consumo excessivo de antocianinas pode induzir efeitos adversos por geração de ROS, uma vez que estes compostos ao atuarem como antioxidantes através de um mecanismo de sequestração de radicais livres originam quinonas. As conversões metabólicas das antocianinas a conjugados parecem eliminar os seus efeitos tóxicos e, mais importante regulam as suas atividades biológicas.

Em paralelo, o nosso grupo tem-se focado na deteção, síntese e estudo das vias de formação de novos pigmentos antociânicos (Mateus, Silva et al. 2003; Cruz, Petrov et al. 2010; Nave, Petrov et al. 2010), nomeadamente portisinas, sendo a caracterização bioquímica destes compostos de todo o interesse em resultado da sua ingestão na dieta e do seu potencial uso como corantes alimentares. Verificou-se que a atividade citotóxica de antocianinas e pigmentos antociânicos é altamente dependente da sua estrutura química, estando a presença do grupo pirogalhol associada aos compostos que se revelaram mais potentes.

Quando se avaliou o efeito das antocianinas na expressão do recetor de estrogénios (ER), verificou-se que a antocianina Dp3glc inibiu significativamente a proliferação celular embora não tenha apresentado capacidade de alterar a expressão do ER. O

mecanismo antiproliferativo pode ou não estar associado a um envolvimento direto do ER, tal como sugerem os resultados de RT<sup>2</sup>-PCR. Um efeito antagónico foi observado para a antocianina Cy3glc, ausência de efeito antiproliferativo associado a sub-expressão do ER, o qual parece estar de acordo com estudos anteriores e pode implicar a associação de um efeito agonista - atividade estrogénica a esta antocianina. Os resultados de RT<sup>2</sup>-PCR confirmam estes dados, uma vez que esta antocianina diminuiu a expressão da isoforma ER- $\beta$  associada ao efeito antiproliferativo de células humanas de tecido mamário.

Estudos complementares serão necessários para esclarecer o mecanismo responsável pelos efeitos antagónicos destes compostos, podendo outros mecanismos estar igualmente implicados, tal como sugerem os resultados, embora preliminares, obtidos por análise do proteoma de células de adenocarcinoma da mama após tratamento com estes compostos.

Estudos futuros no sentido de investigar os benefícios do consumo de produtos ricos em antocianinas devem incluir a identificação de metabolitos antociânicos, bem como a sua distribuição tecidual e atividades biológicas utilizando dados de biologia molecular/celular e de estudos em animais e humanos. É necessário ter em conta que a pH fisiológico a forma predominante da antocianina é a chalcona, conseqüentemente nos tecidos-alvo, nomeadamente no tecido mamário, os efeitos biológicos observados após exposição a antocianinas são provavelmente devidos a essa mesma forma estrutural.

Após a ingestão oral das antocianinas da dieta, a absorção destes compostos para a circulação sistémica deverá ocorrer inicialmente no estômago, em resultado da sua rápida deteção no plasma. Um dos pontos explorados neste trabalho foi a biodisponibilidade de antocianinas, em particular ao nível da sua absorção gástrica. Neste projeto, foi desenvolvido um novo modelo celular gástrico humano, adequado para avaliar a absorção de diferentes componentes da dieta ou mesmo fármacos.

O estudo realizado com o ácido acetilsalicílico (AAS) neste modelo celular comprovou a sua rápida absorção e a dependência da eficiência de absorção com o gradiente de pH. Se para pH apical 3,0, a natureza não iónica do AAS propõe uma passagem por difusão, para pH apical 5,0 este será transportado ativamente por transportadores de ácidos monocarboxílicos e transportadores de aniões orgânicos, expressos maioritariamente no intestino e fígado, mas também no estômago (Neuhoff, Ungell et al. 2005).

Contudo, e ao contrário do AAS, quer pela natureza iónica (a pH inferior ao pKa) quer pela presença do resíduo de glicose, a rápida absorção das antocianinas implica um ou mais transportadores, dependendo da forma de equilíbrio predominante.

O transporte de antocianinas através das células MKN-28 foi dependente do tempo e todas as antocianinas apresentaram de uma forma geral a mesma eficiência de transporte, não se observando uma dependência com a estrutura química e não se observando diferenças estatisticamente significativas na eficiência de transporte nos dois gradientes de pH testados.

A maior parte dos estudos de avaliação da biodisponibilidade de antocianinas recorrem a métodos cromatográficos com quantificação, da estrutura parental na forma de catião flavílio, apresentando resultados subestimados. De facto a pré-acidificação das amostras permitiu quantificar a absorção de antocianinas de forma correta, a qual estaria a ser subestimada em resultado da degradação que estas sofrem quando mantidas à temperatura ambiente e a pH fisiológico e por outro lado em resultado da incompleta conversão das formas hemiacetal e chalcona à forma de catião flavílio.

O mecanismo de absorção gástrica de antocianinas permanece por esclarecer. O estudo cinético do transporte de Cy3glc permitiu concluir que esta é absorvida por um mecanismo de transporte saturável. *Passamonti* e colaboradores sugerem que o transportador de aniões orgânicos, bilitranslocase, pode estar envolvido na absorção gástrica de antocianinas (*Passamonti, Vrhovsek et al. 2002*).

Um trabalho recente do nosso grupo de investigação sugere o envolvimento do GLUT2 no transporte intestinal de antocianinas (*Faria, Pestana et al. 2009*). A conjugação dos diferentes resultados obtidos, com o envolvimento de transportadores de glicose no transporte intestinal de antocianinas e a expressão dos transportadores de glicose GLUT1, GLUT3 e GLUT4 nas células MKN-28 (*Noguchi, Sato et al. 1999*) acrescida da abordagem nutricional deste trabalho conduzirá ao estudo do efeito de componentes da matriz no transporte de antocianinas, nomeadamente do etanol e da glicose. O etanol é um produto do metabolismo como também, e principalmente, um constituinte da dieta, nomeadamente entre os consumidores de bebidas alcoólicas, por exemplo o Vinho do Porto tem na sua constituição uma percentagem elevada de etanol (cerca de 20 %) e de açúcar (glicose e frutose) (90 g/L). Se por um lado o etanol (2 %) favorece a absorção intestinal de antocianinas, as antocianinas parecem inibir a absorção de glicose, muito provavelmente em resultado da competição pelo mesmo transportador (*Faria, Pestana et al. 2009*).

A ingestão de antocianinas está associada à ingestão de pigmentos antociânicos sobre os quais não existem quaisquer dados biológicos. A biodisponibilidade de antocianinas, é considerada muito baixa (< 1 %) (Faria, Pestana et al. 2009), contudo nunca foi quantificada a contribuição dos pigmentos antociânicos presentes em frutos e bebidas (vinho tinto, sumos de fruta). Serão estes compostos igualmente absorvidos? Poderão ser degradados *in vivo* e contribuir para a porção de antocianinas e flavan-3-óis que atinge os tecidos? Estudar a biodisponibilidade desta nova classe de compostos, os adutos flavan-3-ol-antocianina tornou-se uma das questões fundamentais deste trabalho.

Com o estudo *in vitro*, foi possível detetar este tipo de compostos no lado basolateral do modelo celular de barreira intestinal. Este é um resultado extremamente importante pois viabiliza o estudo dos efeitos biológicos destes compostos, já que se provou que estes compostos são biodisponíveis e apresentam uma eficiência de absorção superior à das procianidinas, resta comprovar com estudos *in vivo*.

Tem-se observado nos últimos anos um impulso para melhorar o valor nutricional dos alimentos e bebidas tentando associá-los a efeitos benéficos para a saúde. No entanto, a biodisponibilidade de qualquer nutracêutico deve ser esclarecida de modo a poder atribuir-se um efeito biológico observado a um determinado composto ou metabolito. Esta é atualmente uma prioridade do grupo de investigação, para a qual este projeto deu uma pequena contribuição, no entanto muito ficou ainda por descobrir e clarificar. Este projeto insere-se numa grande área de investigação que visa elucidar o paradoxo entre os efeitos benéficos das antocianinas e a sua aparente reduzida biodisponibilidade.

A abordagem no sentido do melhoramento do valor nutricional de alimentos e bebidas apenas ocorre se existirem evidências claras de efeitos benéficos resultantes dessa alteração. Nesse sentido pretende-se continuar a contribuir para responder a algumas questões fundamentais da comunidade científica: Qual a real biodisponibilidade das antocianinas em humanos? Serão os pigmentos antociânicos (formas mais polimerizadas) absorvidos? Serão os metabolitos bioativos? Como são produzidos estes efeitos?

De um modo geral, os estudos *in vitro* podem fornecer informação bioquímica valiosa, no entanto a extrapolação destes efeitos para o Homem deve ser feita com as devidas precauções. Estudos recentes realizados em humanos por administração de doses

farmacológicas de antocianinas [1,2 - 3,5 g] (Kay, Mazza et al. 2004; Bitsch, Netzel et al. 2004c), descrevem as formas parentais como as principais espécies detetadas no plasma. Este resultado pode ser devido à saturação das vias metabólicas e não é exetável após a ingestão normal de frutos, vegetais, sumos ou vinhos. Desta forma, pretende-se realizar estudos em humanos, nos quais os voluntários irão ingerir diferentes produtos alimentares (vinho tinto ou sumos de fruta) em doses compatíveis com a dieta humana, seguindo-se a deteção de antocianinas, pigmentos antociânicos, adutos flavan-3-ol-antocianina e respetivos metabolitos no plasma e na urina. Serão também incluídos no estudo metabolitos resultantes da degradação pela flora microbiana, ácidos fenólicos e aldeídos. Tendo em conta que apenas uma parte das antocianinas ingeridas são absorvidas na sua forma intata, é essencial ter em consideração a interação destas com o microbiota. Ao sofrerem metabolização pelas bactérias da flora intestinal, as antocianinas são degradadas a moléculas mais simples (ácidos fenólicos e aldeídos) que poderão ser absorvidos e metabolizados e exercerem efeito biológico em órgãos-alvo. Deste modo, a ação biológica detetada poderá não ser diretamente dos metabolitos, mas dos seus produtos de degradação, estando o tipo de produtos formado sujeito às variações genéticas do indivíduo.

É exetável que esta abordagem forneça dados importantes que incluem variação interindividual, a qual resulta da diferente metabolização, e a determinação da natureza e da quantidade dos metabolitos presentes.

Os padrões sintetizados serão essenciais para a identificação de metabolitos de antocianinas e conjugados em tecidos ou amostras biológicas. Este estudo implicará o desenvolvimento de ferramentas analíticas para analisar estes compostos e os respetivos metabolitos em diferentes matrizes (biológicas e alimentares).

As antocianinas são a classe de flavonóides mais difícil de detetar *in vivo*, sobretudo devido à sua instabilidade em condições fisiológicas que pode resultar em degradação química provocando alterações estruturais ou mesmo a formação de novos compostos químicos, ao facto de coexistirem em solução com diferentes formas de equilíbrio dependendo do pH (Brouillard 1983) e claro a extensa metabolização que é comum a outras classes de flavonóides. Vários problemas analíticos prendem-se com esta dificuldade: i) por um lado, a dificuldade em detetar estas moléculas nas matrizes biológicas dada a sua baixa concentração e os processos de purificação; ii) por outro lado, a dificuldade em obter padrões de metabolitos de modo a facilitar a sua posterior deteção e identificação.

Uma vez que os metabolitos possuem propriedades cromáticas bastante diferentes das restantes antocianinas de origem natural, serão igualmente realizados estudos físico-químicos que incluem a monitorização dos espectros de UV-Vis aos vários pHs experienciados no trato gastrointestinal. Este estudo permitirá conhecer os equilíbrios químicos dos metabolitos e a fração molar de cada forma presente nos diferentes locais de absorção. Serão ainda avaliados os parâmetros de estabilidade/degradação nas mesmas condições.

No que diz respeito às propriedades biológicas de antocianinas, pigmentos antociânicos, adutos flavan-3-ol-antocianina e respetivos metabolitos, os estudos serão focados numa das patologias mais comuns da sociedade moderna: o cancro. Serão avaliadas as propriedades antitumorais destes compostos em diversas linhas celulares tumorais comparadas com uma linha não tumoral de fibroblastos humanos.

A mais valia da continuidade deste projeto prende-se com o conhecimento acumulado durante estes 4 anos de investigação e que irá permitir a obtenção de metabolitos de outras classes de polifenóis (não disponíveis comercialmente) e por outro lado o estudo da forma como atravessam diferentes barreiras celulares usando sistemas celulares, um dos quais foi desenvolvido durante este projeto. Um dos avanços futuros deste trabalho será propor um transportador para a absorção das antocianinas ao nível gástrico, através de evidências moleculares associadas a estudos de química computacional.

Estes resultados irão contribuir para direcionar futuros estudos na área da biodisponibilidade destes compostos. Embora estes modelos celulares possam não refletir o sistema metabólico humano, os estudos *in vitro* têm sido usados e aceites pela comunidade científica como uma primeira abordagem para elucidar os mecanismos pelos quais as moléculas se tornam biodisponíveis, os fatores que modulam essa biodisponibilidade, e as formas que poderão ter bioatividade. Estas são ainda questões sobre as quais a informação acessível não é muito clara nem detalhada e certamente incompleta.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharya, A., I. Das, et al. (2010). "Redox Regulation in Cancer: A Double-edged Sword with Therapeutic Potential." *Oxid. Med. Cell Longev.* **3**(1): 23-34.
- Acquaviva, R., A. Russo, et al. (2003). "Cyanidin and cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants." *Chem. Res. Toxicol.* **19**(4): 243-252.
- Amieva, M. R., R. Vogelmann, et al. (2003). "Disruption of the Epithelial Apical-Junctional Complex by *Helicobacter pylori* CagA." *Science* **300**(5624): 1430-1434.
- Andres-Lacueva, C., B. Shukitt-Hale, et al. (2005). "Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory." *Nutr. Neurosci.* **8**(2): 111-120.
- Arts, I. C., P. C. Hollman, et al. (1999). "Chocolate as a source of tea flavonoids." *Lancet* **354**(9177): 488.
- Arts, I. C. W., B. van de Putte, et al. (2000). "Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods, and Processed Foods." *J. Agric. Food Chem.* **48**(5): 1746-1751.
- Arts, I. C. W., B. van de Putte, et al. (2000). "Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk." *J. Agric. Food Chem.* **48**(5): 1752-1757.
- Artursson, P. (1991). "Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa." *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **8**(4): 305-330.
- Aura, A. M., P. Martin-Lopez, et al. (2005). "In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora." *Eur. J. Nutr.* **44**(3): 133-142.
- Aviram, M. and B. Fuhrman (2002). "Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **957**: 146-161.
- Azevedo, J., I. Fernandes, et al. (2009). "Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins." *Food Chem.* **119**(2): 518-523.
- Baba, S., N. Osakabe, et al. (2002). "Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in rats." *Free Radic. Biol. Med.* **33**(1): 142-148.
- Bakker, J. and C. F. Timberlake (1986). "The Mechanism of Color Changes in Aging Port Wine." *Am. J. Enol. Vitic.* **37**: 288-292.
- Bakker, J. and C. F. Timberlake (1997). "Isolation, Identification, and Characterization of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines." *J. Agric. Food Chem.* **45**(1): 35-43.

- Bate-Smith, E. C. (1954). "Leuco-anthocyanins. 1. Detection and identification of anthocyanidins formed leuco-anthocyanins in plant tissues." *Biochem. J.* **58**(1): 122-125.
- Bax, A. and S. Subramanian (1986). "Sensitivity-enhanced two-dimensional heteronuclear shift correlation NMR spectroscopy." *J. Magn. Reson.* **67**(3): 565-569.
- Bax, A. and M. F. Summers (1986). "Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR." *J. Am. Chem. Soc.* **108**(8): 2093-2094.
- Benzie, I. F. F. and J. J. Strain (1996). "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay." *Anal. Biochem.* **239**(1): 70-76.
- Bieche, I., B. Parfait, et al. (2001). "Quantification of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  expression in sporadic breast cancer." *Oncogene* **20**(56): 8109-8115.
- Bitsch, I., M. Janssen, et al. (2004a). "Bioavailability of anthocyanidin-3-glycosides following consumption of elderberry extract and blackcurrant juice." *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **42**(5): 293-300.
- Bitsch, R., M. Netzel, et al. (2004b). "Bioavailability and Biokinetics of Anthocyanins From Red Grape Juice and Red Wine." *J. Biomed. Biotechnol.* **5**(5): 293-298.
- Bitsch, R., M. Netzel, et al. (2004c). "Urinary Excretion of Cyanidin Glucosides and Glucuronides in Healthy Humans After Elderberry Juice Ingestion." *J. Biomed. Biotechnol.* **5**(5): 343-345.
- Bò, C. D., S. Ciappellano, et al. (2009). "Anthocyanin Absorption, Metabolism, and Distribution from a Wild Blueberry-Enriched Diet (*Vaccinium angustifolium*) Is Affected by Diet Duration in the Sprague-Dawley Rat." *J. Agric. Food Chem.* **58**(4): 2491-2497.
- Bohm, H., H. Boeing, et al. (1998). "Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases." *Z. Ernährungswiss.* **37**(2): 147-163.
- Bondet, V., W. Brand-Williams, et al. (1997). "Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH. Free Radical Method." *Lebensm. Wiss. Technol.* **30**: 609-615.
- Bonvehí, J. S. and F. V. Coll (1997). "Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder." *Food Chem.* **60**: 365-370.
- Bors, W., W. Heller, et al. (1990). "Radical chemistry of flavonoid antioxidants." *Adv. Exp. Med. Biol.* **264**: 165-170.
- Boudet, A.-M. (2007). "Evolution and current status of research in phenolic compounds." *Phytochemistry* **68**(22-24): 2722-2735.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bras, N., R. Goncalves, et al. (2010). "Understanding the Binding of Procyanidins to Pancreatic Elastase by Experimental and Computational Methods." *Biochemistry* **49**(25): 5097-5108.
- Brouillard, R. (1983). "The *in vivo* expression of anthocyanin colour in plants." *Phytochemistry* **22**(6): 1311-1323.
- Brouillard, R. and A. Cheminat (1988). "Flavonoids and plant color." *Prog. Clin. Biol. Res.* **280**: 93-106.
- Brzezinski, A. and A. Debi (1999). "Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators?" *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **85**(1): 47-51.
- Brzozowski, A. M., A. C. Pike, et al. (1997). "Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor." *Nature* **389**(6652): 753-758.

- Bub, A., B. Watzl, et al. (2001). "Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice." *Eur. J. Nutr.* **40**(3): 113-120.
- Buchner, J. (1999). "Hsp 90 & Co. - a holding for folding." *Trends Food Sci. Technol.* **24**(4): 136-141.
- Byers, J. P. and J. G. Sarver (2009). *Pharmacokinetic Modeling. Pharmacology: Principles and practice.* M. Hacker, K. Bachmann and W. Messer, Academic Press: 201-277.
- Cani, P. D. and N. M. Delzenne (2009). "The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease." *Curr. Pharm. Des.* **15**(13): 1546-1558.
- Cao, G., H. U. Muccitelli, et al. (2001). "Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study." *Am. J. Clin. Nutr.* **73**(5): 920-926.
- Cao, G. and R. L. Prior (1999). "Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract." *Clin. Chem.* **45**(4): 574-576.
- Cao, G., R. M. Russell, et al. (1998). "Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women." *J. Nutr.* **128**(12): 2383-2390.
- Cao, G., E. Sofic, et al. (1997). "Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships." *Free Radic. Biol. Med.* **22**(5): 749-760.
- Castañeda-Ovando, A., M. d. L. Pacheco-Hernández, et al. (2009). "Chemical studies of anthocyanins: A review." *Food Chem.* **113**(4): 859-871.
- Chen, Y., C. Merzdorf, et al. (1997). "COOH Terminus of Occludin Is Required for Tight Junction Barrier Function in Early *Xenopus* Embryos." *J. Cell Biol.* **138**(4): 891-899.
- Chun, O. K., S. J. Chung, et al. (2007). "Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults." *J. Nutr.* **137**(5): 1244-1252.
- Clifford, M. N. (2000). "Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden." *J. Sci. Food Agric.* **80**(7): 1063-1072.
- Collins-Burow, B. M., M. E. Burow, et al. (2000). "Estrogenic and antiestrogenic activities of flavonoid phytochemicals through estrogen receptor binding-dependent and -independent mechanisms." *Nutr. Cancer* **38**(2): 229-244.
- Constantinou, A. I., A. E. Krygier, et al. (1998). "Genistein induces maturation of cultured human breast cancer cells and prevents tumor growth in nude mice." *Am. J. Clin. Nutr.* **68**(6 Suppl): 1426S-1430S.
- Constantinou, A. I., R. Mehta, et al. (2003). "Phenoxodiol, a novel isoflavone derivative, inhibits dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats." *Eur. J. Cancer* **39**(7): 1012-1018.
- Cos, P., L. Ying, et al. (1998). "Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers." *J. Nat. Prod.* **61**(1): 71-76.
- Cotelle, N. (2001). "Role of flavonoids in oxidative stress." *Curr. Top Med. Chem.* **1**(6): 569-590.
- Cren-Olivé, C. é., E. Teissier, et al. (2003). "Effect of catechin O-methylated metabolites and analogues on human LDL oxidation." *Free Radic. Biol. Med.* **34**(7): 850-855.
- Crespy, V., C. Morand, et al. (2001). "Quercetin, but not Its Glycosides, Is Absorbed from the Rat Stomach." *J. Agric. Food Chem.* **50**(3): 618-621.
- Cruz, L. s., V. Petrov, et al. (2010). "Establishment of the Chemical Equilibria of Different Types of Pyranoanthocyanins in Aqueous Solutions: Evidence for the Formation of Aggregation in Pyranomalvidin-3-O-coumaroylglucoside-(+)-catechin." *J. Phys. Chem. B* **114**(41): 13232-13240.

Curtis, S. W., T. Washburn, et al. (1996). "Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**(22): 12626-12630.

Daayf, F. and V. Lattanzio (2008). *Recent advances in polyphenol research*. Chichester, West Sussex; Ames, Iowa, Wiley-Blackwell. **1**: 1-379.

Day, A. J., F. J. Canada, et al. (2000). "Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase." *FEBS Lett.* **468**(2-3): 166-170.

Day, A. J., M. S. DuPont, et al. (1998). "Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity." *FEBS Lett.* **436**(1): 71-75.

Déchelotte, P., M. Varrentrapp, et al. (1993). "Conjugation of 1-naphthol in human gastric epithelial cells." *Gut* **34**(2): 177-180.

DeFuria, J., G. Bennett, et al. (2009). "Dietary Blueberry Attenuates Whole-Body Insulin Resistance in High Fat-Fed Mice by Reducing Adipocyte Death and Its Inflammatory Sequelae." *J. Nutr.* **139**(8): 1510-1516.

Delgado-Vargas, F., A. R. Jimenez, et al. (2000). "Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability." *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **40**(3): 173-289.

Deprez, S., I. Mila, et al. (2001). "Transport of Proanthocyanidin Dimer, Trimer, and Polymer Across Monolayers of Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells." *Antioxid. Redox Signal.* **3**(6): 957-967.

Diel, P., K. Smolnikar, et al. (1999). "*In vitro* test systems for the evaluation of the estrogenic activity of natural products." *Planta Med.* **65**(3): 197-203.

Dixon-Shanies, D. and N. Shaikh (1999). "Growth inhibition of human breast cancer cells by herbs and phytoestrogens." *Oncol. Rep.* **6**(6): 1383-1387.

Dressman, J. B., R. R. Berardi, et al. (1990). "Upper Gastrointestinal (GI) pH in Young, Healthy Men and Women." *Pharm. Res.* **7**(7): 756-761.

Dueñas, M., H. Fulcrand, et al. (2006). "Formation of anthocyanin-flavanol adducts in model solutions." *Anal. Chim. Acta* **563**(1-2): 15-25.

Dueñas, M., S. González-Manzano, et al. (2010). "Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin." *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* **51**(2): 443-449.

Dueñas, M., S. González-Manzano, et al. (2012). "Characterization of Sulfated Quercetin and Epicatechin Metabolites." *J. Agric. Food Chem.* **60**(14): 3592-3598.

Dyer, J., I. S. Wood, et al. (2002). "Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**(2): G241-248.

El-Tanani, M. K. and C. D. Green (1997). "Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor." *Mol. Endocrinol.* **11**(7): 928-937.

Faria, A., J. Oliveira, et al. (2005). "Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts." *J. Agric. Food Chem.* **53**(17): 6896-6902.

Faria, A., D. Pestana, et al. (2009). "Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells - Putative involvement of GLUT2." *Mol. Nutr. Food Res.* **53**(11): 1430-1437.

Faria, A., D. Pestana, et al. (2009). Bioavailability of anthocyanin-pyruvic acid adducts in rat. International Conference on Polyphenols and Health, Yorkshire, Leeds.

- Faria, A., D. Pestana, et al. (2011). "Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier." *Food Funct.* **2**(1): 39-44.
- Farrell, T. L., T. P. Dew, et al. (2011). "Absorption and Metabolism of Chlorogenic Acids in Cultured Gastric Epithelial Monolayers." *Drug Metab. Dispos.* **39**(12): 2338-2346.
- Felgines, C., S. Talavera, et al. (2003). "Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans." *J. Nutr.* **133**(5): 1296-1301.
- Felgines, C., S. Talavera, et al. (2006). "Absorption and metabolism of red orange juice anthocyanins in rats." *Br. J. Nutr.* **95**(5): 898-904.
- Felgines, C., S. Talavera, et al. (2005). "Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans." *J. Agric. Food Chem.* **53**(20): 7721-7727.
- Felgines, C., O. Texier, et al. (2009). "Tissue distribution of anthocyanins in rats fed a blackberry anthocyanin-enriched diet." *Mol. Nutr. Food Res.* **53**(9): 1098-1103.
- Finley, J. W., A.-N. Kong, et al. (2011). "Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry." *J. Agric. Food Chem.* **59**(13): 6837-6846.
- Fitzpatrick, L. A. (1999). "Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens: new therapies for the postmenopausal women." *Mayo Clin. Proc.* **74**(6): 601-607.
- Fleischhut, J., F. Kratzer, et al. (2006). "Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*." *Eur. J. Nutr.* **45**(1): 7-18.
- Fossen, T., S. Rayyan, et al. (2004). "Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols." *Phytochemistry* **65**(10): 1421-1428.
- Fournier, D. B., J. W. Erdman, Jr., et al. (1998). "Soy, its components, and cancer prevention: a review of the *in vitro*, animal, and human data." *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **7**(11): 1055-1065.
- Frank, T., M. Janßen, et al. (2005). "Pharmacokinetics of Anthocyanidin-3-Glycosides Following Consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. Extract." *J. Clin. Pharmacol.* **45**(2): 203-210.
- Frank, T., M. Janssen, et al. (2007). "Absorption and excretion of elderberry (*Sambucus nigra* L.) anthocyanins in healthy humans." *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **29**(8): 525-533.
- Frank, T., M. Netzel, et al. (2003). "Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice." *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**(5): 423-435.
- Frankel, E. N., A. L. Waterhouse, et al. (1995). "Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins." *J. Agric. Food Chem.* **43**(4): 890-894.
- Fukumoto, L. R. and G. Mazza (2000). "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds." *J. Agric. Food Chem.* **48**(8): 3597-3604.
- Fulcrand, H., C. Benabdeljalil, et al. (1998). "A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins." *Phytochemistry* **47**(7): 1401-1407.
- Galati, G., M. Y. Moridani, et al. (2001). "Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation." *Free Radic. Biol. Med.* **30**(4): 370-382.
- Galli, R. L., B. Shukitt-Hale, et al. (2002). "Fruit polyphenolics and brain aging: nutritional interventions targeting age-related neuronal and behavioral deficits." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**: 128-132.
- Gee, J. M., M. S. DuPont, et al. (2000). "Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway." *J. Nutr.* **130**(11): 2765-2771.

- Gee, J. M., M. S. DuPont, et al. (1998). "Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway." *Free Radic. Biol. Med.* **25**(1): 19-25.
- Giusti, M. M., L. E. Rodriguez-Saona, et al. (1999). "Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization." *J. Agric. Food Chem.* **47**(11): 4657-4664.
- Goldberg, D. M., J. Yan, et al. (2003). "Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects." *Clin. Biochem.* **36**(1): 79-87.
- Goldstein, J. L. and T. Swain (1963). "Changes in tannins in ripening fruits." *Phytochemistry* **2**(4): 371-383.
- González-Paramás, A. M., F. Lopes da Silva, et al. (2006). "Flavanol-anthocyanin condensed pigments in plant extracts." *Food Chem.* **94**(3): 428-436.
- Gromova, I., J. E. Celis, et al. (2006). Protein Detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass Spectrometry. *Cell Biology (Third Edition)*. Burlington, Academic Press: 219-223.
- Hall, J. M., J. F. Couse, et al. (2001). "The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling." *J. Biol. Chem.* **276**(40): 36869-36872.
- Halliwell, B. (1990). "How to Characterize a Biological Antioxidant." *Free Radic. Res.* **9**(1): 1-32.
- Halliwell, B. (2006). "Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life." *Plant Physiol.* **141**(2): 312-322.
- Hanasaki, Y., S. Ogawa, et al. (1994). "The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids." *Free Radic. Biol. Med.* **16**(6): 845-850.
- Harborne, J. B. and C. A. Williams (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." *Phytochemistry* **55**(6): 481-504.
- Harborne, J. B. and C. A. Williams (2001). "Anthocyanins and other flavonoids." *Nat. Prod. Rep.* **18**(3): 310-333.
- Harris, N., V. Costa, et al. (2003). "Mnsod overexpression extends the yeast chronological ( $G_0$ ) life span but acts independently of Sir2p histone deacetylase to shorten the replicative life span of dividing cells." *Free Radic. Biol. Med.* **34**(12): 1599-1606.
- Harris, R. M., R. Picton, et al. (2000). "Activity of phenolsulfotransferases in the human gastrointestinal tract." *Life Sci.* **67**(17): 2051-2057.
- Hartman, J., A. Ström, et al. (2009). "Estrogen receptor beta in breast cancer--Diagnostic and therapeutic implications." *Steroids* **74**(8): 635-641.
- Hashimoto, K., T. Oshima, et al. (2008). "Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**(1): 154-157.
- Haslam, E. (1996). "Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action." *J. Nat. Prod.* **59**(2): 205-215.
- Heim, K. E., A. R. Tagliaferro, et al. (2002). "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships." *J. Nutr. Biochem.* **13**(10): 572-584.
- Heinonen, M. (2007). "Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics - a Finnish perspective." *Mol. Nutr. Food Res.* **51**(6): 684-691.
- Hertog, M. G., P. C. Hollman, et al. (1993). "Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands." *Nutr. Cancer* **20**(1): 21-29.

Hodnick, W. F., S. Ahmad, et al. (1998). "Induction of oxidative stress by redox active flavonoids." *Adv. Exp. Med. Biol.* **439**: 131-150.

Hogben, C. A. M., L. S. Schanker, et al. (1957). "Absorption of drugs from the stomach. II. The human." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **120**(4): 540-545.

Hollman, P. C., M. N. Bijlsman, et al. (1999). "The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man." *Free Radic. Res.* **31**(6): 569-573.

Hollman, P. C. H. (2004). "Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids." *Pharm. Biol.* **42**(1 supp 1): 74 - 83.

Hollman, P. C. H. and M. B. Katan (1999). "Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability." *Food Chem. Toxicol.* **37**(9-10): 937-942.

Holt, R. R., S. A. Lazarus, et al. (2002). "Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa." *Am. J. Clin. Nutr.* **76**(4): 798-804.

Hou, D. X. (2003). "Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins." *Curr. Mol. Med.* **3**(2): 149-159.

Hou, D. X., K. Kai, et al. (2004). "Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms." *Carcinogenesis* **25**(1): 29-36.

Hou, D. X. and T. Kumamoto (2010). "Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling." *Antioxid. Redox Signal.* **13**(5): 691-719.

Hou, D. X., T. Ose, et al. (2003). "Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved." *Int. J. Oncol.* **23**(3): 705-712.

"Stomach: structure. [Art]." *In Encyclopædia Britannica*. Retrieved 30 April, 2012, from <http://www.britannica.com/EBchecked/media/68634/>.

Huang, D., B. Ou, et al. (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays." *J. Agric. Food Chem.* **53**(6): 1841-1856.

Huang, P., J. Han, et al. (2010). "MAPK signaling in inflammation-associated cancer development." *Protein Cell* **1**(3): 218-226.

Ichiyanagi, T., M. M. Rahman, et al. (2004). "Absorption and metabolism of delphinidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside in rats." *Biofactors* **21**(1-4): 411-413.

Ichiyanagi, T., M. M. Rahman, et al. (2004). "Absorption and metabolism of delphinidin 3-O- $\beta$ -glucopyranoside in rats." *Free Radic. Biol. Med.* **36**(7): 930-937.

Ichiyanagi, T., Y. Shida, et al. (2005). "Extended glucuronidation is another major path of cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside metabolism in rats." *J. Agric. Food Chem.* **53**(18): 7312-7319.

Ichiyanagi, T., Y. Shida, et al. (2006). "Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract in rats." *J. Agric. Food Chem.* **54**(18): 6578-6587.

Ichiyanagi, T., Y. Shida, et al. (2005). "Metabolic pathway of cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside in rats." *J. Agric. Food Chem.* **53**(1): 145-150.

Jameson, G. N. L. and W. Linert (2001). "The oxidation of 6-hydroxydopamine in aqueous solution. Part 3.12 Kinetics and mechanism of the oxidation with iron(III)." *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*(4): 569-575.

Jawhari, A. U., M. Noda, et al. (1999). "Abnormal expression and function of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma cell lines." *Br. J. Cancer* **80**(3-4): 322-330.

Jeong, W.-S. and A.-N. Kong (2004). "Biological Properties of Monomeric and Polymeric Catechins: Green Tea Catechins and Procyanidins." *Pharm. Biol.* **42**(Supplement 1): 84-93.

Jiang, W. G., G. Davies, et al. (2005). "Com-1/P8 in oestrogen regulated growth of breast cancer cells, the ER- $\beta$  connection." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**(1): 253-262.

Jordheim, M., T. Fossen, et al. (2006). "Characterization of Hemiacetal Forms of Anthocyanidin 3-O- $\beta$ -Glycopyranosides." *J. Agric. Food Chem.* **54**(25): 9340-9346.

Jovanovic, S. V. and M. G. Simic (2000). "Antioxidants in Nutrition." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**(1): 326-334.

Kähkönen, M. P. and M. Heinonen (2003). "Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons." *J. Agric. Food Chem.* **51**(3): 628-633.

Kahle, K., W. Huemmer, et al. (2007). "Polyphenols Are Intensively Metabolized in the Human Gastrointestinal Tract after Apple Juice Consumption." *J. Agric. Food Chem.* **55**(26): 10605-10614.

Kalt, W., J. B. Blumberg, et al. (2008). "Identification of Anthocyanins in the Liver, Eye, and Brain of Blueberry-Fed Pigs." *J. Agric. Food Chem.* **56**(3): 705-712.

Kamei, H., T. Kojima, et al. (1995). "Suppression of tumor cell growth by anthocyanins *in vitro*." *Cancer Invest.* **13**(6): 590-594.

Kang, N. J., S. H. Shin, et al. (2011). "Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis." *Pharmacol. Ther.* **130**(3): 310-324.

Karakaya, S. (2004). "Bioavailability of phenolic compounds." *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**(6): 453-464.

Karhunen, T., C. Tilgmann, et al. (1994). "Distribution of catechol-O-methyltransferase enzyme in rat tissues." *J. Histochem. Cytochem.* **42**(8): 1079-1090.

Karlsen, A., L. Retterstøl, et al. (2007). "Anthocyanins Inhibit Nuclear Factor-kappaB Activation in Monocytes and Reduce Plasma Concentrations of Pro-Inflammatory Mediators in Healthy Adults." *J. Nutr.* **137**(8): 1951-1954.

Katsube, N., K. Iwashita, et al. (2003). "Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins." *J. Agric. Food Chem.* **51**(1): 68-75.

Katzenellenbogen, B. S., I. Choi, et al. (2000). "Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology." *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **74**(5): 279-285.

Kaur, C. and H. C. Kapoor (2001). "Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health." *Int. J. Mol. Sci.* **36**(7): 703-725.

Kavvada, K. M., J. G. Murray, et al. (2005). "A Collagen IV Matrix Is Required for Guinea Pig Gastric Epithelial Cell Monolayers to Provide an Optimal Model of the Stomach Surface for Biopharmaceutical Screening." *J. Biomol. Screen* **10**(5): 495-507.

Kavvada, K. M., J. G. Murray, et al. (2006). "High permeability of the anionic form restricts accumulation of indomethacin by cultured gastric surface epithelial cells exposed to low apical pH." *Eur. J. Pharmacol.* **549**(1-3): 41-49.

Kay, C. D. (2006). "Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans." *Nutr. Res. Rev.* **19**(1): 137-146.

Kay, C. D., G. Mazza, et al. (2004). "Anthocyanin metabolites in human urine and serum." *Br. J. Nutr.* **91**(6): 933-942.

Kay, C. D., G. J. Mazza, et al. (2005). "Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men." *J. Nutr.* **135**(11): 2582-2588.

- Kellett, G. L. and E. Brot-Laroche (2005). "Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption." *Diabetes* **54**(10): 3056-3062.
- Keppler, K. and H. U. Humpf (2005). "Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora." *Bioorg. Med. Chem.* **13**(17): 5195-5205.
- Klein-Hitpass, L., G. U. Ryffel, et al. (1988). "A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor." *Nucleic Acids Res.* **16**(2): 647-663.
- Koide, T., Y. Hashimoto, et al. (1997). "Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans *in vitro* and *in vivo*." *Cancer Biother. Radiopharm.* **12**(4): 277-280.
- Kong, J. M., L. S. Chia, et al. (2003). "Analysis and biological activities of anthocyanins." *Phytochemistry* **64**(5): 923-933.
- Kousteni, S., T. Bellido, et al. (2001). "Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity." *Cell* **104**(5): 719-730.
- Kryston, T. B., A. B. Georgiev, et al. (2011). "Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis." *Mut. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **711**(1-2): 193-201.
- Kuhnau, J. (1976). "The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition." *World Rev. Nutr. Diet* **24**: 117-191.
- Kushner, P. J., D. A. Agard, et al. (2000). "Estrogen receptor pathways to AP-1." *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **74**(5): 311-317.
- Lala, G., M. Malik, et al. (2006). "Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats." *Nutr. Cancer* **54**(1): 84-93.
- Lapidot, T., S. Harel, et al. (1998). "Bioavailability of Red Wine Anthocyanins As Detected in Human Urine†." *J. Agric. Food Chem.* **46**(10): 4297-4302.
- Lazze, M. C., M. Savio, et al. (2004). "Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines." *Carcinogenesis* **25**(8): 1427-1433.
- Lee, K. W. and H. J. Lee (2006). "The roles of polyphenols in cancer chemoprevention." *Biofactors* **26**(2): 105-121.
- Lee, M. J., Z. Y. Wang, et al. (1995). "Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects." *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **4**(4): 393-399.
- Lemańska, K., H. Van Der Woude, et al. (2004). "The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin - A mechanistic insight." *Free Radic. Res.* **38**(6): 639-647.
- Lemieux, M., F. Bouchard, et al. (2011). "The NCI-N87 cell line as a gastric epithelial barrier model for drug permeability assay." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **412**(3): 429-434.
- Lila, M. A. (2004). "Anthocyanins and Human Health: An *In Vitro* Investigative Approach." *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**(5): 306-313.
- Lima, J. C., C. Vautier-Giongo, et al. (2002). "Color Stabilization of Anthocyanins: Effect of SDS Micelles on the Acid-Base and Hydration Kinetics of Malvidin 3-Glucoside (Oenin)." *J. Phys. Chem. A* **106**(24): 5851-5859.
- Liska, D., M. Lyon, et al. (2006). "Detoxification and Biotransformational Imbalances." *EXPLORE-NY.* **2**(2): 122-140.
- Liu, R. H. (2004). "Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action." *J. Nutr.* **134**(12 Suppl): 3479S-3485S.

- Lodi, F., R. Jimenez, et al. (2009). "Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta." *Atherosclerosis* **204**(1): 34-39.
- Malik, Q. and K. E. Herbert (2012). "Oxidative and non-oxidative DNA damage and cardiovascular disease." *Free Radic. Res.* **46**(4): 554-564.
- Mallery, S. R., D. E. Budendorf, et al. (2011). "Effects of human oral mucosal tissue, saliva and oral microflora on intraoral metabolism and bioactivation of black raspberry anthocyanins." *Cancer Prev. Res.*
- Manach, C., G. Williamson, et al. (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." *Am. J. Clin. Nutr.* **81**(1 Suppl): 230-242.
- Manzano, S. and G. Williamson (2010). "Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells." *Mol. Nutr. Food Res.* **54**(12): 1773-1780.
- Mateus, N., E. Carvalho, et al. (2003). "Isolation and structural characterization of new acylated anthocyanin-vinyl-flavanol pigments occurring in aging red wines." *J. Agric. Food Chem.* **51**(1): 277-282.
- Mateus, N. and V. de Freitas (2001). "Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during Port wine aging." *J. Agric. Food Chem.* **49**(11): 5217-5222.
- Mateus, N., J. Oliveira, et al. (2004). "New Family of Bluish Pyranoanthocyanins." *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**(5): 299-305.
- Mateus, N., A. M. Silva, et al. (2003). "A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines." *J. Agric. Food Chem.* **51**(7): 1919-1923.
- Mateus, N., A. M. Silva, et al. (2001). "Occurrence of anthocyanin-derived pigments in red wines." *J. Agric. Food Chem.* **49**(10): 4836-4840.
- Matsui, T., T. Ueda, et al. (2001). " $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Action of Natural Acylated Anthocyanins. 1. Survey of Natural Pigments with Potent Inhibitory Activity." *J. Agric. Food Chem.* **49**(4): 1948-1951.
- Matsumoto, H., T. Ichyanagi, et al. (2006). "Ingested delphinidin-3-rutinoside is primarily excreted to urine as the intact form and to bile as the methylated form in rats." *J. Agric. Food Chem.* **54**(2): 578-582.
- Matsumoto, H., H. Inaba, et al. (2001). "Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms." *J. Agric. Food Chem.* **49**(3): 1546-1551.
- Matsumoto, H., Y. Nakamura, et al. (2003). "Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin." *J. Agric. Food Chem.* **51**(12): 3560-3563.
- Mazza, G. and R. Brouillard (1990). "The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions." *Phytochemistry* **29**(4): 1097-1102.
- Mazza, G., C. D. Kay, et al. (2002). "Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects." *J. Agric. Food Chem.* **50**(26): 7731-7737.
- McDougall, G. J., S. Fyffe, et al. (2005). "Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion." *Phytochemistry* **66**(21): 2540-2548.
- McGhie, T. K., G. D. Ainge, et al. (2003). "Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats." *J. Agric. Food Chem.* **51**(16): 4539-4548.
- McGhie, T. K. and M. C. Walton (2007). "The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding." *Mol. Nutr. Food Res.* **51**(6): 702-713.

- Meiers, S., M. Kemeny, et al. (2001). "The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor." *J. Agric. Food Chem.* **49**(2): 958-962.
- Mendelsohn, M. E. (2000). "Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean?" *Circ. Res.* **87**(11): 956-960.
- Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, et al. (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer." *Pharmacol. Rev.* **52**(4): 673-751.
- Migliaccio, A., M. Di Domenico, et al. (1996). "Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells." *EMBO J.* **15**(6): 1292-1300.
- Miguel, M. G. (2011). "Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities." *J. Appl. Pharm. Sci.* **1**(6): 7-15.
- Milbury, P. E., G. Cao, et al. (2002). "Bioavailability of elderberry anthocyanins." *Mech. Ageing Dev.* **123**(8): 997-1006.
- Milbury, P. E., J. A. Vita, et al. (2010). "Anthocyanins are Bioavailable in Humans following an Acute Dose of Cranberry Juice." *J. Nutr.* **140**(6): 1099-1104.
- Miyazawa, T., K. Nakagawa, et al. (1999). "Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans." *J. Agric. Food Chem.* **47**(3): 1083-1091.
- Monks, A., D. Scudiero, et al. (1991). "Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines." *J. Natl. Cancer Inst.* **83**(11): 757-766.
- Monks, T. J. and S. S. Lau (1997). "Biological reactivity of polyphenolic-glutathione conjugates." *Chem. Res. Toxicol.* **10**(12): 1296-1313.
- Monks, T. J. and S. S. Lau (1998). "The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**: 229-255.
- Moran, J. F., R. V. Klucas, et al. (1997). "Complexes of Iron with Phenolic Compounds from Soybean Nodules and Other Legume Tissues: Prooxidant and Antioxidant Properties." *Free Radic. Biol. Med.* **22**(5): 861-870.
- Moras, D. and H. Gronemeyer (1998). "The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function." *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**(3): 384-391.
- Morazzoni, P. and E. Bombardelli (1996). "*Vaccinium myrtillus L.*" *Fitoterapia* **67**(1): 3-29.
- Motoyama, T., H. Hojo, et al. (1986). "Comparison of seven cell lines derived from human gastric carcinomas." *Pathol. Int.* **36**(1): 65-83.
- Moure, A., J. M. Cruz, et al. (2001). "Natural antioxidants from residual sources." *Food Chem.* **72**(2): 145-171.
- Mulleder, U., M. Murkovic, et al. (2002). "Urinary excretion of cyanidin glycosides." *J. Biochem. Biophys. Methods* **53**(1-3): 61-66.
- Murkovic, M., U. Mülleder, et al. (2001). "Detection of anthocyanins from elderberry juice in human urine." *J. Sci. Food Agric.* **81**(9): 934-937.
- Murota, K. and J. Terao (2005). "Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach." *FEBS Lett.* **579**(24): 5343-5346.
- Muselík, J., M. García-Alonso, et al. (2007). "Measurement of antioxidant activity of wine catechins, procyanidins, anthocyanins and pyranoanthocyanins." *Int. J. Mol. Sci.* **8**(8): 797-809.

- Nair, S., W. Li, et al. (2007). "Natural dietary anti-cancer chemopreventive compounds: redox-mediated differential signaling mechanisms in cytoprotection of normal cells versus cytotoxicity in tumor cells." *Acta Pharmacol. Sin.* **28**(4): 459-472.
- Narayan, M. S., K. A. Naidu, et al. (1999). "Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation." *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **60**(1): 1-4.
- Nave, F., V. Petrov, et al. (2010). "Thermodynamic and Kinetic Properties of a Red Wine Pigment: Catechin-(4,8)-malvidin-3-O-glucoside." *J. Phys. Chem. B* **114**(42): 13487-13496.
- Netzel, M., G. Strass, et al. (2001). "Bioactive Anthocyanins Detected in Human Urine after Ingestion of Blackcurrant Juice." *J. Environ. Pathol.* **20**(2): 7.
- Neuhoff, S., A.-L. Ungell, et al. (2005). "pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers." *Eur. J. Pharm. Sci.* **25**(2-3): 211-220.
- Nielsen, I. L., L. O. Dragsted, et al. (2003). "Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits." *J. Agric. Food Chem.* **51**(9): 2813-2820.
- Noda, Y., T. Kaneyuki, et al. (1998). "Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant." *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **102**(2): 175-187.
- Noguchi, Y., S. Sato, et al. (1999). "Glucose uptake in the human gastric cancer cell line, MKN28, is increased by insulin stimulation." *Cancer Lett.* **140**(1-2): 69-74.
- Nurmi, T., J. Mursu, et al. (2009). "Metabolism of Berry Anthocyanins to Phenolic Acids in Humans." *J. Agric. Food Chem.* **57**(6): 2274-2281.
- O'Leary, K. A., A. J. Day, et al. (2001). "Flavonoid glucuronides are substrates for human liver  $\beta$ -glucuronidase." *FEBS Lett.* **503**(1): 103-106.
- Ohashi, Y., K. Yoshinaga, et al. (2002). "Kinetic Analysis of the Effect of (-)-Epigallocatechin Gallate on the DNA Scission Induced by Fe(II)." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**(4): 770-776.
- Ohnishi, R., H. Ito, et al. (2006). "Urinary Excretion of Anthocyanins in Humans after Cranberry Juice Ingestion." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**(7): 1681-1687.
- Oliveira, J., V. de Freitas, et al. (2007). "Reaction between Hydroxycinnamic Acids and Anthocyanin-Pyruvic Acid Adducts Yielding New Portisins." *J. Agric. Food Chem.* **55**(15): 6349-6356.
- Oliveira, J., C. Santos-Buelga, et al. (2006). "Chromatic and structural features of blue anthocyanin-derived pigments present in Port wine." *Anal. Chim. Acta* **563**(1-2 SPEC. ISS.): 2-9.
- Oshima, T., H. Miwa, et al. (2008). "Aspirin induces gastric epithelial barrier dysfunction by activating p38 MAPK via claudin-7." *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **295**(3): C800-C806.
- Ou, K., K. Yu, et al. (2008). "Novel Breast Cancer Biomarkers Identified by Integrative Proteomic and Gene Expression Mapping." *J. Proteome Res.* **7**(4): 1518-1528.
- Pacheco-Palencia, L. A., S. U. Mertens-Talcott, et al. (2010). "In vitro absorption and antiproliferative activities of monomeric and polymeric anthocyanin fractions from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.)." *Food Chem.* **119**(3): 1071-1078.
- Paech, K., P. Webb, et al. (1997). "Differential ligand activation of estrogen receptors ER  $\alpha$  and ER  $\beta$  at AP-1 sites." *Science* **277**(5331): 1508-1510.
- Parkin, D. M. (2001). "Global cancer statistics in the year 2000." *Lancet Oncol.* **2**(9): 533-543.
- Passamonti, S., A. Vanzo, et al. (2005). "Hepatic uptake of grape anthocyanins and the role of bilitranslocase." *Food Chem. Toxicol.* **38**(8-9): 953-960.

- Passamonti, S., U. Vrhovsek, et al. (2002). "The interaction of anthocyanins with bilitranslocase." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**(3): 631-636.
- Passamonti, S., U. Vrhovsek, et al. (2003). "The stomach as a site for anthocyanins absorption from food." *FEBS Lett.* **544**(1-3): 210-213.
- Passamonti, S., U. Vrhovsek, et al. (2005). "Fast Access of Some Grape Pigments to the Brain." *J. Agric. Food Chem.* **53**(18): 7029-7034.
- Perron, N. and J. Brumaghim (2009). "A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding." *Cell Biochem. Biophys.* **53**(2): 75-100.
- Pfohl-Leszkowicz, A., E. Pinelli, et al. (1998). "Sex- and strain-specific expression of cytochrome P450s in ochratoxin A-induced genotoxicity and carcinogenicity in rats." *Mol. Carcinog.* **23**(2): 76-85.
- Pink, J. J. and V. C. Jordan (1996). "Models of Estrogen Receptor Regulation by Estrogens and Antiestrogens in Breast Cancer Cell Lines." *Cancer Res.* **56**(10): 2321-2330.
- Piskula, M. K., J. Yamakoshi, et al. (1999). "Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach." *FEBS Lett.* **447**(2): 287-291.
- Pissarra, J., S. Lourenco, et al. (2004). "Structural characterization of new malvidin 3-glucoside-catechin aryl/alkyl-linked pigments." *J. Agric. Food Chem.* **52**(17): 5519-5526.
- Pollard, S. E., G. G. C. Kuhnle, et al. (2006). "The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**(4): 960-968.
- Prasain, J. K., N. Peng, et al. (2009). "Liquid chromatography tandem mass spectrometry identification of proanthocyanidins in rat plasma after oral administration of grape seed extract." *Phytomedicine* **16**(2-3): 233-243.
- Price, K. R. and G. R. Fenwick (1985). "Naturally occurring oestrogens in foods-a review." *Food Addit. Contam.* **2**(2): 73-106.
- Prior, R. L. and X. Wu (2006). "Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities." *Free Radic. Res.* **40**(10): 1014-1028.
- Psarra, E., D. P. Makris, et al. (2002). "Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek white wines: correlation with polyphenolic composition." *J. Sci. Food Agric.* **82**(9): 1014-1020.
- Pulido, R., L. Bravo, et al. (2000). "Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay." *J. Agric. Food Chem.* **48**(8): 3396-3402.
- Puppo, A. (1992). "Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by fenton-type reactions; influence of the iron chelator." *Phytochemistry* **31**(1): 85-88.
- Ramirez-Tortosa, C., O. M. Andersen, et al. (2001). "Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats." *Free Radic. Biol. Med.* **31**(9): 1033-1037.
- Ramos, S. (2008). "Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways." *Mol. Nutr. Food Res.* **52**(5): 507-526.
- Rayalam, S., M. A. Della-Fera, et al. (2008). "Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle." *J. Nutr. Biochem.* **19**(11): 717-726.
- Razandi, M., A. Pedram, et al. (1999). "Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  expressed in Chinese hamster ovary cells." *Mol. Endocrinol.* **13**(2): 307-319.
- Rechner, A. R., M. A. Smith, et al. (2004). "Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products." *Free Radic. Biol. Med.* **36**(2): 212-225.

- Remy, S., H. Fulcrand, et al. (2000). "First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions." *J. Sci. Food Agric.* **80**(6): 745-751.
- Ren, W., Z. Qiao, et al. (2003). "Flavonoids: promising anticancer agents." *Med. Res. Rev.* **23**(4): 519-534.
- Renaud, S. and M. de Lorgeril (1992). "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease." *Lancet* **339**(8808): 1523-1526.
- Ricardo da Silva, J. M., N. Darmon, et al. (1991). "Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds." *J. Agric. Food Chem.* **39**(9): 1549-1552.
- Rice-Evans, C. (2001). "Flavonoid antioxidants." *Curr. Med. Chem.* **8**(7): 797-807.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, et al. (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free Radic. Biol. Med.* **20**(7): 933-956.
- Rios, L. Y., R. N. Bennett, et al. (2002). "Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans." *Am. J. Clin. Nutr.* **76**(5): 1106-1110.
- Riso, P., F. Visioli, et al. (2005). "Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress." *J. Agric. Food Chem.* **53**(4): 941-947.
- Rogerson, F. S. S. and V. A. P. Freitas (2002). "Fortification Spirit, a Contributor to the Aroma Complexity of Port." *J. Food Sci.* **67**(4): 1564-1569.
- Romano, M., M. Razandi, et al. (1988). "Human cell line for study of damage to gastric epithelial cells in vitro." *J. Lab. Clin. Med.* **111**(4): 430-440.
- Ross, J. A. and C. M. Kasum (2002). "Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety." *Annu. Rev. Nutr.* **22**: 19-34.
- Runge-Morris, M. A. (1997). "Regulation of expression of the rodent cytosolic sulfotransferases." *FASEB J.* **11**(2): 109-117.
- Russell, T. L., R. R. Berardi, et al. (1993). "Upper Gastrointestinal pH in Seventy-Nine Healthy, Elderly, North American Men and Women." *Pharm. Res.* **10**(2): 187-196.
- Ryan, P. and M. J. Hynes (2007). "The kinetics and mechanisms of the complex formation and antioxidant behaviour of the polyphenols EGCg and ECG with iron(III)." *J. Inorg. Biochem.* **101**(4): 585-593.
- Saceda, M., M. E. Lippman, et al. (1988). "Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol." *Mol. Endocrinol.* **2**(12): 1157-1162.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N., C. Provost, et al. (1999). "Comparative Study of Polyphenol Scavenging Activities Assessed by Different Methods." *J. Agric. Food Chem.* **47**(2): 425-431.
- Salas, E., V. Atanasova, et al. (2004). "Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions." *Anal. Chim. Acta* **513**(1): 325-332.
- Sano, A., J. Yamakoshi, et al. (2003). "Procyanidin B1 Is Detected in Human Serum after Intake of Proanthocyanidin-rich Grape Seed Extract." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**(5): 1140-1143.
- Santos-Buelga, C. and A. Scalbert (2000). "Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health." *J. Sci. Food Agric.* **80**(7): 1094-1117.
- Santos, R. X., S. C. Correia, et al. (2012). "Nuclear and mitochondrial DNA oxidation in Alzheimer's disease." *Free Radic. Res.* **46**(4): 565-576.
- Sarma, A. D. and R. Sharma (1999). "Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage." *Phytochemistry* **52**(7): 1313-1318.

- Sarma, A. D., Y. Sreelakshmi, et al. (1997). "Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation." *Phytochemistry* **45**(4): 671-674.
- Satué-Gracia, M. T., M. Heinonen, et al. (1997). "Anthocyanins as Antioxidants on Human Low-Density Lipoprotein and Lecithin-Liposome Systems." *J. Agric. Food Chem.* **45**(9): 3362-3367.
- Scalbert, A. and G. Williamson (2000). "Dietary intake and bioavailability of polyphenols." *J. Nutr.* **130**(8S Suppl): 2073S-2085S.
- Schmitt, E. and H. Stopper (2001). "Estrogenic activity of naturally occurring anthocyanidins." *Nutr. Cancer* **41**(1-2): 145-149.
- Scholz, S. and G. Williamson (2007). "Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo." *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **77**(3): 224-235.
- Schweigert, N., A. J. B. Zehnder, et al. (2001). "Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals." *Environ. Microbiol.* **3**(2): 81-91.
- Schwenk, M., C. Linz, et al. (1992). "First pass effect of 1-naphthol in the gastric mucosa: Studies with isolated epithelium and cultured mucous cells of guinea pig." *Biochem. Pharmacol.* **43**(4): 771-774.
- Seeram, N. P., L. D. Bourquin, et al. (2001). "Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities." *J. Agric. Food Chem.* **49**(10): 4924-4929.
- Seeram, N. P., Y. Zhang, et al. (2003). "Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins." *Nutr. Cancer* **46**(1): 101-106.
- Seifried, H. E., D. E. Anderson, et al. (2007). "A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species." *J. Nutr. Biochem.* **18**(9): 567-579.
- Sentandreu, E., J. L. Navarro, et al. (2010). "LC-DAD-ESI/MSn Determination of Direct Condensation Flavanol-Anthocyanin Adducts in Pressure Extracted Pomegranate (*Punica granatum L.*) Juice." *J. Agric. Food Chem.* **58**(19): 10560-10567.
- Shahidi, F. and P. K. Wanasundara (1992). "Phenolic antioxidants." *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **32**(1): 67-103.
- Shahzad, S. and I. Bitsch (1998). "Determination of gallic acid and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography." *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **705**(1): 87-95.
- Shih, P. H., C. T. Yeh, et al. (2005). "Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells." *Food Chem. Toxicol.* **43**(10): 1557-1566.
- Shoji, T., S. Masumoto, et al. (2006). "Apple Procyanidin Oligomers Absorption in Rats after Oral Administration: Analysis of Procyanidins in Plasma Using the Porter Method and High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry." *J. Agric. Food Chem.* **54**(3): 884-892.
- Shutt, D. A. (1976). "The effects of plant oestrogens on animal reproduction." *Endeavour* **35**(126): 110-113.
- Simoncini, T., A. Hafezi-Moghadam, et al. (2000). "Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase." *Nature* **407**(6803): 538-541.
- Singletery, K. W., K. J. Jung, et al. (2007). "Anthocyanin-rich grape extract blocks breast cell DNA damage." *J. Med. Food* **10**(2): 244-251.
- Skehan, P., R. Storeng, et al. (1990). "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening." *J. Natl. Cancer Inst.* **82**(13): 1107-1112.
- Smith, C. L. (1998). "Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways." *Biol. Reprod.* **58**(3): 627-632.

- Smith, D. F. and D. O. Toft (1993). "Steroid receptors and their associated proteins." *Mol. Endocrinol.* **7**(1): 4-11.
- Sousa, A., N. Mateus, et al. (2012). "A novel reaction mechanism for the formation of deoxyanthocyanidins." *Tetrahedron Lett.* **53**(10): 1300-1303.
- Sousa, C., N. Mateus, et al. (2007). "Structural and chromatic characterization of a new Malvidin 3-glucoside–vanillyl–catechin pigment." *Food Chem.* **102**(4): 1344-1351.
- Spencer, J. P. (2009). "The impact of flavonoids on memory: physiological and molecular considerations." *Chem. Soc. Rev.* **38**(4): 1152-1161.
- Spencer, J. P. E. (2003). "Metabolism of Tea Flavonoids in the Gastrointestinal Tract." *J. Nutr.* **133**(10): 3255S-3261S.
- Spencer, J. P. E., F. Chaudry, et al. (2000). "Decomposition of Cocoa Procyranidins in the Gastric Milieu." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**(1): 236-241.
- Spencer, J. P. E., H. Schroeter, et al. (2001). "Epicatechin Is the Primary Bioavailable Form of the Procyranidin Dimers B2 and B5 after Transfer across the Small Intestine." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**(3): 588-593.
- Sriram, G., C. Surendranath, et al. (1999). "Kinetics of Anthocyanin Extraction from Fresh and Dried Grape Waste." *Separ. Sci. Tech.* **34**(4): 683 - 697.
- Steinert, R. E., B. Ditscheid, et al. (2008). "Absorption of Black Currant Anthocyanins by Monolayers of Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells Mounted in Ussing Type Chambers." *J. Agric. Food Chem.* **56**(13): 4995-5001.
- Stintzing, F. C. and R. Carle (2004). "Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition." *Trends Food Sci. Technol.* **15**(1): 19-38.
- Strassburg, C. P., N. Nguyen, et al. (1998). "Polymorphic Expression of the UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A Gene Locus in Human Gastric Epithelium." *Mol. Pharmacol.* **54**(4): 647-654.
- Strassburg, C. P., K. Oldhafer, et al. (1997). "Differential Expression of the UGT1A Locus in Human Liver, Biliary, and Gastric Tissue: Identification of UGT1A7 and UGT1A10 Transcripts in Extrahepatic Tissue." *Mol. Pharmacol.* **52**(2): 212-220.
- Syed, D. N., F. Afaq, et al. (2008). "Delphinidin inhibits cell proliferation and invasion via modulation of Met receptor phosphorylation." *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **231**(1): 52-60.
- Szmitko, P. E. and S. Verma (2005). "Antiatherogenic potential of red wine: clinician update." *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**(5): H2023-H2030.
- Talavera, S., C. Felgines, et al. (2005). "Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain." *J. Agric. Food Chem.* **53**(10): 3902-3908.
- Talavera, S., C. Felgines, et al. (2003). "Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats." *J. Nutr.* **133**(12): 4178-4182.
- Talavera, S., C. Felgines, et al. (2004). "Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats." *J. Nutr.* **134**(9): 2275-2279.
- Tavelin, S., J. Gråsjö, et al. (2002). Applications of Epithelial Cell Culture in Studies of Drug Transport. *Epithelial Cell Culture Protocols*. C. Wise. **188**: 233-272.
- Terao, J., K. Murota, et al. (2011). "Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo." *Food Funct.* **2**(1): 11-17.

- This, P., A. De La Rochefordiere, et al. (2001). "Phytoestrogens after breast cancer." *Endocr. Relat. Cancer* **8**(2): 129-134.
- Tian, Q., M. M. Giusti, et al. (2006). "Urinary excretion of black raspberry (*Rubus occidentalis*) anthocyanins and their metabolites." *J. Agric. Food Chem.* **54**(4): 1467-1472.
- Timberlake, C. F. and P. Bridle (1976). "Interactions Between Anthocyanins, Phenolic Compounds, and Acetaldehyde and Their Significance in Red Wines." *Am. J. Enol. Vitic.* **27**: 97-105.
- Truitt, E. B. and A. M. Morgan (1960). "Absorption of aspirin from the stomach in man." *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2**(2): 237-241.
- Tsang, C., C. Auger, et al. (2005). "The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats." *Br. J. Nutr.* **94**(02): 170-181.
- Tsuda, T., F. Horio, et al. (1999). "Absorption and metabolism of cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside in rats." *FEBS Lett.* **449**(2-3): 179-182.
- Tsuda, T., Y. Kato, et al. (2000). "Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins." *FEBS Lett.* **484**(3): 207-210.
- Tsukita, S. and M. Furuse (2000). "Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores." *J. Cell Biol.* **149**: 13-16.
- Ueda, S., H. Nakamura, et al. (2002). "Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant." *Mol. Immunol.* **38**(10): 781-791.
- Vaidyanathan, J. B. and T. Walle (2001). "Transport and Metabolism of the Tea Flavonoid (-)-Epicatechin by the Human Intestinal Cell Line Caco-2." *Pharm. Res.* **18**(10): 1420-1425.
- van Acker, S. A., D. J. van den Berg, et al. (1996). "Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids." *Free Radic. Biol. Med.* **20**(3): 331-342.
- van der Hoeven, J. C., I. M. Bruggeman, et al. (1984). "Genotoxicity of quercetin in cultured mammalian cells." *Mutat. Res.* **136**(1): 9-21.
- van der Woude, H., M. G. Boersma, et al. (2006). "Consequences of quercetin methylation for its covalent glutathione and DNA adduct formation." *Chem. Biol. Interact.* **160**(3): 193-203.
- Vanzo, A., M. Terdoslavich, et al. (2008). "Uptake of grape anthocyanins into the rat kidney and the involvement of bilitranslocase." *Mol. Nutr. Food Res.* **52**(10): 1106-1116.
- Vitaglione, P., G. Donnarumma, et al. (2007). "Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides." *J. Nutr.* **137**(9): 2043-2048.
- Vivar-Quintana, A. M., C. Santos-Buelga, et al. (1999). "Formation of anthocyanin-derived pigments in experimental red wines / Formación de pigmentos derivados de antocianos en vinos tintos experimentales." *Food Sci. Technol. Int.* **5**(4): 347-352.
- Walgren, R. A., J. T. Lin, et al. (2000). "Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**(3): 837-843.
- Walle, T. (2004). "Absorption and metabolism of flavonoids." *Free Radic. Biol. Med.* **36**(7): 829-837.
- Walle, T., A. M. Browning, et al. (2005). "Flavonoid Glucosides Are Hydrolyzed and Thus Activated in the Oral Cavity in Humans." *J. Nutr.* **135**(1): 48-52.
- Walle, T., T. S. Vincent, et al. (2003). "Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells." *Biochem. Pharmacol.* **65**(10): 1603-1610.

- Walton, M. C., T. K. McGhie, et al. (2006). "The flavonol quercetin-3-glucoside inhibits cyanidin-3-glucoside absorption *in vitro*." *J. Agric. Food Chem.* **54**(13): 4913-4920.
- Wang, H., G. Cao, et al. (1997). "Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins." *J. Agric. Food Chem.* **45**(2): 304-309.
- Wang, H., M. G. Nair, et al. (1999). "Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries." *J. Nat. Prod.* **62**(2): 294-296.
- Wang, I. K., S. Y. Lin-Shiau, et al. (1999). "Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells." *Eur. J. Cancer* **35**(10): 1517-1525.
- Wang, J. and G. Mazza (2002). "Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages." *J. Agric. Food Chem.* **50**(4): 850-857.
- Wang, L. S. and G. D. Stoner (2008). "Anthocyanins and their role in cancer prevention." *Cancer Lett.* **269**(2): 281-290.
- Wang, T. T., N. Sathyamoorthy, et al. (1996). "Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways." *Carcinogenesis* **17**(2): 271-275.
- Wiese, S., S. Gärtner, et al. (2009). "Protein interactions with cyanidin-3-glucoside and its influence on  $\alpha$ -amylase activity." *J. Sci. Food Agric.* **89**(1): 33-40.
- Wijayarathne, A. L. and D. P. McDonnell (2001). "The human estrogen receptor- $\alpha$  is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators." *J. Biol. Chem.* **276**(38): 35684-35692.
- Wildenradt, H. L. and V. L. Singleton (1974). "The Production of Aldehydes as a Result of Oxidation of Polyphenolic Compounds and its Relation to Wine Aging." *Am. J. Enol. Vitic.* **25**(2): 119-126.
- Williamson, G. and M. N. Clifford (2010). "Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?" *Br. J. Nutr.* **104**: pp S48-S66.
- Woodward, G., P. Kroon, et al. (2009). "Anthocyanin Stability and Recovery: Implications for the Analysis of Clinical and Experimental Samples." *J. Agric. Food Chem.* **57**(12): 5271-5278.
- Woodward, G. M., P. W. Needs, et al. (2011). "Anthocyanin-derived phenolic acids form glucuronides following simulated gastrointestinal digestion and microsomal glucuronidation." *Mol. Nutr. Food Res.* **55**(3): 378-386.
- Wroblewski, L. E., L. Shen, et al. (2009). "Helicobacter pylori Dysregulation of Gastric Epithelial Tight Junctions by Urease-Mediated Myosin II Activation." *Gastroenterology* **136**(1): 236-246.
- Wu, X., G. R. Beecher, et al. (2006). "Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption." *J. Agric. Food Chem.* **54**(11): 4069-4075.
- Wu, X., G. Cao, et al. (2002). "Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry." *J. Nutr.* **132**(7): 1865-1871.
- Wu, X., H. E. Pittman, 3rd, et al. (2005). "Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism after berry consumption in weanling pigs." *J. Nutr.* **135**(10): 2417-2424.
- Wu, X., H. E. Pittman, 3rd, et al. (2004). "Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyanidin after marionberry consumption in pigs." *J. Nutr.* **134**(10): 2603-2610.
- Xu, J. W., K. Ikeda, et al. (2004). "Cyanidin-3-glucoside regulates phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase." *FEBS Lett.* **574**(1-3): 176-180.

Yi, W., C. C. Akoh, et al. (2006). "Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by caco-2 human intestinal cell monolayers." *J. Agric. Food Chem.* **54**(15): 5651-5658.

Youdim, K. A., J. McDonald, et al. (2002). "Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled)." *J. Nutr. Biochem.* **13**(5): 282-288.

Zava, D. T. and G. Duwe (1997). "Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro." *Nutr. Cancer* **27**(1): 31-40.

Zhang, Y., S. K. Vareed, et al. (2005). "Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables." *Life Sci.* **76**(13): 1465-1472.

Ziegler, R. G., R. N. Hoover, et al. (1993). "Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women." *J. Natl. Cancer Inst.* **85**(22): 1819-1827.