

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**



**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO EXTRATO DE *Diospyros kaki* L.  
(DIÓSPIRO) NA PREVENÇÃO DA INFLAMAÇÃO E CANCRO**

**Rosa Fernandes Direito**

Orientadores: Prof. Doutora Maria Eduardo da Costa Morgado Figueira

Prof. Doutora Maria do Rosário Beja Gonzaga Bronze

Tese especialmente elaborada para a obtenção do grau de Doutor em Farmácia,  
especialidade em Bromatologia.

2019

**UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE FARMÁCIA**



**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO EXTRATO DE *Diospyros kaki* L.  
(DIÓSPIRO) NA PREVENÇÃO DA INFLAMAÇÃO E CANCRO**

**Rosa Fernandes Direito**

Orientadores: Prof. Doutora Maria Eduardo da Costa Morgado Figueira  
Prof. Doutora Maria do Rosário Beja Gonzaga Bronze

Tese especialmente elaborada para a obtenção do grau de Doutor em Farmácia,  
especialidade em Bromatologia.

Júri:

Presidente: Doutor António José Leitão das Neves Almeida, Professor Catedrático e  
Presidente do Conselho Científico da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Vogais:

- Doutor Fernando Jorge dos Ramos, Professor Associado com Agregação  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra;
- Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira, Professora Associada  
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto;
- Doutora Ana Teresa de Carvalho Negrão Serra, Investigadora Auxiliar Instituto  
de Biologia Experimental e Tecnológica;
- Doutor Bruno Miguel Nogueira Sepodes, Professor Auxiliar com Agregação  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa;
- Doutora Maria Eduardo da Costa Morgado Figueira, Professora Auxiliar  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa;
- Doutor João Pedro Fidalgo Rocha, Professor Auxiliar Faculdade de Farmácia da  
Universidade de Lisboa

**Bolsa de Doutoramento:** REITORIA/BD/FF01/2015 – Universidade de Lisboa

## **AGRADECIMENTOS**

Só com o trabalho, dedicação, ajuda e companheirismo de várias pessoas em todo o meu percurso permitiu a realização deste trabalho de doutoramento.

Desde o primeiro momento, as diretrizes, conselhos e apoio das minhas orientadoras, a Senhora Professora Doutora Maria Eduardo Figueira e a Senhora Professora Doutora Maria do Rosário Bronze, que me têm acompanhado e orientado nesta jornada a que me propus e que a tornaram possível, o meu profundo e sincero agradecimento. A força e determinação de ambas fizeram deste trabalho uma vivência onde desistir não faz parte do vocabulário do dia-a-dia. A entrega e a mesma paixão pela investigação que reconheço em mim fizeram com que me sentisse entre família.

Ao Senhor Professor Doutor João Rocha, agradeço por toda a ajuda ao longo destes anos de trabalho e por me ter recebido no Laboratório de Farmacologia com toda a confiança. Sem o seu apoio, carinho, cuidado, motivação e parceria não teria sido possível chegar até aqui. Ao Senhor Professor Doutor Bruno Sepodes, agradeço por todo o apoio, por ter acreditado no meu valor e ter colaborado neste trabalho com compreensão, amizade, preocupação e entusiasmo. Ao Senhor Professor Doutor Rui Pinto agradeço as palavras de apoio, incentivo e confiança, a paciência e dedicação com que sempre encarou todos os trabalhos que comigo partilhou. Ao Senhor Professor Doutor Hélder Mota Filipe, agradeço toda a colaboração. À Senhora Professora Doutora Catarina Pinto Reis agradeço toda a participação neste trabalho, em especial na realização da última parte deste. Sem a sua ajuda e colaboração não teria sido possível alcançar estes resultados. Além disso, a motivação e entusiasmo com que sempre me brindou no trabalho foram contagiantes, obrigada. À Senhora Professora Doutora Adelaide Fernandes agradeço pelo trabalho desenvolvido neste projeto desde a primeira hora e pela amizade e simpatia com que sempre me tratou. À Senhora Professora Doutora Margarida Gonçalves agradeço toda a ajuda e persistência para resolver dificuldades experimentais e a boa disposição e ensinamentos com que me recebeu no seu laboratório. À Senhora Professora Doutora Cristina Almeida agradeço toda a colaboração, carinho, amizade e alegria contagiante que me levava durante o trabalho no Laboratório de Bromatologia. Ao Senhor Professor Doutor Ricardo Boavida Ferreira por me ter recebido no seu laboratório e ter colaborado com todo o trabalho que lá desenvolvi.

À Senhora Doutora Ana Teresa Sanches-Silva agradeço a colaboração, amizade e entusiasmo na pesquisa em que me acompanhou. À Senhora Doutora Teresa Serra agradeço toda a colaboração, simpatia e ajuda neste trabalho. À Senhora Doutora Ana Lima agradeço ter-me recebido de braços abertos no laboratório onde me apoiou e ensinou numa área nova para mim. A sua alegria, motivação e carinho fizeram com que tudo parecesse mais fácil. À Senhora Doutora Manuela Gaspar agradeço toda a

organização, ajuda e colaboração no desenvolvimento dos protocolos experimentais no Biotério da FFUL. Muito em especial pela amizade, consideração e carinho, muito obrigada. Ao Doutor Luís Roque agradeço por toda a ajuda e disponibilidade para colaborar comigo no desenvolvimento do trabalho de Tecnologia Farmacêutica. À Senhora Dra Lucila Vales agradeço pelo apoio, ajuda e carinho com que sempre me tratou e por me ter recebido no Laboratório de Bromatologia como um membro da família científica FFUL. Ao Doutor João Ferreira pela ajuda na realização das análises MS/MS e pela sua amizade ao longo de todo o tempo. À Dra Paula Nobre, que com a sua dedicação e seriedade profissional garantiu rigor e agilidade em várias frentes deste trabalho ao longo de todo este tempo, agradeço e expresso a minha admiração pela mulher e profissional que é.

Agradeço à Universidade de Lisboa e à Reitoria a concessão da Bolsa de Doutoramento REITORIA/BD/FF01/2015.

À Ex<sup>ma</sup>. Senhora Rosário Borges agradeço o apoio no Laboratório de Farmacologia e Bromatologia, foi sempre uma ajuda preciosa na organização e realização dos protocolos experimentais. Agradeço ainda a dedicação que presta aos alunos desta Faculdade, sempre com a mesma dedicação e máxima entrega. Os seus cuidados e preocupação com o decorrer dos trabalhos e com as pessoas envolvidas, contribuíram para que ao longo destes anos, os laboratórios da FFUL se tenham felizmente tornado um pedaço do que sinto como a minha casa. Agradeço à Mestre Suzan Blima, a aluna de ERASMUS que na sua aventura por Portugal e na FFUL, colaborou comigo no trabalho experimental e para além disso foi um ser humano carinhoso e dedicado. Agradeço à Mestre Ana Mota por toda a ajuda e colaboração na última fase deste trabalho.

A todos quantos fora da Universidade me apoiaram nesta busca científica que me move desde que me lembro, mas que nas horas mais difíceis são os pilares e as asas que me voltam a fazer voar, obrigada.

Lisboa, 12 de Abril de 2019

## RESUMO

Vários estudos têm mostrado que os processos oxidativos e inflamatórios estão fortemente implicados na etiologia das doenças crônicas.

A ingestão de frutos e produtos hortícolas, fontes de vitaminas e compostos fenólicos (CF) com ações antioxidantes e outras, podem ter um papel primordial na proteção da saúde e prevenção da doença.

O dióspiro (*Diospyros kaki* L.) é um fruto rico em CF especialmente proantocianidinas.

O objetivo deste trabalho é caracterizar quimicamente o extrato de dióspiro, em especial a sua composição fenólica, averiguar as suas atividades antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa e ainda preparar uma formulação farmacêutica oral deste extrato.

A caracterização química do extrato por HPLC-DAD-MS/MS mostrou a sua riqueza em glucose e frutose, *L*-triptofano e ácidos málico e cítrico. Foram ainda identificados ácidos fenólicos benzóicos e derivados do ácido gálico e do ácido vanílico bem como procianidinas e flavanóis, derivados glicosilados de flavonas e derivado de flavonol.

A atividade antioxidante do extrato avaliada por ensaios de ORAC e HORAC é menor que a de alguns frutos vermelhos mas superiores à de maçãs e morangos. Os ensaios de CAA e *burst* oxidativo dos neutrófilos mostraram atividade antioxidante superior à das laranjas, peras ou maçãs.

A dose oral de extrato de 15mg EAG/Kg mostrou atividade anti-inflamatória em modelo animal de inflamação aguda (edema da pata induzido pela carragenina) e nos modelos animais de inflamação crónica de artrite reumatóide e de colite ulcerosa.

O extrato fenólico de dióspiro reduziu a invasão e proliferação de células de adenocarcinoma do cólon HT-29 e inibiu ligeiramente as atividades de MMPs com efeito dependente da dose.

Os fitossomas com extrato, de dimensão inferior a 300nm, conseguem encapsular 97,4% do total de CF e são monodispersos e com potencial zeta negativo e apresentam maior atividade antioxidante durante 6 meses sob condições de armazenamento de T e RH estabelecidas do que o extrato livre.

Assim, o extrato fenólico de dióspiro mostrou propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e efeito anti-proliferativo nas células de cancro de cólon. A incorporação em fitossomas é uma alternativa para produção de suplemento alimentar.

**Palavras-chave:** *Diospyros kaki* L., atividade anti-inflamatória, atividade anti-proliferativa, atividade antioxidante, fitossomas

## ABSTRACT

Several studies have shown that oxidative and inflammatory processes are strongly implicated in the etiology of chronic diseases.

Ingestion of fruits and vegetables, sources of vitamins and phenolic compounds (PC) with antioxidant and other actions, may play a primary role in protecting health and preventing disease.

The persimmon (*Diospyros kaki* L.) is a fruit rich in PC, especially proanthocyanidins.

The aim of this work is to chemically characterize the persimmon extract, in particular its phenolic composition, ascertain its antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activities and to prepare an oral pharmaceutical formulation of this extract.

The chemical characterization of the extract by HPLC-DAD-MS/MS showed its richness in glucose and fructose, *L*-tryptophan and malic and citric acids. Also identified were benzoic phenolic acids and derivatives of gallic acid and vanillic acid as well as procyanidins and flavanols, glycosylated derivatives of flavones and flavonol derivative.

The antioxidant activity of the extract evaluated by ORAC and HORAC assays is lower than that of some red fruits but higher than that of apples and strawberries. The CAA and oxidative burst assays of neutrophils showed antioxidant activity superior to that of oranges, pears or apples.

The oral dose of 15mg GAE/kg extract showed anti-inflammatory activity in an animal model of acute inflammation (carrageenan-induced paw edema) and in animal models of chronic inflammation of rheumatoid arthritis and ulcerative colitis.

The phenolic persimmon extract reduced the invasion and proliferation of HT-29 colon adenocarcinoma cells and slightly inhibited MMPs activities with dose-dependent effect.

Phytosomes with a size smaller than 300nm can encapsulate 97.4% of total PC and are monodisperse and with negative zeta potential and present higher antioxidant activity for 6 months under established T and RH storage conditions than the free extract.

Thus, the persimmon phenolic extract showed antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative effect in colon cancer cells. The incorporation in phytosomes is an alternative for food supplement production.

**Keywords:** *Diospyros kaki* L., anti-inflammatory activity, anti-proliferative activity, antioxidant activity, phytosomes

## **ABREVIATURAS**

<b>AA</b>	ácido araquidónico
<b>AA</b>	ácido ascórbico
<b>AAPH</b>	dicloridrato de 2',2'-Azobis (2-amidinopropano)
<b>ABTS</b>	(2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))
<b>AC</b>	ácido cafeico
<b>ACH</b>	ácido clorogénico
<b>ADME</b>	absorção, distribuição, metabolização e eliminação
<b>AG</b>	ácido gálico (GA do inglês)
<b>AINEs</b>	fármacos anti-inflamatórios não esteroides
<b>AMPK</b>	proteína cinase AMP ativada
<b>AO</b>	osteoartrite
<b>AP-1</b>	<i>activator protein 1</i>
<b>APC</b>	célula apresentadora de antígeno
<b>APCI</b>	ionização por electrospray atmosférica
<b>API</b>	ionização à pressão atmosférica
<b>APPI</b>	foto-ionização a pressão atmosférica
<b>AR</b>	artrite reumatoide
<b>BSA</b>	albumina sérica bovina
<b>C</b>	catequina
<b>CA</b>	ácido cafeico
<b>CAA</b>	<i>celular antioxidant activity</i>
<b>CAC</b>	capacidade antioxidante celular
<b>CAC</b>	cancro colorretal associado à colite
<b>CAEAC</b>	<i>caffeic acid equivalents antioxidant capacity</i>
<b>CAO</b>	capacidade antioxidante
<b>CCR</b>	cancro colorretal

<b>CF</b>	compostos fenólicos
<b>CFA</b>	adjuvante completo de <i>Freund</i> (do inglês <i>Complete Freund's adjuvant</i> )
<b>CHA</b>	ácido clorogénico
<b>CIA</b>	artrite induzida por colagénio
<b>CII</b>	colagénio tipo II bovino
<b>COX</b>	ciclooxigenase
<b>COX-2</b>	ciclooxigenase-2
<b>CRC</b>	cancro colorretal
<b>CXCL</b>	quimiocina
<b>DAD</b>	detetor de díodo
<b>DC</b>	doenças crónicas
<b>DCFH-DA</b>	diacetato de diclorofluoresceína
<b>DCV</b>	doenças cardiovasculares
<b>DDR</b>	dose diária recomendada
<b>DHA</b>	ácido docoso-hexaenóico
<b>DII</b>	doença inflamatória intestinal
<b>DLS</b>	<i>dynamic laser scattering</i>
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>DP</b>	desvio padrão
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazil (ou do inglês <i>1,1-diphenyl-2-picryldrazyl</i> )
<b>DQ</b>	<i>dye-quenched</i>
<b>EAG</b>	equivalentes de ácido gálgico (GAE do inglês)
<b>EC</b>	epicatequina
<b>EC</b>	equivalentes de catequina
<b>ECg</b>	epicatequina-3- O-galhato
<b>ECM</b>	matriz extracelular



<b>ECRs</b>	ensaios controlados randomizados
<b>EE</b>	eficiência de encapsulação
<b>EGC</b>	epigalhocatequina
<b>EGCg</b>	epigalhocatequina-3-O-galhato
<b>eNOS</b>	NOS endotelial
<b>EPA</b>	ácido eicosapentaenóico
<b>EPR</b>	ressonância paramagnética eletrónica (do inglês <i>electron paramagnetic resonance</i> )
<b>EQ</b>	quercetina
<b>ESI</b>	ionização por electrospray
<b>FBS</b>	soro fetal de bovino (do inglês <i>Fetal bovine serum</i> )
<b>FF</b>	fruto fresco
<b>FL</b>	fluoresceína dissódica
<b>FLS</b>	fibroblastos sinoviais
<b>fMLP</b>	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (do inglês <i>N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine</i> )
<b>FRAP</b>	do inglês <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
<b>GA</b>	ácido gálgico
<b>GABA</b>	ácido gama-aminobutírico
<b>GI</b>	trato gastrointestinal
<b>GSH-Px</b>	glutathiona peroxidase
<b>HDL</b>	lipoproteína de alta densidade
<b>HLA</b>	antigénio leucocitário humano
<b>HMWT</b>	taninos condensados de elevado peso molecular
<b>HORAC</b>	capacidade de resgate do radical hidroxilo
<b>HPLC</b>	cromatografia Líquida de Alta Performance ( <i>high performance liquid chromatography</i> )

<b>HT-29</b>	células de adenocarcinoma de cólon humano
<b>IBD</b>	<i>inflammatory bowel disease</i>
<b>IL</b>	interleucina
<b>IL-1</b>	interleucina-1
<b>IL-6</b>	interleucina-6
<b>iNOS</b>	óxido nítrico sintase indutível
<b>LC-MS</b>	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
<b>LCAT</b>	<i>lecithin cholesterol acyl transferase</i>
<b>LDL</b>	lipoproteína de baixa densidade
<b>LMWT</b>	taninos de baixo peso molecular
<b>LOO•</b>	radicais alquilo peróxido
<b>LOOH</b>	hidroperóxidos de lipídios
<b>LOX</b>	lipooxigenase
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeo
<b>LT</b>	leucotrieno
<b>MAC</b>	macrófago
<b>MAdCAM-1</b>	molécula-1 de adesão celular adressina de adesão da mucosa
<b>MALDI</b>	<i>matrix-assisted laser desorption ionisation</i>
<b>MAPKs</b>	proteínas cinase ativadas por mitogénios
<b>MDA</b>	malondialdeído
<b>MICs</b>	<i>minimal inhibitory concentrations</i>
<b>MMP</b>	metaloproteases da matriz
<b>MTT</b>	brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>m/z</b>	relação massa/carga de um ião
<b>NCD</b>	doenças crónicas não transmissíveis
<b>NF</b>	fator nuclear
<b>NF-κB</b>	fator nuclear kapa B ( <i>nuclear factor-kappa B</i> )

<b>NKT</b>	células T natural <i>killer</i>
<b>nNOS</b>	NOS neuronal
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>NOSs</b>	sintases específicas de monóxido de azoto
<b>NrF2</b>	fator <i>redox</i> nuclear 2
<b>NSAIDs</b>	drogas anti-inflamatórias não-esteroides
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ORAC</b>	capacidade de absorção do radical oxigénio
<b>p53</b>	proteína supressora de tumor 53
<b>PAs</b>	proantocianidinas
<b>PAI-1</b>	inibidor-1 do ativador do plasminogénio
<b>PBML</b>	leucócitos mononucleares do sangue periférico
<b>PBS</b>	solução salina de tampão fosfato
<b>PC</b>	fosfatidilcolina
<b>PCR</b>	proteína C reativa
<b>PFA</b>	paraformaldeído
<b>PG</b>	prostglandina
<b>PGE</b>	prostaglandina E
<b>PI</b>	índice de polidispersão
<b>PMA</b>	acetato de miristato de forbol
<b>PUFA</b>	ácidos gordos polinsaturados
<b>RNS</b>	espécies reativas de nitrogénio
<b>ROO•</b>	radicais peroxilo
<b>ROS</b>	espécies reativas de oxigénio
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Park</i>
<b>SD</b>	desvio padrão ( <i>standard deviation</i> )
<b>SEM</b>	<i>scanning electron microscope</i>
<b>SOD</b>	superóxido dismutase

<b>T-AOC</b>	capacidade anti-oxidante total
<b>T2D</b>	<i>type 2 diabetes</i>
<b>TEAC</b>	capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox
<b>Th</b>	<i>T-helper</i>
<b>TNBS</b>	ácido trinitrobenzeno sulfúrico
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>t<sub>R</sub></b>	tempo de retenção
<b>TRAP</b>	do inglês <i>Trapping Antioxidant Parameter</i>
<b>Treg</b>	células T reguladoras
<b>Trolox</b>	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-acido carboxílico
<b>TSP</b>	termopulverização
<b>TXA</b>	tromboxano A
<b>UHPLC</b>	cromatografia líquida de ultra alta performance ( <i>ultra high performance liquid chromatography</i> )
<b>uPA</b>	ativador da urocrinase plasminogénio
<b>uPAR</b>	recetor do uPA

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT.....	iv
ABREVIATURAS .....	v
ÍNDICE .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xvi
ÍNDICE DE TABELAS .....	xx
ÍNDICE DE EQUAÇÕES.....	xxii
INTRODUÇÃO .....	2
<b>1. <i>Diospyros kaki</i> L. (Dióspiro).....</b>	<b>3</b>
1.1 Composição do dióspiro.....	5
1.1.1 Caracterização nutricional .....	5
1.1.2 Compostos Fenólicos (CF) .....	8
1.2 Atividade Biológica do Dióspiro.....	15
1.2.1 Atividade Antioxidante .....	16
1.2.2 Atividade Anti-inflamatória.....	22
1.3 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos.....	33
<b>2. ARTRITE REUMATOIDE (AR) .....</b>	<b>36</b>
2.1 Modelos Experimentais de Artrite <i>In Vivo</i> .....	39
<b>3. DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL (DII) .....</b>	<b>41</b>
3.1 Modelo Experimental de Colite.....	45
<b>4. ATIVIDADE ANTICARCINOGÉNICA .....</b>	<b>47</b>
4.1 Metaloproteases da Matriz.....	49
4.1.1 Gelatinases: MMP-2 e MMP-9 .....	51
<b>5. FITOSSOMAS .....</b>	<b>54</b>
<b>6. OBJETIVOS GERAIS .....</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO I. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO DE <i>Diospyros kaki</i> L. (Dióspiro) .....</b>	<b>63</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
<b>3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....</b>	<b>63</b>

3.1	Materiais .....	63
3.2	Equipamentos.....	64
<b>4.</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
4.1	Escolha da metodologia para preparação do extrato .....	65
4.1.1	Caracterização dos extratos .....	66
4.2	Identificação de compostos do extrato por HPLC-DAD-MS/MS .....	67
4.2.1	Condições de Análise .....	67
4.4	Caracterização da atividade antioxidante do extrato <i>in vitro</i> .....	68
4.4.1	Avaliação da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC).....	68
4.4.2	Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Hidroxilo (HORAC) .....	69
4.5	Análise estatística .....	70
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
5.1	Escolha da metodologia para preparação do extrato .....	70
5.1.1	Caracterização dos extratos .....	70
5.2	Identificação de compostos do extrato por HPLC-DAD-MS/MS .....	77
5.2.1	Açúcares .....	84
5.2.2	Ácidos orgânicos .....	85
5.2.3	Ácidos fenólicos: Ácidos Benzóicos e derivados .....	88
5.2.4	Flavonóides.....	90
5.2.5	Taninos condensados ou proantocianidinas.....	91
5.2.6	Aminoácidos .....	95
5.3	Caracterização da atividade antioxidante do extrato <i>in vitro</i> (ORAC e HORAC)	96
	<b>CAPÍTULO II. BIOATIVIDADE DO EXTRATO DE <i>Diospyros kaki</i> L.....</b>	<b>100</b>
<b>1.</b>	<b>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....</b>	<b>101</b>
1.1	Experimental.....	101
1.1.1	Materiais .....	101
1.2	Métodos .....	101
1.2.1	Atividade antioxidante celular [ <i>Cellular Antioxidant Activity (CAA)</i> ] .....	101
1.2.2	Avaliação do <i>Burst</i> Oxidativo dos Neutrófilos.....	102
1.2.3	Tratamento dos Resultados .....	103
1.3	Resultados e Discussão .....	103

1.3.1	Atividade antioxidante celular [ <i>Cellular Antioxidant Activity (CAA)</i> ] .....	103
1.3.2	Avaliação do <i>Burst</i> Oxidativo dos Neutrófilos .....	106
<b>2.</b>	<b>ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA EM MODELOS ANIMAIS .....</b>	<b>108</b>
2.1	Experimental.....	108
2.1.1	Materiais .....	108
2.1.2	Amostras .....	109
2.1.3	Equipamento .....	109
2.2	MÉTODOS.....	110
2.2.1	Atividade anti-inflamatória no Modelo animal de edema da pata induzido pela carragenina .....	110
2.2.2	Atividade anti-inflamatória no Modelo Animal de Artrite Induzida pelo Colagénio (CIA) .....	112
2.2.3	Atividade anti-inflamatória no modelo colite ulcerosa .....	115
2.2.4	Análise estatística .....	119
2.3	Resultados e Discussão .....	119
2.3.1	Estudo da atividade anti-inflamatória aguda no modelo de inflamação induzida pela carragenina .....	119
2.3.2	Estudo da atividade anti-inflamatória crónica num modelo animal de artrite induzida pelo colagénio (CIA) .....	121
2.3.3	Estudo da Atividade Anti-inflamatória Crónica no Modelo de Colite ....	125
<b>CAPÍTULO III. MODELO <i>IN VITRO</i> DO CANCRO COLORRETAL COM A LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO: HT-29.....</b>		
<b>134</b>		
<b>1.</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>134</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>135</b>
2.1	Reagentes e Padrões.....	135
2.3	Equipamentos.....	135
2.4	Métodos .....	136
2.4.1	Cultura de células HT-29 .....	136
2.4.2	Ensaio de migração celular ( <i>wound healing assay</i> ) .....	136
2.4.3	Atividade gelatinolítica de células do cancro do cólon .....	137
2.4.4	Determinação das concentrações mínimas inibitórias [ <i>minimal inhibitory concentrations (MIC)</i> ] .....	138
2.4.5	Atividade gelatinolítica no tecido do cólon .....	138

2.4.6	Análise estatística.....	139
<b>3.</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>139</b>
3.1	Avaliação da capacidade anti-proliferativa do extrato em células HT-29 ....	139
3.1.1	Cultura de células HT-29 .....	139
3.2	A atividade gelatinolítica tanto nas células HT-29 cultivadas como no tecido fresco do cólon do estudo da colite <i>in vivo</i> .....	140
<b>CAPÍTULO IV. DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO DO EXTRATO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL..... 147</b>		
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>147</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>148</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS .....</b>	<b>148</b>
3.1	Materiais .....	148
<b>4.</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>149</b>
4.1	Preparação dos fitossomas .....	149
4.1.1	Caracterização física e morfológica dos fitossomas .....	149
4.1.2	Determinação da eficiência de encapsulação (EE) .....	149
4.3	Ensaio de estabilidade .....	151
4.3.1	Condições de Armazenamento (curto prazo, longo prazo e acelerado) .....	151
4.3.2	Especificações.....	151
4.3.3	Sistema de acondicionamento .....	152
4.3.4	Frequência dos testes .....	152
4.4	Análise por <i>High-performance liquid chromatography</i> (HPLC).....	152
4.5	Determinação do teor em compostos fenólicos totais .....	152
4.6	Determinação da atividade antioxidante.....	153
4.7	Avaliação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta ao longo do tempo.....	153
4.8	Análise estatística .....	153
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>154</b>
5.1	Caracterização física e morfológica dos fitossomas .....	154
5.2	Determinação da eficiência de encapsulação (EE) .....	158
5.2.1	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) .....	158
5.2.2	Análise espectrofotométrica .....	163



5.3	Determinação do teor em compostos fenólicos totais .....	163
5.4	Determinação da atividade antioxidante (DPPH).....	164
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSÕES .....</b>		<b>170</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>173</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUÇÃO

FIGURA I. 1 – DIÓSPIROS. ADAPTADO DE ( <a href="https://www.shutterstock.com/pt/search/persimmon">HTTPS://WWW.SHUTTERSTOCK.COM/PT/SEARCH/PERSIMMON</a> ).....	3
FIGURA I. 2 – CLASSIFICAÇÃO COMPOSTOS FENÓLICOS. ADAPTADO DE (LIU 2004) .....	9
FIGURA I. 3 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ÁCIDOS FENÓLICOS. ÁCIDOS HODROXIBENZÓICOS SÃO ÁCIDO BENZOICO (1), ÁCIDO SALICÍLICO (2), ÁCIDO VANÍLICO (3), ÁCIDO GÁLHICO (4) E ÁCIDOS HIDOXICINÂMICOS ÁCIDO CINÂMICO (5), ÁCIDO FERÚLICO (6), ÁCIDO SINÁPTICO (7) E ÁCIDO CAFEICO (8). ADAPTADO DE (SAXENA ET AL. 2013) .....	11
FIGURA I. 4 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS TANINOS CONDENSADOS DO DIÓSPIRO E CATEQUINAS RELACIONADAS. [ADAPTADO DE (MATSUO 1978; OZEN ET AL. 2004; GU ET AL. 2008)]. .....	12
FIGURA I. 5 - VISÃO GERAL DE SÍNTESE E AÇÕES DE MEDIADORES LIPÍDICOS PRODUZIDOS A PARTIR DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO, EPA E DHA. COX, CICLOOXIGENASE; LOX, LIPOOXIGENASE; LT, LEUCOTRIENO; PG, PROSTAGLANDINA. ADAPTADO DE (CALDER 2010). .....	26
FIGURA I. 6 - PAPEL DAS CITOCINAS NA INFLAMAÇÃO NA ARTRITE REUMATOIDE. ADAPTADO DE (CHOY ET AL. 2001). .....	38
FIGURA I. 7 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA INFLAMAÇÃO E EROÇÃO ÓSSEA NAS ARTICULAÇÕES ARTRÍTICAS DE RATOS DO MODELO CIA. OS ANTICORPOS ANTI-CII PRODUZIDOS PELA IMUNIZAÇÃO DE PROTÉINA HETERÓLOGA E CII CFA LIGAM-SE AO CII DE CARTILAGEM, E O SISTEMA DO COMPLEMENTO É ATIVADA. C5A, QUE É UM PRODUTO DE CLIVAGEM DO COMPONENTE DO COMPLEMENTO 5, É POTENTEMENTE QUIMIOTÁTICO PARA NEUTRÓFILOS E MACRÓFAGOS E MODULA A EXPRESSÃO DE FCGRS. OS ANTICORPOS LIGADOS CII ATIVAM ATRAVÉS C5A OS NEUTRÓFILOS E MACRÓFAGOS RECRUTADOS. SEGUINDO FCGR LIGADURA, ESTES LEUCÓCITOS ATIVADOS SEGREGAM MATERIAIS E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIOS QUIMIOTÁTICAS, TAIS COMO IL-1B, TNF-A, IL-8, IL-6, O ÓXIDO NÍTRICO (NO), E AS PROSTAGLANDINAS (PGE <sub>2</sub> ), QUE ATIVAM MACRÓFAGOS SINOVIAIS E INFILTRANDO CÉLULAS MONONUCLEARES. EM INFLAMAÇÃO EM CURSO, CÉLULAS T, CÉLULAS B, CÉLULAS DENDRÍTICAS, MACRÓFAGOS E SINOVIAIS PROLIFERAR E AGEM EM CONJUNTO PARA SECRETAR CITOCINAS AO INTERAGIR UNS COM OS OUTROS. AS MMPS, ELASTÁSE E CATEPSINA G DEGRADAR A ECM E CARTILAGEM. OS FIBROBLASTOS SINOVIAIS E MACRÓFAGOS PROGRIDEM PARA HIPERPLASIA E A FORMAÇÃO DE CENTROS GERMINAIS ECTÓPICOS OCORREM ALGUMAS VEZES, DEVIDO ÀS ATIVIDADES DE CITOCINAS, FATORES DE CRESCIMENTO E NEOANGIOGÊNESE. SOB CONDIÇÕES RESTRITAS, TAIS COMO OS NÍVEIS MAIS BAIXOS DE IFN- $\gamma$ E IL-4 E NÍVEIS MAIS ELEVADOS DE TGF- $\beta$ E IL-6, AS CÉLULAS TH17 SÃO INDUZIDAS E A OSTEOCLASTOGÊNESE OCORRE. OS OSTEOCLASTOS GERADOS CAUSAM EROÇÃO ÓSSEA. AS CÉLULAS T DESEMPENHAM UM PAPEL REGULADOR NA SINÓVIA E AUMENTA OU INIBE A INFLAMAÇÃO E A EROÇÃO ÓSSEA, DE ACORDO COM AS CONDIÇÕES PREVALECENTES. ADAPTADO DE (CHO ET AL. 2007).....	40
FIGURA I. 8 - FISIOPATOLOGIA DA COLITE ULCEROSA. ADAPTADO DE (ORDÁS ET AL. 2012). .....	43
FIGURA I. 9 - MECANISMO DE INDUÇÃO E TOLERÂNCIA NO MODELO DE COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO TRINITRO-BENZENO SULFÔNICO (TNBS). ADAPTADO DE (STROBER ET AL. 1998). .....	46
FIGURA I. 10 - PROCESSO DE METASTIZAÇÃO. ADAPTADO DE (WIRTZ ET AL. 2011). .....	50
FIGURA I. 11 – FITOSSOMAS SÃO FORMAS AVANÇADAS DE FORMULAÇÕES VEGETAIS FEITAS PELA LIGAÇÃO DE PARTE INDIVIDUAL DO EXTRATO VEGETAL À FOSFATIDILCOLINA (PC). ADAPTADA DE: COPYRIGHT © FIT-BIOCEUTICALS LTD. ....	56

## CAPÍTULO I

FIGURA 1. 1 - DETERMINAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS NAS AMOSTRAS DE EXTRATOS DE DIÓSPIRO.....	71
--	----

FIGURA 1. 2- DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO EM FLAVONÓIDES TOTAIS NAS AMOSTRAS DE EXTRATOS DE DIÓSPIRO. ***P<0,0001 GRUPO ACETONA 80% VS GRUPO ETANOL 50%; Φ P<0,0001 GRUPO ACETONA 80% VS GRUPO ETANOL 80%. .....	73
FIGURA 1. 3- DETERMINAÇÃO DAS PROCIANIDINAS TOTAIS (PADRÃO DE CATEQUINA) NAS AMOSTRAS DE DIÓSPIRO. ....	75
FIGURA 1. 4– DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS (CF) TOTAIS, FLAVONÓIDES TOTAIS E PROCIANIDINAS TOTAIS.....	76
FIGURA 1. 5 - COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS (360, 320, 280, 254 NM) MS <sup>2</sup> , ENTRE OS 17 MIN E OS 22MIN, DO EXTRATO DE DIÓSPIRO. DETETOR DE REDE DE DIODOS (DAD) A 280 NM, 320 NM, 360 NM E 254 NM. (VERDE: 280NM; PRETO: 254NM; VERMELHO: 320NM; ROXO: 360NM). .....	79
FIGURA 1. 6 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO DE DIÓSPIRO OBTIDO EM MODO <i>FULL SCAN</i> ES <sup>+</sup> (M/Z 100-1500).....	79
FIGURA 1. 7 – ESPECTRO DE MS/MS DO IÃO MOLECULAR 259 (6,626 MINUTOS) E RESPECTIVOS FRAGMENTOS GERADOS (79, 97). IÃO MOLECULAR 259, IDENTIFICADO COMO D-FRUCTOSE-6-FOSFATO OU D-GLUCOSE 6-FOSFATO (M=260,02972).....	85
FIGURA 1. 8 –ESPECTRO MS/MS DO IÃO MOLECULAR 133 (8,909 MINUTOS) IDENTIFICADO COMO ÁCIDO MÁLICO (M=134,02152), COM OS FRAGMENTOS 71, 73, 89 E 115.....	86
FIGURA 1. 9 – EM CIMA - CROMATOGRAMA DO IÃO EXTRAÍDO CORRESPONDENTE AO IÃO PERCURSOR 191 AOS 9,819 MINUTOS, IDENTIFICADO COMO ÁCIDO CÍTRICO (M=192,02700). EM BAIXO – ESPECTRO DE MS/MS DO IÃO PERCURSOR M/Z 191.....	87
FIGURA 1. 10 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÁCIDOS MÁLICO E CÍTRICO. ....	88
FIGURA 1. 11 – EM CIMA – CROMATOGRAMA DO IÃO EXTRAÍDO CORRESPONDENTE AO IÃO PERCURSOR M/Z 169 (AOS 14,025 MINUTOS) IDENTIFICADO COMO ÁCIDO GÁLHICO (M=170,02; C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ). EM BAIXO – ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO MS/MS DO IÃO PERCURSOR M/Z 169.....	89
FIGURA 1. 12 – ESPECTRO MS/MS DO IÃO PERCURSOR M/Z 289. (TR=25,622 MINUTOS) IDENTIFICADO COMO MONÓMERO DE PROCIANIDINA [-(-)EPICATEQUINA OU +(-) EPICATEQUINA M=290,07904]. .....	91
FIGURA 1. 13 - ESPECTRO DO IÃO PERCURSOR M/Z 577 E FRAGMENTOS GERADOS POR MS/MS. COMPOSTO COM M/Z 577, IDENTIFICADO COMO PROCIANIDINA DÍMERO (B1 OU B2).....	93
FIGURA 1. 14 – ESPECTRO MS/MS DO COMPOSTO COM IÃO PERCURSOR 203 COM FRAGMENTOS PRINCIPAIS IÕES COM M/Z 74, 116, 142, 221. COMPOSTO IDENTIFICADO COMO L-TRIPTOFANO (M=204,08988).....	95
<b>CAPÍTULO II</b>	
FIGURA 2. 1 – <i>BURST</i> OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS HUMANOS E O EFEITO INIBITÓRIO DO EXTRATO DE <i>DIOSPYROS KAKI</i> L. ....	107
FIGURA 2. 2 - MEDIÇÃO DO VOLUME DA PATA NO PLETISMÓMETRO.....	112
FIGURA 2. 3 – IMPACTO DA ADMINISTRAÇÃO DE EXTRATO DE DIÓSPIRO, INDOMETACINA, TROLOX E TEMPOL NO AUMENTO DO VOLUME DA PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA.....	120
FIGURA 2. 4 – PERCENTAGEM DE AUMENTO DO VOLUME DA PATA ASSOCIADO À CIA (ARTRITE INDUZIDA POR COLAGÉNIO) E APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO DE DIÓSPIRO (CIA + EXT. DIÓSPIRO). ....	121
FIGURA 2. 5 – RADIOGRAFIAS DAS ARTICULAÇÕES TIBIOTÁRSICAS DOS RATOS DO MODELO DA CIA. A) CONTROLO NEGATIVO; B) CONTROLO POSITIVO; C) EXTRACTO DE DIÓSPIRO P.O. 15MG/KG. AS IMAGENS DE RAIOS-X SÃO REPRESENTATIVAS DE PELO MENOS 3 EXPERIÊNCIAS REALIZADAS EM DIAS DIFERENTES.....	122
FIGURA 2. 6 - TECIDO DAS PATAS E ARTICULAÇÃO TIBIOTÁRSICA DOS RATOS DO MODELO CIA. (A) ESPÉCIME DE UM RATO CONTROLO NEGATIVO (SEM AR). (B) CORTES HISTOPATOLÓGICOS DE RATOS CONTROLO POSITIVO EM QUE A ARTRITE FOI INDUZIDA PELO COLAGÉNIO (CIA), EVIDENCIAVAM SINOVITE SEVERA, DANOS NA CARTILAGEM (SETA GRANDE), INFILTRAÇÃO	

ACENTUADA, <i>PANNUS</i> (SETA PEQUENA) E REABSORÇÃO ÓSSEA (CABEÇA DA SETA). (C) OS CORTES HISTOPATOLÓGICOS DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE ANIMAIS CIA, TRATADOS COM O EXTRATO (15MG/KG/DAY, <i>P.O.</i> ), EXIBEM MENOS DANOS NA CARTILAGEM (SETA GRANDE), MANTENDO A INFILTRAÇÃO (SETA PEQUENA) E A REABSORÇÃO ÓSSEA (CABEÇA DE SETA). (H&E, AMPLIAÇÃO 100X). .....	123
FIGURA 2. 7 - COLORAÇÃO IMUNOHISTAQUÍMICA PARA PESQUISA DE COX-2. (A) AMOSTRA DE TECIDO DO RATO DO CONTROLO NEGATIVO (SAUDÁVEL); (B) GRUPO POSITIVO (CIA), EXIBEM UMA PRODUÇÃO MACIÇA DE COX-2, NOMEADAMENTE PERTO DOS INFILTRADOS (COLORAÇÃO CASTANHA - SETA GRANDE); (C) TECIDO DE ANIMAIS TRATADOS COM O EXTRATO DE DIÓSPIRO (15MG KG <sup>-1</sup> , <i>P.O.</i> ) REVELAM QUE NÃO MODIFICOU A ATIVAÇÃO DE COX-2 NO MODELO DE CIA (COLORAÇÃO CASTANHA - SETA GRANDE). (AMPLIAÇÃO 100X). A BARRA DE ESCALA É IGUAL A 500MM. ....	123
FIGURA 2. 8 - COLORAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA PARA EXPRESSÃO DE INOS. (A) AS AMOSTRAS DE UM RATO DO CONTROLO NEGATIVO, EXIBEM QUASE NENHUMA EXPRESSÃO DE INOS. (B) OS RATOS ARTRÍTICOS DO CONTROLO POSITIVO EXIBEM UMA PRODUÇÃO MACIÇA DE INOS, NOMEADAMENTE, PERTO DOS INFILTRADOS (COLORAÇÃO CASTANHA - SETA GRANDE). (C) AS AMOSTRAS DE ANIMAIS TRATADOS COM O EXTRATO DE DIÓSPIRO (15 MG KG <sup>-1</sup> , <i>P.O.</i> ) ADMINISTRADOS POR GAVAGEM NÃO REDUZIRAM SIGNIFICATIVAMENTE A COLORAÇÃO PARA A EXPRESSÃO INOS. (AMPLIAÇÃO 100X). A BARRA DE ESCALA É IGUAL A 500MM. ....	124
FIGURA 2. 9 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO FENÓLICO DE DIÓSPIRO NA EXTENSÃO DA LESÃO INTESTINAL, DOS GRUPOS: CONTROLO NEGATIVO, ETOH, TNBS, TNBS + ED (EXTRATO DE DIÓSPIRO). ....	126
FIGURA 2. 10 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO FENÓLICO DE DIÓSPIRO NA OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA DO CÓLON. (A) GRUPO CONTROLO NEGATIVO, (B) GRUPO ETOH, (C) GRUPO TNBS, (D) GRUPO TNBS + EXTRATO DE DIÓSPIRO. ....	127
FIGURA 2. 11 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO FENÓLICO DE DIÓSPIRO NA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA NAS FEZES (MMOL/G DE FEZES), NOS GRUPOS: CONTROLO NEGATIVO, TNBS E TNBS + ED (EXTRATO DE DIÓSPIRO). ....	128
FIGURA 2. 12 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO FENÓLICO DE DIÓSPIRO NAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DA INFLAMAÇÃO DO CÓLON. (A) GRUPO CONTROLO NEGATIVO; (B) GRUPO TNBS, ONDE A INFILTRAÇÃO MARCADAMENTE AUMENTADA DE NEUTRÓFILOS SE MOSTRA COM A SETA PRETA (PONTUAÇÃO 3); (C) TNBS + EXTRATO DE DIÓSPIRO, COM BAIXA INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS (PONTUAÇÃO 2). H&E, AMPLIAÇÃO ORIGINAL × 100. A BARRA DE ESCALA É IGUAL A 100MM. ....	129
FIGURA 2. 13 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO FENÓLICO DE DIÓSPIRO NA EXPRESSÃO DO TECIDO DO CÓLON DE COX-2 E INOS. (A) - EXPRESSÃO DE COX-2: (1) GRUPO CONTROLO NEGATIVO, (2) GRUPO TNBS, (3) GRUPO TNBS + ED; (B) - EXPRESSÃO DE INOS: (1) GRUPO CONTROLO NEGATIVO, (2) GRUPO TNBS, (3) GRUPO TNBS + ED. SOMENTE AS AMOSTRAS DE ANIMAIS SUBMETIDOS A COLITE INTESTINAL MOSTROU EXPRESSÃO MARCADA DE COX-2 E INOS (COLORAÇÃO CASTANHA, SETAS), ENQUANTO AS AMOSTRAS DE ANIMAIS TRATADOS COM EXTRATO FENÓLICO DE DIÓSPIRO EXIBIRAM UMA EXPRESSÃO REDUZIDA DAQUELES MARCADORES INFLAMATÓRIOS. AMPLIAÇÃO ORIGINAL × 100. A BARRA DE ESCALA É IGUAL A 200MM. ....	129

### **CAPÍTULO III**

FIGURA 3. 1 - MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS HT-29 APÓS EXPOSIÇÃO AO EXTRATO FENÓLICO DE DIÓSPIRO, DETERMINADA PELOS ENSAIOS DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS. O HISTOGRAMA MOSTRA AS TAXAS DE MIGRAÇÃO RELATIVA, ONDE OS VALORES SÃO AS MÉDIAS DE PELO MENOS TRÊS RÉPLICAS ± D.P., E SÃO EXPRESSOS COMO PERCENTAGEM DE FECHAMENTO DA FERIDA EM RELAÇÃO AO TEMPO 0. AS CÉLULAS FORAM CULTIVADAS ATÉ ATINGIR 80% DE CONFLUÊNCIA E A	
--	--

MONOCAMADA FOI ARRANHADA COM UMA PONTA DE MICROPIPETA (DIA 0). AS CÉLULAS FORAM ENTÃO EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FENÓLICAS DO EXTRATO DE DIÓSPIRO E A MIGRAÇÃO CELULAR FOI REGISTRADA APÓS 48H. *P <0,05, **P <0,001.....	140
FIGURA 3. 2 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE EXTRATO FENÓLICO DE DIÓSPIRO NAS ATIVIDADES DAS GELATINASES MMP-2 E MMP-9 DO MEIO EXTRACELULAR DAS CÉLULAS HT-29. (A) ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DAS GELATINASES PRESENTES NO MEIO EXTRACELULAR DAS CÉLULAS HT-29 APÓS UMA EXPOSIÇÃO DE 48H A 250, 500, 1000 E 2000MG DE COMPOSTOS FENÓLICOS/ML DO EXTRATO DE DIÓSPIRO, CONFORME QUANTIFICADO PELO MÉTODO DQ FLUOROGÉNICO. OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO FLUORESCÊNCIA RELATIVA, COMO % DOS CONTROLES E REPRESENTAM A MÉDIA DE PELO MENOS TRÊS RÉPLICAS DIFERENTES (N = 3) ± D.P. *P <0,05. (B) IMAGEM REPRESENTATIVA DOS PERFIS ZIMOGRÁFICOS DAS ATIVIDADES DA MMP-9 E MMP-2 DO MEIO EXTRACELULAR DAS HT-29 APÓS UMA EXPOSIÇÃO DE 48H À MAIOR CONCENTRAÇÃO FENÓLICA DE DIÓSPIRO (2000MG/ML). C = CONTROLOS E ED = EXTRATO FENÓLICO DE DIÓSPIRO. ....	141
FIGURA 3. 3 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE EXTRATO FENÓLICO DE DIÓSPIRO NAS ATIVIDADES DAS GELATINASES, MMP-2 E MMP-9, DO TECIDO DO CÓLON DOS RATINHOS DO MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE. (A) ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DAS GELATINASES PRESENTES EM CÓLONS, QUANTIFICADA PELO MÉTODO FLUOROGÉNICO DQ. OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS EM PORCENTAGEM, COMO FLUORESCÊNCIA RELATIVA EM RELAÇÃO AOS CONTROLOS E REPRESENTAM A MÉDIA DE PELO MENOS TRÊS RÉPLICAS DIFERENTES (N = 3) ± D.P. *P <0,05. (B) IMAGEM REPRESENTATIVA DOS PERFIS ZIMOGRÁFICOS DAS ATIVIDADES DA MMP-9 E DA MMP-2 DOS MESMOS CÓLONS. OS EXTRATOS DE PROTEÍNA DO CÓLON FORAM CARREGADOS EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA DE 12,5% (M/V) COM 1% (M/V) GELATINA. ....	142
<b>CAPÍTULO IV</b>	
FIGURA 4. 1 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO NO TAMANHO DOS FITOSSOMAS. ....	155
FIGURA 4. 2 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO NO PI DOS FITOSSOMAS. ....	155
FIGURA 4. 3- IMAGENS DE SEM DOS FITOSSOMAS. A, ESQUERDA: AMPLIAÇÃO = 10.000X, BARRA DE ESCALA = 1µM; A, À DIREITA: AMPLIAÇÃO = 20.000X, BARRA DE ESCALA = 1MM. ....	157
FIGURA 4. 4 - PERFIL CROMATOGRÁFICO POR HPLC A 280NM DO EXTRATO PRESENTE NOS FITOSSOMAS. OS COMPOSTOS MAIORITÁRIOS IDENTIFICADOS FORAM: 1) E 2) CATEQUINA; 3) ÁCIDO GÁLHICO; 4) MONOGALHOIL-HEXÓSIDO; 5) MONOGALHOIL-GLUCÓSIDO. ....	160
FIGURA 4. 5 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO POR HPLC A 360NM. OS PRINCIPAIS COMPOSTOS IDENTIFICADOS FORAM: 6) E 7) ISÓMEROS DE FLAVONAS, ISÓMEROS METILADOS P.EX.; 8) FLAVONOL OU FLAVONA; 9) QUERCETINA TRISSACARÍDEO; 10) FLAVONOL GLUCÓSIDO; 11) FLAVONOL HEXÓSIDO; 12) QUERCETINA-O-HEXÓSIDO-GALHATO; 13) CANFEROL 3-O-GLUCÓSIDO; 14) CANFEROL 3-O-RUTINÓSIDO; 15) CANFEROL 3-O-DIGLUCÓSIDO; 16) CANFEROL 3-O-HEXÓSIDO. ....	160
FIGURA 4. 6 - ÁREA CROMATOGRÁFICA DO SOBRENADANTE A 280NM A) E A 360NM B). ....	162
FIGURA 4.7 - PORCENTAGEM DE DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS AO LONGO DE 6 MESES NO EXTRATO LIVRE E NOS FITOSSOMAS. NAS CONDIÇÕES DE T E RH ESTABELECIDAS PARA O ARMAZENAMENTO. ....	164
FIGURA 4. 8 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO, FITOSSOMAS (1:2 E 1:1) E CONTROLO POSITIVO (QUERCETINA), NAS CONDIÇÕES DE T E RH ESTABELECIDAS, EM TERMOS DE PORCENTAGEM DE DECAIMENTO (% DPPH <sub>T0</sub> -% DPPH <sub>T6</sub> ). **** P<0,0001 VS QUERCETINA, #P<0,0001 VS QUERCETINA, **P<0,0001 VS QUERCETINA, ***P<0,0001 VS EXTRATO LIVRE, +P<0,0001 VS EXTRATO LIVRE... 165	

# ÍNDICE DE TABELAS

## INTRODUÇÃO

TABELA I. 1- COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL GENÉRICA DO DIÓSPIRO. ADAPTADA DE (BAREA-ÁLVAREZ ET AL. 2016; INSA ET AL. 2018). .....	6
TABELA I. 2 - O CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS E SUA CONTRIBUIÇÃO INDIVIDUAL PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, QUE FORAM CALCULADOS COM BASE NAS ATIVIDADES DE ELIMINAÇÃO DE RADICAIS DPPH DOS 6 TIPOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS NOS 4 FRUTOS TESTADOS. ADAPTADA DE (CHEN ET AL. 2008).....	20
TABELA I. 3 - PAPÉIS DOS MEDIADORES LIPÍDICOS NOS PASSOS DA INFLAMAÇÃO. ADAPTADA DE (SERHAN ET AL. 2010).....	27

## CAPÍTULO I

TABELA 1. 1 - PARÂMETROS DAS RETAS DE CALIBRAÇÃO E DOSEAMENTO DE FENÓIS TOTAIS NOS EXTRATOS EM ESTUDO.....	70
TABELA 1. 2 - DADOS REFERENTES AOS PARÂMETROS SEGUIDOS NAS CARTA DE CONTROLO PARA A DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS (N=123).....	71
TABELA 1. 3 - PARÂMETROS DAS RETAS DE CALIBRAÇÃO E DOSEAMENTO DE FLAVONÓIDES TOTAIS NOS EXTRATOS EM ESTUDO.....	72
TABELA 1. 4- DADOS REFERENTES AOS PARÂMETROS SEGUIDOS NAS CARTA DE CONTROLO PARA FLAVONÓIDES TOTAIS (N=15). .....	73
TABELA 1. 5 - PARÂMETROS DAS RETAS DE CALIBRAÇÃO E DOSEAMENTO DE PROCIANIDINAS TOTAIS NOS EXTRATOS EM ESTUDO. ....	74
TABELA 1. 6 - DADOS REFERENTES AOS PARÂMETROS SEGUIDOS NAS CARTA DE CONTROLO PARA DOSEAMENTO DE PROCIANIDINAS TOTAIS (N=15).....	74
TABELA 1. 7 - CONTEÚDO EM COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES TOTAIS, PROCIANIDINAS TOTAIS, DETERMINADO ESPECTROFOTOMETRICAMENTE. EXTRATO PREPARADO COM DIÓSPIRO LIOFILIZADO E EXTRAÍDO COM ACETONA 80%. .....	75
TABELA 1. 8 - TEOR EM ÁCIDO ASCÓRBICO DO EXTRATO (OS VALORES SÃO EXPRESSO EM MÉDIA DE TRÊS REPLICAS ± DESVIO PADRÃO). ....	77
TABELA 1. 9 - POSSÍVEL IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR MS/MS NO EXTRATO TESTADO DE <i>DIOSPYROS KAKI</i> L. ....	81
TABELA 1. 10- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE. ....	97

## CAPÍTULO II

TABELA 2. 1 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CELULAR <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO DE <i>DIOSPYROS KAKI</i> , L. E OUTROS FRUTOS. ....	104
TABELA 2. 2 – DESENHO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL COM O MODELO DE ARTRITE REUMATOIDE (CIA), PARA O ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE UM EXTRATO DE DIÓSPIRO. ....	114
TABELA 2. 3 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DO MODELO DE COLITE <i>IN VIVO</i> , PARA O ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO DE <i>DIOSPYROS KAKI</i> L.....	117
TABELA 2. 4 - PONTUAÇÃO DA GRAVIDADE DA DIARREIA. ....	117
TABELA 2. 5 - CLASSIFICAÇÃO SEMI-QUANTITATIVAMENTE DA GRAVIDADE DA LESÃO DO CÓLON, POR AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA. ....	118
TABELA 2. 6 - OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS DO CÓLON, IMEDIATAMENTE APÓS A COLHEITA. ....	125

## CAPÍTULO III

TABELA 3. 1 - CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS INIBITÓRIAS CONTRA O CRESCIMENTO DAS CÉLULAS HT-29 E A ATIVIDADE DA GELATINOLÍTICA. ....	141
--	-----

## CAPÍTULO IV

TABELA 4. 1 - CARACTERIZAÇÃO DO TAMANHO MÉDIO (NM), DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS (PI) E POTENCIAL ZETA (MV) DOS FITOSSOMAS PREPARADOS A 1:1 E 1:2 (RAZÃO MOLAR, FOSFATIDILCOLINA:EXTRACTO).....	154
TABELA 4. 2 - EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE,%) DO EXTRATO NOS FITOSSOMAS. ....	158
TABELA 4. 3 - ÁREA DE CADA PICO IDENTIFICADO COM CORRESPONDÊNCIA NO SOBRENADANTE DA FORMULAÇÃO.....	159
TABELA 4. 4 - CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DETERMINADOS PELA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA DE <i>FOLIN-CIOCALTEAU</i> . ....	163
TABELA 4. 5 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH NO EXTRATO E NOS FITOSSOMAS, ÀS DIFERENTES CONDIÇÕES DE T E RH AO LONGO DO TEMPO DE ESTUDO.....	165

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1.....	111
EQUAÇÃO 2.....	150
EQUAÇÃO 3.....	153



# INTRODUÇÃO

---

## INTRODUÇÃO

As doenças crónicas (DC) como a diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e cancro, são a principal causa de morte na atualidade, especialmente nos países mais industrializados. Estas doenças têm aumentado de forma exponencial em consequência da adoção de certos estilos de vida, em especial pelo consumo de dietas muito calóricas ricas em gordura e açúcar, pelo stresse e pelo sedentarismo, entre outros fatores.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estas mortes prematuras podem ser prevenidas (Organization 2013) com a adoção de hábitos alimentares saudáveis nomeadamente aumentando a ingestão de frutos e produtos hortícolas, principais fontes de algumas vitaminas e compostos fenólicos, que pelas suas ações antioxidantes e outras, podem ter um papel primordial na proteção da saúde das populações (OCDE 2014).

Vários estudos têm mostrado que os processos oxidativos e inflamatórios estão fortemente implicados na etiologia das doenças crónicas. É consensual que o stresse oxidativo pode desencadear inflamação e que a resposta inflamatória (aguda e crónica) gera uma produção excessiva de espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS) (Dalle-Donne et al. 2006; Pan et al. 2009), perpetuando-se assim os stresses oxidativo e inflamatório.

O stresse oxidativo é consequência da elevada produção de radicais livres que não sendo totalmente neutralizados e removidos pelo sistema antioxidante endógeno podem provocar danos em macromoléculas biológicas, contribuindo para o desenvolvimento de patologias tais como por exemplo o cancro, doenças autoimunes e diabetes tipo 2 (Yoshihara et al. 2014).

A inflamação aguda é um mecanismo de defesa do organismo muito importante mas necessita ser autorregulada pois quando descontrolada transforma-se em inflamação crónica havendo uma libertação persistente de mediadores que destroem tecidos tendo consequências patológicas para o organismo (Roda et al. 2012; Roy et al. 2012).

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais (tanto *in vitro* quanto *in vivo*) sugerem que dietas muito calóricas ricas em açúcares e gorduras estão associadas a um maior risco de doenças cardiovasculares, diabetes e certos tipos de cancro (Willett 1994; Ferrari et al. 2001), sendo que os principais mecanismos fisiopatológicos apontados são as reações de peroxidação de lípidos e de ácido desoxirribonucleico (DNA), provocadas por espécies reativas de oxigénio e de azoto, embora existam outros mecanismos para além dos oxidantes como por exemplo o estado pró-inflamatório associado diretamente a estes alimentos ou à oxidação por eles provocada (Halliwell 1999; Michels et al. 2000; Ferrari et al. 2001).

Por outro lado, estão descritas correlações negativas entre o consumo de alguns alimentos, nomeadamente frutos e legumes, e o risco de desenvolvimento destas doenças (Halliwell 1999; Weisburger 2000; Ferrari et al. 2001). O papel benéfico das frutas e vegetais tem sido atribuído à grande variedade de antioxidantes/compostos fenólicos nestes alimentos e à presença de algumas vitaminas (Esposito et al. 2006; Rahman et al. 2006).

## 1. *Diospyros kaki* L. (Dióspiro)

A cultura do dióspiro é nativa da China onde foi cultivado durante séculos antes de Cristo. Depois espalhou-se para o Japão (c. VII) e para a Coreia (c. XIV) na Idade Média, e posteriormente para outros continentes. Durante os últimos anos, a popularidade do dióspiro (Fig. i. 1) cresceu fora das áreas tradicionais de produção (China, Japão e Coreia), tornando-se numa cultura promissora no Brasil e em alguns países do Mediterrâneo como Espanha, Itália e Portugal. Na Europa, o cultivo de dióspiro é limitada à proximidade do mar Mediterrâneo (Del Bubba et al. 2009).

O nome «dióspiro» (*Diospyros*) tem origem no grego *dióspuron*, que significa «alimento de Zeus», enquanto «caqui» vem do japonês kaki (柿) (Vieites 2012).

A árvore de dióspiro pertence ao género *Diospyros*, família Ebenaceae, tem quatro espécies comercialmente importantes, sendo que entre elas a mais representativa é *Diospyros kaki* (dióspiro japonês) havendo, no entanto, outras igualmente relevantes como *Diospyros virginiana*, *Diospyros oleifera* e *Diospyros lotus*, (Bibi et al. 2007; Vieites 2012).



Figura i. 1 – Diósipros. Adaptado de (<https://www.shutterstock.com/pt/search/persimmon>)

Em Portugal existem alguns pomares na região do Algarve, embora a maioria do dióspiro seja proveniente de árvores dispersas ou em bordadura, espalhadas por todo o país. A área ocupada por esta cultura é de 231 hectares, dando origem a uma

produção de cerca de 2 900 toneladas por ano. A China continua a ser o maior produtor, produzindo cerca de 2,5 milhões de toneladas, seguido pela Coreia do Sul com 530 000 toneladas e Japão com 266 000 toneladas, enquanto o Brasil aparece em quarto lugar no ranking mundial com 173 300 toneladas. O dióspiro tem uma produção mundial da ordem dos 5 milhões de toneladas correspondendo a 0,75% do total da produção de fruta (FAO 2016).

As cultivares de dióspiro podem ser divididas em dois grupos distintos: adstringente (*Rojo brillante, Triumph*, etc.) e não adstringente (*Fuyu, Hana-Fuyu, Jiro*, etc.). A adstringência está ligada à estrutura química dos taninos que o fruto contém, sendo que os taninos são insolúveis na variedade não adstringente e solúveis nas adstringentes. Os taninos solúveis podem interagir com as proteínas da saliva originando um gosto amargo na boca.

À medida que avança a maturação, o teor de taninos diminui e o risco de sabor amargo das variedades adstringentes também (Akagi et al. 2010). No entanto, a adstringência maior ou menor de todas as cultivares vai decrescendo durante o amadurecimento não só por diminuição do conteúdo em taninos mas porque o tanino solúvel se transforma em formas insolúveis (Pei et al. 2013). As cultivares adstringentes continuam a ter uma quantidade significativa de taninos solúveis mesmo quando maduras (Yaquub et al. 2016).

As variedades Coroa de Rei, tipo Kaki e Roxo Brilhante são consideradas “adstringentes” e necessitam de uma maturação adequada. Fuyo, Hana Fuyo, Giro e outras incluem-se nas variedades não adstringentes, podendo ser consumidas imediatamente após a colheita.

O dióspiro é um fruto esférico com uma coloração que vai de avermelhada a amarela de acordo com o conteúdo em carotenos, a polpa é viscosa vermelho-alaranjada e mais ou menos “áspera”, consoante o teor em taninos. A polpa, independentemente da variedade, é constituída principalmente por mucilagem e pectina, que lhe conferem a sua aparência característica (OMAIAA 2011).

O dióspiro é uma fruta de época e só está disponível na forma fresca por um curto período do ano. Na Europa, o dióspiro pode ser comprado no final do Outono e no início do Inverno, de Novembro a Fevereiro.

O dióspiro (*Diospyros kaki* L.), para além do seu valor nutritivo, tem sido usado pela medicina tradicional chinesa pelos seus efeitos benéficos na saúde humana, nomeadamente contra a hipertensão, hemorragias (Uchida et al. 1995), na manutenção da temperatura corporal e processos oxidativos em geral (Hibino et al. 2003; Gu et al. 2008), pelo seu efeito diurético, na diabetes e aterosclerose (Briand 2005). Tem sido igualmente utilizado para melhorar a função dos pulmões, do

estômago, do baço e dos intestinos e usado na prevenção e tratamento de doenças como garganta inflamada, aftas e insónias (Chen et al. 2008).

Alguns estudos demonstraram também que o dióspiro possui propriedades anti-tumorais (Kawase et al. 2003), efeitos de prevenção da dislipidemia (Matsumoto et al. 2006), efeitos antihipocolesterolémicos e antioxidantes (Gorinstein et al. 1998) e efeitos antidiabéticos (Lee et al. 2006).

Os efeitos benéficos na saúde têm sido associadas com a sua riqueza em antioxidantes onde se incluem as vitaminas, os compostos fenólicos e os carotenóides (Chen et al. 2008).

## **1.1 Composição do dióspiro**

### **1.1.1 Caracterização nutricional**

O dióspiro é um fruto nutritivo sendo a recomendação de ingestão diária de dióspiro fresco de 100-150g (Giordani et al. 2011).

A sua composição química é variada e compreende, entre outros componentes, diferentes açúcares, amido, ácidos orgânicos e aminoácidos, proantocianidinas (PAs), flavonóides, carotenóides, triterpenóides e ácidos gordos (Inaba et al. 1971; Ayaz et al. 1999; Veberic et al. 2010; Zhou et al. 2010; Santos et al. 2018), proteínas e vitaminas A, B6, B12, D e C (Kim et al. 2013). Deve ser tomada em consideração a grande quantidade de hidratos de carbono que o dióspiro contém, em especial, no caso dos diabéticos.

A Tabela i. 1 apresenta a composição nutricional do dióspiro.

**Tabela i. 1- Composição nutricional genérica do dióspiro. Adaptada de (Barea-Álvarez et al. 2016; INSA et al. 2018).**

	<b>100g da parte edível</b>
Energia (Kcal)	71,50
Proteínas (g)	0,64
Lípidos totais (g)	0,25
Hidratos de carbono (g)	17,30
Fibras (g)	2,60
Água (g)	80,86
Cálcio (mg)	8,00
Ferro (mg)	0,20
Magnésio (mg)	9,25
Zinco (mg)	0,11
Sódio (mg)	2,50
Potássio (mg)	230,00
Fósforo (mg)	19,50
Selénio (µg)	0,60
Tiamina (mg)	0,03
Riboflavina (mg)	0,03
Niacina equivalentes (mg)	0,20
Vitamina B <sub>6</sub> (mg)	0,10
Vitamina C (mg)	11,75
Vitamina A total (equivalentes de retinol) (µg)	177,00
Folato (µg)	7,00

O dióspiro possui cerca de 12,5g de açúcar por 100g de fruto, sendo a frutose, a glucose e a sacarose, os mais abundantes (Piretti 1991; Veberic et al. 2010) e contendo menores quantidades de maltose, xilose, arabinose e ácido glucurônico (Maulidiani et al. 2018).

Nos extratos de dióspiro foram encontrados ácidos orgânicos como málico, oxoglutâmico, cítrico, succínico e aspártico, aminoácidos como ácido gama-aminobutírico (GABA), alanina, arginina, valina, leucina e isoleucina, ácidos gordos (ácido palmitoleico metil éster, ácido mirístico e ácido linoleico (Hitaka et al. 2013; Maulidiani et al. 2018) e vitaminas (trigonelina e ácido ascórbico). O  $\alpha$ -tocoferol, ácido oleanólico, ácido betulínico,  $\beta$ -sitosterol e uridina também foram identificados (Maulidiani et al. 2018).

Tendo uma composição mineral importante, o consumo de uma peça deste fruto (200-400g) pode fornecer 1-10% da dose diária recomendada (DDR) para cálcio, 1-30% para cobre e potássio, 1-15% de ferro e magnésio, até 1% de sódio e até 4% de zinco (Mir-Marqués et al. 2015).

O dióspiro é uma boa fonte de carotenóides tendo sido descritos valores de 2mg de carotenóides/100g de fruto fresco (Butt et al. 2015), o que corresponde a 22% da dose diária recomendada (DDR) de vitamina A (INSA et al. 2018). Embora presentes maioritariamente na pele (Bing et al. 2006), a polpa contem ainda grandes quantidades destes compostos responsáveis pela cor dos frutos e cuja quantidade aumenta no fruto mais maduro (Ebert et al. 1985; Veberic et al. 2010). Os principais carotenóides são  $\beta$ -criptoxantina (193 $\mu$ g/100g) que é maioritária (Yaqub et al. 2016),  $\beta$ , $\beta$ -caroteno (113 $\mu$ g/100g FF) e  $\beta$ -caroteno (30 $\mu$ g/100g FF) (Giordani et al. 2011). Este grupo de compostos têm sido implicados na redução de doenças degenerativas humanas devido à sua capacidade antioxidante e propriedades de captação de radicais livres (Block et al. 1992; van Poppel 1993; Steinmetz et al. 1996).

Recentemente foram identificados na pele do dióspiro (*Diospyros kaki* THUNB.), ésteres de ácidos gordos dos carotenóides  $\beta$ -caroteno, licopeno, nomeadamente éster do ácido monomirístico de  $\beta$ -criptoxantina, éster de ácido dimirístico de zeaxantina, bem como pequenas quantidades de ácido palmitoleico e ácido oleanólico. (Goto et al. 2009; Hitaka et al. 2013).

Em relação à vitamina C, um dióspiro pode suprir cerca de 46% das necessidades diárias desta vitamina (Rao et al. 2007). No geral os níveis de vitamina C nas cultivares não adstringentes são significativamente maiores (10 vezes) do que nas cultivares adstringentes (Giordani et al. 2011). A vitamina C existe no dióspiro em duas formas: ácido *L*-ascórbico e o seu produto oxidado, ácido *L*-desidroascórbico. Embora ambas as espécies químicas sejam compostos importantes graças às suas atividades

antioxidantes, elas não têm a mesma atividade, uma vez que o ácido *L*-ascórbico é mais ativo do que a forma oxidada (Gregory 2007). Cerca de 2/3 da vitamina C total no dióspiro está disponível como ácido *L*-ascórbico (Giordani et al. 2011).

O dióspiro também é rico em compostos fenólicos já identificados como bioativos (Jung et al. 2005; Jang et al. 2010; Maulidiani et al. 2018). À semelhança dos carotenóides, estes são também mais abundantes na pele relativamente à polpa (Gorinstein et al. 1994).

### **1.1.2 Compostos Fenólicos (CF)**

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas e constituem um grupo de compostos complexo, com mais de 8 000 estruturas fenólicas conhecidas (Bloch et al. 1995; Bravo 1998).

São compostos de baixo peso molecular, amplamente disseminados na natureza, que embora não tendo funções nutritivas têm associadas propriedades benéficas para a saúde humana, muitas delas consequência da sua atividade antioxidante, quer por eliminação de radicais livres como por absorção de radicais de oxigénio e ainda por quelatação de iões metálicos (Su et al. 2007).

Para além da capacidade antioxidante, os compostos fenólicos possuem muitos outros efeitos, como efeito anti-inflamatório, antitumoral, antiaterogénico, que não podem ser explicados apenas com base nas suas propriedades antioxidantes (Rahman et al. 2006).

Até há algum tempo atrás, o interesse nutricional dos compostos fenólicos prendia-se com a capacidade de alguns deles se ligarem e precipitarem macromoléculas, como as proteínas dietéticas, hidratos de carbono e enzimas digestivas, resultando na redução da sua digestibilidade (Bravo 1998). Mais recentemente, o interesse destes compostos está dirigido para a sua capacidade antioxidante (reação com radicais livres e quelatação de metais) e possíveis implicações benéficas na saúde humana, como prevenção e co-adjuvantes de tratamento de diversos tipos de cancro, doenças cardiovasculares e outras patologias (Wollgast et al. 2000).

Uma grande variedade de atividades biológicas atribuídas aos flavonóides (compostos fenólicos abundantes na dieta) foi sendo reportada ao longo dos anos. Exemplos disso são as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, anticancerígena e antidiabética (Benavente-Garcia et al. 2008; Kumar et al. 2013; Xiao et al. 2015; Loizzo et al. 2016).



Os compostos fenólicos encontram-se numa grande variedade de alimentos disponíveis para a dieta humana, incluindo frutos, vegetais, bebidas e especiarias, muitos dos quais usados empiricamente pelo Homem há milhares de anos, nomeadamente na medicina tradicional (Yoon et al. 2005). Frutos e vegetais são dos alimentos mais ricos nestes compostos.

### 1.1.2.1 Classificações dos Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos compreendem uma ampla variedade de moléculas que possuem uma estrutura de polifenol (isto é, vários grupos hidroxilo em anéis aromáticos), mas também moléculas com um anel de fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH), tais como ácidos fenólicos e álcoois fenólicos (Daayf et al. 2008). Assim, incluem desde moléculas mais simples, como ácidos fenólicos, até compostos com alto grau de polimerização, como os taninos.

Os compostos fenólicos são divididos em várias classes de acordo com o número de anéis fenol que contêm e os elementos estruturais que ligam esses anéis entre si (D'Archivio et al. 2007). Segundo a Fig. i. 2 os compostos fenólicos dividem-se em cinco famílias: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, coumarinas e taninos. Os flavonóides são o grupo maior e melhor estudado de compostos fenólicos (Ferguson 2001).

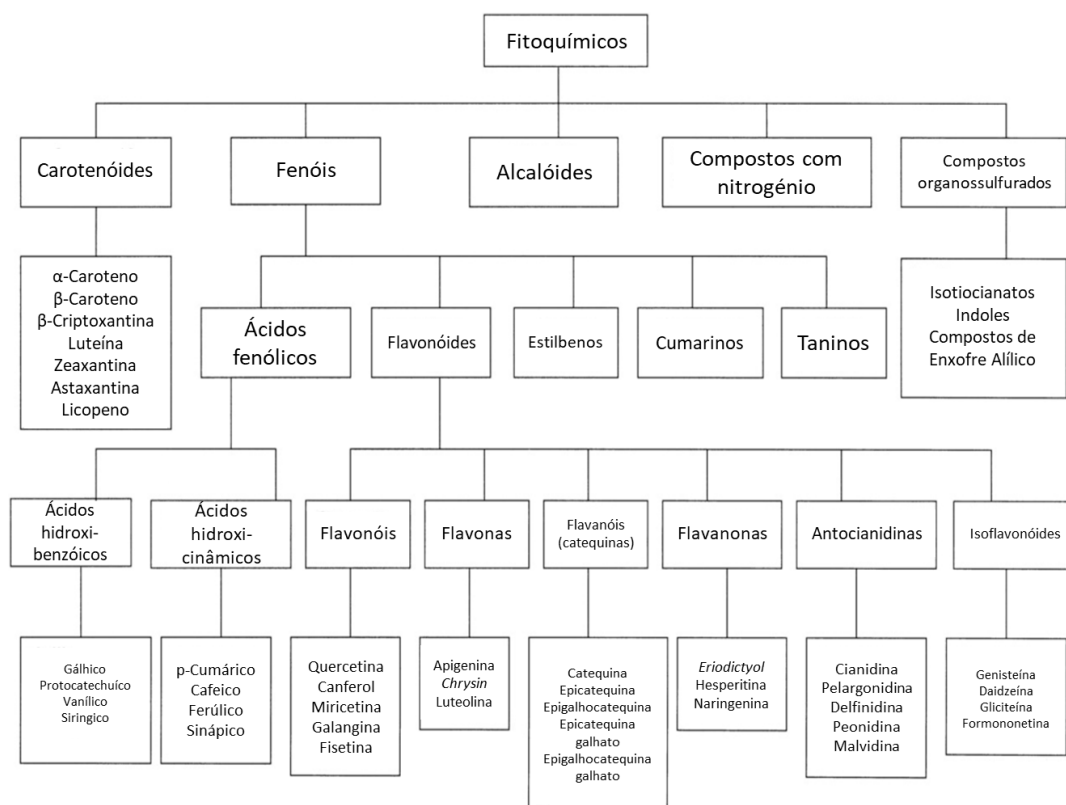


Figura i. 2 – Classificação compostos fenólicos. Adaptado de (Liu 2004)

Estes compostos ocorrem sob a forma conjugada, com um ou mais resíduos de hidratos de carbono ligados a grupos hidroxilo, embora também existam ligações diretas da unidade do hidrato de carbono com um átomo de carbono do anel aromático. Os hidratos de carbono ligados podem ser monossacarídeos, dissacarídeos, ou oligossacarídeos. A glicose é o resíduo de hidrato de carbono mais comum, embora também se possa encontrar galactose, ramnose, xilose e arabinose, para além de ácidos glucurónico e galacturónico entre muitos outros. Também podem ser encontradas ligações com outros compostos, como ácidos orgânicos, aminas e lípidos ou ainda outras moléculas de fenóis. (Bravo 1998).

Não havendo consenso quanto à nomenclatura e classificação dos compostos fenólicos, habitualmente dividem-se em duas grandes classes: flavonóides e não-flavonóides (Wildman 2006).

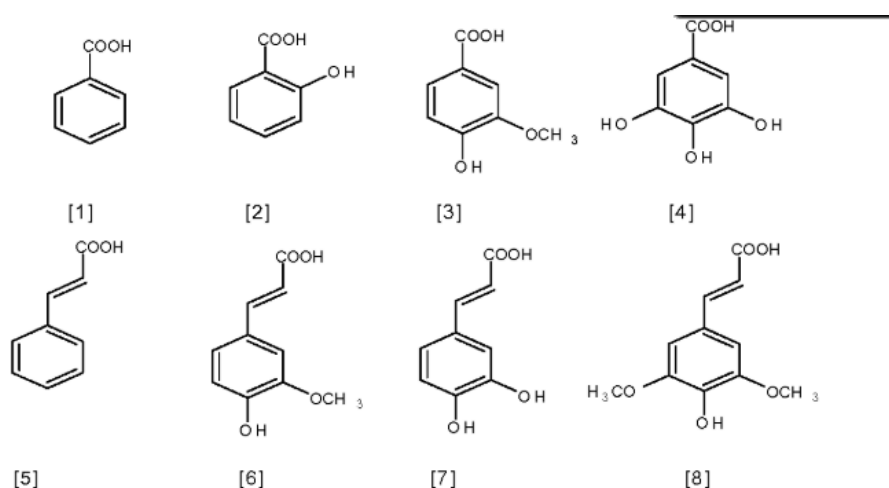
#### **A) Flavonóides**

Os flavonóides, amplamente distribuídos nas frutas e nos vegetais, podem ser divididos em diferentes subclasses tais como: flavonol, flavonas, flavanóis, flavanonas, chalconas, auronas, antocianinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas e isoflavonas (Dornas et al. 2009).

Os fenóis simples e os flavonóides representam a vasta maioria dos fenóis das plantas. São compostos com pesos moleculares baixos cuja solubilidade depende da estrutura química (grau de hidroxilação, glicosilação, acilação – conversão de fenol em ésteres, por exemplo). Podem ligar-se a componentes da parede celular como aos polissacarídeos e ligninas (Bravo 1998).

#### **B) Não-flavonóides**

Neste grupo estão incluídos os derivados do ácido hidroxicinâmico, como os ésteres dos ácidos cafeico, cumárico e felúrico e os derivados do ácido hidroxibenzóico como os ácidos siríngico, gálhico, elágico e vanílico e protacatechuico (Fig. i. 3) (Crozier et al. 2009) e também estilbenos (ex: resveratrol) e lignanos, entre outras sub-classes (Saxena et al. 2013).



**Figura i. 3 - Estruturas químicas de ácidos fenólicos. Ácidos hidroxibenzóicos são ácido benzoico (1), ácido salicílico (2), ácido vanílico (3), ácido gálgico (4) e ácidos hidoxicinâmicos ácido cinâmico (5), ácido ferúlico (6), ácido sináptico (7) e ácido cafeico (8). Adaptado de (Saxena et al. 2013)**

#### **1.1.2.2 Compostos fenólicos presentes no *Diospyros kaki***

O dióspiro é rico em flavonóides e taninos condensados (Mallavadhani et al. 1998). Na parte comestível de dióspiro existem ácidos fenólicos como ácido gálgico e seus derivados glicosídeos e acilo, glicosídeos de ácido *p*-cumárico e vanílico, ácidos cafeico, clorogénico e várias flavonas di-*C*-hexóxidos (Sentandreu et al. 2014). Os resultados de Chen *et al.* estão de acordo com os estudos de Suzuki *et al.*, que tinham já mostrado que o ácido gálgico é o composto fenólico em maior quantidade no dióspiro japonês (Suzuki et al. 2005; Chen et al. 2008).

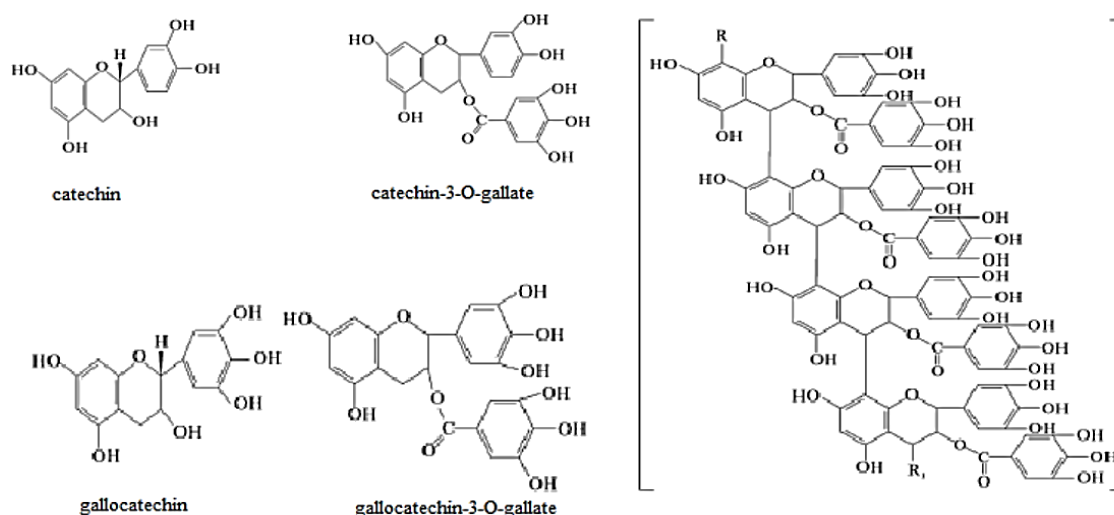
Foram detetados no dióspiro, os seguintes monómeros de flavan-3-óis: catequina, epicatequina, epigalocatequina (Suzuki et al. 2005). A conjugação de várias técnicas analíticas permitiu identificar a miricetina como unidade terminal dos flavan-3-óis mais comuns (catequina e epigalocatequina-3-*O*-galhato) (Li et al. 2010).

O dióspiro acumula uma grande quantidade de taninos condensados em vacúolos de células específicas denominadas “células de tanino” durante o desenvolvimento do fruto, que são os responsáveis pela adstringência, que é uma sensação de secura devido à reacção com as proteínas da saliva (Taira 1995).

As proantocianidinas resultam de reacções de polimerização (condensação) de monómeros de flavonóides. Consistem em oligómeros e polímeros de flavanóis ligados por carbonos (C4-C8). Existem 2 tipos de proantocianidinas, as proantocianidinas B que são constituídas por unidades de catequina e epicatequina ligadas pelo C4 e C6 ou C8 e as proantocianidinas A, que para além do já referido, possuem também ligações C2-C7.

As proantocianidinas constituídas por apenas epicatequina são chamadas de procianidinas (de la Iglesia et al. 2010).

No estudo da estrutura das proantocianidinas presentes no dióspiro, verificou-se que estas consistem essencialmente em epigalhocatequina-3-O-galato, galato de epicatequina e epicatequina (Fig. i. 4) (Gu et al. 2008; Li et al. 2010). Experimentalmente a separação e determinação estrutural dos taninos é muito difícil devido à agregação intermolecular e à forte adsorção a vários adsorventes e a outros materiais usados para separação cromatográfica, porque os taninos do dióspiro possuem um grande número de grupos hidroxilo fenólicos (Gu et al. 2008). A distribuição dos pesos moleculares dos taninos condensados de elevado peso molecular foi determinada, estando num intervalo entre  $1,16 \times 10^4$  Da e  $1,54 \times 10^4$  Da (Gu et al. 2008).



**Figura i. 4 - Estruturas químicas dos taninos condensados do dióspiro e catequinas relacionadas. [Adaptado de (Matsuo 1978; Ozen et al. 2004; Gu et al. 2008)].**

Suzuki *et al.* reportam que o conteúdo de fenóis totais nos extratos metanólicos de diósipros japoneses adstringentes é superior a 84,6mg/100g de peso seco (Suzuki et al. 2005). Chen *et al.* em 2008 encontraram valores duas vezes superiores de compostos fenólicos totais na cultivar *Diospyros kaki* L. cv. Mopan (adstringente) comparativamente com os valores descrito no estudo de Suzuki *et al.*

O dióspiro Mopan é a cultivar de dióspiro adstringente mais cultivado no norte da China, especialmente em Pequim. Um único fruto pode pesar cerca de 250g até cerca de 610g, muito nutritivo e com uma polpa com sumo doce. Chen *et al.* determinaram o conteúdo em fenóis totais e individuais (catequina, epicatequina, epigalhocatequina, ácido clorogénico, ácido cafeico e ácido gálico) e compararam-nos

com os de outros frutos, como a maçã, a uva e o tomate. Assim concluíram que o dióspiro era o fruto com um conteúdo em compostos fenólicos totais mais elevado (cerca de 170mg/100g peso seco) quando comparado com uvas (cerca 100mg/100g peso seco), maçã (cerca 40mg/100g peso seco) e tomate (cerca 20mg/100g peso seco) (Chen et al. 2008).

No entanto, a diversidade de pequenos fenóis nos extratos da polpa do dióspiro relatados até à data é surpreendentemente escassa, sendo normalmente restrito de três a dez componentes (derivados principalmente do ácido cinâmico), dependendo da variedade em estudo (Giordani et al. 2011). Assim, pode-se concluir que o perfil de fenóis de baixo peso molecular, por exemplo, na polpa do dióspiro ainda está por esclarecer (Sentandreu et al. 2014).

#### **1.1.2.4 Detecção e Quantificação dos Compostos Fenólicos**

Tem sido descrito que o conteúdo em compostos fenólicos totais pode variar entre as várias variedades de dióspiro. Para além da variabilidade no fruto o facto de não existirem métodos standardizados para extracção destes compostos faz com que seja difícil a comparação de resultados obtidos entre diferentes autores (Gorinstein et al. 1998; Suzuki et al. 2005).

A extracção é assim um passo determinante para a identificação e quantificação de compostos fenólicos e comparação dos resultados obtidos pelos diferentes autores. Após a extracção poderá ser feita uma concentração e purificação da amostra de modo a facilitar a análise dos compostos fenólicos na amostra (Ignat et al. 2011).

Na literatura têm sido reportados diferentes métodos, que variam no tipo de solvente utilizado, tempo de extracção, temperatura e número de extracções a realizar (Giordani et al. 2011).

Os solventes de extracção mais usados são metanol, água, acetona, solução metanol-água, solução etanol-água, etanol e clorofórmio (Giordani et al. 2011).

Enquanto Suzuki *et al* utilizaram água destilada, a 80°C durante 90 minutos, como solvente de extracção, com posterior reconstituição do extrato em solução de água-clorofórmio (Suzuki et al. 2005) outros autores fizeram extracção sob refluxo a 90°C com metanol acidificado com HCl (Gu et al. 2008; Li et al. 2010) e outros ainda realizaram o método de extracção assistida por ultrassons, utilizando etanol com solvente (Chen et al. 2008) e extracção com etanol-acetona à temperatura de 37°C durante 1 hora (Li et al. 2010).

Como processo adicional para a eliminação de interferentes quer para separação de frações com diferente peso molecular foram já referidas metodologias

de preparação de amostra que usam resinas macroporosas e membranas de filtração na purificação de extratos (Gu et al. 2008).

Também a identificação e quantificação dos diferentes compostos fenólicos presentes no dióspiro, apresenta dificuldades analíticas, dada a complexidade da matriz (Giordani et al. 2011).

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, como pelo método *Folin-Denis* (Suzuki et al. 2005; Gu et al. 2008), pelo método *Folin-Ciocalteu* (Gorinstein et al. 2001; Jung et al. 2005; Chen et al. 2008; Veberic et al. 2010; Li et al. 2011) e pelo método de *Gutfinger* (Jang et al. 2010). Estes ensaios baseiam-se em princípios diferentes e são utilizados para determinar diferentes grupos estruturais presentes em compostos fenólicos, todavia, a técnica que utiliza o reagente de *Folin-Ciocalteu* figura entre as mais extensivamente utilizadas (Asgari et al. 2003; Lapornik et al. 2005) para a determinação de compostos fenólicos totais (Naczek et al. 2006).

O reagente de *Folin-Ciocalteu* consiste numa mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstúico, no qual o molibdénio e o tungsténio se encontram no estado de oxidação  $6^+$  porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdénio azul e tungsténio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (Singleton et al. 1965).

Como referido anteriormente, os compostos fenólicos compreendem uma ampla variedade de moléculas que vão de moléculas mais simples como os ácidos fenólicos e álcoois fenólicos até estruturas complexas com vários anéis fenol.

Os flavonóides constituem um a classe de compostos fenólicos que pode também ser determinada utilizando um método colorimétrico baseado na complexação com Al (III) (Naczek et al. 2006; Huang et al. 2009).

A principal desvantagem dos ensaios espectrofotométricos é que são métodos globais e que carecem por vezes de especificidade pelo que aos valores obtidos pode estar associado algum erro (Ignat et al. 2011), daí a vantagem na utilização de métodos separativos como a cromatografia em fase líquida, actualmente a técnica mais usada para o estudo da composição dos alimentos, nomeadamente a composição fenólica, sendo associada à utilização de detetores específicos, permitindo um maior rigor nos resultados obtidos. Na separação dos componentes são habitualmente usadas colunas de fase reversa. Entre os detetores a espectrometria de massa *tandem* (Sakakibara et al. 2003), apresenta inúmeras vantagens, nomeadamente a capacidade de identificação e de quantificação. A evolução que tem ocorrido no desenvolvimento

deste tipo de equipamentos (diferentes fontes iônicas, diferentes analisadores) tem permitido nestes últimos anos um grande avanço no que se refere ao conhecimento sobre matrizes complexas como os alimentos e também a identificação de metabolitos em matrizes biológicas que permitem conhecer melhor o mecanismo de atuação dos compostos. No que se refere à identificação os equipamentos denominados de alta resolução como o ORBITRAP e FTICR são uma mais valia, enquanto que os equipamentos baseados em analisadores do tipo triplo quadrupolo permitem uma quantificação precisa e exacta dos compostos dada a sua especificidade (Ignat et al. 2011).

Assim as técnicas de cromatografia líquida associadas a espectrometria de massa, são hoje em dia a melhor abordagem analítica para estudar os compostos fenólicos em amostras complexas (Bureau et al. 2009; Ignat et al. 2011).

## **1.2 Atividade Biológica do Dióspiro**

O dióspiro (*Diospyros kaki* L.) é um fruto nutritivo e com forte atividade antioxidante (Jung et al. 2005) especialmente pela sua riqueza em compostos fenólicos, vitamina C e carotenoides (Jang et al. 2010; Veberic et al. 2010; Gorinstein et al. 2011; Hitaka et al. 2013; Butt et al. 2015; Pérez-Burillo et al. 2018) responsáveis pela redução de danos oxidativos e, conseqüentemente, com atividade nas doenças associadas a eles como as doenças cardiovasculares e a diabetes *mellitus*. Para além disso, há provas em como os dióspiros ou os seus constituintes funcionais, como as proantocianidinas podem ajudar em casos de hiperlipidémia e hiperglicemia (Matsuo 1978; Gorinstein et al. 1998; Matsumoto et al. 2010; Butt et al. 2015). Diversos estudos têm demonstrado que o dióspiro apresenta funções farmacológicas na promoção do sistema imunitário e atividade anti-tumoral (Achiwa et al. 1997; Kawase et al. 2003).

O conteúdo em compostos fenólicos do dióspiro, incluindo as proantocianidinas e outros, têm sido igualmente relacionados com efeitos ao nível da redução de doenças degenerativas humanas (Steinmetz et al. 1996) e também estão na base da sua utilização como antissépticos na medicina popular (Serrano et al. 2009; Ueda et al. 2013).

De acordo com muitos autores, este fruto tem efeitos preventivos do processo arteriosclerótico (Gorinstein et al. 2001; Chahoud et al. 2004; Jung et al. 2005; Park et al. 2006; Park et al. 2008) e previne a síndrome metabólica (Matsumoto et al. 2011).

No estudo de Tian *et al.* as proantocianidinas de elevado peso molecular do dióspiro mostraram atenuar a perda da memória e melhorar o desempenho comportamental quando testadas num modelo de envelhecimento em ratos (Tian et al. 2011).

As proantocianidinas, têm sido descritas como compostos com moléculas com elevada atividade antioxidante (Dixon et al. 2005; Xie et al. 2005) e constituem os principais antioxidantes da polpa do dióspiro (Suzuki et al. 2005; Gu et al. 2008) apresentando atividade anti-inflamatória e de prevenção da aterosclerose (Gorinstein et al. 2000; Kim et al. 2013) e que a ação nas doenças cardiovasculares ocorre diminuindo a vasoconstrição e a oxidação da LDL. Atuam também na diabetes, diminuindo a expressão de recetores para os produtos finais de glicosilação avançada, a peroxidação lipídica no fígado, a hiperglicémia, hiperlipidémia e o stresse oxidativo. Estão descritas ações de diminuição de peso, melhorias na resistência à insulina, nas nefropatias, retinopatias e neuropatias e no cancro por aumento da apoptose e diminuição da proliferação celular e angiogénese. Parecem também actuar nas infeções bacterianas, melhor atividade anti-adesiva e diminuir os mediadores inflamatórios (de la Iglesia et al. 2010).

Muitos dados epidemiológicos sugerem que a ingestão de taninos (taninos condensados e taninos hidrolisáveis) pode prevenir o aparecimento de doenças crónicas (Lila 2007). Os efeitos biológicos de taninos têm sido extensivamente estudados utilizando vários modelos *in vitro* ou em modelos animais mas, no entanto, os dados clínicos em seres humanos ainda são limitados ou escassos (Serrano et al. 2009).

Como o nosso estudo assenta nas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e na modulação do cancro de colón vamos desenvolver um pouco mais esses aspetos nesta introdução.

### **1.2.1 Atividade Antioxidante**

O oxigénio molecular é fundamental em condições aeróbias de sobrevivência, é o aceitador final de eletrões da cadeia respiratória mitocondrial, permitindo a obtenção de energia na forma de ATP, a reoxidação do NADH e do FADH<sub>2</sub> (Pietta 2000).

Espécies reativas de oxigénio (ROS) formam-se nas células aeróbias, através das reações de transferência eletrónica da cadeia respiratória e desempenham funções importantes em processos biológicos (Halliwell et al. 1990), em respostas fisiológicas e patológicas (Schreck et al. 1991). Algumas das suas funções biológicas normais e importantes estão relacionadas com a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular e síntese de compostos biologicamente importantes (Halliwell 1997).

Exemplos destas espécies são os radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), peróxido (ROO<sup>•</sup>), alcóxido (RO<sup>•</sup>), hidróxido (<sup>•</sup>OH) e o monóxido de azoto ou óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) (Pietta



2000). O radical hidroxilo (tempo de meia-vida de  $10^{-9}$  s) e o radical alcoxilo (tempo de meia-vida de apenas alguns segundos) são espécies muito reativas que rapidamente atacam moléculas das células próximas (Pietta 2000). Os hidroperóxidos de lipídios (LOOH) e o monóxido de azoto são menos reativos que os anteriores e em conjunto formam a classe dos ROS radicalares (Pietta 2000). O oxigénio singleto ( $^1O_2$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o ácido hipocloroso (HOCl) são ROS não radicalares (Pietta 2000).

As ROS podem ter origem intracelular ou extracelular, através de diversas fontes como mitocôndrias, peroxissomas (envolvidos no metabolismo dos ácidos gordos), lipoxigenases, NADH oxidase, citocromo P450 (microssomal da cadeia transportadora de eletrões) entre outras (Finkel et al. 2000; Valko et al. 2004). As células imunocompetentes libertam monóxido de azoto e vários radicais de oxigénio durante uma resposta imunológica crónica. Também existem fontes exógenas de ROS que incluem drogas e toxinas ambientais, fumo de cigarro, radiação UV, choque térmico e poluentes do ar (Clinton 1998). Estas espécies também são produzidas em determinadas situações fisiopatológicas como após a ingestão de dieta rica em ácidos gordos polinsaturados, inflamação, isquemia/reperfusão, entre outras. (Halliwell 1994).

Em condições fisiológicas normais a produção de ROS é bem controlada (Jacob et al. 1996). Em condições de stresse há um desacoplamento do fluxo de eletrões através da cadeia respiratória, o que pode conduzir à formação de ROS de forma desequilibrada (Pietta 2000).

O organismo tem vários mecanismos de defesa antioxidante contra ROS:

- enzimas (catalase, superóxido dismutase (SOD), glutathione dismutase, glutathione peroxidase);
- moléculas endógenas que podem funcionar como antioxidantes (ácido úrico, glutathione, transferrina, ferritina, albumina, proteínas que tenham grupos  $-SH$  e bilirrubina entre outras);
- algumas vitaminas (ácido *L*-ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol) e carotenóides (Pietta 2000; Fernandez-Pancho et al. 2008).

Quando os radicais livres são produzidos em excesso ou não são neutralizados pelos enzimas antioxidantes endógenos habituais (Jacob et al. 1996), as ROS, dada a elevada capacidade reativa que as caracteriza, reagem com moléculas biológicas como o DNA, proteínas de tecidos e de enzimas, lípidos das membranas celulares e hidratos de carbono, induzindo oxidações que causam dano nas membranas celulares, modificações em proteínas (incluindo enzimas) e dano no DNA (Pietta 2000). Este stresse oxidativo gerado destes desequilíbrios, que vão desde a sobreprodução de ROS

até ao défice de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Valko et al. 2007), pode levar ao desenvolvimento de patologias como o cancro, arteriosclerose, dano da mucosa gástrica, processos degenerativos de envelhecimento (Halliwell et al. 1990), inflamação ou a cancro (Nordberg et al. 2001). Há ligação dos ROS/espécies reativas de nitrogénio (RNS) ainda a patogénese como doenças cardiovasculares, hipertensão, lesão por isquémia/reperfusão, diabetes *mellitus*, doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer e doença de Parkinson) e a artrite reumatoide (Valko et al. 2007). Pela associação das espécies reativas de oxigénio ao cancro e doenças cardiovasculares, os antioxidantes têm sido considerados uma via promissora para a prevenção e tratamento destas doenças, especialmente tendo em conta as ligações observadas entre dietas ricas em frutas e vegetais (e provavelmente antioxidantes) e diminuição dos riscos para o cancro (Seifried et al. 2007)

Porque os mecanismos de defesa antioxidante nos humanos podem não ser suficientes e eficientes, a ingestão de antioxidantes exógenos, por via alimentar, torna-se indispensável para combater o excesso de ROS (Jacob et al. 1996). Na dieta encontram-se antioxidantes como a vitamina C, vitamina E e carotenóides, que reduzem o risco de desenvolvimento de determinadas doenças (Jacob et al. 1996), mas também compostos fenólicos de vegetais, frutos, chá e vinho, por exemplo (Crozier et al. 2009).

Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes protegendo os tecidos humanos contra o stresse oxidativo e patologias associadas a essa condição (Biesalski 2007), tendo sido reconhecidos como antioxidantes potentes através da capacidade de captação e aprisionamento dos radicais livres e sequestro de agentes oxidantes, conseguindo ter maior capacidade antioxidante que as vitamina C e E (Rice-Evans et al. 1997; Scalbert et al. 2005). Devido à sua estrutura química, os grupos fenólicos podem aceitar um eletrão ou um próton formando-se radicais fenólicos relativamente estáveis impedindo as reações de oxidação em cadeia nos compartimentos celulares (Scalbert et al. 2005) mas também podem alterar a expressão dos múltiplos genes que codificam as enzimas com função antioxidante e mudança de sinalização celular (Markovic et al. 2012).

Um mecanismo de atuação alternativo pode ser relacionado com a possibilidade dos compostos fenólicos presentes na dieta poderem aumentar o potencial das defesas endógenas antioxidantes e assim modular o estado *redox* celular, tanto em condições normais como durante processos fisiopatológicos (Rahman et al. 2006).

A composição química, em conjunto com os estudos realizados *in vivo* e *in vitro*, sugerem um papel relevante do dióspiro na proteção contra os radicais livres e na prevenção de doenças em humanos (Gorinstein et al. 1998; Giordani et al. 2011; Direito et al. 2017).

Em resumo, a procura de antioxidantes naturais tem aumentado (Yu et al. 2002) resultado da necessidade de incrementar a capacidade antioxidante endógena via ingestão de alimentos ricos em compostos antioxidantes, com o objetivo de anular ou diminuir um dos fatores de risco no desenvolvimento de doenças crónicas.

O papel relevante do dióspiro na proteção contra os radicais livres tem sido demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* nos últimos anos (Giordani et al. 2011; Heras et al. 2017). O elevado potencial antioxidante dos ácidos fenólicos foi verificado por vários autores (Jung et al. 2005; Park et al. 2008).

Gu *et al.*, utilizou o método HPLC acoplado com espectrometria de massa com ionização por electospray (ESI-MS) para determinar as frações de taninos condensados (ou proantocianidinas, PAs) de elevado peso molecular que constituem o dióspiro (Gu et al. 2008). Este autor referiu que a atividade antioxidante das frações de taninos de elevado peso molecular é significativamente maior do que a da fração de taninos de baixo peso molecular e do que das proantocianidinas das sementes das uvas, pelo que considerou que os taninos condensados de elevado peso molecular são o antioxidante mais importante na polpa do dióspiro (Gu et al. 2008), sendo o teor mais elevado em proantocianidinas nas variedades adstringentes estudadas por Suzuki *et al.* (Suzuki et al. 2005).

Existem poucos estudos das atividades bioativas no dióspiro, especialmente dos diósperos adstringentes pelo que Chen e colaboradores pesquisaram a atividade de captação dos radicais livres, do dióspiro Mopan, através dos métodos de captação de radicais: DPPH (*1,1-diphenyl-2-picryldrazyl*) e ABTS (*2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*) (Chen et al. 2008). Determinaram também o contributo dos compostos fenólicos totais e individuais (catequina, epicatequina, epigalocatequina, ácido clorogénico, ácido cafeico e ácido gálico) na atividade antioxidante apresentada pelo dióspiro Mopan (Chen et al. 2008). Os resultados foram comparados com os resultados obtidos para a maçã, a uva e o tomate, frutos usados como referência para comparação pois as suas propriedades antioxidantes estão muito bem descritas e documentadas (Giovannelli et al. 1999; Leong et al. 2002; Matito et al. 2003; Hagen et al. 2007; Orak 2007; Chen et al. 2008).

Os resultados obtidos neste estudo descrevem que a atividade antioxidante medida para o dióspiro Mopan foi significativamente maior do que a dos frutos utilizados como referência. O ácido gálico mostrou a maior atividade antioxidante de entre os 6 tipos de fenóis testados e o seu conteúdo é o maior de entre os 6 medidos no dióspiro Mopan, presumivelmente sendo o responsável pela capacidade antioxidante superior do dióspiro quando comparada com a maçã, uva e tomate. O conteúdo dos 6 tipos de fenóis catequina, epicatequina, epigalocatequina, ácido clorogénico, ácido cafeico e ácido gálico mostrou estar significativamente correlacionado com a atividade de captação de radicais livres dos 4 frutos, contudo o

conteúdo total dos 6 fenóis não representa mais do 20% do total de fenóis no dióspiro Mopan.

Embora muitos outros compostos naturais, incluindo carotenóides, vitamina E, e vitamina C, possam também contribuir para a atividade antioxidante dos frutos e vegetais, os resultados apresentados por Chen *et al.* sugerem que os compostos fenólicos totais são os principais responsáveis pelas atividades antioxidantes observadas (Chen et al. 2008). Esta ideia está de acordo com o já evidenciado em estudos prévios (Kaur et al. 2002) que mostraram que os compostos fenólicos podem contribuir principalmente para a atividade de captação de radicais livres, destes extratos de frutas e vegetais (Tabela i. 2) (Kaur et al. 2002; Chen et al. 2008).

**Tabela i. 2 - O conteúdo de compostos fenólicos individuais e sua contribuição individual para a atividade antioxidante, que foram calculados com base nas atividades de eliminação de radicais DPPH dos 6 tipos de compostos fenólicos nos 4 frutos testados. Adaptada de (Chen et al. 2008).**

	<u>Dióspiro</u>		<u>Uvas</u>		<u>Maçãs</u>		<u>Tomate</u>	
	1)	2)	1)	2)	1)	2)	1)	2)
<b>C</b>	5,81 ± 0,12	22,021	16,04 ± 0,94	60,795	4,97 ± 0,49	18,837	3,11 ± 0,15	11,788
<b>EC</b>	0,61 ± 0,023	3,009	5,79 ± 0,230	28,56	3,42 ± 0,14	16,87	ND	0
<b>EGC</b>	0,28 ± 0,02	0,883	0,91 ± 0,051	2,869	2,21 ± 0,16	6,967	6,29 ± 0,45	19,828
<b>AG</b>	19,11 ± 0,61	259,033	5,63 ± 0,17	76,314	0,95 ± 0,03	12,877	3,01 ± 0,18	40,8
<b>ACH</b>	3,67 ± 0,07	14,713	1,20 ± 0,02	4,811	14,54 ± 0,71	58,291	1,90 ± 0,06	7,617
<b>AC</b>	2,83 ± 0,07	28,32	ND	0	1,38 ± 0,03	13,81	1,02 ± 0,02	10,207
<b>Total</b>	32,31	327,979	29,57	173,35	27,47	127,651	15,33	90,27

**Legenda:** **1)** conteúdo em composto(s) fenólico(s) (mg/100g peso seco); **2)** atividade antioxidante (eq. Trolox  $\times 10^{-3}$  mmol/100g peso seco). Catequina (C), epicatequina (EC), epigalhocatequina (EGC), ácido clorogénico (ACH), ácido cafeico (AC) e ácido gálgico (AG).

Estudos *in vivo* em que se adicionou dióspiro (o fruto total e não apenas uma parte dele) à alimentação de ratos submetidos a uma dieta rica em colesterol (Gorinstein et al. 2000; Park et al. 2008) mostraram que o dióspiro conseguiu contrariar, em parte, o decréscimo da atividade antioxidante do plasma promovido pela dieta rica em colesterol (Park et al. 2008). Os compostos bioativos do dióspiro responsáveis por este efeito foram descritos como sendo os compostos fenólicos totais (Park et al. 2008).

Os compostos fenólicos do dióspiro são 20 vezes mais potentes *in vitro* do que o clássico antioxidante, vitamina E (Uchida et al. 1990). O elevado potencial

antioxidante dos ácidos fenólicos foi verificado por vários autores (Jung et al. 2005; Park et al. 2008).

Indubitavelmente, são indispensáveis mais estudos para o melhor esclarecimento da ação dos ROS nas funções celulares, em diferentes tipos de células, e o impacto na patologia dos diferentes estados da doença inflamatória (Rahman et al. 2006), tal como devem continuar os esforços para a identificação de antioxidantes novos e mais eficazes que possam ser usados estrategicamente na prevenção e ajuda terapêutica (Rahman et al. 2006; Figueira et al. 2014)

Uma vez que os antioxidantes fisiologicamente eliminam espécies reativas de oxigénio e azoto por transferência do átomo de hidrogénio, os métodos de transferência de átomo de hidrogénio são considerados como fisiologicamente mais relevantes.

A avaliação da atividade antioxidante de um alimento pode basear-se na avaliação de mecanismos relativos ao resgate de espécies reativas de oxigénio e de azoto entre outros. As ROS e RNS são principalmente os radicais peróxido ( $\text{ROO}^\bullet$ ), hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), singuleto de oxigénio ( $^1\text{O}_2$ ), anião superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e de monóxido de azoto ( $\text{NO}^\bullet$ ).

Os métodos mais usados na avaliação da capacidade antioxidante (CAO) nos frutos em geral, incluem ensaios capazes de avaliar a capacidade de resgate de radicais  $\text{ROO}^\bullet$  como o ensaio ORAC (Capacidade de absorção do radical oxigénio) que avalia a atividade de eliminação de radicais da amostra contra os radicais peróxido, que fisiologicamente são os mais importantes, métodos como a técnica de ressonância paramagnética eletrónica (EPR) (do inglês *electron paramagnetic resonance*) que medem a capacidade de inibição e resgate do radical  $^\bullet\text{OH}$ , ensaios FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) que mede o poder de redução do íon ferro, ensaios TRAP (do inglês - *Trapping Antioxidant. Parameter*) que avaliam a capacidade antioxidante de uma amostra e, ainda, técnicas que possibilitam uma avaliação capacidade de inibição da oxidação de LDL, por radicais  $\text{ROO}^\bullet$ , entre outros. O método HORAC mede a atividade de metalo-quelante de antioxidantes sob as condições de reações Fenton-like e, conseqüentemente, a capacidade de proteger contra a formação de radicais hidroxilo. Os métodos escolhidos abarcam diferentes aspetos da ação antioxidante e dão uma visão abrangente sobre o potencial antioxidante do extrato investigado. Isto é importante, uma vez que é recomendado o uso de mais do que um ensaio de atividade antioxidante para o entendimento detalhado dos princípios das propriedades antioxidantes dos antioxidantes (Ciz et al. 2010).

A avaliação das propriedades antioxidantes dos compostos, nomeadamente, dos flavonóides podem ser realizados *in vitro* em sistemas não celulares ou celulares. Quando os estudos são realizados em sistemas celulares, isto permite a previsão da atividade de flavonóides num ambiente que se assemelha mais as condições fisiológicas, ou seja, o seu efeito na modulação do fenómeno da explosão oxidativa (Ribeiro et al. 2015). Recentemente, investigadores da Universidade do Porto estudaram a modulação da explosão oxidativa em neutrófilos humanos por diversos flavonóides, nomeadamente a quercetina, um flavonol presente nos frutos de *Rubus idaeus* L. (Ribeiro et al. 2013). Os flavonóides foram estudados em presença de neutrófilos humanos que foram estimulados com forbol-12-miristato-13-acetato, e para a avaliação das ROS libertadas foram usadas técnicas de fluorescência e de quimioluminescência (Ribeiro et al. 2013). Segundo Ribeiro *et al.* (Ribeiro et al. 2013) todos os flavonóides testados evidenciaram capacidade de modular a explosão oxidativa dos neutrófilos.

A produção de ROS e de RNS por neutrófilos pode ser avaliada *in vitro* por diversos métodos de deteção, nomeadamente através de técnicas de fluorescência e quimioluminescência (Freitas et al. 2009; Ribeiro et al. 2013). Estudos *ex vivo* realizados em neutrófilos humanos com derivados da pirazolona e com paracetamol evidenciaram a inibição da explosão oxidativa nestas células e o resgate de ROS libertados (Costa et al. 2006; Freitas et al. 2013).

### **1.2.2 Atividade Anti-inflamatória**

A inflamação é um mecanismo de defesa do sistema imunitário através do qual o corpo combate infeções ou agressões (traumas por agentes físicos ou químicos, corpos estranhos, bactérias, vírus e outros agentes patogénicos) (Yoon et al. 2005; Serhan et al. 2010). Os sintomas clínicos que definem a inflamação são conhecidos como rubor, calor, edema e dor (Yoon et al. 2005). O rubor e o edema que ocorrem no local são resultado do aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos, aumentando a sua permeabilidade, para permitir mais infiltração de leucócitos e de plasma a partir do sangue para os tecidos lesionados para combaterem os agentes patogénicos. Esta reação é classificada como uma inflamação aguda que, sendo autocontrolada, desaparece e a cura começa (Yoon et al. 2005).

Uma resposta inflamatória é benéfica quando é autolimitada e envolve a inibição da expressão de proteínas pró-inflamatórias, o estímulo de proteínas anti-inflamatórias e a inversão das alterações vasculares que induzem o processo inicial de recrutamento de células imunológicas (Zhou et al. 2007).

A regulação da resposta inflamatória aguda é conseguida porque existem numerosos fatores anti-inflamatórios que são expressos naturalmente. No entanto se, por qualquer razão a inflamação aguda não for auto controla, evolui para inflamação crónica.

Durante o processo inflamatório as células libertam radicais livres e espécies reativas de oxigénio e de azoto podendo entrar em stresse oxidativo, provocando danos celulares. Estes ROS e RNS estão direta e indiretamente envolvidos na inflamação, pois induzem a ativação de fatores de transcrição levando à formação e libertação de mediadores químicos como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas, que continuam a estimular o processo inflamatório e a produção de mais radicais livres. Assim acontece um ciclo com amplificação da resposta inflamatória (Huang et al. 2004; Boots et al. 2008). Deste modo, de um mecanismo de defesa benigno pode evoluir-se para doenças inflamatórias crónicas e a ativação inapropriada ou excessiva, bem como a falha na inativação deste mecanismo de defesa, podem ter efeitos graves na saúde humana (Yoon et al. 2005). Esses efeitos resultam em determinadas doenças ou situações, em que a resposta inflamatória pode ser exagerada ou inadequada e mantida sem qualquer benefício aparente e até com consequências adversas, originando uma inflamação crónica (Furst et al. 2007) que está na génese de doenças inflamatórias crónicas como, por exemplo, a artrite reumatoide e a colite ulcerosa, entre outras, e pode ser progenitora de progressão dos tumores, pois promove um microambiente em torno dos tumores que promovendo a proliferação, sobrevivência e migração (Coussens et al. 2002) permite a progressão maligna de células mutadas/transformadas (Yadav et al. 2010).

Em determinadas doenças ou situações, a resposta inflamatória pode ser exagerada ou inadequada e mantida sem qualquer benefício aparente e até com consequências adversas, originando uma inflamação crónica (Furst et al. 2007).

Como exemplo disso temos a incidência e a prevalência mundiais das doenças inflamatórias intestinais (DII) como, por exemplo, a colite ulcerosa (CU) e a doença de Crohn (DC), doenças inflamatórias crónicas que aumentaram drasticamente ao longo do tempo (Rogler 2009; Molodecky et al. 2012; Burisch et al. 2014), cuja evolução, muitas vezes, termina em cancro colorretal.

Do mesmo modo as doenças reumáticas em geral e a artrite reumatoide em particular aumentam o risco de morte e, especialmente, em condições inflamatórias que estão implicadas em complicações das doenças inflamatórias subjacentes, (Toledano et al. 2012) e cuja prevalência tem vindo a aumentar e chega a atingir 1% da população mundial (Tobón et al. 2010).

Outras doenças crónicas, como doenças pulmonares e cardiovasculares, doenças neurológicas, diabetes e doenças autoimunes, apresentam um mesmo quadro

de aumento da resposta inflamatória o qual é, frequentemente, observado numa fase muito precoce da patologia antes mesmo de ser diagnosticada (Yoon et al. 2005; Santangelo et al. 2007; Harikumar et al. 2008).

Alguns estilos de vida nas sociedades modernas podem ser considerados agressivos para o organismo que responde com estados pró-inflamatórios (Esposito et al. 2006). Hábitos alimentares que incluem o consumo de dietas extremamente calóricas e ricas em açúcares, ácidos gordos saturados e *trans* originam um estado pró-inflamatório persistente (Esposito et al. 2006; Rahman et al. 2006), em que se verifica o aumento dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de neutrófilos e stresse oxidativo (Esposito et al. 2006; Rahman et al. 2006).

Na resposta inflamatória aguda há uma complexa orquestração de eventos envolvendo perda de água, sais e proteínas do compartimento vascular, ativação de células endoteliais, interações de adesão entre leucócitos e a vasculatura do endotélio, recrutamento de leucócitos, ativação dos macrófagos dos tecidos, ativação de plaquetas e a sua agregação, ativação do sistema de complemento, sistema de coagulação e fibrinolítico e libertação de proteases e oxidantes pelas células fagocitárias, podendo todos em conjunto ajudar a lidar com o estado de agressão.

Qualquer que seja a agressão, a primeira resposta *in vivo*, da resposta inflamatória aguda é a adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular (“marginização”). A reversão da resposta inflamatória implica que os leucócitos sejam removidos por meio do sistema linfático ou por apoptose (morte/suicídio celular programada) e que a resposta inflamatória aguda em curso termine.

A resposta inflamatória aguda é exuberante nas primeiras horas ou dias e depois vai gradualmente diminuindo, a não ser que o agente agressor não possa ser eliminado por fagocitose.

A fim de levar a cabo o seu papel na inflamação aguda, os neutrófilos na corrente sanguínea detetam primeiramente mediadores químicos (quimioatratores) através de recetores da membrana celular. Em seguida, os neutrófilos ligam-se ao endotélio ativado através de diversas interações envolvendo moléculas de adesão e seus recetores. Depois de passar através de vénulas pós-capilares (diapedese), os neutrófilos migram para locais de inflamação que reconhecem como alvo, fagocitam-no e finalmente, destroem-no. Eventualmente, os neutrófilos que participam na inflamação aguda devem ser removidos do local da inflamação quando a inflamação está resolvida (Serhan et al. 2010).

Vários eventos intravasculares estão envolvidos no desencadeamento desta resposta. A primeira mudança é a ativação de células endoteliais da zona lesada, por mediadores inflamatórios produzidos localmente, entre os quais as citocinas IL-1 e



TNF- $\alpha$ . Ativadas, estas células expressam moléculas de adesão para leucócitos, como a selectina-P e -E, integrinas e as VCAM-1 e as ICAM-1 e ICAM-2 (Serhan et al. 2010). Células endoteliais ativadas também atuam na produção e libertação de citocinas e quimiocinas que vão quimiotaticamente atrair e ativar células polimorfonucleares (PMNs) para que estas adiram ao endotélio antes da sua transmigração para dentro do compartimento extravascular (Serhan et al. 2010).

Um segundo evento é a abertura reversível das junções apertadas (*tight junctions*) das células endoteliais, o que permite a saída de proteínas e fluidos dos vasos para os tecidos. (Serhan et al. 2010).

Outros mecanismos que contribuem para o processo inflamatório incluem a produção de uma variedade de citocinas (Hogan et al. 2008), libertação de mediadores lipídicos pro-inflamatórios, como os leucotrienos (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) e prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) (Cruvinel et al. 2010).

Os mediadores da resposta inflamatória são variados e derivam de precursores plasmáticos e celulares, podendo ser classificados de acordo com suas propriedades bioquímicas. Entre os vários mediadores da resposta inflamatória, incluem-se: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, quimiocinas e enzimas proteolíticas, mediadores solúveis da inflamação derivados de componentes plasmáticos (bradicina, sistema do complemento, mediadores da coagulação), mediadores solúveis da inflamação derivados de células (maioritariamente PMNs) tais como a histamina, monóxido de azoto, eicosanóides derivados do ácido araquidónico (leucotrienos e prostaglandinas), citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) e variadas interleucinas como a IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 e espécies reativas de oxigénio e azoto (anião superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrogénio, monóxido de azoto e peroxinitrito).

Os eicosanóides estão envolvidos na modulação da intensidade e duração da resposta inflamatória (Lewis et al. 1990; Tilley et al. 2001), sendo o seu precursor principal o ácido araquidónico (AA) que existe em quantidade relativamente elevada nos fosfolípidos de membrana das células envolvidas na inflamação (Levy et al. 2001; Gewirtz et al. 2002; Vachier et al. 2002; Serhan et al. 2003) e é libertado pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub> e então metabolizado. Quando a via de metabolização é a da ciclooxigenase (COX), há a formação de prostanóides como as prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs). Estas são substâncias muito potentes mesmo estando em concentrações muito baixas, mas com uma meia-vida muito curta (menor que 1 minuto), sendo degradados rapidamente a metabolitos com fraca ou nenhuma atividade (Konig et al. 1997). As prostaglandinas compreendem muitos subtipos, que possuem diferentes funções. A prostaglandina E (PGE) tem sido amplamente investigada, em função do seu papel como imunomoduladora. Entre os tromboxanos, apenas o tromboxano A (TXA) é ativo. Todos metabolitos formados a partir de ácido araquidónico recebem um sufixo "2" (PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PCI<sub>2</sub>) enquanto que os oriundos do

ácido eicosapentaenóico (EPA) recebem o sufixo “3” (PGE<sub>3</sub>, TXA<sub>3</sub>, PCI<sub>3</sub>) (Fig. i. 5) (Calder 2010).

Uma outra via de formação de eicosanóides é a via da lipooxigenase, a qual leva a síntese de leucotrienos.

Por exemplo, a PGE<sub>2</sub> aumenta a permeabilidade vascular, a vasodilatação, o fluxo de sangue e piroxia do local, e potencia a dor causada por outros agentes. Além disso, promove a produção de certas metaloproteinasas de matriz que podem causar danos e destruição local de tecido (p. ex., no osso na artrite reumatoide) (Tabela i. 3) (Calder et al. 2013).

Embora seja geralmente considerado que os eicosanóides derivados do AA são pró-inflamatórios (Calder 2009) a PGE<sub>2</sub>, por exemplo, inibe a produção de duas das clássicas citocinas pró-inflamatórias, o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina (IL-1) (Calder 2009).

Resolvinas são uma família de mediadores lipídicos produzidos a partir do ácido eicosapentaenóico e o ácido docoso-hexaenóico (DHA). As protetinas são produzidas a partir de DHA. A síntese de resolvinas e protetinas envolve as vias da COX e da LOX (Serhan et al. 2000; Serhan et al. 2000; Serhan et al. 2002; Serhan et al. 2008). As resolvinas e protetinas mostraram ser anti-inflamatórias e ajudar na resolução da inflamação em estudos *in vitro* e em modelos animais de inflamação nomeadamente em artrite (Lima-Garcia et al. 2011), colite (Arita et al. 2005) e asma (Aoki et al. 2008; Haworth et al. 2008).

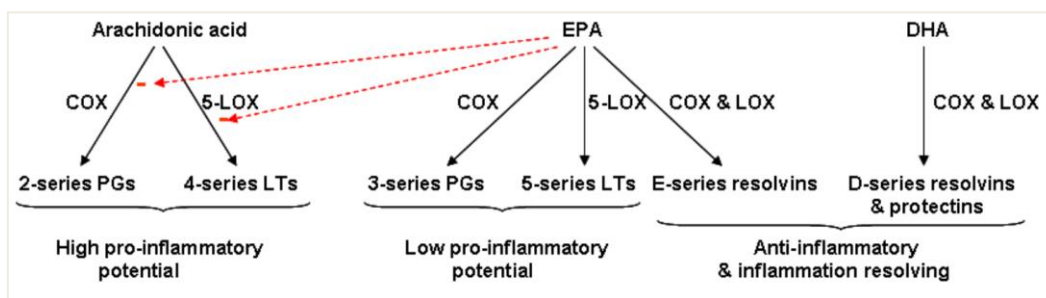


Figura i. 5 - Visão geral de síntese e ações de mediadores lipídicos produzidos a partir do ácido araquidônico, EPA e DHA. COX, ciclooxygenase; LOX, lipooxigenase; LT, leucotrieno; PG, prostaglandina. Adaptado de (Calder 2010).

**Tabela i. 3 - Papéis dos mediadores lipídicos nos passos da inflamação. Adaptada de (Serhan et al. 2010).**

Acção	Mediadores lipídicos envolvidos
Vasoconstrição	PGF2 $\alpha$ , TxA2, LTC4, LTE4
Vasodilatação (eritema)	PGI2, PGE2, PGD2, LXA4, LXB4, LTB4
Edema (inchaço)	PGE <sub>2</sub> , LTB <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub>
Quimiotaxia, adesão de leucócitos	LTB <sub>4</sub> , HETE, LXA <sub>4</sub> , LXB <sub>4</sub>
Aumento da permeabilidade vascular	LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub>
Dor e hiperalgesia	PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub> , LTB <sub>4</sub>
Calor local e febre sistémica	PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub> , LXA <sub>4</sub>
Troca de classe de eicosanóides	PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub>
Estímulo de resolução	Lipoxinas, resolvinas e protectinas

Em contraste com as ações anti-inflamatórias de ácidos gordos n-3, os ácidos gordos saturados parecem promover a inflamação, reduzindo a ativação do NF- $\kappa$ B e aumentando a expressão dos genes inflamatórios. Estudos em humanos demonstram que os ácidos gordos *trans* são pró-inflamatórios, talvez até mais do que ácidos gordos saturados. Estas considerações estabelecem que os ácidos gordos *trans* e saturados promovem maiores respostas inflamatórias e que os ácidos gordos n-3 são anti-inflamatórios. Os múltiplos mecanismos envolvidos na interação de ácidos gordos com células inflamatórias criam um quadro complexo. Atualmente, estes múltiplos mecanismos de ação não estão completamente integrados, mas parece provável que as alterações na composição da membrana celular seja um evento chave uma vez que tais alterações podem influenciar os perfis de mediadores lipídicos, a função do recetor de membrana e os processos de sinalização celular (Calder et al. 2013).

As espécies reativas de oxigénio e azoto produzidas durante o processo inflamatório conduzem a um fenómeno de stresse oxidativo, provocando lesão celular. Estas espécies reativas estão direta e indiretamente envolvidas na inflamação pois induzem a ativação de fatores de transcrição levando à formação e libertação de mediadores químicos como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas, que continuam a estimular o processo inflamatório e a produção de mais espécies reativas, levando a um ciclo com amplificação da resposta inflamatória. Se a inflamação pode estar na origem do stresse oxidativo, muitos estudos evidenciam que este pode também induzir a inflamação, criando-se assim uma dependência inter-relacionada (Huang et al. 2004; Boots et al. 2008).

As espécies reativas de oxigénio têm um papel importante no funcionamento adequado da resposta imune inata, na ativação da resposta imunitária adaptativa, bem como na regulação negativa de inflamação e na atividade do sistema imunitário. A desregulação de funções do sistema imunológico pode levar a doenças caracterizadas por inflamação, onde se incluem doenças crónicas. As ações dos ROS foram implicadas em doenças, incluindo diabetes, doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, cancro, particularmente num ambiente em que a geração de ROS ou a destoxificação se tornou desequilibrada (Seifried et al. 2007).

Durante a resposta inicial à invasão por um agente patogénico, a ativação da resposta imune inata, caracterizada pela geração de ROS dentro de células fagocíticas, tais como macrófagos e neutrófilos, é um acontecimento crítico na iniciação de fagocitose e subsequente destruição desses microrganismos (Bogdan et al. 2000; Droge 2002). Na produção de níveis elevados de aniões superóxido e de peróxido de hidrogénio por NADPH-oxidase, a explosão oxidativa (*burst oxidativo*) é necessário para a destruição de agentes patogénicos (Segal et al. 2000).

A explosão oxidativa dos neutrófilos é caracterizada pela produção maciça de ROS num ambiente inflamatório e desempenha um papel fundamental na defesa contra agentes patogénicos ambientais. Num ambiente inflamatório, os neutrófilos e macrófagos ativados produzem grandes quantidades de radical superóxido e outros ROS através da isoforma fagocítica de NAD(P)H oxidase (Keisari et al. 1983). Neutrófilos e macrófagos ativados produzem também oxigénio singlete através de reações envolvendo a NAD(P)H oxidase ou a mieloperoxidase (Valko et al. 2007).

A explosão oxidativa é uma das maiores armas do nosso organismo contra microrganismos invasores. Existem evidências que sugerem que determinados compostos podem regular a produção de espécies reativas de oxigénio pelas células humanas (Bochkov et al. 2017). A modulação da explosão oxidativa dos neutrófilos pode revelar-se útil a prevenir ou minimizar os efeitos nefastos de processos inflamatórios não controlados ou sustentados (Ribeiro et al. 2013).

Também foram desenvolvidos mecanismos de sinalização que utilizam ROS para iniciar os processos que permitem que as células sobrevivam à exposição ao stresse oxidativo dentro de certos limites de tolerância, mas também quando o stresse e dano se tornam muito grandes, para garantir a morte celular. Como estas vias são iniciadas e controladas por ROS são consideradas o cerne da sinalização redox e da resposta oxidativa (Soberman 2003).

Um grande número de funções fisiológicas é controlado por vias de sinalização redox, como por exemplo: i) produção redox regulada de NO; (ii) a produção de ROS pela NAD(P)H oxidase fagocítica (*burst oxidativo*); (iii) produção de ROS por NAD(P)H

oxidases nas células não fagocíticas; (iv) regulação do tónus vascular e outras funções reguladoras de NO; (v) a produção de ROS como um sensor para alterações da concentração de oxigénio; (vi) a regulação redox de adesão celular; (vii) a regulação redox de respostas imunitárias; (viii) apoptose induzida por ROS e outros mecanismos. O NO é gerado em tecidos biológicos por sintases específicas de monóxido de azoto (NOSs) que existem em três isoformas, NOS neuronal (nNOS), NOS indutível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS) (Bredt et al. 1991; Lamas et al. 1992; Xie et al. 1992). Muitos tecidos expressam uma ou mais destas isoformas. Enquanto que a nNOS e eNOS estão constitutivamente expressas e a sua atividade é regulada pela concentração de cálcio intracelular (Levy et al. 2001; Gewirtz et al. 2002; Vachier et al. 2002; Serhan et al. 2003). A iNOS é indutivamente expressa em macrófagos após estimulação por lipopolissacarídeos, citocinas e outras substâncias. A expressão de iNOS é regulada ao nível da transcrição e pós-transcrição por vias de sinalização envolvendo a transcrição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*), ou proteínas cinase ativadas por mitogénios (MAPKs) (Valko et al. 2007).

Os ROS produzidos durante um processo inflamatório desempenham um papel chave no reforço da inflamação através da ativação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B e a AP-1 (*activator protein 1*) e da acetilação e desacetilação das histonas nucleares, factores de transcrição já identificados como tendo uma importância crucial no desenvolvimento de várias doenças inflamatórias (Rahman et al. 2006).

A ativação do NF- $\kappa$ B é um elemento central na imunidade levando à expressão de variados tipos de células e expressão de genes que respondem a estímulos específicos. Para além disso, a ativação e proliferação dos linfócitos T é fortemente dependente do potencial redox do microambiente extracelular. A diferenciação de linfócitos T para Th1, Th2 e linfócitos T reguladores parece depender também da ativação de cascatas de sinalização redox-sensíveis (Gostner et al. 2013).

Os neutrófilos constituem a primeira linha da imunidade inata nos seres humanos. Utilizam várias estratégias para isolar e eliminar os microrganismos, tais como fagocitose, desgranulação, e a formação de armadilhas extracelulares (NETs). Tem sido bem documentado, que a produção de espécies reativas de oxigénio e azoto (ROS e RNS) é essencial no ciclo de vida de um fagócito polimorfonuclear. Estes compostos, devido à elevada reatividade atuam como poderosos fatores antimicrobianos no processo de eliminação de patógenos e podem também modular a resposta imunológica. Por outro lado, a quantidade excessiva de espécies reativas pode ter um efeito prejudicial sobre os tecidos do hospedeiro e sendo que vários marcadores de stresse oxidativo são detetáveis em muitas doenças, mostrando a importância da manutenção do equilíbrio entre a formação e a remoção de ROS/RNS (Manda-Handzlik et al. 2015). Em condições patológicas, grandes concentrações de

ROS/RNS podem levar a mudanças permanentes na transdução de sinal e expressão genética (Valko et al. 2007).

A maioria das células tem demonstrado potencial para desenvolvimento de uma pequena explosão oxidativa produzindo baixas concentrações de ROS quando são estimuladas por variadas citocinas, fatores de crescimento e hormonas (Thannickal et al. 2000) sendo que as citocinas são dos fatores mais diretamente envolvidos na indução da produção de ROS em células não fagocíticas (Chapple 1997).

Isto levou à hipótese de que a iniciação e/ou funcionamento de várias vias de transdução de sinal dependem da ação de ROS como moléculas de sinalização que podem atuar em diferentes níveis da cascata de transdução de sinal. Provavelmente, o efeito mais significativo dos ROS em vias de sinalização foi observado nas vias das proteínas cinase ativadas por mitogénio (MAPK) (Sun et al. 1996). Os ROS podem, portanto, desempenhar um papel fisiológico muito importante como mensageiros secundários (Lowenstein et al. 1994), regulando importantes funções celulares tais como a proliferação e a morte celular programada (Valko et al. 2007).

Muitos trabalhos suportam a evidência de que os antioxidantes alimentares desempenham um papel importante na prevenção de muitas doenças humanas nomeadamente as que têm na sua génese fenómenos oxidativos e ou inflamatórios (p.ex., cancro, arteriosclerose, acidente vascular cerebral, a artrite reumatoide, neurodegeneração e diabetes) (Fang et al. 2002).

Dado que as espécies reativas estão implicadas na patogénese de doenças inflamatórias crónicas, as intervenções terapêuticas baseadas nos efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos podem ser uma alternativa para o tratamento ou prevenção dessas doenças (Rahman et al. 2006).

Os compostos fenólicos medeiam a modulação da sinalização celular sendo por isso capazes de influenciar vários processos celulares como a sinalização, proliferação, apoptose, balanço redox, diferenciação, etc. (Rahman et al. 2006). Entre outros processos, regulam a ativação do NF- $\kappa$ B, a estrutura da cromatina, a biossíntese de glutathiona, a ativação do fator redox nuclear (NrF2), a captura de ROS diretamente ou por via da atividade da glutathiona peroxidase, e como consequência regulam os genes envolvidos no processo inflamatório (Rahman et al. 2006). Consequentemente, dados sugerem que os compostos fenólicos da dieta podem funcionar como modificadores das vias de transdução de sinal para exercer os seus efeitos biológicos benéficos (Rahman et al. 2006; Yokozawa et al. 2014).

A investigação sobre os mecanismos de ação destas moléculas elucidaram o facto de os compostos fenólicos não exercerem os seus efeitos apenas como captadores de radicais livres, mas como podendo modular os processos de sinalização

celular durante a inflamação ou podendo eles próprios servir de agentes sinalizadores (Aggarwal et al. 2004; Yokozawa et al. 2007).

Um grande número de estudos entre 2000 e 2016, entre ensaios clínicos e investigação experimental elucidaram o potencial anti-inflamatório de flavonóides, atribuindo a sua capacidade de atenuar a inflamação não só aos efeitos antioxidantes, mas também à capacidade de modular várias vias de sinalização intracelular como as do NF- $\kappa$ B, JAK-STATs, AP-1, PPAR, Nrf2 e MAPKs. Apenas entre 2011 e 2015 foram publicados 126 estudos sobre o potencial anti-inflamatório dos flavonóides da dieta e seus efeitos de modulação sobre o processo inflamatório e as vias de sinalização intracelulares (Chen et al. 2017).

Dados epidemiológicos e experimentais evidenciam que os compostos fenólicos ingeridos na dieta podem ter atividade anti-inflamatória, pois mostraram que as populações que consomem alimentos ricos em compostos fenólicos específicos têm menor incidência de doenças inflamatórias crônicas (Yoon et al. 2005). Estudos *in vivo* em modelos animais demonstraram a inibição de alguns dos mecanismos de inflamação bem como efeito sobre os mecanismos de iniciação tumoral por parte de vários destes compostos (Yoon et al. 2005). Mesmo o consumo alimentar de pequenas quantidades de compostos fenólicos teve um efeito significativo na redução do impacto de doenças inflamatórias crônicas em modelos animais, bem como nas populações que consomem alimentos ricos nesses compostos (Yoon et al. 2005).

Nestes estudos os flavonóides da alimentação que modulam as vias de sinalização associadas à inflamação, regulando a expressão de mediadores pró-inflamatórios. A relação entre a estrutura dos flavonóides e sua atividade anti-inflamatória também é evidenciada, na esperança de oferecer informações úteis para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-inflamatórios baseados em fontes naturais (Chen et al. 2017).

A investigação dos mecanismos de ação destas moléculas elucidaram o facto dos compostos fenólicos não exercerem, meramente, os seus efeitos como captadores de radicais livres, mas como podendo modular os processos de sinalização celular durante a inflamação ou podendo eles próprios servir de agentes sinalizadores (Aggarwal et al. 2004).

Os flavonóides da dieta têm a capacidade de atenuar a inflamação, visando diferentes vias de sinalização intracelular desencadeadas por NF- $\kappa$ B, AP-1, PPAR, Nrf2 e MAPKs. A identificação das principais características estruturais necessárias para a modulação dessas vias relacionadas à inflamação (padrão de hidroxilação, dupla ligação C2=C3) tem um papel importante a desempenhar no desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios (Chen et al. 2017).

Os compostos fenólicos apresentam desta forma um potencial elevado para utilização farmacológica no contexto dos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (Rahman et al. 2006; Figueira et al. 2014). A catequina, por exemplo, foi identificada como um composto ativo do extrato aquoso do fruto, dióspiro, com atividade anti-inflamatória alérgica num modelo de inflamação alérgica (Kim et al. 2013).

Em termos terapêuticos o ácido acetilsalicílico e outros fármacos anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs), há muito que são usados como terapêutica da inflamação (Yoon et al. 2005). Os inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 (COX-2) foram desenvolvidos e recomendados para o tratamento da artrite reumatoide (AR) e da osteoartrite (OA) (Yoon et al. 2005), no entanto podem ter efeitos adversos graves em determinados doentes (Yoon et al. 2005). Assim, é necessário aparecerem novas moléculas com efeito terapêutico semelhante mas com menores efeitos secundários.

Dado que as abordagens terapêuticas e cirúrgicas convencionais não foram capazes de controlar totalmente a incidência e a progressão de muitas doenças inflamatórias, existe uma necessidade urgente de descobrir substâncias mais seguras como alternativa para a gestão terapêutica dessas doenças (Yoon et al. 2005),

No entanto para além de se pensar em novos tratamentos é de toda a utilidade usar uma estratégia de prevenção do desenvolvimento e progressão destas doenças. Uma das medidas preventivas amplamente recomendada à população prende-se com o aumento do consumo de frutas e vegetais, naturalmente ricos em compostos bioativos que podem contribuir para a redução do risco de doenças associadas com o stress oxidativo, devido à grande variedade de antioxidantes que estes compostos contêm (Esposito et al. 2006; Rahman et al. 2006; Parada et al. 2007). Este efeito antioxidante deve-se principalmente aos compostos fenólicos presentes nestes alimentos (Esposito et al. 2006; Rahman et al. 2006) que, concomitantemente, têm vindo a demonstrar efeito anti-inflamatório (Impellizzeri et al. 2014; Oliviero et al. 2015; Serra et al. 2018).

Têm sido atribuídas ações anti-inflamatórias a alguns compostos fenólicos que têm vindo a receber uma atenção considerável por parte da população em geral e da comunidade científica em particular. 12 das 40 moléculas anti-inflamatórias aprovadas entre 1983 e 1994 derivaram ou basearam-se em produtos naturais (Cragg et al. 1997). Existe um grande potencial para que os compostos fenólicos da dieta se tornem a próxima geração de fatores dietéticos com efeitos na saúde ao nível do controlo da inflamação, para além dos fármacos sintéticos que já existem para esse efeito. Estes compostos podem ainda fornecer um excelente modelo para o desenvolvimento de compostos quimiopreventivos mais efetivos e seguros no futuro (Yoon et al. 2005).



Têm sido observados efeitos de inibição dos compostos fenólicos na expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e da produção de prostanóide e metaloproteinase (Scoditti et al. 2012) conhecidas pelo desempenho de um papel crucial na angiogénese, um processo patogénico chave associado não só a doenças vasculares ateroscleróticas e cancro, mas também com doenças articulares inflamatórias crónicas (Oliviero et al. 2015).

Os compostos fenólicos medeiam a modulação da sinalização celular sendo por isso capazes de influenciar vários processos celulares como a sinalização, proliferação, apoptose, balanço redox, diferenciação, etc. (Rahman et al. 2006). Adicionalmente, modelam a ativação do NF- $\kappa$ B, a estrutura da cromatina, a biossíntese de glutathione, a ativação do fator *redox* nuclear (Nrf2), a captura de ROS diretamente ou por via da atividade da glutathione peroxidase e, como consequência, regulam os genes envolvidos na inflamação em macrófagos e células epiteliais pulmonares (Rahman et al. 2006), e os compostos fenólicos da dieta podem funcionar como modificadores das vias de transdução de sinal para exercer os seus efeitos biológicos benéficos (Rahman et al. 2006).

A atividade anti-inflamatória dos compostos ou extratos pode ser determinada usando modelos animais de inflamação aguda e inflamação crónica. Como exemplos podemos nomear o modelo do edema da pata do rato induzido por carragenina, usado no estudo de inflamação aguda local, modelos de inflamação sistémica como, p. ex. os modelos de choque séptico induzido por lipopolissacarídeo (LPS) e de isquémia-reperfusão de órgãos como coração, fígado, pulmão ou rim e, finalmente em modelos de inflamação crónica como sendo os modelos de artrite reumatoide e o modelo de colite ulcerosa, entre outros (Bendele et al. 1999; Greten et al. 2004; Murch et al. 2006; Sepodes et al. 2006; Bignotto et al. 2009; Alzabin et al. 2011).

### **1.3 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos**

Embora seja verdade que à presença de compostos bioactivos na dieta estão ligados aos benefícios acima mencionado, a sua repercussão na saúde humana depende principalmente do estado bioquímico em que se encontram quando atingem a corrente sanguínea e conseqüentemente, os tecidos. O próprio processo digestivo leva a uma série de mudanças nos macro e micronutrientes condicionando sua bioacessibilidade e biodisponibilidade final (Parada et al. 2007).

A bioacessibilidade inclui toda a sequência de eventos que ocorrem durante a transformação digestiva do alimento em material que pode ser assimilado pelo corpo, a absorção/assimilação pelas células do epitélio intestinal e, por último, o metabolismo pré-sistémico (tanto intestinal como hepático) (Fernandez-Garcia et al. 2009).

A biodisponibilidade (que engloba os eventos referentes à biacessibilidade e os da bioatividade) dos compostos da dieta em geral, e os fitoquímicos em particular, está dependente da quantidade consumida, da sua estabilidade digestiva, da sua libertação da matriz alimentar e a eficiência da passagem trans-epitelial. O melhor caminho para determinar os benefícios decorrentes da ingestão de alimentos e da sua biodisponibilidade, consiste em submeter o produto à digestão gastrointestinal *in vivo*, apesar de todos os inconvenientes éticos, médicos, financeiros e períodos longos de tempo de observação, especialmente quando se refere a humanos (Heras et al. 2017)

O estudo dos mecanismos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação (ADME) é fundamental para compreender os efeitos observados (Manach et al. 2004; Yoon et al. 2005).

A absorção e o metabolismo dos constituintes alimentares que possuem grupos fenólicos são determinados pela estrutura química, grau de glicosilação/acilação, conjugação com outros grupos fenólicos, tamanho da molécula, grau de polimerização dos compostos e sua solubilidade. A grande diversidade deste grupo de compostos e o facto de existirem em matéria vegetal como uma mistura complexa de compostos fenólicos, levantam grandes dificuldades ao estudo da biodisponibilidade e efeitos biológicos associados (Bravo 1998).

A estrutura química dos compostos fenólicos determina ainda a velocidade e o grau de absorção intestinal e a natureza dos metabolitos em circulação no plasma (Scalbert et al. 2000). Devido à sua hidrofília, os flavonóides glicosilados penetram a membrana celular com dificuldade (Chen et al. 2017). Os flavonóides agliconas e flavonóides glicosilados são absorvidos no intestino delgado, contudo são rapidamente transformados em derivados metilados, glucoronidados ou sulfurados (Das et al. 1969).

Muitos flavonóides da dieta provaram ser potentes agentes antioxidantes em modelos *in vitro* mas é menos provável que *in vivo* ocorra uma atividade antioxidante semelhante. Como já mencionado, após a ingestão, os flavonóides sofrem biotransformação no intestino delgado e no fígado (deglicosilação, oxidação, conjugação, metilação) e também no intestino grosso (clivagem do anel, quebra de ligações duplas, descarboxilação). Consequentemente, pouco do flavonóide ingerido pode ser detetado no plasma após a ingestão, sendo os seus metabolitos os predominantes na circulação sistémica e nos tecidos. Os metabolitos de flavonóides têm uma capacidade antioxidante mais baixa do que as moléculas ingeridas e, além disso, alguns deles (metabolitos com fração livre de catecol e/ou grupo hidroxilo livre na posição C-3) mostraram poder ter efeitos pró-oxidantes (aumento na produção de radicais peróxido de hidrogénio e anião superóxido) (Prochazkova et al. 2011), o que nos leva a pensar que os potenciais efeitos benéficos estarão dependentes das doses ingeridas.

Estudos de biodisponibilidade em humanos mostraram que as quantidades de compostos fenólicos encontrados intactos na urina variam de composto fenólico para composto fenólico (Scalbert et al. 2000).

Considerando a complexidade dos processos de transformação metabólica e absorção dos compostos fenólicos e os aspetos ainda pouco compreendidos da biodisponibilidade, continua a ser premente responder a questões como: que dose de compostos fenólicos deve ser tomada? Quais as alterações metabólicas pós-absorção que tornariam os compostos fenólicos mais bioativos? Como a maioria dos estudos que demonstram os efeitos benéficos dos compostos fenólicos são *in vitro*, doses semelhantes nos animais produzirão efeitos similares? (Rahman et al. 2006).

As proantocianidinas são compostos fenólicos com estruturas poliméricas que poderão ser absorvidas, como comprova a deteção de formas triméricas em soro de rato (Serra et al. 2010), podem sofrer reações de metilação, glucoronidação e sulfatação (Blade et al. 2010) ou podem não ser absorvidas e exercer efeitos locais no trato gastrointestinal neutralizando compostos oxidantes e carcinogénicos, ou ser metabolizadas por microrganismos do cólon produzindo ácidos carboxílicos hidroxilados (van't Slot et al. 2009).

Durante a digestão no intestino delgado, as proantocianidinas de elevado peso molecular, podem formar complexos com proteínas, amido e enzimas digestivas incluindo pectinase, amilase, lipase, protease e  $\beta$ -galactosidase (Chung et al. 1998), resultando na formação de complexos menos digestíveis. As interações são do tipo ligações por pontes de hidrogénio, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e covalentes, originando compostos menos solúveis e a acessibilidade a enzimas também diminui (Goel et al. 2005). Cerca de 95% das proantocianidinas são libertadas da matriz alimentar pela ação de enzimas bacterianas no intestino grosso (Saura-Calixto et al. 2007).

No entanto, acredita-se que as proantocianidinas podem exercer os seus efeitos biológicos de duas maneiras diferentes: (i) como uma estrutura complexa não absorvível, com propriedades de ligação que podem produzir efeitos locais no trato gastrointestinal (antioxidante, eliminação de radicais, antimicrobiana, antiviral, antimutagénica e efeitos antinutricionais), ou (ii) como proantocianidinas absorvíveis (provavelmente de baixo peso molecular) e metabolitos absorvíveis a partir da fermentação colónica de taninos que podem produzir efeitos sistémicos em vários órgãos (Haslam 1996).

Outros autores sugerem que as proantocianidinas podem exercer as suas propriedades biológicas de três formas diferentes: (i) por complexação com iões metálicos; (ii) por meio de atividades de antioxidantes e eliminação de radicais; ou (iii)

através da sua capacidade para complexar com outras moléculas, incluindo macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos (Haslam 1996).

Muito pouco se sabe sobre os efeitos biológicos dos metabolitos microbianos das proantocianidinas. Esta questão precisa ser abordada no futuro próximo para se entender a significância destes compostos. O seu tempo de permanência na circulação do ser humano é muito mais longo do que no caso de metabolitos hepáticos derivados diretamente dos compostos fenólicos de plantas (Seeram et al. 2006). Assim, podem ter um papel importante na prevenção das doenças crônicas (Serrano et al. 2009).

Com base nos resultados obtidos, Lee e os colaboradores (2008) sugerem que o efeito antioxidante das proantocianidinas do dióspiro pode ser estimado para um consumo de cerca de 50g/dia no caso de adultos com peso corporal de 60 Kg (Lee et al. 2008).

## **2. ARTRITE REUMATOIDE (AR)**

Nos países industrializados, a AR afeta 0,5-1,0% dos adultos, surgindo novos casos todos os anos, com maior incidência nas mulheres e idosos (Scott et al. 2010). É mais prevalente em indivíduos com idade entre 40 a 60 anos de idade ou mais velhos, tendo as mulheres um risco 5 vezes superior aos dos homens de desenvolver a doença (Brosseau et al. 2004).

A artrite reumatoide é uma doença autoimune que causa inflamação crônica da articulação e tecidos envolventes, com infiltração de macrófagos e linfócitos T ativados que produzem anticorpos, citocinas e quimiocinas (ex: IL-6, IL-10 e LTβ) (Bauerova et al. 2000). É um dos exemplos mais representativos do quadro inflamatório crônico, em parte desencadeada pela ativação dos linfócitos T e libertação de citocinas, interleucinas (ILs) e o fator de necrose tumoral (TNF) (Teixeira 2006). Daqui resulta a dor e degeneração do osso e cartilagem, que podem levar à incapacidade funcional grave, temporária ou definitiva, ou mesmo à morte, se em condições mais avançadas da doença (Teixeira 2006; Furst et al. 2007).

Os tecidos mais afetados são a membrana sinovial, a cartilagem e os ossos (McInnes et al. 2007), no entanto pode ter implicações sistémicas aumentando, por exemplo, o risco de doença coronária cardíaca (Sattar et al. 2003). É caracterizada pela presença de articulações edemaciadas, sensíveis e destruição da porção sinovial das articulações, levando a invalidez e mortalidade prematura (Aletaha et al. 2010).

A AR é uma doença multifatorial, envolvendo fatores ambientais e genéticos (Tobón et al. 2010). Deficiências, incapacidades e desvantagens associadas a AR podem ser devastadoras, levando a dor, restrição de atividade, e diminuição da

qualidade de vida, o que se reflete em aumento de custos no sistema de saúde (despesas de saúde) e da sociedade (perda de produtividade devido à morbidade e diminuição da expectativa de vida) (Kobelt et al. 1999).

A AR é caracterizada por sinovite persistente, inflamação sistémica e auto-anticorpos (Scott et al. 2010).

Esta doença produz uma degeneração progressiva do sistema músculo-esquelético (Kobelt et al. 1999). Os doentes sofrem de dor articular, força muscular reduzida e função física prejudicada (Ekdahl et al. 1992). Uma síndrome caracterizada por dor, rigidez, e sinovite simétrica (inflamação da membrana sinovial) das articulações diartrodiais (articulações livremente móveis, tais como o joelho) que conduz à destruição articular, diminuição funcional, e comorbidade substancial nos sistemas cardiovascular, neurológico, e metabólico (Brennan et al. 2008).

A par da fadiga (Ek et al. 2001; Moreland et al. 2006), a destruição de osso e cartilagem é um dos grandes efeitos da artrite reumatoide, manifestando-se através de osteopénia, erosão óssea e redução do espaço sinovial à observação por radiografia (Plant et al. 1998). Apesar dos mecanismos da destruição de osso e cartilagem serem diferentes, ambos são parcialmente dependentes do processo inflamatório (Pettit et al. 2001; Redlich et al. 2002).

Nas articulações com AR, várias células inflamatórias, incluindo células imunes inatas (p. ex., mastócitos, macrófagos, células dendríticas e células NK), células imunes adaptativas (células T e B), e fibroblastos sinoviais (sinoviócitos tipo fibroblasto) (FLS) são ativados. Estas células interagem umas com as outras através de uma série de citocinas e/ou contactos célula-a-célula, que conduz à inflamação prolongada, proliferação anormal de fibroblastos sinoviais, e a destruição da cartilagem e osso (Gravallese et al. 2000; Firestein 2003; McInnes et al. 2005).

Reconhece-se também que as células do tecido hospedeiro (fibroblastos sinoviais ativados, condrócitos e osteoclastos) são envolvidas, mediando a destruição da cartilagem e do osso, bem como promover a perpetuação da inflamação (Brennan et al. 2008).

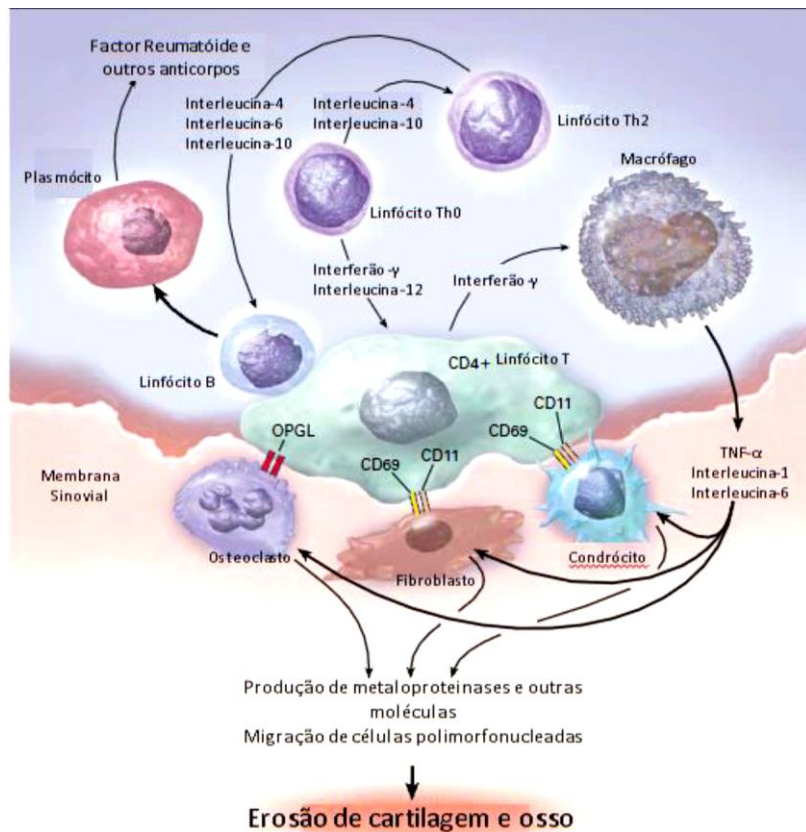
A inflamação grave da membrana sinovial (sinovite), onde existe uma elevação 3-100 vezes de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), e proteína C-reativa (PCR) (McInnes 2001) conduz a sinovite crónica (Brennan et al. 2008).

A inflamação crónica da membrana sinovial e as reações imunitárias dependentes dos linfócitos B e T, em conjunto com a hiperplasia da membrana sinovial, levam à formação do *pannus*, um tecido composto por células imunitárias, vasos sanguíneos (angiogénese) e células fibrosas (McInnes et al. 2007). A proliferação

do *pannus* ocorre no início da doença e pode ser observada antes da destruição da cartilagem e do osso (Hau et al. 1999). A destruição da cartilagem é mediada por metaloproteases da matriz (MMP) sintetizadas nos macrófagos ativados e nos fibroblastos estimulados pelas citocinas pró-inflamatórias, (p.ex.: Interleucina-1 e TNF- $\alpha$ ) (Yoshida et al. 1990).

Os condrócitos passam de um estado anabólico em que sintetizam matriz, para um estado catabólico com a liberação de metaloproteases e de citocinas, nomeadamente IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-18 e TNF- $\alpha$ , contribuindo desta forma para a degradação da cartilagem (Fig. i. 6) (McInnes et al. 2007).

Os níveis de citocinas em circulação refletem a atividade da doença e o grau de inflamação presente e pode também desempenhar um papel significativo nos efeitos sistêmicos da doença, tais como a doença vascular (Sattar et al. 2003) e caquexia reumatoide (Roubenoff et al. 1994). O desenvolvimento de caquexia reumatoide é associado ao excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias, em particular fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Walsmith et al. 2004; Roubenoff 2009).



**Figura i. 6 - Papel das citocinas na inflamação na artrite reumatoide. Adaptado de (Choy et al. 2001).**

Inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2) são recomendados para o tratamento da AR e da osteoartrite (OA) (Yoon et al. 2005). No entanto, alguns têm mostrado efeitos colaterais inesperados (Yoon et al. 2005).

Com a introdução dos agentes biológicos - caso dos inibidores do TNF $\alpha$ , houve uma melhoria no prognóstico da doença nomeadamente na perda de funcionalidade das articulações permitindo uma melhor qualidade de vida dos doentes (Klareskog et al. 2009).

Uma das medidas preventivas amplamente recomendada à população prende-se com o aumento do consumo de frutas e vegetais devido à grande variedade de antioxidantes que estes compostos contêm, nomeadamente os compostos fenólicos (Esposito et al. 2006; Rahman et al. 2006).

Na verdade várias fontes de evidências sugerem que a produção de radicais livres no local da inflamação pode contribuir decisivamente para a patogénese da doença (Mapp et al. 1995; Araujo et al. 1998).

Existe um grande potencial para que os compostos fenólicos da dieta se tornem a próxima geração de fatores dietéticos com efeitos na saúde ao nível do controlo da inflamação (Yoon et al. 2005).

Os custos diretos e indiretos associados aos doentes com AR são muito altos (Huscher et al. 2006), o que fundamenta a necessidade de implementar medidas preventivas que levem a uma diminuição incidência da doença como, por exemplo, adoção de dietas ricas em alimentos que contenham um elevado teor de antioxidantes.

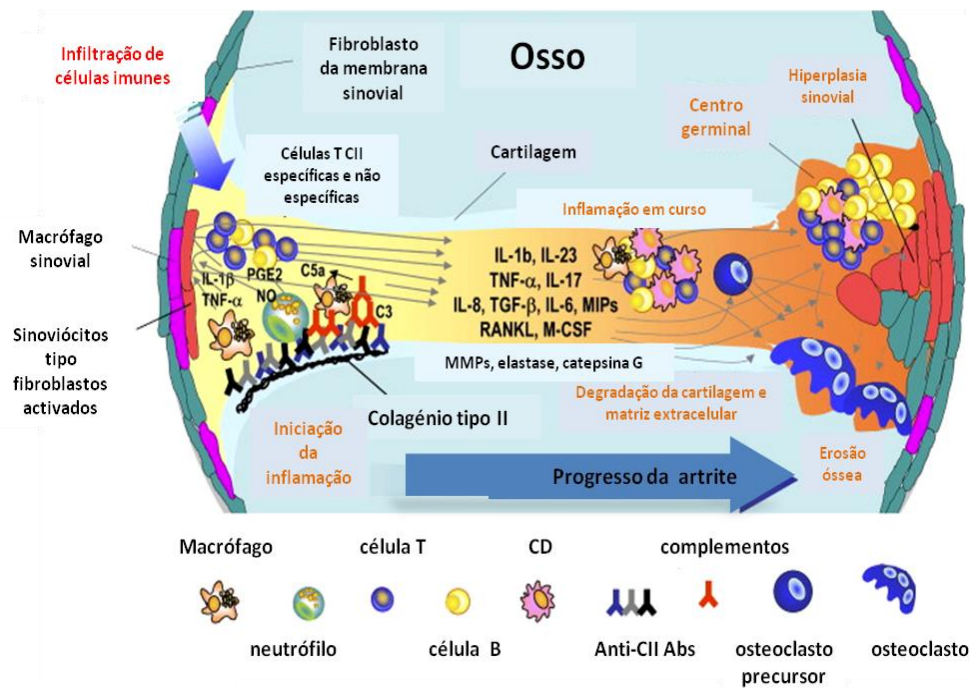
Uma revisão sistemática sugeriu que há provas de um efeito protetor de uma maior ingestão de frutas e vegetais no desenvolvimento de AR (Pattison et al. 2004). Estudos *in vitro* mostraram que efetivamente antioxidantes da dieta suprimem a libertação de citocinas inflamatórias (Jung et al. 2004; Kowalski et al. 2005; Surh et al. 2005).

## **2.1 Modelos Experimentais de Artrite *In Vivo***

Os modelos de artrite podem ser espontâneos, usando animais geneticamente modificados, ou induzidos. Nos modelos de indução de artrite existem pelo menos 4 métodos mais utilizados: artrite induzida por colagénio, por anticorpo anti-colagénio, por *zymosan* ou por antigénio.

A artrite induzida por colagénio (CIA) é considerada o *gold standard* dos modelos *in vivo*, devido à sua semelhança à AR no humano (Asquith et al. 2009). Normalmente são utilizados murganhos DBA/1 e consiste na imunização dos animais

através da administração intradérmica de colagénio tipo II heterólogo em adjuvante de *Freund* completo, o qual irá amplificar a resposta imunitária pela presença de *Mycobacterium tuberculosis* mortos (Holmdahl et al. 1990; Nandakumar et al. 2007). Os sinais clínicos aparecem 21-25 dias após inoculação e manifesta-se como uma poliartrite mais proeminente nos membros com infiltração inflamatória sinovial, erosão do osso e da cartilagem e hiperplasia sinovial. Estão também presentes linfócitos B e T com a produção de anticorpos anti-colagénio e células T específicas para colagénio (Fig. i. 7) (Asquith et al. 2009).



**Figura i. 7 - Diagrama esquemático da inflamação e erosão óssea nas articulações artríticas de ratos do modelo CIA. Os anticorpos anti-CII produzidos pela imunização de proteína heteróloga e CII CFA ligam-se ao CII de cartilagem, e o sistema do complemento é ativada. C5a, que é um produto de clivagem do componente do complemento 5, é potentemente quimiotático para neutrófilos e macrófagos e modula a expressão de FcγRs. Os anticorpos ligados CII ativam através C5a os neutrófilos e macrófagos recrutados. Seguindo FcγR ligadura, estes leucócitos ativados segregam materiais e citocinas pró-inflamatórias quimiotáticas, tais como IL-1β, TNF-α, IL-8, IL-6, o óxido nítrico (NO), e as prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), que ativam macrófagos sinoviais e infiltrando células mononucleares. Em inflamação em curso, células T, células B, células dendríticas, macrófagos e sinoviais proliferar e agem em conjunto para secretar citocinas ao interagir uns com os outros. As MMPs, elastase e catepsina G degradar a ECM e cartilagem. Os fibroblastos sinoviais e macrófagos progridem para hiperplasia e a formação de centros germinais ectópicos ocorrem algumas vezes, devido às atividades de citocinas, fatores de crescimento e neoangiogénese. Sob condições restritas, tais como os níveis mais baixos de IFN-γ e IL-4 e níveis mais elevados de TGF-β e IL-6, as células Th17 são induzidas e a osteoclastogénese ocorre. Os osteoclastos gerados causam erosão óssea. As células T**



**desempenham um papel regulador na sinóvia e aumenta ou inibe a inflamação e a erosão óssea, de acordo com as condições prevalentes. Adaptado de (Cho et al. 2007)**

Foi este modelo animal de artrite induzida pelo colagénio o usado neste trabalho.

### **3. DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL (DII)**

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são inflamações gastrointestinais idiopáticas crónicas que envolvem ulcerações recorrentes dos intestinos (Pithadia et al. 2011). DII, onde se incluem doença de Crohn (DC) e colite ulcerosa (CU), são doenças gastrointestinais comuns marcadas por inflamação crónica do epitélio intestinal, danificando o tecido mucoso e manifestam-se com vários sintomas intestinais e extraintestinais, principalmente relacionados com stresse oxidativo, inflamação e de autoimunidade (Targan et al. 1995; Fiocchi 1998; Mowat et al. 2011).

A inflamação da mucosa intestinal é induzida por fatores ambientais, herança genética e imunidade. A imunidade é crucial entre todas. A homeostasia das citocinas tipo TH1/TH2 é importante na imunidade da mucosa intestinal. Citocinas pró-inflamatórias estão significativamente aumentadas e citocinas anti-inflamatórias estão diminuídas na inflamação intestinal (Jian et al. 2005).

As DII podem estar relacionadas com o aumento de permeabilidade do intestino, permitindo a passagem de agentes patogénicos que, com exposição repetida e contactando diretamente com as células imunitárias desencadeiam uma resposta adaptativa normal, levando a uma inflamação crónica (Strober et al. 2007)

A mortalidade na doença inflamatória crónica é baixa (Duricova et al. 2010), o diagnóstico é feito na maior parte dos casos em doentes ainda jovens (Loftus et al. 2002), o que faz prever que a prevalência global da DII continuará a aumentar substancialmente nas próximas décadas. As razões definitivas para as crescentes taxas da DII são em grande parte desconhecidas (Molodecky et al. 2012). Embora a etiologia de DII tenha vindo a ser extensivamente estudada nas últimas décadas (Podolsky 2002), a patogénese da doença ainda não está totalmente compreendida (Jones et al. 2008; Mikhailov et al. 2009). Contudo, está acordado que o início e progressão da DII resultam de uma interação complexa entre predisposição genética, razões ambientais, uma resposta imunológica aberrante e um ambiente infeccioso (Thoreson et al. 2007; Wirtz et al. 2007; Mayer 2010). Também são referidos outros fatores como tabagismo, dietas ricas em gordura e açúcar, uso de certos medicamentos e stresse podem aumentar a probabilidade do aparecimento da doença (Danese et al. 2004). A localização geográfica, origem étnica, suscetibilidade genética, condições sanitárias e

de higiene, infecções microbiológicas e o sistema imune desregulado e o histórico familiar são fatores que condicionam a inflamação da mucosa (Baumgart et al. 2007).

Evidências têm sugerido que a DII é o resultado de uma resposta imunológica anormal a bactérias intestinais em hospedeiros geneticamente suscetíveis (Abraham et al. 2009).

As lesões intestinais típicas do DII revelam características e localização diferentes, dependendo se é DC ou CU. A DC é uma doença inflamatória transmural, ou seja, afeta todas as camadas da parede do intestino e qualquer localização ao longo do trato gastrointestinal, da boca ao ânus (Wibmer et al. 2010), envolvendo a mucosa, a submucosa, o tecido muscular e tecido conjuntivo (Mowat et al. 2011). Ao contrário da CU a doença de Crohn pode não ser contínua e deixar partes de tecido saudável, entre locais de tecido inflamado (CCFA et al. 2015). A colite ulcerosa é uma inflamação crônica, idiopática da mucosa do cólon, que começa no reto, tipicamente envolve apenas a mucosa e a submucosa superficial (Podolsky 1991) e geralmente estende-se em parte ou pela totalidade do cólon (Ordás et al. 2012). Manifesta-se normalmente como áreas contínuas de inflamação e ulceração, sem os segmentos do tecido normal (Head et al. 2003). Diarreia com sangue é o sintoma característico da doença, mas os doentes apresentam frequentemente dor abdominal, febre, e sinais clínicos de obstrução intestinal ou diarreia com passagem de sangue ou muco, ou ambos (Baumgart et al. 2012).

A evolução clínica é imprevisível, marcada por períodos de exacerbação e remissão alternados (Ordás et al. 2012).

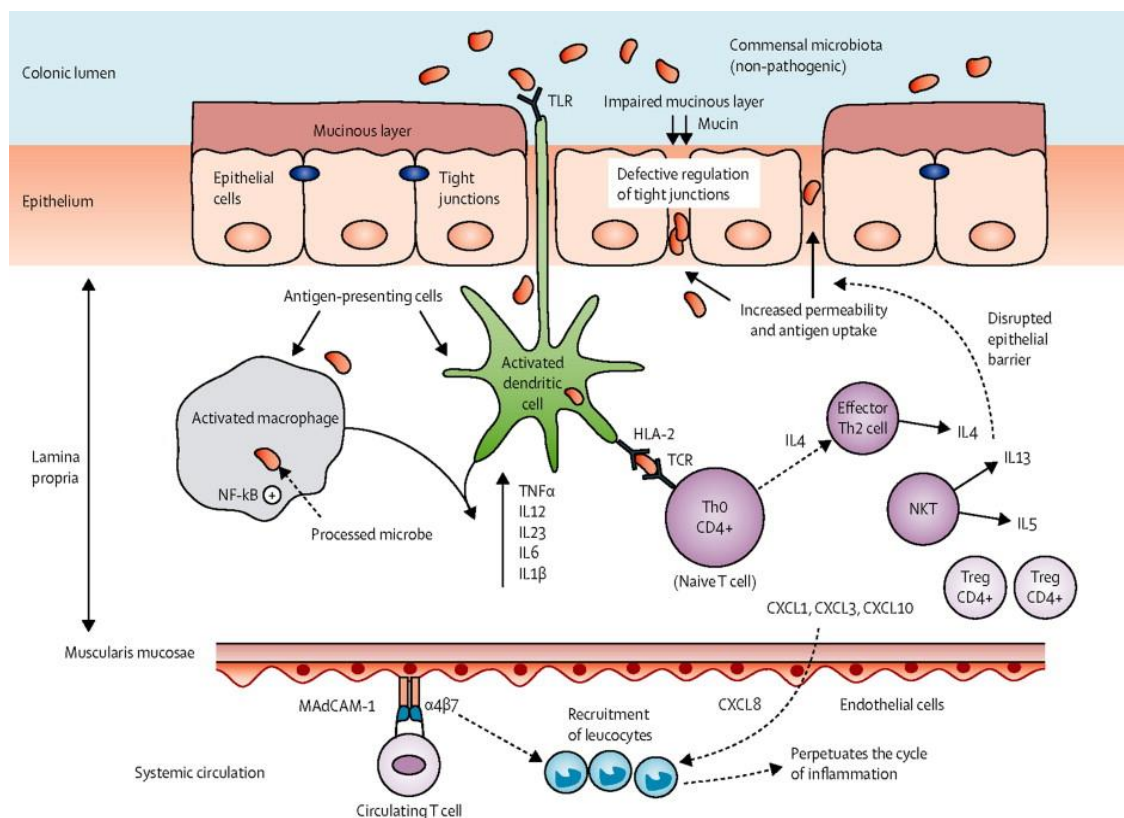
Como a doença de Crohn pode envolver o cólon e tem manifestações clínicas comuns com a colite ulcerosa, estas duas doenças têm sido muitas vezes confundidas e diagnosticadas como doença inflamatória do intestino, apesar de serem claramente entidades fisiopatológicas distintas. A colite ulcerosa é a forma mais comum de doença inflamatória do intestino em todo o mundo. Em contraste com a doença de Crohn, a colite ulcerosa é uma doença da mucosa que é menos dada a complicações e pode ser curada por meio de colectomia e, em muitos doentes, é uma doença moderada (Solberg et al. 2009).

Tanto a colite ulcerosa como a doença de Crohn são doenças da sociedade moderna, e sua frequência nos países desenvolvidos tem vindo a aumentar desde meados do século 20, mas a colite ulcerosa tem uma incidência maior (Loftus 2004). A sua incidência tem aumentado nos países que adotaram um estilo de vida industrializado o que sugere que fatores ambientais podem ser cruciais no desencadeamento desta doença (Ordás et al. 2012).

A alteração da permeabilidade do intestino é um dos fatores etiológicos que leva a uma resposta inflamatória descontrolada (Strober et al. 2007)

O fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$  está elevado no sangue (Murch et al. 1991), nas amostras de fezes (Braegger et al. 1992) e na mucosa (Masuda et al. 1994) de doentes com colite ulcerosa. Estas descobertas, juntamente com a eficácia do tratamento com anti-TNF- $\alpha$  para a colite ulcerosa, corroboraram a importância do TNF- $\alpha$  na patogénese da doença (Fig. i. 8) (Ordás et al. 2012).

A síntese de TNF- $\alpha$  leva à produção de ROS que por sua vez leva à ativação do fator nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), responsável pela expressão de diversas citocinas, entre as quais se encontra o TNF- $\alpha$ , isto leva a uma ciclo vicioso e à perpetuação da inflamação (Head et al. 2003).



**Figura i. 8 - Fisiopatologia da colite ulcerosa. Adaptado de (Ordás et al. 2012).**

**TLR = *Toll-like receptor*. HLA = antígeno leucocitário humano. IL = Interleucina. TNF = fator de necrose tumoral. NF- $\kappa\beta$  = fator nuclear- $\kappa\beta$ . Th = T-helper. NKT = células T natural killer. CXCL = quimiocina. Treg = células T reguladoras. MAdCAM -1 = molécula-1 de adesão celular adressina de adesão da mucosa.**

A ativação de vias de NF- $\kappa\beta$  estimula a transcrição de genes pró-inflamatórios, o que resulta num aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , interleucinas 12, 23, 6, e 1 $\beta$ ) (Ordás et al. 2012).

Como é hábito nas reações inflamatórias, existe libertação de espécies oxidativas. Também na CU a lesão pode ser causada pelo stresse oxidativo. Esta lesão resulta do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio e de antioxidantes, contribuindo para perpetuação do dano tecidual e genético que poderá, eventualmente, levar ao desenvolvimento de cancro (Aslan et al. 2011).

Apesar de já existirem diversos tratamentos para as doenças inflamatórias do intestino, nenhum deles é 100% eficiente na cura mas têm o objetivo de diminuir a sintomatologia e provocar remissão. Devido à natureza inflamatória destas doenças a maioria dos fármacos utilizados têm como alvos precisamente os mediadores das cascatas inflamatórias que estão na origem da Doença de Crohn e da Colite Ulcerosa.

O tratamento farmacológico para a DII evoluiu do tratamento convencional com aminosalicilatos, corticosteroides e imunossupressores de baixa seletividade. Todos estes medicamentos atuam por mecanismos diferentes, mas apresentam a mesma finalidade, a diminuição da resposta inflamatória ativa (Mowat et al. 2011). Estas moléculas atuam em diversas moléculas da cascata inflamatória, nomeadamente: inibição da ciclooxigenase (COX), lipooxigenase (LOX), linfócitos B (Kozuch et al. 2008), interleucina-1, NF- $\kappa$ B (Egan et al. 1999), na ativação do TNF, na produção de ROS e sobre o fator ativador das plaquetas (Hanauer 2004). Estes fármacos são também capazes de inibir a quimiotaxia dos macrófagos intestinais e levar à redução de anticorpos das células mononucleares (Whittle et al. 2010).

Sendo fármacos com contraindicações pelos seus possíveis efeitos secundários, continua a procurar-se novas moléculas anti-inflamatórias eficazes mas com menor toxicidade para o tratamento de doentes com DII (Jian et al. 2005).

Nos últimos tempos têm sido usados uma nova geração de produtos biofarmacêuticos, principalmente anticorpos monoclonais visando o TNF- $\alpha$ , particularmente nas manifestações moderadas a graves da doença, resistentes às terapias convencionais. No entanto, existe um risco aumentado para malignidades e uma perda de resposta terapêutica ao longo do tempo devido à formação de anticorpos (Yadav et al. 2016).

Em resumo, continua a procura de uma abordagem farmacológica que prejudique o desenvolvimento de processos inflamatórios no cólon com menor incidência dos efeitos adversos, mas também de estratégias preventivas e/ou modeladoras dos processos inflamatórios.

Nos últimos anos, tem-se realçado que alguns alimentos com função nutritiva fornecem um efeito benéfico para a saúde na prevenção e tratamento de determinadas doenças (Ortega 2006; Sirtori et al. 2009). Alguns estudos vão surgindo neste campo tentando esclarecer a mais-valia de alguns alimentos, nomeadamente

presentes na dieta mediterrânea, e o seu efeito na prevenção ou controlo sobre o desenvolvimento desta doença. Um desses exemplos é o azeite extra virgem que foi testado num modelo de colite crónica. Os resultados mostraram que exerceu um efeito benéfico notável pela modulação de citocinas e na redução da COX-2 e iNOS por via da diminuição da expressão do p38 MAPK. Muitos destes benefícios são atribuídos não só ao conteúdo elevado de ácido oleico mas, sobretudo, aos altos teores de compostos fenólicos presentes no azeite (Sánchez-Fidalgo et al. 2012).

Vários ensaios clínicos confirmaram a eficácia e tolerabilidade de suplementos naturais em doentes com DII. Evidências crescentes sugerem que estes compostos naturais realizam o seu efeito protetor sobre a DII através de numerosos mecanismos moleculares, incluindo anti-inflamatórios e imunorregulatórios, antioxidante, modulação de vias de transdução de sinal intracelular, bem como melhoria da microbiota intestinal (Farzaei et al. 2016).

Vários trabalhos relatam que os alimentos vegetais enriquecidos com antocianinas desempenham o seu papel protetor na DII e cancro colorretal (CCR) induzido por inflamação via diferentes vias celulares de transdução de sinal (Sodagari et al. 2015; Farzaei et al. 2018). A combinação de alimentos enriquecidos com antocianinas com a medicação existente poderá ser encarada como novas opções terapêuticas para doentes com DII. Além disso, ensaios controlados randomizados (ECRs) bem planeados são essenciais para avaliar o papel de alimentos enriquecidos com antocianinas e de componentes isolados de antocianinas como promissores agentes dietéticos preventivos e terapêuticos para DII e para a oncogénese a ela associada (Farzaei et al. 2018), desde que a sua segurança e eficácia sejam confirmadas em futuros ensaios clínicos bem delineados, com uma amostragem adequada (Farzaei et al. 2016).

Assim, muitos mais alimentos ou extratos fenólicos desses alimentos deverão ser estudados com o objetivo de prevenção do aparecimento de doenças, nomeadamente, das DII.

Com esse objetivo neste trabalho estuda-se o efeito do extrato fenólico de dióspiro, como antioxidante e anti-inflamatório, num modelo animal de CU.

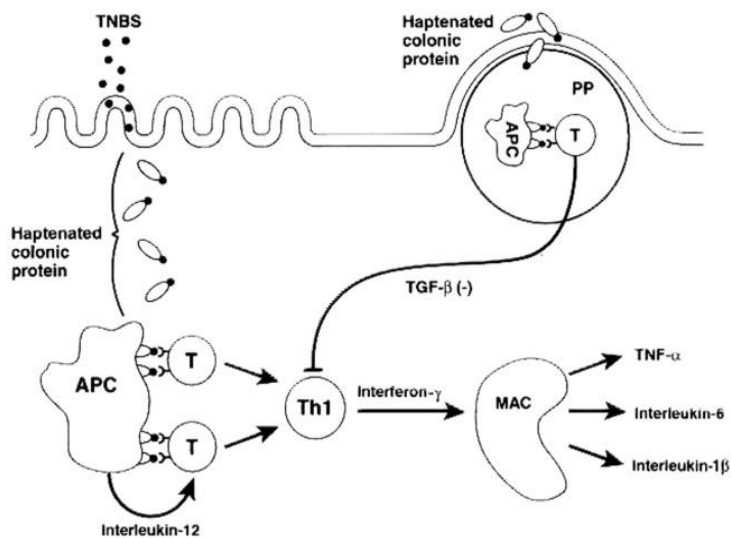
### **3.1 Modelo Experimental de Colite**

Os modelos animais de inflamação intestinal são indispensáveis para a nossa compreensão da patogénese da doença de Crohn e colite ulcerosa, as duas principais formas de doença inflamatória dos intestinos em humanos. Também a procura de outras abordagens terapêuticas é crucial para o tratamento de DII e, para tal, é importante o uso de modelos animais para mimetizar as características da doença.

As disfunções da barreira epitelial são importantes, já que levam ao desenvolvimento de inflamação intestinal, devido ao contacto que existe entre os antigénios que passam pelos intestinos e o sistema imunitário adaptativo (Strober et al. 2007).

A colite pode ser induzida pela administração intrarretal dos reagentes ácido 2,4,6-tri-nitro-benzeno-sulfónico (TNBS)/oxazolona ou sulfato de sódio dextrano (DSS) (Morris et al. 1989; Wirtz et al. 2007), que se acredita induzirem uma resposta mediada por células T contra antigénios proteínas/luminais autólogas modificadas-hapteno. O etanol é necessário para quebrar a barreira das mucosas, ao passo que TNBS e oxazolona se acredita que haptenize autólogos do cólon ou proteínas da microbiota tornando-os imunogénicos para o sistema imunitário do hospedeiro (Neurath et al. 1995).

O TNBS e o DSS induzem quimicamente a inflamação intestinal e são os modelos mais utilizados de indução química de colite, tanto aguda como crónica (Wirtz et al. 2007). Estes são modelos baseados na inflamação intestinal devido à perturbação da integridade epitelial ou seja, o início da doença deu-se pela deficiência na integridade epitelial/permeabilidade (Fig. i. 9).



**Figura i. 9 - Mecanismo de indução e tolerância no modelo de colite induzida por ácido trinitro-benzeno sulfónico (TNBS). Adaptado de (Strober et al. 1998).**

**APC = célula apresentadora de antígeno; MAC = macrófago; TNF-α = fator de necrose tumoral-α.**

A gravidade da doença e o tempo requerido para produzir a lesão pode variar entre laboratórios (Murthy 2006). Em geral, a lesão aguda transmural atinge o ponto máximo em três dias a uma semana, após a instalação intracolónica, o que gradualmente progride para inflamação crónica durante cerca de oito semanas (Morris

et al. 1989; Murthy 2006; Qin et al. 2011). Concretamente, o TNBS apresenta uma infiltração de células inflamatórias dentro de 2 horas após a administração, mas os sinais típicos de inflamação crônica podem desenvolver-se após 48 horas (Cheon et al. 2012).

Dado que a colite é amplamente reconhecida como uma doença mediada por Th1, os perfis de citocinas na colite com TNBS apoia ainda mais a relevância do modelo TNBS para estudar as respostas do sistema imunológico relacionadas com a colite (Alex et al. 2009).

O modelo de colite por TNBS tem sido muito útil para estudar muitos aspetos importantes da inflamação do intestino, incluindo os padrões de secreção de citocinas, os mecanismos de tolerância oral, a adesão celular e imunoterapia (Wirtz et al. 2007).

Para efeitos de avaliação de novos agentes terapêuticos, modelos de colite aguda experimentalmente induzida (por exemplo, DSS ou TNBS) são amplamente usados apesar de se assemelharem somente em alguns aspetos à doença humana. Estes modelos indutíveis oferecem a vantagem adicional de custo-eficiência e alta reprodutibilidade (Wirtz et al. 2007).

#### **4. ATIVIDADE ANTICARCINOGÉNICA**

A persistência da inflamação numa forma crônica gera um ambiente profundamente modificado que favorece a ocorrência de células transformadas e a sua progressão a cancro malignos (Ognjanovic et al. 2010). A inflamação crônica é uma das marcas da maioria dos tumores sólidos e é uma condição precursora de uma grande gama de cancros incluindo os do cólon, esófago, estômago e bexiga (Ognjanovic et al. 2010). A inflamação crônica é caracterizada pela atração persistente de células imunológicas que secretam mediadores específicos no local de lesão (Ognjanovic et al. 2010). Estes mediadores incluem radicais livres agressores de DNA, citocinas e quimiocinas que aumentam a proliferação celular, estimulam o desenvolvimento de células estromais, diminuem a apoptose, aumentam a neoangiogénese e facilitam a motilidade e invasão celulares (Ognjanovic et al. 2010). As citocinas são produzidas numa larga variedade de formas com sobreposição dos efeitos biológicos, operando dentro de uma complexa rede de sinalização (Ognjanovic et al. 2010). De particular importância no cancro são as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), TNF $\alpha$ , quimiocinas e seus recetores, bem como os recetores de “*death domain family*” (Ognjanovic et al. 2010). Células residentes de locais inflamatórios adaptam-se produzindo fatores que aumentam a sua sobrevivência (Ognjanovic et al. 2010). Um desses fatores é a ciclooxigenase-2 (COX-2), que é controlada pela interação entre

proteína supressora de tumor 53 (p53) e o fator nuclear kapa B (NF-κB), dois fatores com amplos papéis nas respostas inflamatórias (Ognjanovic et al. 2010). Assim, segundo o trabalho desenvolvido por Ognjanovic e colega (2010), o cancro pode ser visto como a consequência duma falha na resposta, essencialmente orientada para a cicatrização de feridas (Ognjanovic et al. 2010). Nesta perspetiva, os mediadores inflamatórios oferecem uma gama grande de potenciais alvos para intervenções preventivas ou terapêuticas (Ognjanovic et al. 2010).

As paredes do cólon e reto são compostas de várias camadas, incluindo mucosa, submucosa, muscular própria e serosa. A camada mais íntima da parede do intestino, a mucosa, é composta por uma camada única de células epiteliais colunares, que produz grande quantidade de muco, sendo assim, denominadas de células caliciformes. Este é o sítio das primeiras alterações genéticas que levam ao desenvolvimento do cancro (Yeatman 2001).

A mucosa intestinal tem funções de excreção, absorção e barreira imunitária. A função de barreira da mucosa é levada a cabo por células epiteliais intestinais, componentes extracelulares e sistema imunitário. Estes componentes podem bloquear substâncias nocivas de entrarem no corpo (Targan et al. 1995; Fiocchi 1998).

A incidência e a prevalência mundiais das doenças inflamatórias intestinais (DII) aumentaram drasticamente ao longo do tempo, evidenciando a sua emergência como doença crónica global (Molodecky et al. 2012; Burisch et al. 2014). Um dos principais problemas de saúde crónicos em relação à DII é o potencial para a diferenciação celular. A carcinogénese colónica exemplifica a ligação entre a inflamação crónica e a origem do cancro e tem sido discutida e investigada há muito tempo. Doentes com colite ulcerosa e doença de Crohn têm um risco elevado de desenvolver cancro, incluindo cancro de cólon e cancro de intestino delgado respetivamente (Bernstein et al. 2001).

O cancro colorretal associado à colite (CAC) é um tumor que se desenvolve no contexto da inflamação crónica e é considerada a complicação mais grave da DII (Taleban et al. 2016). Os doentes com colite ulcerosa são mais propensos a desenvolver cancro colorretal (CCR) (risco de 20 a 30 vezes) quando comparado com a população em geral (Romano et al. 2016). O cancro colorrectal em doentes com colite ulcerosa surge nas áreas de inflamação crónica da mucosa, a displasia unifocal ou multifocal (Mathy et al. 2003).

O CCR começa normalmente a manifestar-se nas idades compreendidas entre os 45 e os 50 anos, mas aumenta progressivamente com a idade, e os homens têm um maior risco do que as mulheres (Society 2013). Neste tipo de cancro, apenas 5% dos casos é de origem hereditária (Labianca et al. 2010).



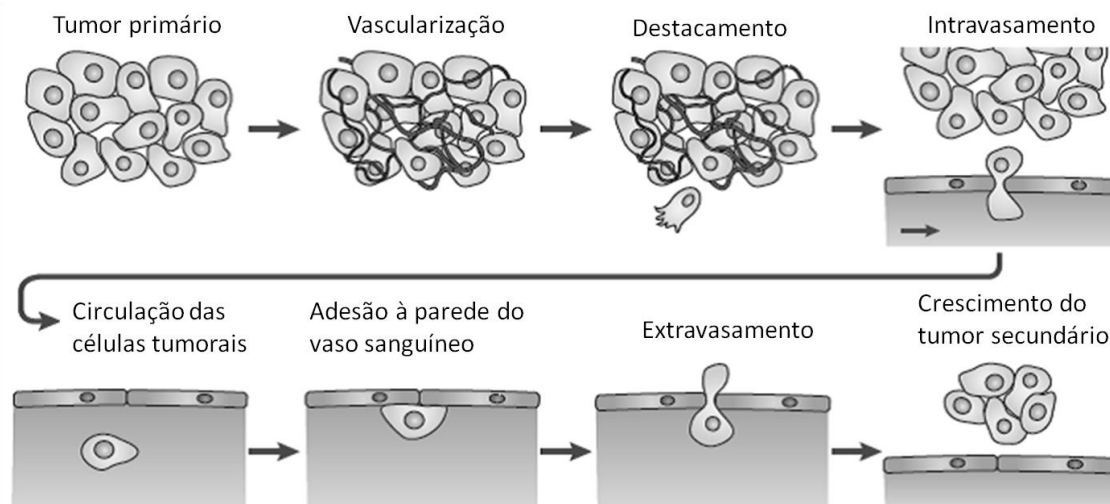
Na Europa, surgem cerca de 250 000 novos casos por ano de cancro do cólon, em que aproximadamente 9% são malignos, com maior incidência nas zonas urbanizadas e industrializadas (Labianca et al. 2010).

Sabe-se que uma alimentação adequada poderia prevenir entre 70 a 80% de todos os casos de CCR (Glade 1999). Para além da dieta, a obesidade e a inflamação são fatores de risco para este tipo de cancro (Bruce et al. 2000). A indução de cancro por inflamação pode ser suscetível a influências nutricionais. Assim, componentes alimentares, podem ser envolvidos na geração de espécies reativas de oxigénio, que podem influenciar as defesas antioxidantes, ou interferir no processo inflamatório. O consumo de carnes vermelhas, carnes processadas, bebidas alcoólicas (mais de 30 g diários de etanol), gordura saturada e açúcar são fatores que levam ao desenvolvimento deste tipo de cancro (Cancer et al. 2007). Para além dos riscos alimentares, o tabagismo, o uso crónico de anti-inflamatórios não esteroides, doenças colorretais, pré-disposição genética e síndrome metabólico aumentam o risco para o cancro de cólon (Stewart BW 2003).

A metastização é um processo pelo qual o tumor se difunde de um órgão primário para órgãos ou tecidos secundários (Deryugina et al. 2006). Para que isto ocorra é necessário que as células cancerígenas passem diversas barreiras fisiológicas (Chambers et al. 1997), sendo que apenas algumas, menos de 0,1%, têm a capacidade de superar todos os obstáculos e sobreviver para formar novas colónias (Stamenkovic 2000). No entanto, como já mencionado, uma percentagem relevante dos indivíduos com cancro apresenta metastização. As metástases definem o tumor maligno e são a principal causa de morte no cancro (Stamenkovic 2000). Há várias décadas que a literatura tem associado as metaloproteases de matriz (MMP) com este fenótipo maligno (Liotta et al. 1982; Pauli et al. 1983).

#### **4.1 Metaloproteases da Matriz**

As metaloproteases da matriz (MMPs) estão implicadas em determinados pontos críticos no processo de metastização como no destacamento, na passagem das células cancerígenas para os vasos sanguíneos ou linfáticos (intravasamento) e ainda no processo inverso, ou seja, a passagem destas células para fora dos vasos sanguíneos ou linfáticos (extravasamento), Fig. i. 10 (Stamenkovic 2000).



**Figura i. 10 - Processo de metastização. Adaptado de (Wirtz et al. 2011).**

As MMPs são endoproteases dependentes de zinco com capacidade de degradação dos componentes da matriz extracelular (Nagase et al. 1999). As MMPs têm funções cruciais em vários processos fisiológicos normais, como na degradação fisiológica da matriz extracelular, por exemplo, na formação e remodelação de tecidos, sua reparação e angiogénese e desenvolvimento de órgão (Shapiro 1998; Page-McCaw et al. 2007), na regulação de processos inflamatórios (Parks et al. 2004) e em doenças como o cancro (Egeblad et al. 2002).

Estas estão ligadas ao desenvolvimento das metástases do cancro, a inflamação crónica e a danos nos tecidos, em distúrbios neurológicos (Klein et al. 2011). Estas desordens ocorrem porque as MMPs regulam diferentes processos celulares, nomeadamente, a apoptose, angiogénese, invasão e metastização (Verma et al. 2014). As MMPs regulam a apoptose através da degradação da matriz proteica, que pode resultar numa ação apoptótica ou anti-apoptótica nas células endoteliais e epiteliais (Herren et al. 1998).

Estas proteases da família das metaloproteases (Klein et al. 2011), podem ser divididas em 5 subgrupos, identificados consoante os substratos sobre os quais exercem proteólise (Sbardella et al. 2012):

- (i) colagenases (MMP -1, -8 e -13), que degradam colagénio fibrilar (Gioia et al. 2002);
- (ii) estromelisinases (MMP-3, -10 e -11), que preferem proteoglicanos e glicoproteínas como substratos (Nagase et al. 1999);
- (iii) as gelatinases (MMP-2 e -9), que são particularmente ativas na degradação de substratos da matriz extracelular (ECM) como o colagénio tipo I e colagénio tipo IV (Steffensen et al. 1995; Chambers et al. 1997; Stamenkovic 2000; Chow et al. 2007);

- (iv) matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), que não têm o domínio hemopexina-*like* e são capazes de processar o colagénio IV, mas não o colagénio I (Marchenko et al. 2001);
- (v) MMPs membranares tipo I (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25). Apenas a MMP-14 e MMP-16 mostraram clivar colagénio fibrilar I (Ohuchi et al. 1997; Sabeh et al. 2009).

#### **4.1.1 Gelatinases: MMP-2 e MMP-9**

Dentro da família das MMPs, existem duas metaloproteases específicas, a gelatinase A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9). A maior diferença entre MMP-2 e MMP-9 é a diferente regulação da expressão (Huhtala et al. 1991).

Tipicamente a MMP-2 é expressa apenas constitutivamente com pequenos ajustes na regulação de aumento ou diminuição sob várias condições (Birkedal-Hansen et al. 1993). Pelo contrário, a expressão da MMP-9 é altamente indutível pelos fatores de crescimento, quimiocinas e outros sinais estimuladores (Higgs et al. 1991).

As gelatinases degradam vários tipos de colagénio presente na matriz extracelular, bem como gelatina e elastina (Fanjul-Fernandez et al. 2010). A ativação é conseguida por remoção proteolítica do pro-peptídeo por enzimas, como a tripsina, plasmina (Vanwart et al. 1990) e outras MMPs ou por stresse oxidativo. A ativação das MMPs pode ser influenciada pelas espécies reativas de oxigénio. A resposta inflamatória no local do tumor gera grandes quantidades de ROS que são produzidos pelos neutrófilos e macrófagos ativados. Estes oxidantes inicialmente ativam MMPs via oxidação do pró-domínio cisteína (Weiss et al. 1985) mas, eventualmente, em combinação com a enzima mieloperoxidase, contributo das células inflamatórias. (Fu et al. 2003).

O aumento da atividade das gelatinases tem sido observado numa variedade de patologias incluindo o cancro, inflamação, doenças infecciosas, doenças neurológicas degenerativas e doenças vasculares (Van den Steen et al. 2002). Estudos mostram que das MMPs, as gelatinases são as mais importantes para a formação de metástases (Bjorklund et al. 2005; Nikkola et al. 2005). Ambas são expressas em várias células incluindo fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, monócitos e osteoclastos (Fanjul-Fernandez et al. 2010) e vários estudos mostram que estão diretamente implicadas na formação de metástases, sendo altamente ativas nos tecidos circundantes ao tumor, degradando a matriz extracelular (Toda et al. 2006; Fanjul-Fernandez et al. 2010; Herszenyi et al. 2012).

Desta forma, ambas as gelatinases têm um papel crucial na invasão e metastização do cancro, pois as células estão ligadas entre si pela matriz extracelular e

quando esta é degradada, as células cancerígenas estão livres para iniciar a migração, entrar na corrente sanguínea, proliferar e colonizar outros locais. Vários estudos têm verificado esta relação entre as MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B) e a formação de metástases (Bernhard et al. 1994; Hua et al. 1996; Itoh et al. 1998; Parsons et al. 1998) e que com a inibição das gelatinases, em particular da MMP-9, é possível impedir de uma forma eficaz a formação de metástases e a invasão tumoral (Zheng et al. 2006; Yang et al. 2014).

Os inibidores das MMP's (MMPi) conseguiram reduzir a progressão do cancro/metástase em ensaios *in vitro* e em modelos animais, parecendo serem principalmente eficazes nos estados iniciais do cancro ou até na prevenção do desenvolvimento de micrometástases não detetadas após a cirurgia (Herszenyi et al. 2012).

Devido à aparente eficácia da inibição destas enzimas na prevenção de metástases, tem havido um trabalho desenvolvido na criação de inibidores de MMPs sintéticos. No entanto, os resultados não têm sido muito animadores, uma vez que devido à sua similaridade e ubiquidade, torna-se difícil inibir especificamente a MMP-9 ou a MMP-2 sem se observarem graves efeitos secundários, devido à inibição não seletiva das MMPs. Estudos realizados anteriormente com o objetivo de inibir a atividade das enzimas em doentes com cancro produziram resultados muito insatisfatórios com vários efeitos secundários e generalizados, como no sistema músculo-esquelético, devido à toxicidade dos inibidores (Zucker et al. 2004). Por esta razão, a investigação mais recente tem-se direcionado para novos compostos inibidores de MMPs, principalmente derivados de plantas, que apresentam um menor risco de aparecimento de efeitos secundários e de toxicidade e sendo clinicamente ativos contra vários tipos de células cancerígenas (Sarkar et al. 2010; Herszenyi et al. 2012).

A utilização de alimentos com atividade anticancerígena e anti-metastática, abriu portas para uma ação preventiva da formação tumoral, em que os alimentos ou os seus componentes proporcionam benefícios para a prevenção e/ou tratamento tumoral (de Mejia et al. 2010). Algumas estratégias terapêuticas de sucesso contra o crescimento do cancro do cólon têm sido alcançadas usando suplementos alimentares vegetais com ação sobre MMPi usadas na prevenção ou em recidivas pós cirúrgicas (Markle et al. 2010).

Alguns trabalhos como o de Xu e Chang (Xu et al. 2012), com legumes e nove linhas tumorais humanas, levaram o *World Cancer Relief Fund/American Institute for Cancer Research Committee* a reconhecer o benefício do consumo de legumes no potencial decréscimo do risco de cancro embora haja necessidade continuar a pesquisa nesta área (Glade 2008).

Estudos *in vivo* e *in vitro* com dióspiro (*Diospyros kaki* L.) sugerem um papel relevante deste fruto na proteção contra os radicais livres e na prevenção de algumas doenças humanas (Giordani et al. 2011), o que é justificado pela sua composição química e pela sua riqueza em compostos fenólicos.

Já foi descrito que a  $\beta$ -criptoxantina e a quercetina no extrato de pele de dióspiro têm um efeito preventivo da carcinogênese (Chen et al. 2002; Nishino et al. 2002; Murakami et al. 2008).

Também os resultados de Izuchi e colaboradores (2011) mostraram um decréscimo na expressão de genes relacionados com o processo tumoral, sugerindo que o extrato de pele de dióspiro testado, suprime o stresse oxidativo que pode resultar em carcinogênese, contudo mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo pelo qual ocorre este efeito anticancerígeno (Izuchi et al. 2011).

As proantocianidinas do dióspiro também têm sido associadas à atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória e prevenção da aterosclerose (Gorinstein et al. 2000) e existem, ainda, evidências que de que os extratos de dióspiro e seus constituintes possuem uma atividade antitumoral potente em células de cancro humano. Embora os mecanismos moleculares envolvidos permaneçam em grande parte desconhecidos, estudos mostraram que o ácido 24-hidroxiursólico, um triterpenóide encontrado no dióspiro, ativa a proteína cinase AMP-ativada (AMPK), inibe a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) em células HT-29 e induz apoptose celular por ativação de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), caspase-3 e fosforilação de p53 em Ser15. Também induz fortemente a fragmentação do DNA em células HT-29 e, assim, inibe significativamente a formação de colônias de células HT-29 em agar (Khanal et al. 2010). No entanto, não há nenhuma evidência da ação do dióspiro na atividade das metaloproteases da matriz (MMP-9 e MMP-2).

Existem várias linhas de evidência em que o extrato de dióspiro e seus constituintes têm atividade antitumoral potente contra células tumorais humanas. No entanto, os mecanismos moleculares em atividades antitumorais não são ainda compreendidos (Achiwa et al. 1997; Kawase et al. 2003; Direito et al. 2017).

A metodologia para estudar o possível efeito anticarcinogénico dos extratos fenólicos do dióspiro pode assentar em técnicas *in vitro* usando células de adenocarcinoma de cólon humano, HT-29, que são células epiteliais intestinais humanas, com características aderentes e tumorogénicas, no intuito de avaliar a implicação desses compostos fenólicos na prevenção do desenvolvimento do cancro colorretal, testando o efeito dos extratos na proliferação e invasão de células de carcinoma do cólon humano.

É usual avaliar a capacidade anti-proliferativa dos extratos em células HT-29, fazendo ensaio de migração celular e determinando as concentrações mínimas inibitórias (MICs).

É ainda de toda a utilidade estudar a inibição da atividade das enzimas MMP-9 e MMP-2 através da inibição da atividade gelatinolítica em células HT-29, com zimografia de substrato usando SDS-PAGE.

## 5. FITOSSOMAS

Atualmente, a extração de ingredientes funcionais do dióspiro tornou possível a sua utilização em muitos alimentos como, por exemplo, iogurtes ou produtos de panificação, a fim de melhorar a textura e a viscosidade do produto e até aumentar o seu potencial pré-biótico (Thebaudin et al. 1997; Guevara-Cruz et al. 2013; Martinez-Las Heras et al. 2017).

No atual cenário da Saúde, observa-se uma mudança de paradigma do tratamento para a prevenção. O potencial preventivo dos suplementos alimentares começa a ser um dos focos da indústria alimentar e farmacêutica. Para garantir o cumprimento de seu uso a longo prazo, o desenho dos sistemas de veiculação adequados para estes suplementos administrados por via oral torna-se um pré-requisito. A via de administração oral é considerada uma via não invasiva, com uma enorme facilidade de execução, levando à adesão do doente a longo prazo. Porém, é igualmente descrito que a via oral de administração é condicionada por diversos fatores intrínsecos à anatomofisiologia do trato gastrointestinal (GI) mas também características relacionadas com os próprios suplementos alimentares como seja a estabilidade *in vivo* de muitos dos suplementos, por exemplo, vitaminas, enzimas, certos antioxidantes e fitoconstituintes como curcumina, licopeno, entre outros. Um número de novas estratégias de formulação está sendo desenvolvido para superar os problemas relacionados à absorção oral e à biodisponibilidade desses produtos. Estas novas formulações foram utilizadas não só para aumentar a solubilidade e biodisponibilidade destes bioativos, mas também se revelaram eficazes no aumento da sua estabilidade física, química e biológica. A literatura descreve ainda vários exemplos dessas formulações que oferecem uma vantagem adicional de controlar a libertação de agentes bioativos por um período prolongado de tempo e também de fazê-los chegar ao local necessário, evitando assim o seu desperdício e permitindo otimizar as doses que são administradas (Lipinski et al. 2001; Ajazuddin et al. 2010; Belcaro et al. 2010; Abd El-Fattah et al. 2017).

A veiculação destes agentes bioativos em nanossistemas é considerada uma estratégia promissora para a otimização dos seus efeitos farmacológicos, nutracêuticos

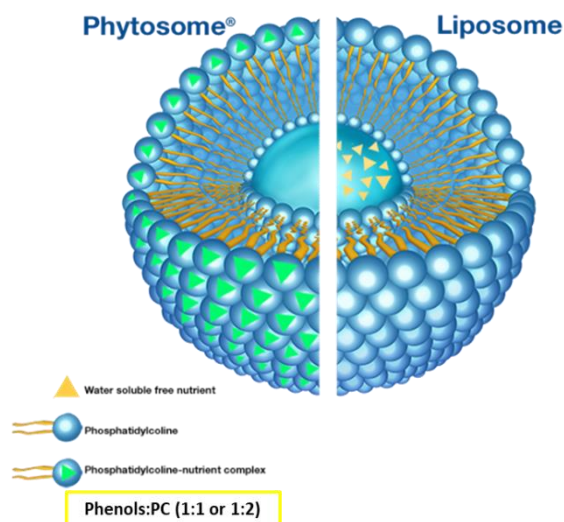
ou funcionais. Recentes revisões bibliográficas demonstraram que, de todos os fármacos utilizados na clínica moderna, cerca de 90% apresentam origem natural, isto é, são derivados de produtos naturais ou a sua estrutura química foi inspirada em produtos naturais (Newman et al. 2012).

Novas estratégias de veiculação de fármacos como acontece com os FITOSSOMAS® (Indena, Milão, Itália) têm demonstrado inúmeras vantagens para ultrapassar essas limitações (Semalty et al. 2010).

Os fitossomas são complexos moleculares formados por fosfolípidos, como a fosfatidilcolina, e os fitocomponentes existentes num produto natural. Como principais componentes da membrana celular, os fosfolípidos possuem uma excelente biocompatibilidade (Vemuri et al. 1995; Nogueira et al. 2015). Além disso, os fosfolípidos são conhecidos pelas suas estruturas anfifílicas. Esta última característica confere uma capacidade de auto-organização, para fácil formação de emulsões e características humectantes muito interessantes do ponto de vista cosmético. Em meio aquoso, os fosfolípidos geram diferentes estruturas supramoleculares que são naturalmente dependentes das suas propriedades e condições específicas. No mercado existem inúmeros produtos baseados em fitossomas (Indena 2018).

Os fitossomas diferem dos lipossomas pois têm um teor de fosfolípido similar ao do fármaco (proporção molar 1:1 ou 1:2) que permite uma maior proporção de fitocomponentes no complexo (Fig. i. 11). No caso dos lipossomas, o composto ativo é colocado no interior de uma cavidade interna da partícula, verificando-se uma interação limitada com o meio circundante. No fitossoma existe uma dispersão do composto ativo no meio fosfolipídico (Indena 2018).

Os fosfolípidos são pequenas moléculas lipídicas onde a “cauda” hidrofóbica tem o glicerol ligado a dois ácidos gordos e a “cabeça” hidrofílica, constituída pelo grupo álcool fosforilado ligado ao glicerol, ou a serina, ou a etanolamina ou a colina ou a inositol (Citernesi et al. 1995; Stryer et al. 1995). Fosfolípidos de soja, principalmente fosfatidilcolina, são substâncias lipofílicas e facilmente complexam compostos fenólicos. Neste contexto, fosfatidilcolina, o principal bloco de construção molecular das membranas celulares e um composto miscível em água e em óleo/ambientes lipídios, é bem absorvido por via oral e tem o potencial para atuar como um acompanhante (*chaperon*) de compostos fenólicos, acompanhando-os através de membranas biológicas (Kidd 1996; El-Far et al. 2018).



**Figura i. 11 – Fitossomas são formas avançadas de formulações vegetais feitas pela ligação de parte individual do extrato vegetal à fosfatidilcolina (PC). Adaptada de: Copyright © FIT-BioCeuticals Ltd.**

As primeiras referências da preparação destes complexos referem-se ao uso essencialmente de solventes orgânicos no meio reacional como, por exemplo, o diclorometano ou o dioxano (Saraf et al. 2013). Estes solventes apresentam grandes limitações de segurança e têm sido progressivamente substituídos por solventes menos tóxicos como a acetona ou o etanol (Saraf et al. 2013). Os métodos mais frequentes de preparação de fitossomas são a evaporação de solvente, *salting-out* ou ainda através da utilização de fluídos supercríticos (Saraf et al. 2013; Gonçalves et al. 2018).

Para uma boa biodisponibilidade, os produtos naturais devem ter um bom equilíbrio entre a hidrofiliabilidade (para dissolução nos fluidos gastrointestinais) e lipofiliabilidade (para atravessar biomembranas). Muitos fitoconstituintes como os compostos fenólicos têm boa solubilidade em água mas são, no entanto, mal absorvidos (Manach et al. 2004) devido ao seu tamanho grande, incompatível com um processo de difusão passiva e/ou sua fraca miscibilidade com óleos e outros lípidos. Como resultado, a capacidade dos flavonóides para atravessar a membrana exterior do intestino delgado rica em lípidos é severamente limitada (Semalty et al. 2010; Gonçalves et al. 2018).

Fitoconstituintes solúveis em água (principalmente compostos fenólicos) podem ser convertidos num complexo molecular mais compatível com lípidos. Aqui o complexo é geralmente mais biodisponível do que um simples extrato vegetal devido à sua capacidade de atravessar as biomembranas ricas em lípidos e alcançar a circulação (Bombardelli et al. 1989; Mauri et al. 2001; Kidd et al. 2005; Rossi et al. 2009).



Os primeiros complexos fitossomais foram desenvolvidos pela empresa Indena (Milão, Itália) no final dos anos oitenta. São muitos os extratos vegetais populares que estão comercialmente disponíveis na forma fitossomal, como, por exemplo, *Ginkgo biloba* L., sementes de uva (*Vitis vinifera* L.), cardo *milk thistle* (*Silybum marianum* (L.) Gaertn), chá verde (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer), alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.), castanha (*Aesculus hippocastanum* L.), *Centella asiatica* (L.) Urban, azeitona (*Olea europea* L.), *Terminalia sericea* Burch. Ex. DC, *Amni visnaga* (L.) Lam, cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e espinheiro (*Crataegus* spp.) (Semalty et al. 2010).

De acordo com o nosso conhecimento baseado na pesquisa bibliográfica realizada entre 1980 e 2019 usando motores de busca e fontes de indexação *online* como o *Google Books*, *PubMed* e *Web of Knowledge*, o extrato de dióspiro ainda não foi encapsulado em fitossomas. O dióspiro e os seus componentes têm potencial promissor como agentes moduladores na terapia baseada na dieta. No entanto, a investigação integrada e meta-análise são ainda necessários para melhorar a meticulosidade (Butt et al. 2015).

Em resumo, como é mais vantajosos prevenir doenças crónicas do que tratá-las, reduzir o risco de doenças cardiovasculares ou cancro, tornou-se uma das prioridades das autoridades de saúde, dos cientistas e da indústria alimentar. Para reduzir o risco de sofrer de doenças associadas ao stresse oxidativo, é importante o consumo de alimentos funcionais enriquecidos em antioxidantes, bem como frutas e vegetais naturalmente ricos em compostos bioativos. De igual modo e como a inflamação está, por um lado diretamente relacionada com o stresse oxidativo e, por outro, com muitas doenças crónicas é importante estudar a possível ação anti-inflamatória dos mesmos alimentos tanto por via de mecanismos antioxidantes como outros.

É inegável o papel da alimentação na saúde humana. A chamada alimentação “dos países industrializados” caracterizada por ser altamente calórica, rica em açúcares refinados e ácidos gordos saturados, e pobre em antioxidantes e fibras favorece o desenvolvimento de algumas doenças crónicas como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e cancro. De facto, este tipo de alimentos altera a homeostasia do endotélio vascular, havendo evidências que após o seu consumo há um aumento excessivo das citocinas pró-inflamatórias e diminuição das anti-inflamatórias o que pode conduzir à hipertensão, resistência à insulina, dislipidémias, aterosclerose e doenças cardiovasculares (DCV) (Esposito et al. 2006)

Pelo contrário sabe-se que outras dietas são responsáveis por uma diminuição dos fatores de risco associados às doenças crónicas sendo uma delas a dieta mediterrânica em que se verifica uma diminuição na mortalidade por DCV (Trichopoulou et al. 2003; Estruch et al. 2006) e no aparecimento de diabetes tipo 2 e

síndrome metabólico (Martinez-Gonzalez et al. 2008). O mecanismo através do qual a dieta mediterrânea beneficia o sistema cardiovascular não está atualmente bem definido, mas sabe-se que esta dieta está inversamente relacionada com alguns marcadores inflamatórios como a Interleucina-6 (IL-6), PCR e também com o stresse oxidativo (Dai et al. 2008).

O padrão de dieta mediterrânea tradicional é caracterizado por uma abundância de alimentos vegetais, como verduras, legumes, frutas, grãos, cereais, nozes, peixe e consumo moderado de carnes brancas. O azeite é a principal fonte de gordura. Quantidades variáveis de vinho são frequentemente consumidas com as refeições. O vinho em quantidades moderadas também está incluído nesta dieta e ervas aromáticas e especiarias são outro componente importante que parece aumentar as características de promoção da saúde pela dieta alimentar e palatabilidade (Vallverdu-Queralt et al. 2014). Muitos dos componentes característicos da dieta mediterrânea são considerados "alimentos funcionais", os quais são conhecidos por terem efeitos positivos sobre a saúde, capacidade de bem-estar, e podem ser responsáveis por algumas das vantagens associadas à dieta (Oliviero et al. 2015).

Os compostos fenólicos de frutas e legumes, azeite virgem e vinho tinto, têm sido alvo de atenção devido às suas propriedades anti-inflamatórias, anti-angiogênicas, cardioprotetores e anticancerígenas importantes (Oliviero et al. 2015).

Sendo o dióspiro um fruto da dieta mediterrânea rico em compostos fenólicos pareceu-nos importante estudarmos a sua potencialidade como antioxidante e anti-inflamatório bem como averiguar se terá algum papel no cancro.

Sendo um fruto com uma quantidade considerável de açúcar aconselhar a sua ingestão em grande quantidade pode não fazer sentido, em especial quando se trata de grupos de risco como os diabéticos. Por outro lado, tratando-se de um fruto sazonal só está disponível no mercado por períodos relativamente curtos. Assim, poderá ser importante conseguir produzir um suplemento alimentar usando uma forma farmacêutica que permita a ingestão controlada da dose eficaz de compostos fenólicos sem a desvantagem da ingestão de grande quantidade de açúcar.

## **6. OBJETIVOS GERAIS**

Considerando o exposto anteriormente, este trabalho tem por objetivo estudar as atividades antioxidante e anti-inflamatória e o potencial antitumoral de um extrato de *Diospyros kaki* L (dióspiro) visando a formulação de uma forma farmacêutica oral desse extrato.

Os objetivos específicos do trabalho experimental realizado são os seguintes:

- I. Obtenção de um extrato de dióspiro rico em compostos fenólicos e fazer a sua caracterização química.
- II. Avaliação da atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato de dióspiro
- III. Avaliação *in vitro* da atividade anticancerígena do extrato de dióspiro.
- IV. Formulação do extrato numa forma farmacêutica oral (fitossomas) e sua avaliação.

Para se atingirem os objetivos propostos, o trabalho experimental foi delineado em cinco etapas e compreende os capítulos seguintes:

**Capítulo I** - descreve a otimização do método para preparação dos extratos de dióspiro e a caracterização química dos extratos obtidos, incluindo a avaliação da composição fenólica e atividade antioxidante *in vitro*, utilizando diferentes metodologias analíticas.

Assim, apresentam-se e discutem-se os dados dos estudos preliminares que possibilitaram a seleção dos métodos de extração e das técnicas de preparação da amostra de *Diospyros kaki* L. (dióspiro). Procede-se à caracterização química dos extratos utilizados que irão ser utilizados nos ensaios *in vivo* e *in vitro*. Esta caracterização compreendeu avaliação da composição fenólica e da atividade antioxidante *in vitro*.

A 1ª etapa do trabalho compreende a comparação de diferentes modos de preparação da amostra, implementação e/ou otimização de metodologias para a obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos. A avaliação do melhor extrato é feita por métodos espectrofotométricos para a determinação do teor total de compostos fenólicos (método de *Folin-Ciocalteu*), flavonóides totais e procianidinas totais. São utilizados métodos separativos nomeadamente, cromatografia líquida associada a diferentes modos de deteção (absorção no UV-visível, fluorescência, eletroquímico e espectroscopia de massa) para a análise dos diferentes compostos fenólicos do extrato e também será avaliada a sua capacidade antioxidante pelos testes ORAC e HORAC.

**Capítulo II** - respeitante à avaliação da atividade do extrato de dióspiro, *in vitro* e *in vivo*, no que se refere a potenciais efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios.

Assim, (i) são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos estudos de avaliação das propriedades antioxidantes intracelulares; (ii) é estudado o efeito anti-inflamatório de um extrato fenólico de dióspiro num modelo de inflamação aguda e em dois modelos de inflamação crónica, (modelo AR e modelo CU) realizados em ratos e ratinhos.

Realizam-se estudos com extratos de dióspiro para a caracterização *in vitro* de efeitos antioxidantes (atividade antioxidante intracelular e impacto no *oxidative burst* em neutrófilos humanos) e anti-inflamatórios. Com a realização de estudos *in vivo* em animais de laboratório, envolvendo a ingestão de uma dieta suplementada com um extrato de dióspiro, visando a avaliação de efeitos anti-inflamatórios em modelos experimentais de inflamação aguda (modelo do edema da pata induzido pela carragenina) e crónica (CIA, modelo de AR induzida pelo CII e modelo de inflamação crónica de colite).

**Capítulo III** - respeitante à avaliação da atividade anticancerígena dum extrato de dióspiro, *in vitro*, utilizando a linha celular HT-29 (células humanas do cancro do cólon).

Assim, (i) são apresentados e discutidos os resultados obtidos da avaliação da capacidade anti-proliferativa do extrato em células HT-29 e (ii) da capacidade de inibição das enzimas MMP-9 e MMP-2.

É caracterizada a bioatividade *in vitro* do extrato por avaliação da capacidade anticancerígena, estudando a capacidade anti-proliferativa do extrato em células HT-29 e também avaliada a capacidade de inibição da atividade enzimática das MMP-9 e MMP-2.

**Capítulo IV** - respeitante à formulação do extrato numa forma farmacêutica oral.

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos com a formulação farmacêutica para uso oral realizada, relativamente à garantia da manutenção da bioatividade detetada no extrato.

Esta etapa inclui a seleção da forma farmacêutica, a sua preparação e caracterização bem como os ensaios de estabilidade/atividade.

**Os resultados do trabalho foram apresentados em Encontros científicos e originaram publicações em revistas internacionais**

**Publicações em revistas internacionais com arbitragem científica:**

Direito R, Lima A, Rocha J, Ferreira RB, Mota J, Rebelo P, Fernandes A, Pinto R, Alves P, Bronze R, Sepodes B, Figueira ME (2017). "**Dyospiros kaki phenolics inhibit colitis and colon cancer cell proliferation, but not gelatinase activities.**" Journal of Nutritional Biochemistry, 46: 100-108. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2017.03.002

Direito R, Reis C, Roque L, Gonçalves M, Sanches-Silva A, Gaspar M, Pinto R, Rocha J, Sepodes B, Bronze R, Figueira ME (Submetido, 2019). "**Phytosomes with *Diospyros kaki* L. Phenolic Extract: Preparation and *in vivo* assessment of its therapeutic value**". special issue "Bioinspired Design in Drug Delivery" of journal Pharmaceutics

Rosa Direito, João Rocha, Ana-Teresa Serra, Adelaide Fernandes, Marisa Freitas, Eduarda Fernandes, Rui Pinto, Rosário Bronze, Bruno Sepodes, Maria-Eduardo Figueira (submetido, 2019) "**Anti-inflammatory effects of persimmon (*Diospyros kaki*, L.) in experimental rodent rheumatoid arthritis**".

**Comunicações em congressos:**

Direito R, Reis C, Roque L, Gonçalves M, Rocha J, Sepodes B, Lima B, Bronze MR, Figueira ME (2018) "**Phytosomes with *Diospyros kaki* Phenolic Extract: Preparation and Characterization**" at the 10<sup>th</sup> iMed.Ulisboa and 3<sup>rd</sup> i3du Postgraduate Students Meeting 24-25 July, 2018, Lisbon.

Direito R, Lima A, Rocha J, Ferreira RB, Mota J, Rebelo P, Fernandes A, Pinto R, Alves P, Bronze R, Sepodes B, Figueira ME (2017) "***Dyospiros kaki* phenolics inhibit colitis and colon cancer cell proliferation, but not gelatinase activities.**" in "2017 Annual Reunion of the Portuguese Pharmacology Society" held in Coimbra, 2-4 February 2017, organized by the Portuguese Pharmacology Society.

Direito R, Rocha J, Bronze M R, Marques C, Sepodes B, Figueira M E (2013) "**Evaluation of the anti-inflammatory activity of a persimmon (*Diospyros kaki*, L.) extract in an animal (Wistar rats) model of rheumatoid arthritis.**" XLIII Annual Meeting of the Portuguese Pharmacological Society; XXXI Clinical Pharmacology Meeting; XII Toxicology Meeting, UMIB, ICBAS-University of Porto, 6-8 February, 2013, Porto.

## Capítulo I.

---

### Avaliação da composição fitoquímica do extrato de *Diospyros kaki* L. (Dióspiro)

---

# **CAPÍTULO I. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO DE *Diospyros kaki* L. (Dióspiro)**

## **1. INTRODUÇÃO**

Foram estudadas as melhores condições experimentais (escolha de solvente e condições de operação) para obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos, a utilizar no trabalho experimental descrito nos capítulos seguintes deste trabalho. A avaliação da composição fitoquímica do extrato foi efectuada utilizando diferentes metodologias analíticas e foi ainda avaliada a sua atividade antioxidante.

A avaliação do melhor extrato foi feita com base nos resultados obtidos nos métodos espectrofotométricos para a determinação dos teores totais de compostos fenólicos, flavonóides totais e procianidinas totais. Selecionado o extrato mais rico em compostos fenólicos este foi ainda analisado por cromatografia líquida LC-MS/MS para identificação dos compostos presentes. Foram ainda doseados alguns compostos fenólicos característicos deste fruto.

## **2. OBJETIVOS**

Neste capítulo procedeu-se à escolha das condições de preparação de um extrato e sua caracterização no que se refere à sua composição fenólica. Assim:

- I. avaliaram-se diferentes métodos de extração de compostos fenólicos tendo como ponto de partida informação já disponível na bibliografia;
- II. procedeu-se à caracterização química do teor em de fenóis totais, flavonóides totais, procianidinas totais;
- III. identificaram-se os principais compostos fenólicos, açúcares, aminoácidos e vitaminas presentes no extrato;
- IV. quantificaram-se os principais ácidos fenólicos presentes no extrato;
- V. avaliou-se a atividade antioxidante do extrato pelos métodos de ORAC e HORAC.

## **3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS**

### **3.1 Materiais**

Extratos: etanol absoluto da Carlo Erba Reagents; H<sub>2</sub>O desionizada obtida num sistema de purificação de água ultrapura Milli-Q<sup>®</sup> Reference/Millipore Direct Q3 UV System (Millipore, Bedford, US); acetona p.a. da Merck; azoto líquido; papel de filtro Whatman no.41; filtro Watman 0.45µm e 0.20µm.

Determinação do teor em fenóis totais: reagente de *Folin-Ciocalteu* da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US); carbonato de sódio (35%); ácido gálico (98%) adquirido à Fluka Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)

Determinação do teor em flavonóides totais: catequina (98%) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US); nitrito de sódio (5%); cloreto de alumínio (10%); hidróxido de sódio (98%) adquirido à Merck (Darmstadt, Germany).

Determinação do teor em procianidinas totais: vanilina 99% da Reagents plus (1%); ácido clorídrico (37%) da Carlo Erba Reagents (8M); catequina da Sigma Aldrich; etanol absoluto (99,9%) da Carlo Erba Reagents (Rodano, Italy).

Determinação do teor em Ácido Ascórbico: ácido acético glacial, 99% da Carlo Erba Reagents (Rodano, Italy); ácido metafosfórico, 33,5% - 36,5% da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US) e ácido ascórbico (99,7%) foram adquiridos à Panreac Química (Barcelona, Spain); acetato de sódio anidro 99% adquirido à Carlo Erba Reagents (Rodano, Italy); hidrogenocarbonato de sódio, 99,5%, Merck S.A. (Algés, PT); sal de sódio 2,6-diclofenol indofenol, 90% foi adquirido a Riedel-de Haën; xileno, mistura de isómeros 96% foi adquirido a António M.S. Cruz.

HPLC-DAD-MS/MS: Acetonitrile HPLC *gradient grade* foi adquirido a VWR® (Leuven, Belgium); ácido fórmico adquirido à Fluka (Seelze, Germany). Água Milli-Q® water (18.2 MΩ cm) foram adquiridos à Millipore – Direct Q3 UV System equipment (Molsheim, France).

Capacidade de Absorção do Radical Oxigénio (ORAC) e Capacidade de Resgate do Radical Hidroxilo (HORAC): dicloridrato de 2',2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), ácido cafeico, cobalto tetra hidratado, peróxido de hidrogénio adquirido de Sigma-Aldrich (St Louis, USA); solução de fluoresceína dissódica (FL) foi adquirida a partir de TCL (Antuérpia, Bélgica); solução de tampão fosfato (pH = 7,4) de Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha); fluoreto de cobalto II (CoF<sub>2</sub>) adquirido de Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, França).

### 3.2 Equipamentos

Liofilizador Edwards Modulyo; Homogeneizador Ultra-Turrax T25 Janke & Kunkel (IKA Labortechnik, DE); mini-picadora MC-4200, 500W Orbeyzo da Sonifer.ES; centrífuga 5804 R da Eppendorf (Hamburg, DE); rotavapor R-210 da Buchi (Suíça, Meierseggsstrasse, CH); espectrofotómetros Beckmann DU-70®, CAT No 523001 (Beckmann Instruments, Inc., Fullerton, US) e Perkin Elmer Lambda 25 UV/vis, da Perkin Elmer (Massachusetts, US) e células de vidro com um percurso ótico de 1cm; centrífuga Sigma, Modelo 2K15 (Sigma, DE), espectrofotómetro UV-vis, Hitachi L-2000 (Hitachi High Technology, JP); célula de Quartzo com um percurso ótico de 1cm; leitor



de microplacas de fluorescência FL800 com o programa de controlo dos dados Gen5 da Bio-Tek Instruments (Winooski, VT, US); sistema de HPLC-DAD-ED-FD de marca Thermo Finnigan e modelo Surveyor é equipado com amostrador automático, bomba e detetor de fotodíodos e ainda detetor eletroquímico da Dionex; coluna RP – 18 (5µm) 250×4 da Lichrocart®; pré-coluna RP- 18 (5µm) da Manu-cart®; a aquisição de dados e controlo do equipamento é feita com o software Chromquest no detetor de díodos e pelo software Unicam 4880 no detetor eletroquímico.

## **4. MÉTODOS**

### **4.1 Escolha da metodologia para preparação do extrato**

Nesta tarefa pretendeu-se otimizar o método de preparação da amostra, para análises posteriores de caracterização química. Para tal as amostras de dióspiro (*Diospyros kaki* L.) de uma cultivar desconhecida produzida em território português foram usadas em fresco, liofilizado e após tratamento com azoto líquido.

O dióspiro, fruto fresco, foi processado com pele e sem pedúnculo, na trituradora “Mini-picadora MC-4200, 500W Orbeyzo da Sonifer.ES”. Distribuiu-se uma parte do fruto processado por quatro tubos de *Falcon*, que foram introduzidos no liofilizador Eduards Modulyo para a obtenção de dióspiro liofilizado. O remanescente do dióspiro fresco foi ainda sujeito a mais trituração com recurso à UltraTorrax, T25 Janke & Kunkel (IKA Labortechnik, DE) e foram retiradas pequenas porções de fruto processado para um almofariz envolvido em gelo, onde se aplicou azoto líquido.

O extrato do fruto foi preparado de acordo com procedimento descrito na literatura (Wu et al. 2002; Jang et al. 2010; Denev et al. 2013) com algumas modificações. O dióspiro foi tratado com a pele a extração ocorreu durante um período de duas horas, foram evaporados, ressuspendidos em água e armazenados a -20°C até serem analisados.

Com base na literatura (Wu et al. 2002; Jang et al. 2010; Denev et al. 2013), foram escolhidos e testados diferentes solventes de extração, nomeadamente: misturas de etanol/água, 50:50 (v/v); etanol/água, 80:20 (v/v); acetona/água, 80:20 (v/v) nas três amostras que se descrevem:

- (i) A 2g do fruto fresco triturado com recurso à Ultra-Turrax foram adicionados 4mL de cada um dos solventes;
- (ii) A 1g de dióspiro liofilizado foram adicionados 10mL de cada um dos solventes;
- (iii) A 5g de fruto obtidas com recurso à aplicação de azoto líquido foram adicionados 10mL de cada um dos solvente.

Os nove tubos contendo o extracto e os respectivos solventes foram centrifugados a 9000 rpm [centrífuga 5804 R da Eppendorf (Hamburg, DE)] durante 10min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C. Este procedimento foi repetido quatro vezes e os sobrenadantes das quatro extrações foram combinados, filtrados e armazenados a -20°C. Os extratos de dióspiro frescos, de azoto líquido e de dióspiro liofilizados foram posteriormente concentrados com recurso ao rotavapor [rotavapor da Büchi (Meierseggstrasse, CH)]. As amostras foram evaporadas até quase à secura e reconstituídas com água Milli- Q® para um volume de 10 mL.

Os extratos obtidos para cada amostra do fruto (fresco, liofilizados e preparado com azoto líquido) foram usados para determinação do teor em fenóis totais, flavonóides totais e procianidinas totais.

#### **4.1.1 Caracterização dos extratos**

##### **4.1.1.1 Determinação do teor em fenóis totais**

Para a determinação do teor de fenóis totais o método de Stamatakis G et al, 2009 (Stamatakis et al. 2009), foi modificado. Resumidamente, 0,100mL do reagente *Folin-Ciocalteu* foram adicionados a 3,5ml de extrato diluído (1:500). Após 3min, 0,4mL de solução de carbonato de sódio (35% w/v) foram adicionados. Após uma hora foi medida a absorvância da solução a 725nm contra um branco de água desionizada. O ácido gálgico foi usado como padrão externo num intervalo de concentrações de 1 a 6mg/L. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálgico (mg EAG) por 100g de fruto fresco e por mililitro de extrato. As análises foram feitas em triplicado.

##### **4.1.1.2 Determinação do teor em flavonóides totais**

O conteúdo total de flavonóides foi determinado pelo método de Zhishen, Mengcheng & Jianming 1999, described by Cam M et al (Cam et al. 2010). Resumidamente, a 1ml da amostra foram adicionados 4ml de água Milli- Q® e 0,300ml de nitrito de sódio (5% w/v). Esta mistura foi agitada e posteriormente ficou em repouso durante 5 minutos. À mistura foram adicionados 0,300mL de cloreto de alumínio (10%, w/v) e 2mL de solução de hidróxido de sódio 1M para balão de 10 mL cujo volume foi completado com água Milli- Q®. A absorvância da mistura com coloração cor-de-rosa foi medida a 510nm contra um branco de água. Uma solução de catequina foi utilizada como padrão externo num intervalo de concentrações de 1 a 160mg/L. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de catequina (mg EC) por 100g de fruto fresco. A análises foram realizadas em triplicados.

#### **4.1.1.3 Determinação do teor em procianidinas totais**

Este procedimento foi realizado de acordo com Swain and Hillis (Swain et al. 1959). A amostra de extracto foi medida para balões volumétricos de 25ml adicionou-se 7,5ml de solução 1% de vanilina em etanol. A mistura de 2,5ml de etanol, 7,5ml de solução 1% de vanilina em etanol e 8 M de HCl em etanol foi utilizada para completar o volume e foi usada como branco. As soluções foram agitadas e ficaram em repouso por 25 min protegidas da luz. A absorvância foi medida a 500nm a catequina foi utilizada como padrão externo numa concentração entre 5 e 120mg/L. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina (mg EC) por 100g de fruto fresco. As análises foram feitas em triplicado.

#### **4.1.1.4 Determinação do teor em Ácido Ascórbico**

O teor de ácido ascórbico na amostra foi determinado utilizando um método espectrofotométrico, como descrito na norma Portuguesa NP-3030:1985 (NP-3030 1985) com algumas modificações. O doseamento do ácido ascórbico baseia-se na extração deste por uma solução de ácido metafosfórico e de ácido acético. Seguidamente dá-se a redução do corante 2,6-diclorofenol-indofenol pelo ácido ascórbico, extração do corante em excesso pelo xileno e sua determinação por leitura espectrofotométrica a 500nm.

Assim, 2mL de extrato foram homogeneizados num frasco de 100mL com uma solução de ácido metafosfórico a 3%. 3mL desta solução, 3mL da solução tampão de acetato de sódio e ácido acético glacial (acetato de sódio, água destilada e ácido acético glacial (15:35:50, w/v/v) e 1mL de solução corante, 2,6-diclorofenol indofenol, foram adicionadas num tudo de centrífuga de 50mL com 10mL de xileno e foi agitada vigorosamente durante 6 segundos. A mistura foi centrifugada a 3000g durante 3 minutos e a absorvância do sobrenadante foi medida a 500nm, num espectrofotómetro UV-Vis (Hitachi L-2000, Hitachi High Technology, JP), utilizando xileno como referência. Utilizou-se uma gama de calibração de 150mg/L a 1000mg/L de ácido ascórbico. O teor de ácido ascórbico na amostra foi expresso em mg de ácido ascórbico por 100g de dióspiro fresco. As amostras foram analisadas em triplicado e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## **4.2 Identificação de compostos do extrato por HPLC-DAD-MS/MS**

### **4.2.1 Condições de Análise**

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo de fase líquida (HPLC) modelo Waters Alliance 2695 Separation Module (Waters®, Irlanda), que consiste de um sistema de bombas quaternárias, degasificador, amostrador automático, forno para a coluna, todos acoplados a uma rede de detetores de díodos PDA Waters 996 (Waters®,

Irlanda). A espectroscopia de massa em tandem (MS/MS) utilizada foi uma *MicroMass Quattro*® API (Waters®, Irlanda), tipo triplo quadrupolo. A ionização dos compostos foi realizada por uma fonte de iões em electrospray no modo negativo (ESI<sup>-</sup>). Para a aquisição e processamento de dados foi utilizado o programa *MassLynx*® versão 4.1.

Condições cromatográficas: a separação dos compostos foi conseguida por cromatografia de fase reversa com uma coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 mm, 250 x 4 mm) de Merck® ("LiChroCART®250-4", LiChrospher®100 RP-18 (5µm). A fase móvel consiste num gradiente de solventes: (A) Água/Ácido fórmico 0,5% (v/v) e (B) Acetonitrilo, com um fluxo de 0,30 mL/min O volume de injeção foi 20µL. A rede do detetor de diodos foi utilizada numa gama de comprimento de onda de 210 a 600nm.

Condições no espectrometro de massa: utilizou-se modo de ionização negativo numa fonte de electrospray (ESI) mantida a 120°C sendo a temperatura de dessolvatação de 350°C. Foi aplicado um potencial capilar de 3.0 kV e uma fonte potencial de 30 V. Os espectros de massa foram obtidos em "Full Scan" a *m/z* 100-1500. Logo a seguir, foi realizada a fragmentação do ião molecular para determinar os fragmentos característicos dos compostos. Árgon foi usado como o gás de colisão dentro da célula de colisão.

Ensaio realizados: a amostra foi inicialmente analisada em modo "Full Scan" a *m/z* 60-1000 em ESI<sup>-</sup>. Após a identificação dos valores de *m/z* de interesse em "Full Scan", foram aplicadas diferentes energias de colisão (15, 20, 30eV) para promover a fragmentação do ião molecular e determinar os fragmentos característicos dos compostos.

Os dados MS adquiridos foram processados usando o software *MassLynx*® versão 4.1 e a identificação dos compostos foi feita pelo ião precursor ([M-H]<sup>-</sup>) e padrão de fragmentação (MS/MS) com dados da literatura; e comparação com soluções padrão analisadas nas mesmas condições ou com dados da literatura.

## **4.4 Caracterização da atividade antioxidante do extrato *in vitro***

### **4.4.1 Avaliação da Capacidade de Absorção do Radical Oxigénio (ORAC)**

A avaliação da capacidade de absorção do radical oxigénio, ORAC, do extrato de dióspiro seguiu o método descrito por Huang *et al.* (2002) (Huang *et al.* 2002), com modificações para o leitor de microplacas de fluorescência FL800 da BioTek Instruments (Winooski, VT, US), como descrito por Feliciano *et al.* (2009) (Feliciano *et al.* 2009). A mistura reacional era constituída por  $1,5 \times 10^{-7}$  mM de FL e  $1,9 \times 10^{-1}$  mM de AAPH em 75mM de tampão fosfato (pH = 7,4) e a amostra diluída no tampão

fosfato até ao volume final de 200µL. Em seguida esta mistura foi colocada numa microplaca de 96 poços, à temperatura de 37°C, e a reação foi iniciada com a adição de AAPH. A fluorescência emitida pela forma reduzida da fluoresceína dissódica (FL) foi medida e registada a minuto a minuto, por um período de 30 minutos. Os comprimentos de onda utilizados foram de emissão  $\lambda_{em}=530 \pm 25\text{nm}$  e de excitação de  $\lambda_{ex}=485 \pm 20\text{nm}$ . As leituras do leitor de microplaca foram tratadas pelo programa informático de análise de dados Gen5™ da BioTek Instruments (Winooski, VT, US), que lhe está associado. O tampão fosfato foi usado como branco. Os padrões de calibração foram soluções de Trolox nas concentrações de, 10, 20, 30, 40 e 50µmol/L. As amostras, o branco e os padrões foram todos analisados em sextuplicado. Os resultados finais de ORAC, foram expressos em micromoles de capacidade antioxidante de equivalentes de Trolox por 100 g de fruto fresco (µmol CAET/100g FF), foram determinados através da equação de regressão entre a concentração de Trolox e a curva correspondente ao decaimento da área da FL.

#### 4.4.2 Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Hidroxilo (HORAC)

A avaliação da capacidade de resgate do radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) pela nossa amostra seguiu o método desenvolvido por Ou *et al.* (Ou *et al.* 2002), com modificações introduzidas para o leitor de microplacas de fluorescência FL800, descritas por Serra *et al.* (Serra *et al.* 2010). Em cada ensaio utilizaram-se 200µL de uma mistura contendo de 10µL da amostra (extrato de dióspiro diluído), 180µL de FL ( $4 \times 10^{-3}\mu\text{M}$ ) e 10µL de CoF2 (0,79mg/ mL). A mistura foi colocada num dos 96 poços da microplaca, à temperatura de 37°C. A reação foi iniciada com a adição de 5µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.1 M). A fluorescência emitida pela forma reduzida da FL foi medida e registada minuto a minuto, por um período de 35 minutos. Foram usados filtros de fluorescência para os comprimentos de onda de emissão  $\lambda_{em}=530 \pm 25\text{nm}$  e de excitação de  $\lambda_{ex}=485 \pm 20\text{nm}$ . O leitor de placas foi controlado pelo *software* Gen5™ da BioTek Instruments (Winooski, VT, US). O ácido cafeico foi usado como padrão de calibração, por proporcionar uma gama mais linear em relação à obtida com o ácido gálgico (Serra *et al.* 2010). Todas as amostras, o branco e os padrões foram analisados em sextuplicado. Os resultados finais foram expressos em micromoles de capacidade antioxidante de equivalentes de ácido cafeico (CAEAC) (CAEAC, *caffeic acid equivalents antioxidant capacity*) por 100g de fruto fresco (µmol CAEAC/100g FF) e foram determinados através da equação da reta de calibração que relaciona a concentração de ácido cafeico e a curva correspondente ao decaimento da área da FL.

## 4.5 Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados compreendeu, quando aplicável: (i) a determinação da média e do desvio-padrão; (ii) a comparação de valores médios entre grupos através de uma análise de variância ANOVA, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey's ou Sidak's.

Em todos os casos, os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi realizada com a versão 6,01 do programa estatístico GraphPad da PRISM™ da GraphPad Software (San Diego, US).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Escolha da metodologia para preparação do extrato

#### 5.1.1 Caracterização dos extratos

Foram comparados os teores de fenóis totais, flavonóides totais e procianidinas totais dos extratos preparados com diferentes soluções extratantes: acetona 80%, etanol 50% ou etanol 80%. Pretendeu-se avaliar qual a melhor solução extratante e a amostra foi usada na forma fresca, liofilizada e após manipulação com azoto líquido.

##### 5.1.1.1 Determinação do teor em compostos fenólicos totais

Foram construídas retas de calibração, utilizando como padrão ácido gálgico nas concentrações: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 ppm e foi medida a absorvância a 725nm. Na Tabela 1. 1 apresentam-se os dados correspondentes às retas.

**Tabela 1. 1 - Parâmetros das retas de calibração e doseamento de fenóis totais nos extratos em estudo.**

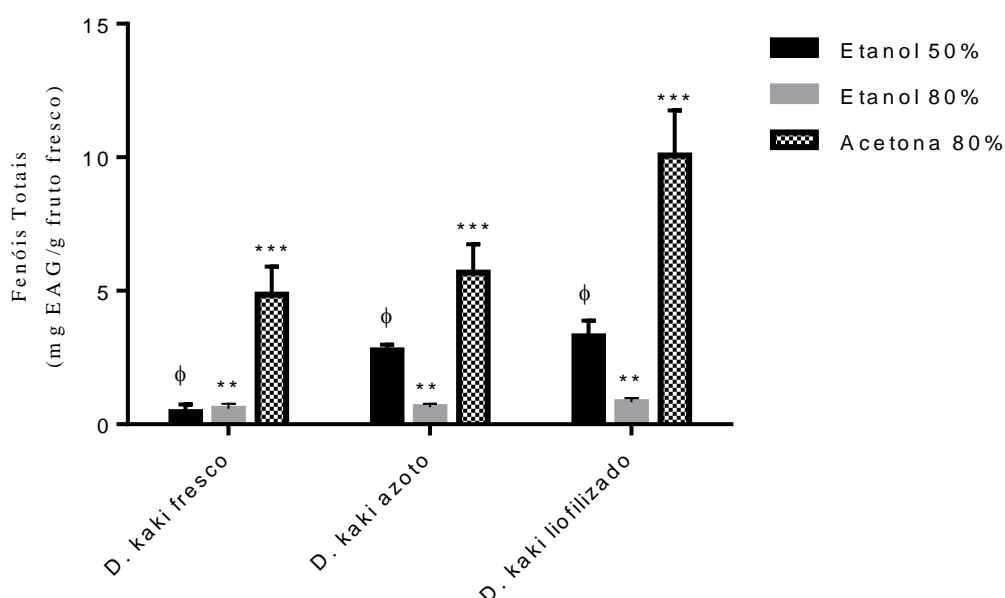
Reta de calibração					Fenóis totais (mg EAG/100g fruto fresco)		
Solvente	Gama de concentração (ppm)	R <sup>2</sup>	Equação (y=mx+b)		Extrato com <i>D. kaki</i> fresco	Extrato com <i>D. kaki</i> com azoto	Extrato com <i>D. kaki</i> liofilizado
			m	b			
Acetona 80%	1-6	0,9953	0,0846	-0,0191	485 ± 10,5	568 ± 10,64	1006 ± 16,9
Etanol 50%		0,9983	0,0859	-0,025	46 ± 2,9	277 ± 1,1	329 ± 10,1
Etanol 80%		0,9953	0,0801	-0,0013	58 ± 1,9	64 ± 1,3	83 ± 1,9

Os parâmetros relativos às retas de calibração foram comparados com os valores controlados em cartas de Controlo construídas no laboratório (Tabela 1. 2) e verificou-se que os coeficientes de correlação obtidos (R<sup>2</sup>), o valor do declive (m) e o valor da ordenada na origem (b) obtido para cada uma das retas estavam dentro dos respetivos intervalos admissíveis no laboratório.

**Tabela 1. 2 - Dados referentes aos parâmetros seguidos nas carta de controle para a determinação de fenóis totais (N=123).**

	Média - 2DP	Média - DP	Média	Média + DP	Média + 2DP
<b>Coefficiente de correlação (R<sup>2</sup>)</b>	0,994	0,996	0,998	1,00	1,002
<b>Declive (m)</b>	0,071	0,08	0,089	0,098	0,107
<b>Ordenada na origem (b)</b>	-0,06	-0,036	-0,013	0,011	0,033

Os resultados obtidos para os diferentes extratos ensaiados apresentam-se na Fig. 1. 1.



**Figura 1. 1 - Determinação dos fenóis totais nas amostras de extratos de dióspiro. \*\*p<0,05 grupo etanol 80% vs grupo etanol 50%; phi p<0,0001 grupo acetona 80% vs grupo etanol 50%; \*\*\*p<0,0001 grupo acetona 80% vs grupo etanol 80%.**

Verificou-se que ocorriam diferenças estatisticamente significativas nos teores de fenóis totais presentes nos diferentes extratos.

O extrato preparado com dióspiro liofilizado e solução extratante de acetona:água (80:20) foi o que apresentou maior teor em fenóis totais. Jang *et al.* (2011) testou diferentes soluções extratantes (metanol, etanol, água e acetona) com cultivares adstringentes de dióspiro e descreveu que o extrato preparado com acetona revelou maior teor em fenóis totais (Jang *et al.* 2011). Denev *et al.* determinou 916,8mg EAG/100g FF, valores da ordem dos doseados no extrato em estudo neste trabalho (1006mg EAG/100g FF) preparado nas mesmas condições (Denev *et al.* 2013).

Jang *et al.* (2010) determinou o teor em fenóis totais nos extratos etanólico e aquoso preparados com a cultivar *Fuyu*. Obteve a menor concentração no extrato etanólico (454mg EAG/100g FF), cerca de metade da concentração obtida no extrato preparado com água (860mg EAG/100g FF) (Jang *et al.* 2010). Também no nosso estudo, as determinações feitas nos extratos etanólicos revelaram menor concentração de fenóis totais.

Os doseamentos do teor em fenóis totais no dióspiro, descritos na literatura variam bastante. Nos estudos de Veberic *et al.*, com 11 cultivares diferentes variam desde 12,7 a 29,5mg EAG/100g de fruto fresco (FF) (Veberic *et al.* 2010). Outros autores como Gorinstein *et al.* e Park *et al.* descrevem teores em fenóis totais entre 1,3mg EAG e 1550mg EAG/100g FF para a mesma cultivar adstringente *Triumph* (Gorinstein *et al.* 2001; Park *et al.* 2008).

A ampla variabilidade observada nestes doseamentos, pode ser explicada com base nas condições edafoclimáticas, diferentes cultivares de dióspiro analisadas, estadio de maturação mesmo quando na fase em que o fruto é mais adequado ao consumo, para além dos diferentes métodos de extração aplicados e os protocolos analíticos também possam influenciar significativamente os resultados (Giordani *et al.* 2011).

#### 5.1.1.2 Determinação do teor em flavonóides totais

Foram construídas retas de calibração, utilizando como padrão catequina em concentrações entre 0 e 160ppm e foi medida a absorvância a 510nm (Tabela 1. 3).

**Tabela 1. 3 - Parâmetros das retas de calibração e doseamento de flavonóides totais nos extratos em estudo.**

Reta de calibração					Flavonóides totais (mg EC/100g fruto fresco)		
Solvente	Gama de concentração (ppm)	R <sup>2</sup>	Equação (y=mx+b)		Extrato com <i>D. kaki</i> fresco	Extrato com <i>D. kaki</i> com azoto	Extrato com <i>D. kaki</i> liofilizado
			m	b			
Acetona 80%	0-160	0,9992	0,0035	0,0033	150±15,5	145 ± 15,3	231 ± 23,4
Etanol 50%					0,4 ± 0,03	12,3 ± 2,5	6,2 ± 1,1
Etanol 80%		0,9945	0,0033	-0,0007	16,4 ± 0,03	3,8 ± 2,1	21 ± 8,9

Os parâmetros relativos às retas de calibração foram comparados com os valores controlados em cartas de Controlo construídas no laboratório (Tabela 1. 4) e verificou-se que os coeficientes de correlação obtidos (R<sup>2</sup>), o valor do declive (m) e o

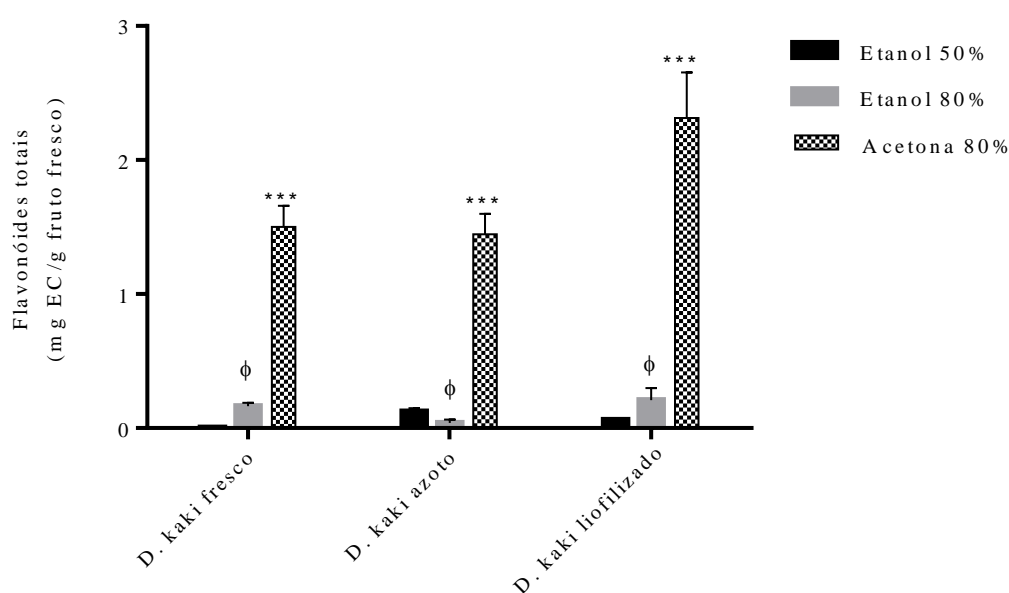


valor da ordenada na origem (b) obtido para cada uma das retas estavam dentro dos respetivos intervalos admissíveis no laboratório.

**Tabela 1. 4- Dados referentes aos parâmetros seguidos nas carta de controlo para flavonóides totais (N=15).**

	Média- 2DP	Média - DP	Média	Média + DP	Média+2DP
<b>Coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>)</b>	0,993	0,995	0,997	1,00	1,002
<b>Declive (m)</b>	0,003	0,003	0,004	0,004	0,004
<b>Ordenada na origem (b)</b>	-0,014	-0,007	-0,001	0,005	0,012

Os resultados obtidos para os diferentes extractos ensaiados apresentam-se na Fig. 1. 2.



**Figura 1. 2- Determinação do conteúdo em flavonóides totais nas amostras de extractos de dióspiro. \*\*\*p<0,0001 grupo acetona 80% vs grupo etanol 50%;  $\phi$  p<0,0001 grupo acetona 80% vs grupo etanol 80%.**

A determinação do conteúdo em flavonóides totais nos extractos em estudo, mostrou que o extrato preparado com o dióspiro liofilizado e solução extratante de acetona:água (80:20) é novamente o que apresenta maior teor em flavonóides totais (231mg EC/100g FF) (Fig. 1. 2). Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os extractos preparados com acetona e os restantes solventes utilizados e também entre cada amostra utilizada.

Gorinstein *et al.* (2011), descreveu 114 mg EC/100g FF destes compostos no extrato de dióspiro (Gorinstein *et al.* 2011), o que se encontra dentro da ordem de grandeza dos teores determinados neste trabalho.

### 5.1.1.3 Determinação do teor em Procianidinas totais

Para a análise de procianidinas totais construíram-se as respectivas retas de calibração e na Tabela 1. 5 apresentam-se os dados referentes a estas retas.

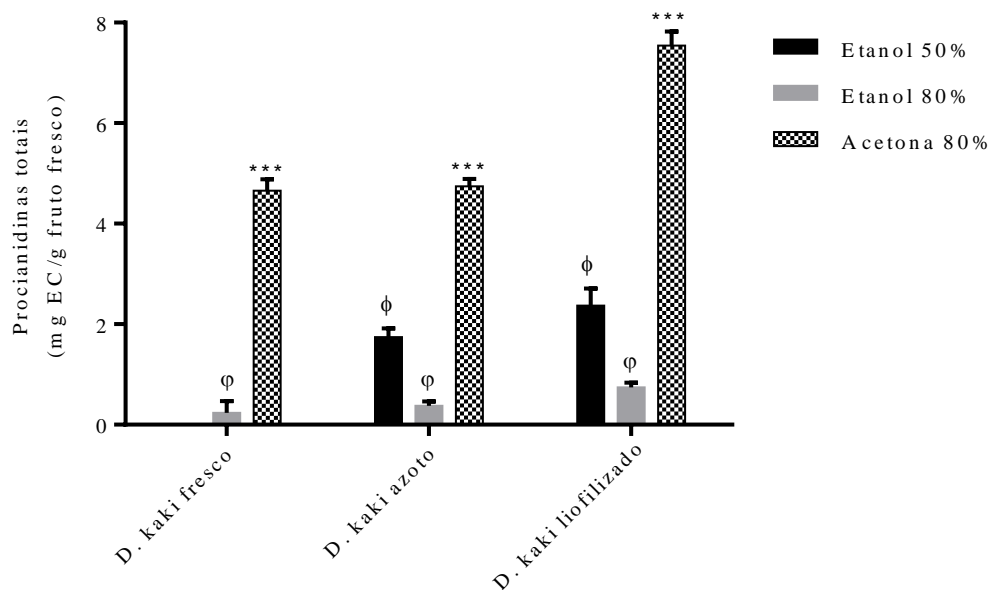
**Tabela 1. 5 - Parâmetros das retas de calibração e doseamento de procianidinas totais nos extratos em estudo.**

Reta de calibração					Flavonóides totais (mg EC/100g fruto fresco)		
Solvente	Gama de concentração (mg/L)	R <sup>2</sup>	Equação (y=mx+b)		Extrato com <i>D. kaki</i> fresco	Extrato com <i>D. kaki</i> com azoto	Extrato com <i>D. kaki</i> liofilizado
			m	b			
Acetona 80%	5 - 120	0,9999	0,002	-0,0042	466 ± 22,2	474,1 ± 14,8	754,1 ± 28,5
Etanol 50%					1,1 ± 0,09	174,4 ± 17,5	237 ± 34,1
Etanol 80%		0,9971	0,0021	-0,0211	23,5 ± 5,5	37,6 ± 8,9	74,4 ± 9,1

Os parâmetros relativos às retas de calibração foram comparados com os valores controlados em cartas de Controlo construídas no laboratório (Tabela 1. 6) e verificou-se que os coeficientes de correlação obtidos (R<sup>2</sup>), o valor do declive (m) e o valor da ordenada na origem (b) obtido para cada uma das retas estavam dentro dos respetivos intervalos admissíveis no laboratório.

**Tabela 1. 6 - Dados referentes aos parâmetros seguidos nas carta de controlo para doseamento de procianidinas totais (N=15).**

	Média-2DP	Média -DP	Média	Média+DP	Média+2DP
<b>Coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>)</b>	0,992	0,994	0,997	0,999	1,001
<b>Declive (m)</b>	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003
<b>Ordenada na origem (b)</b>	-0,03	-0,017	-0,004	0,096	0,023



**Figura 1. 3- Determinação das procianidinas totais (padrão de catequina) nas amostras de dióspiro.**

$\omega$   $p < 0,0001$  grupo etanol 80% vs grupo etanol 50%; \*\*\*  $p < 0,0001$  grupo acetona 80% vs grupo etanol 80%;  $\phi$   $p < 0,0001$  grupo acetona 80% vs grupo etanol 50%.

Ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os extratos preparados com os diferentes solventes e as diferentes amostras (Fig. 1. 3).

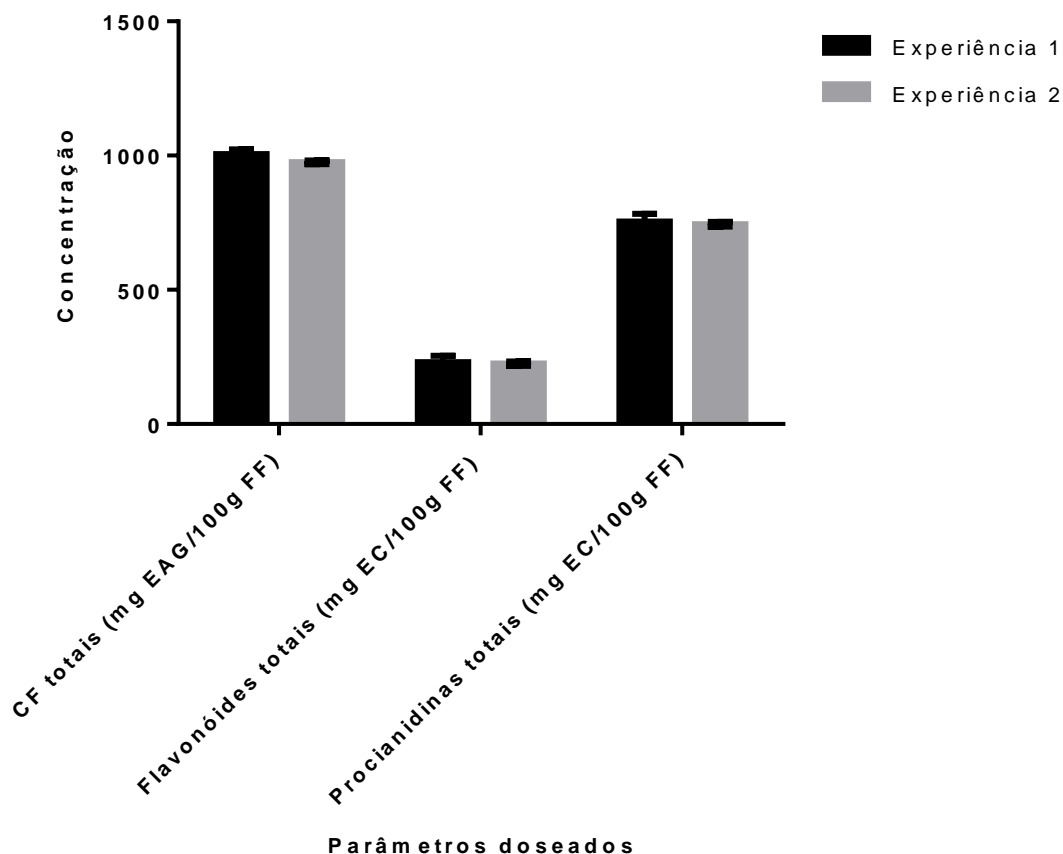
O extrato que apresentou um teor mais elevado de procianidinas totais foi aquele em que se utilizou dióspiro liofilizado e acetona 80%, (754mg EC/100g FF). Gorinstein *et al* descreve 430mg EC/100g FF.

Voltou-se a repetir a extração pela metodologia escolhida e voltámos a fazer os mesmos doseamentos, para garantir a repetibilidade dos resultados anteriores. Os resultados são apresentados na Tabela 1. 7 e verificou-se que são semelhantes aos apresentados por outros autores.

**Tabela 1. 7 - Conteúdo em compostos fenólicos totais, flavonóides totais, procianidinas totais, determinado espectrofotometricamente. Extrato preparado com dióspiro liofilizado e extraído com acetona 80%.**

	Determinação	Descrito	Referência
Compostos fenólicos totais (mg EAG/100 g FF)	975 ± 6,5	916,8	(Denev et al. 2013)
Flavonóides totais (mg EC/100 g FF)	225 ± 7,9	124	(Denev et al. 2013)
Procianidinas totais (mg EC/100 g FF)	744 ± 8,6	430	(Gorinstein et al. 2011)

Verificámos que os resultados para o extrato selecionado estão muito próximos aos resultados dos doseamentos anteriores e aos apresentados na literatura citada. Não se registando diferenças estatisticamente significativas entre as duas experiências de doseamentos realizadas (Fig. 1. 4). Pelo que prosseguimos o trabalho com a escolha da amostra de dióspiro liofilizado e a solução extrativa de acetona 80%, por permitirem obter o extrato mais rico em fenóis totais, flavonóides totais e procianidinas totais.



**Figura 1. 4– Doseamento de compostos fenólicos (CF) totais, flavonóides totais e procianidinas totais.**

Assim, o extrato preparado para estudo neste trabalho, segundo a metodologia selecionada, empregou aproximadamente  $360\text{g} \pm 0,1\text{g}$  de dióspiros frescos (cultivados na região de Setúbal) extraídos com acetona:água (80:20, v/v). Todos os solventes foram evaporados até à secura e reconstituído com água Milli-Q® (240mL). O extrato obtido foi dividido em alíquotas armazenadas em tubos *falcon* a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para as posteriores análises. Na caracterização em termos de teor em compostos fenólicos totais quantificou-se  $15530,56 \pm 277,43$  mg EAG/L extrato correspondendo a  $1035 \pm 18$ mg EAG/100g FF

#### 5.1.1.4 Determinação do teor em ácido ascórbico

O teor em ácido ascórbico (AA) (Tabela 1. 8) contribui também para as propriedades antioxidantes no extrato usado, daí o interesse no seu doseamento.

**Tabela 1. 8 - Teor em ácido ascórbico do extrato (os valores são expresso em média de três replicas  $\pm$  desvio padrão).**

Parâmetro	Por 100g FF	Referência (mg/100g FF)
Teor em ácido ascórbico (mg AA) <sup>a</sup>	18 $\pm$ 1,60	34 $\pm$ 22 (Giordani et al. 2011)

<sup>a</sup> AA – ácido ascórbico; FF –fruto fresco

Segundo os dados disponibilizados pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, os frutos do *Diospyros kaki* têm um teor em ácido ascórbico de 3mg/100g da parte edível (INSA et al. 2018). A *US Food and Drug Administration* descreve 7,5mg/100g FF da parte edível (Food et al. 2012). Está descrito que os genótipos adstringentes e não adstringentes apresentam diferentes concentrações de ácido ascórbico. Os adstringentes têm valor médio de 34 $\pm$ 22 e os não adstringentes de 71 $\pm$ 51mg/100g FF (Giordani et al. 2011).

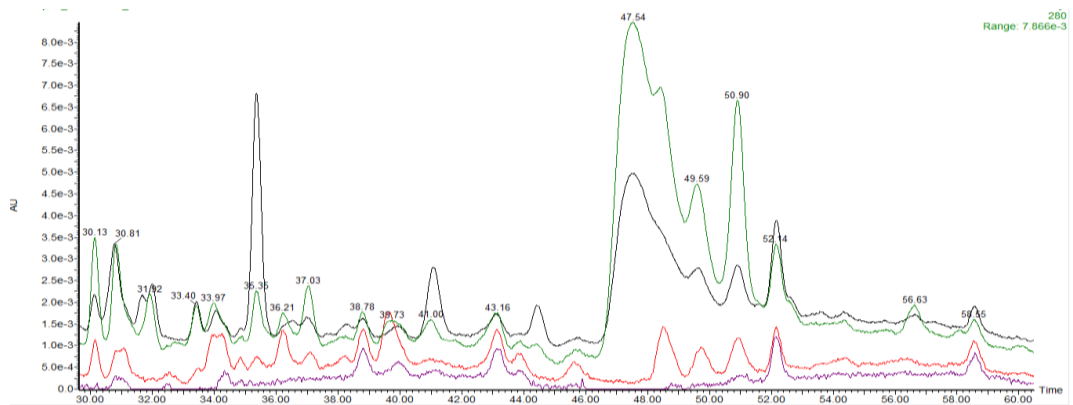
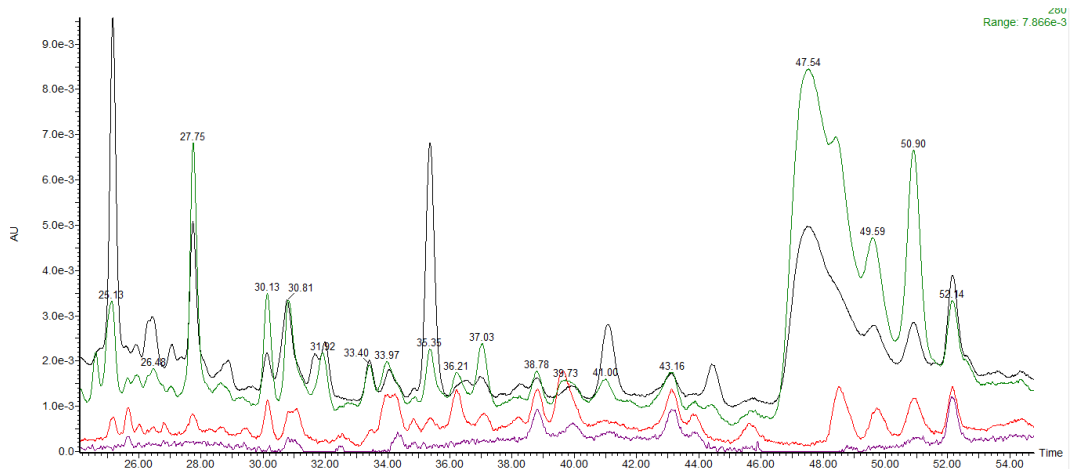
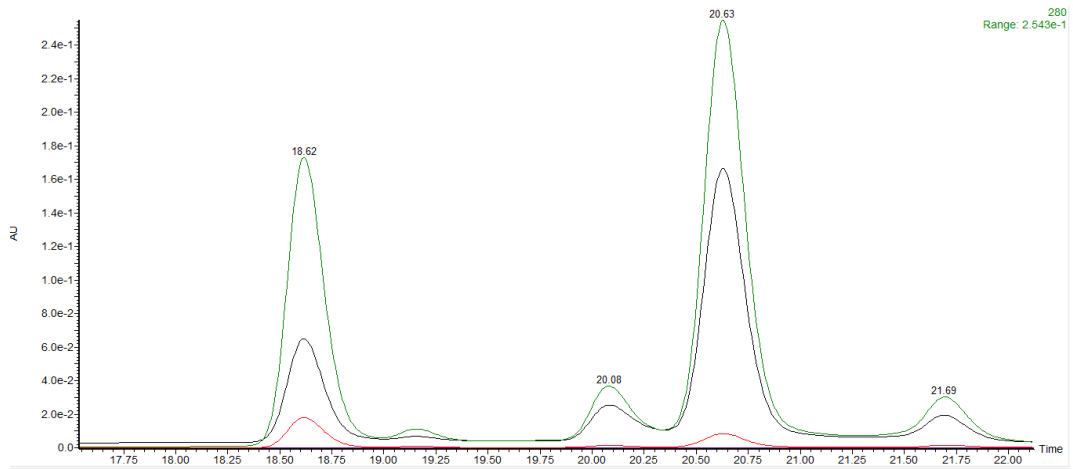
O fruto *D. kaki* é rico em vitaminas e é uma fonte moderada de ácido ascórbico (Singh et al. 2011), como o nosso resultado demonstra.

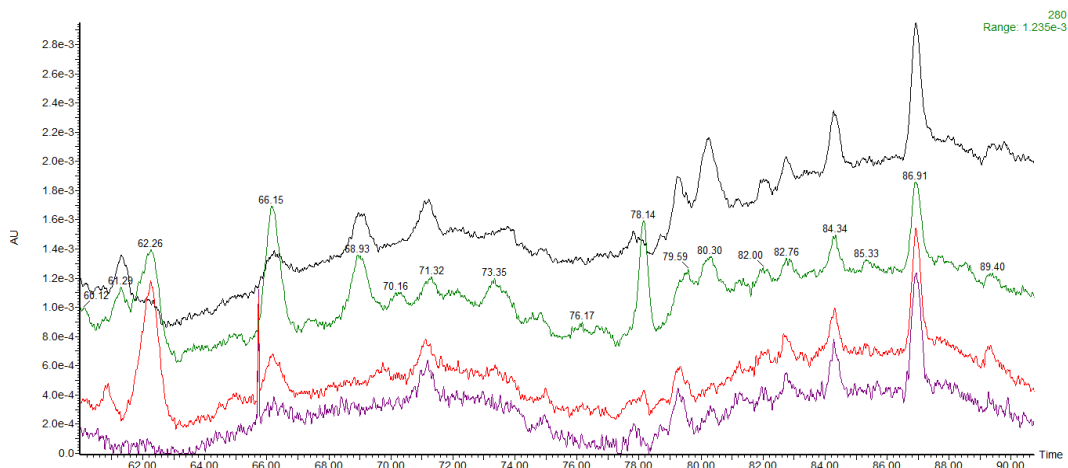
## 5.2 Identificação de compostos do extrato por HPLC-DAD-MS/MS

Para uma mais completa caracterização fitoquímica do extrato utilizado recorreu-se à análise por HPLC-MS/MS nas condições anteriormente descritas.

Após análise foram comparados os cromatogramas do extrato de dióspiro a 360, 320, 280 e 254nm.

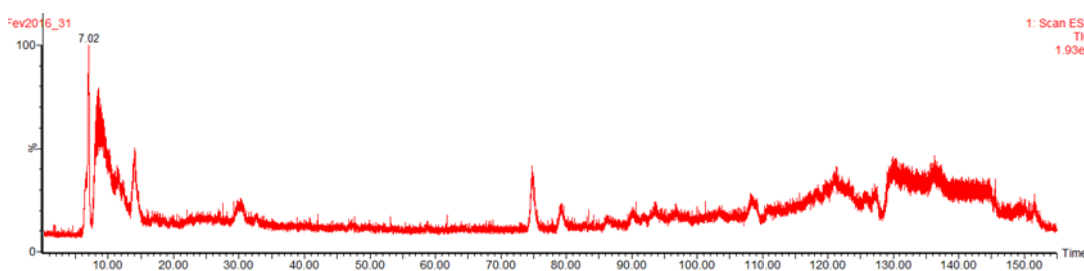
Dadas as características destes compostos e como se mostra na Fig. 1. 5, a deteção a 280nm foi a que permitiu a deteção de mais compostos e com área superior, o que era de esperar dado que corresponde ao comprimento de onda característico de absorção dos compostos fenólicos.





**Figura 1. 5 - Comparação dos cromatogramas (360, 320, 280, 254 nm) MS<sup>2</sup>, entre os 17 min e os 22min, do extrato de dióspiro. Detetor de rede de Diodos (DAD) a 280 nm, 320 nm, 360 nm e 254 nm. (Verde: 280nm; Preto: 254nm; Vermelho: 320nm; Roxo: 360nm).**

Dependendo da família de compostos presentes, ácidos fenólicos, flavonóides, etc, poderão ser escolhidos outros comprimentos de onda mais característicos para proceder à sua análise. Para uma mais fácil identificação dos compostos presentes no extrato procedeu-se à sua análise cromatográfica com detecção por espectrometria de massa. Na Fig. 1. 6 apresenta-se um cromatograma típico obtido em modo SCAN numa gama de m/z 100-1500, quando analisado em modo negativo (ESI<sup>-</sup>).



**Figura 1. 6 - Cromatograma do extrato de dióspiro obtido em modo Full Scan ESI<sup>-</sup> (m/z 100-1500).**

Os compostos fenólicos detetados no extrato ensaiado estão listados na Tabela 1. 9 (mostrando os seus tempos de retenção, o ião molecular desprotonado [M-H]<sup>-</sup> detetado, o comprimento(s) de onda UV-visíveis, os principais fragmentos MS<sup>n</sup> e a tentativa de identificação). Nesta análise foi ainda detetada a presença de açúcares, ácidos orgânicos e vitaminas.

A informação obtida relativa a um possível identificação foi comparada, quando disponível, com os dados disponíveis na bibliografia, (Bylund et al. 2007; Gu et al. 2008; Huang et al. 2010; Li et al. 2010; Engels et al. 2012; Zhang et al. 2013; Jimenez-Sanchez et al. 2015; Sentandreu et al. 2015; Ryu et al. 2016) e em bases de dados disponíveis como a MassBank, PhytoHub; HMDB e FoodDB e com padrões comerciais disponíveis no laboratório e analisados nas mesmas condições.



**Tabela 1. 9 - Possível identificação de compostos por MS/MS no extrato testado de *Diospyros kaki* L..**

$t_r$ (min)	UV $\lambda_{max}$	$[M-H]^-$ $m/z$	Energia (eV)	Fragmentos característicos $MS^2$ $m/z$	Possível identificação	Referência	Matriz descrita
6,626	228	259	25	<b>79</b> , 97	D-Frutose-6-fosfato ou D-Glucose 6-fosfato	(Ryu et al. 2016); MassBank	Dióspiro
7,965	212	179	25	43, <b>59</b> , 71, 75, 88, 179	Glucose	(Ryu et al. 2016); Base de dados MassBank	Dióspiro
8,909	250	133	20	<b>71</b> , 73, 89, 115	Ácido málico	(Bylund et al. 2007; Jimenez-Sanchez et al. 2015; Ryu et al. 2016)	Sumo de dióspiro; dióspiro
9,819	230, 260	191	20	<b>67</b> , 85, 87, <b>111</b>	Ácido cítrico	(Bylund et al. 2007; Jimenez-Sanchez et al. 2015; Ryu et al. 2016)	Sumo de dióspiro; dióspiro
12,206	272	331	25	59, 71, 89, 124, 125, 151, 168, <b>169</b> , 211, 271	Monogalhoil-hexósido (ou ácido gálgico O-hexósido)	(Engels et al. 2012; Sentandreu et al. 2015)	Jocote; Dióspiro
14,025	270	169	20	69, 79, 81, 97, 107, 124, <b>125</b> , 169	Ácido gálgico	(Gu et al. 2008; Jimenez-Sanchez et al. 2015);	Dióspiro
	272	331	20	89, 124, 125, 167, 168, 169, 211, 241, <b>271</b> , 331	Galhoil glucose	(Engels et al. 2012)	Jocote
15,879	220, 283	433	25	71, 82, <b>89</b> , 137, 149, 286, 349, 412, 415, 424,	10-Hidroxiolosido 7-metil éster	(Jimenez-Sanchez et al. 2015)	Sumo de dióspiro
17,253	211, 228	405	25	106, 128, 151, 169, 172, 233, 253, 315, 380, 391, <b>405</b>	-	-	-
21,991	255, 265, 211, 270	373	25	125, <b>169</b> , 211, 253	Monogalhoil-acetilhexósido	(Sentandreu et al. 2015)	Dióspiro
	211, 215, 219, 228, 280	577	20	125, 193, 245, <b>289</b> , 346, 407, 425, 451, 468, 538, 577	Procianidina dímero B1 ou Procianidina B2	(Huang et al. 2010; Jimenez-Sanchez et al. 2015; Heras et al. 2016)	<i>Areca catechu</i> L.; sumo de dióspiro; folhas de dióspiro
25,622	280, 228	289	25	83, 95, 97, <b>109</b> , 121, 123, 125, 137, 149, 151, 193, 203, 205, 279, 289	Procianidina monómero ou (-)-Epicatequina; (+)-Epicatequina	(Huang et al. 2010; Zhang et al. 2013; Jimenez-Sanchez et al. 2015)	<i>Areca catechu</i> L.; sumo de dióspiro; videira

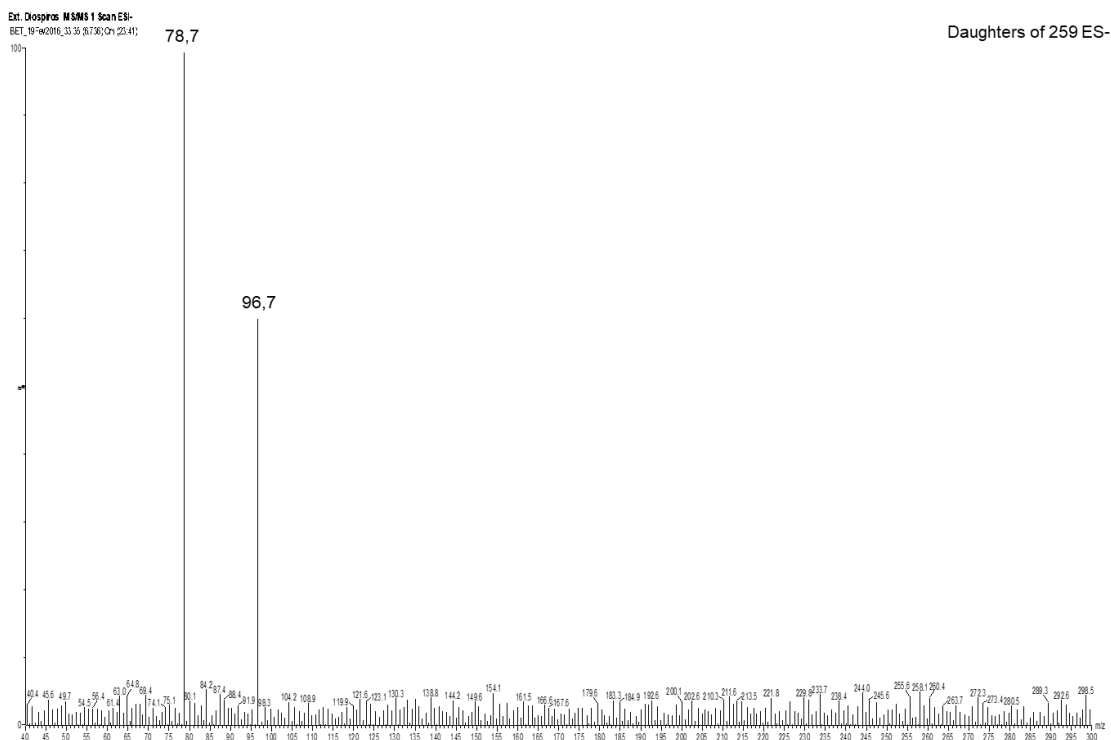
27,536	289; 280	595	20	355; <b>385</b> ; 415; 595	Flavona di-C-hexósido	(Sentandreu et al. 2015)	Dióspiro
30,231	237, 278	329	20	123; 125; 166; <b>167</b> ; 191; 209; 213	Ácido vanílico hexósido	(Jimenez-Sanchez et al. 2015)	Sumo de dióspiro
31,072	288	613	25	131, 187, 316, <b>373</b> , 403, 433, 475, 493, 588, 612	Flavona di-C-hexósido	(Sentandreu et al. 2015)	Dióspiro
47,656	262, 321, 352;	447	25	175, 189, 230, 255, 277, <b>284</b> , 285, 299, 359, 374, 420, 447	Canferol-3-O-glucosídeo ( <i>Astragalin</i> )	(Engels et al. 2012; Jimenez-Sanchez et al. 2015; Quifer-Rada et al. 2015)	Jocote; sumo de dióspiro; cerveja
	265,351	563	25	<b>269</b> ; 563	Apigenina	(Li et al. 2010); Base de dados MassBank	Dióspiro
47,673	211, 215, 277; 220, 270	203	20	74, <b>116</b> , 142, 203; 221	L-Triptofano	MassBank; (Jimenez-Sanchez et al. 2015)	Sumo de dióspiro
79,338	290	329	20	99, 139, 171, <b>211</b> , 229, 329	Terpenóide (19-O-metilcafestol)	Base de dados PhytoHub	Café verde
83,407	280	461	30	233, 191, <b>167</b>	Derivado de ácido vanílico (diglicosídeo)	(Sentandreu et al. 2015)	Dióspiro
86,128	275	577	20	<b>577</b>	Procianidina dímero Procianidina B1 ou B2	(Huang et al. 2010; Li et al. 2010).	<i>Areca catechu</i> L.; dióspiro
96,634	-	339	25	<b>49</b> , 55, 148, 217, 252, 264, 279, 292, 322	Desconhecido	-	
	-	597	20	153, 194, 281, 435, 517, 568, 575, 586, <b>597</b>	Desconhecido	-	
103,467	-	293	25	41, 97, <b>121</b> , 130, 171, 200, 235, 296	Desconhecido	-	
108,153	-	635	25	175, 205, 258, 363, 401, 473, 534, 592, 634, <b>636</b>	Desconhecidos	-	
112,359	267; 359	755	25	<b>755</b>	Quercetina 3-O-(2, 6-di-O-ramnosil-glucosídeo)	(Lee et al. 2014; Karar et al. 2015)	<i>Chokeberry (Aronia melanocarpa); Crataegus monogyna and Crataegus laevigata (Hawthorn);</i>

	-	651	20	96, 160, 296, 298, 326, 346, 412, <b>472</b> , 473, 573, 606, 633, 646	Desconhecido	-
115,707	-	450	25	113, 204, <b>253</b> , 270, 281, 343, 364, 406, 435, 469	Desconhecido	-
119,621	-	617	25	182, 196, 391, 400, <b>414</b> , 534, 466, 530, 569, 585	Desconhecido	-

### 5.2.1 Açúcares

A análise do extrato permitiu a identificação de D-frutose-6-fosfato ou D-glucose-6-fosfato com  $m/z$  259 e iões característicos gerados a 25eV, 79 e 97 (Fig. 1. 7) e conforme a base de dados MassBank e Senica *et al.* (Senica *et al.* 2016). Foi ainda possível verificar a presença de glucose, açúcar comum e em elevada quantidade neste fruto enquanto maduro (Ryu *et al.* 2016; Senica *et al.* 2016). Este é o composto que identificámos com  $m/z$  179 e padrão de fragmentação com energia de 25eV, 43, 59, 71, 75, 88, 179 e conforme apresentado na base de dados MassBank e por Jiménez-Sánchez *et al.* (Jimenez-Sanchez *et al.* 2015).

Sabe-se que o dióspiro apresenta teores de açúcar da ordem de 12,5g de açúcar por 100g de fruto, sendo a frutose, a glucose e a sacarose, que estão presentes em maior quantidade (Jung *et al.* 2005; Jang *et al.* 2010; Jimenez-Sanchez *et al.* 2015) e todas as cultivares, desde verde, até completamente maduro. As quantidades destes açúcares podem, no entanto variara significativamente entre cultivares e grau de maturação. Foram já descritos outros açúcares como arabinose, galactose (Senter *et al.* 1991). Com o recente estudo de Ryu *et al.* sobre a composição do dióspiro, onde empregaram várias técnicas combinadas com RMN, foi possível demonstrar que a glucose e frutose estão presentes no extrato aquoso do sumo do fruto em muito maior quantidade que a sacarose (Ryu *et al.* 2016). Conforme Giordani *et al.* referem, os métodos de extração afetam significativamente a composição em açúcares dos extractos obtidos devido à atividade da invertase, que degrada a sacarose durante a extração (Giordani *et al.* 2011). A baixa percentagem de sacarose observada por Ryu *et al.* (Ryu *et al.* 2016), pode ser devida à atividade da invertase na polpa do dióspiro.



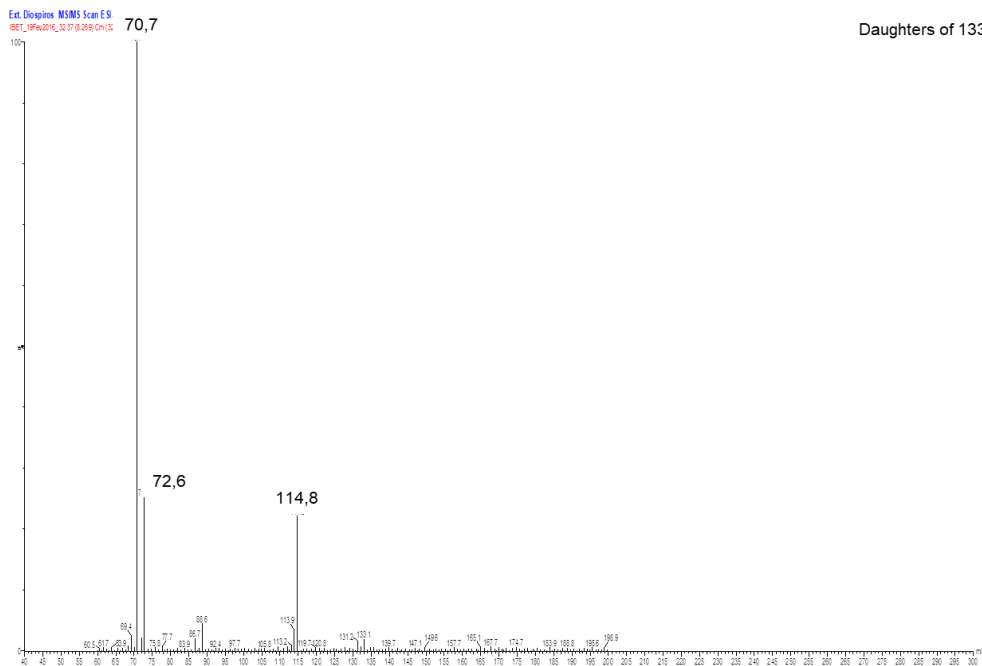
**Figura 1. 7 – Espectro de MS/MS do ião molecular 259 (6,626 minutos) e respetivos fragmentos gerados (79, 97). Ião molecular 259, identificado como D-Fructose-6-fosfato ou D-Glucose 6-fosfato (M=260,02972).**

## 5.2.2 Ácidos orgânicos

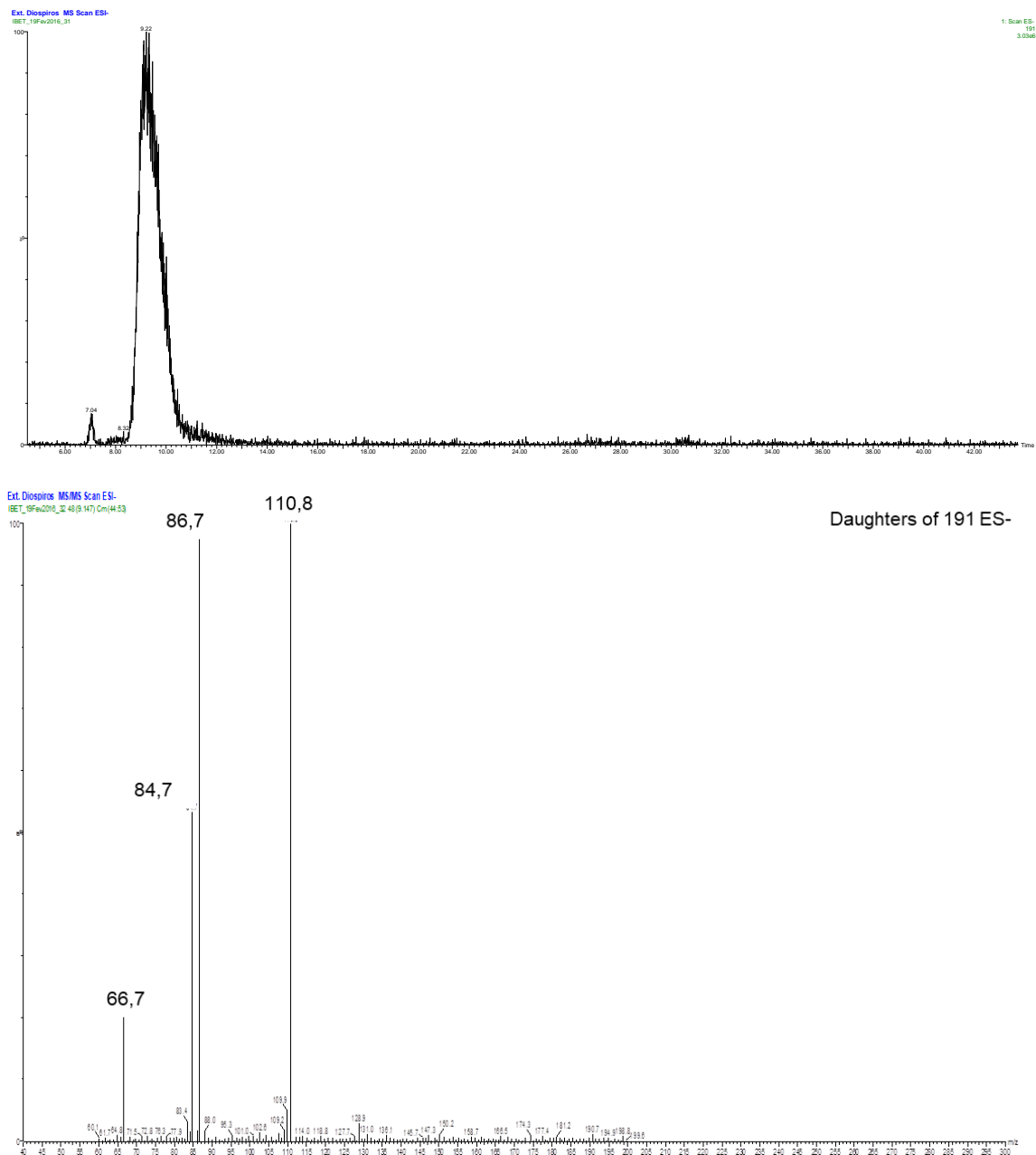
Os resultados obtidos mostram a presença de ácido málico e cítrico (Fig. 1. 8 e Fig. 1. 9) no extrato analisado.

O ácido málico com ião molecular  $[M-H]^-$   $m/z$  133 e com os iões de fragmentação característicos 71, 73, 89 e 115 (Fig. 1. 7) em que  $[M-H-H_2O]^-$  corresponde ao principal ião molecular desprotonado gerado (115) na fragmentação. Que deverá corresponder à perda de uma molécula de água. Conforme descrito por (Bylund et al. 2007; Jimenez-Sanchez et al. 2015).

O ácido cítrico apresentou o ião molecular  $[M-H]^-$   $m/z$  191, sob energia de fragmentação de 20eV, revelou o padrão característico deste composto, pelos fragmentos iónicos gerados, 67, 85, 87 e 111 (Fig. 1. 8). O principal fragmento gerado (111) foi identificado como  $[M-H-2H_2O-CO_2]^-$  por Bylund *et al.* (Bylund et al. 2007; Jimenez-Sanchez et al. 2015). Tal como no nosso estudo, também Ryu *et al.* por tecnologia HPLC-DAD-ESI-TOF/MS, identificou e quantificou os ácidos málico e cítrico, no extrato aquoso do sumo de dióspiro, em média  $5,881 \pm 1,114$  e  $4,900 \pm 0,816$  mM respectivamente (Ryu et al. 2016).



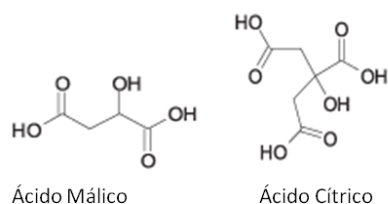
**Figura 1. 8 –Espectro MS/MS do ião molecular 133 (8,909 minutos) identificado como ácido málico (M=134,02152), com os fragmentos 71, 73, 89 e 115.**



**Figura 1. 9 – Em cima - Cromatograma do ião extraído correspondente ao ião precursor 191 aos 9,819 minutos, identificado como ácido cítrico ( $M=192,02700$ ). Em baixo – Espectro de MS/MS do ião precursor  $m/z$  191.**

Sabe-se que os ácidos orgânicos ocorrem naturalmente nos alimentos como resultado de processos metabólicos, nomeadamente no metabolismo do ácido abscísico, e estão relacionados com a tolerância ao stress ambiental em plantas (Setha et al. 2004). Os principais no dióspiro são os ácidos málico e cítrico (Fig. 1. 10) (Ryu et al. 2016). Nos estudos de Senter *et al.* (1991) com dióspiros, estes ácidos foram quantificados. O ácido málico foi o ácido predominante em todas as cultivares

estudadas pelos autores, seguido de cítrico (Senica et al. 2016). As quantidades de málico aumentaram com a maturação e as do cítrico diminuíram (Senter et al. 1991).



**Figura 1. 10 - Estruturas químicas dos ácidos málico e cítrico.**

O ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) é um ácido orgânico tricarboxílico presente na maioria das frutas, sobretudo nos cítricos como o limão e a laranja (Gorinstein et al. 2001).

O ácido málico ( $C_4H_6O_5$ ), pertencente ao grupo dos ácidos carboxílicos, encontrado naturalmente em frutas como a maçã e a pera. Aparece em menores quantidades noutras frutas, como os citrinos (Duarte et al. 2012).

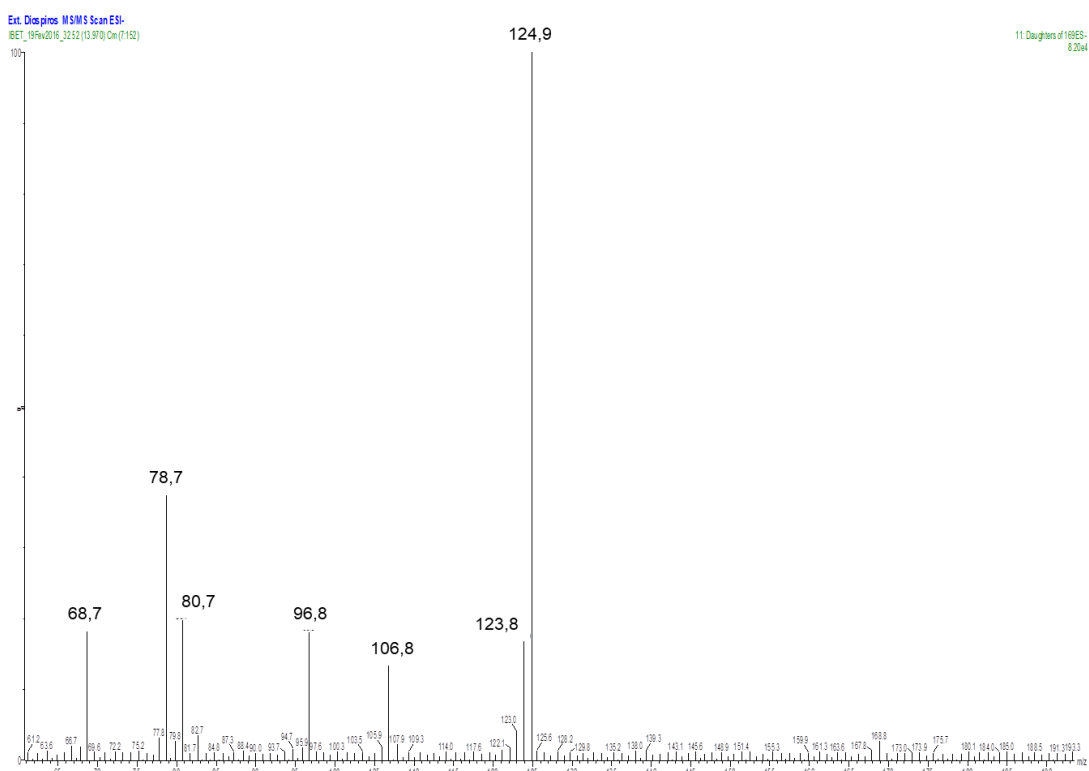
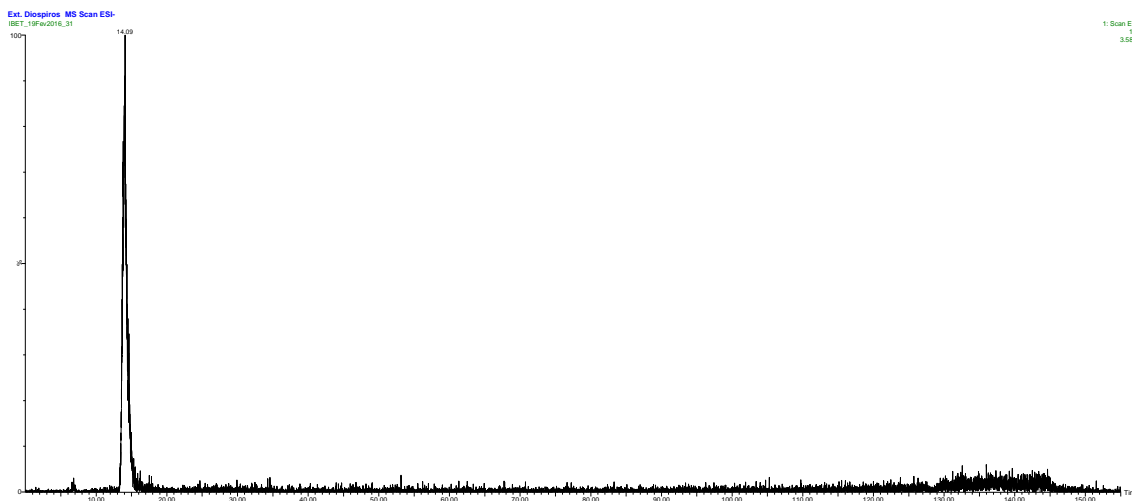
### 5.2.3 Ácidos fenólicos: Ácidos Benzóicos e derivados

Os ácidos benzoicos têm uma estrutura química C6-C1 e mostram uma perda característica de  $CO_2$  [ $M-H-44$ ]<sup>-</sup> por análise de  $MS^2$  (Vallverdú-Queralt et al. 2013).

Nas amostras analisadas foram identificados o ácido gálico ( $m/z$  169) e seus derivados hexósido ( $m/z$  331) e acetilhexósido ( $m/z$  373). Ainda derivados glicosídicos ( $m/z$  329 e  $m/z$  461) do ácido vanílico ( $m/z$  167) (Jimenez-Sanchez et al. 2015; Sentandreu et al. 2015).

Os derivados de ácido gálico formaram os principais grupos de fenóis detetados no extrato do fruto dióspiro, que apresentavam no padrão de fragmentação um íão  $m/z$  169 (característico do ácido gálico) e também o íão descarboxilado com  $m/z$  125. O ácido gálico (Fig. 1. 11), foi confirmado pela análise nas mesmas condições de um padrão comercial. Este composto tem sido o mais reportado como característico de extratos de polpa de diferentes variedades de dióspiro (Suzuki et al. 2005; Gu et al. 2008; Giordani et al. 2011).





**Figura 1. 11 – Em cima – Cromatograma do ião extraído correspondente ao ião precursor  $m/z$  169 (aos 14,025 minutos) identificado como ácido gálico ( $M=170,02$ ;  $C_7H_6O_5$ ). Em baixo – Espectro de fragmentação MS/MS do ião precursor  $m/z$  169.**

Os compostos na fonte iónica do espetrometro de massa podem formar dímeros e polimerizar na fonte iónica. Assim por exemplo era detectado no espectro de massa para o mesmo tempo de retenção o valor de  $m/z$  331 e  $m/z$  663. A análise de fragmentação do ião precursor  $m/z$  331 originou os iões  $m/z$  271, 211 e 169 e com base na literatura pôde identificar-se o composto com o ião molecular 331 como o composto monogalhoil-hexósido ou ácido gálico *O*-hexósido, com fórmula molecular  $C_{13}H_{16}O_{10}$  (Sentandreu et al. 2015; Heras et al. 2016).

O composto com íon precursor  $m/z$  461 foi identificado como derivado do ácido vanílico (diglicosídeo). Com a principal transição  $MS^2$  correspondente à perda neutral de 294 amu (pentósido + hexósido) para gerar o íon  $m/z$  167 (ácido vanílico) como o íon mais abundante (Sentandreu et al. 2015).

O composto detectado aos 30,23 minutos com íon precursor  $m/z$  329 e íões  $m/z$  167 e 191 após fragmentação, foi identificado como derivado hexósido do ácido vanílico (Sentandreu et al. 2015).

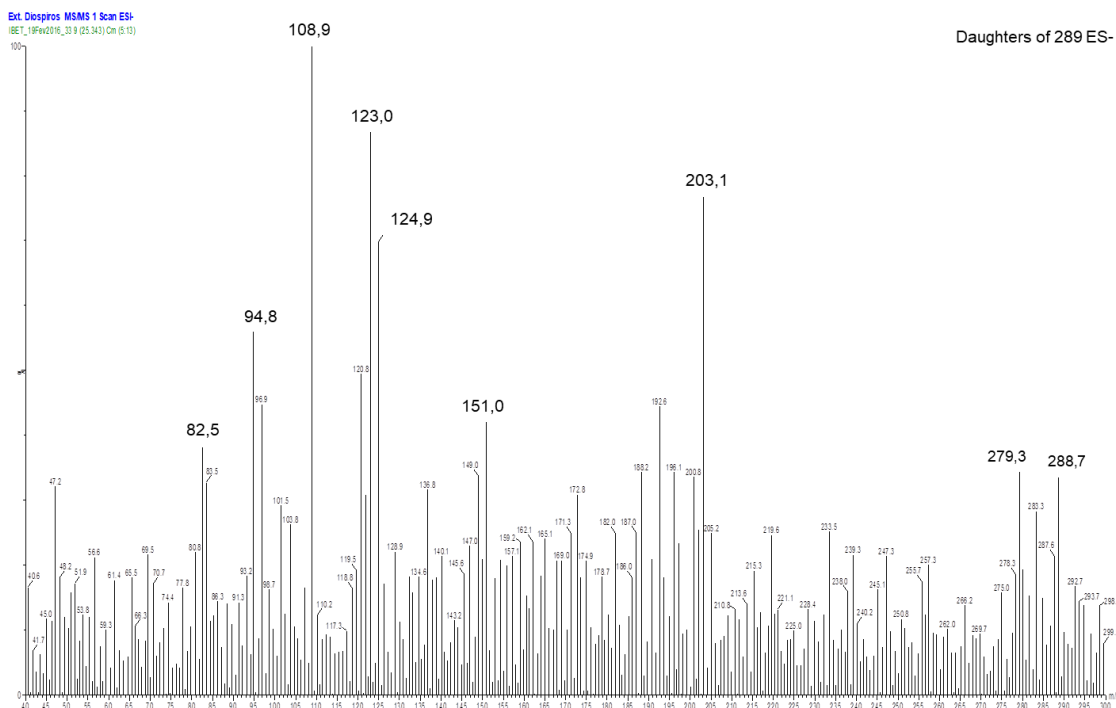
A diversidade de fenóis com pequena estrutura molecular descritos até à data nos extratos da polpa do dióspiro é surpreendentemente escasso, sendo normalmente restrito de três a dez componentes (derivados principalmente do ácido cinâmico), dependendo da variedade em estudo (Giordani et al. 2011). Assim, pode-se concluir que o perfil de fenóis de baixo peso molecular, por exemplo, na polpa do dióspiro ainda permanece com muito por se conhecer (Sentandreu et al. 2014). O nosso estudo veio descrever alguns ácidos fenólicos benzoicos e derivados conforme descrito por (Jimenez-Sanchez et al. 2015; Sentandreu et al. 2015; Heras et al. 2016).

## **5.2.4 Flavonóides**

### **5.2.4.1 Flavanois**

As catequinas são os principais flavonóides do dióspiro. As catequinas (flavan-3-ol) são flavonóides que podem oferecer potenciais benefícios para a saúde humana, estes estão relacionados com várias funções fisiológicas, incluindo um papel protetor contra doenças relacionadas com o stresse oxidativo, capacidades antimutagénicas e anticarcinogénicas (Suzuki et al. 2005). Extratos de dióspiro mostraram atividade de indução de apoptose de células leucémicas Molt 4B (Achiwa et al. 1997).

Foram já reportados na literatura procianidinas constituídas por (epi)catequina e (epi)galthocatequina juntamente com ácidos fenólicos livres em extratos de diferentes variedades de dióspiro japonês (Suzuki et al. 2005). Porém Sentandreu e colaboradores não encontraram nenhuma evidência de sua presença nas amostras ensaiadas (Sentandreu et al. 2015). No nosso estudo detetámos a presença aos 25,62 minutos do íon precursor  $m/z$  289, podendo ser (-)epicatequina (Zhang et al. 2013) ou (+)epicatequina (MassBank) e com um espectro de fragmentação característico deste tipo de compostos:  $m/z$  109, 123, 125, 205 e 245 (Fig. 1. 12) (Jimenez-Sanchez et al. 2015).



**Figura 1. 12 – Espectro MS/MS do ião precursor m/z 289. (tr=25,622 minutos) identificado como monómero de procianidina [(-)-epicatequina ou (+)- epicatequina M=290,07904].**

#### 5.2.4.2 Flavonol

Foi detetado no extrato de dióspiro o ião precursor m/z 447 ao tempo de retenção de 47,6 minutos e que deverá corresponder ao canferol-3-O-glucosídeo, de acordo com o espectro de fragmentação obtido. A perda da molécula de açúcar de 162 u.m.a. origina o ião fragmento m/z 285 (Quifer-Rada et al. 2015).

Autores identificaram este composto em sumo de dióspiro e em peles de jacote ou até mesmo em cervejas quando se estudou os compostos fenólicos por espectrometria de massa de alta resolução (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS) (Engels et al. 2012; Jimenez-Sanchez et al. 2015; Quifer-Rada et al. 2015).

#### 5.2.5 Taninos condensados ou proantocianidinas

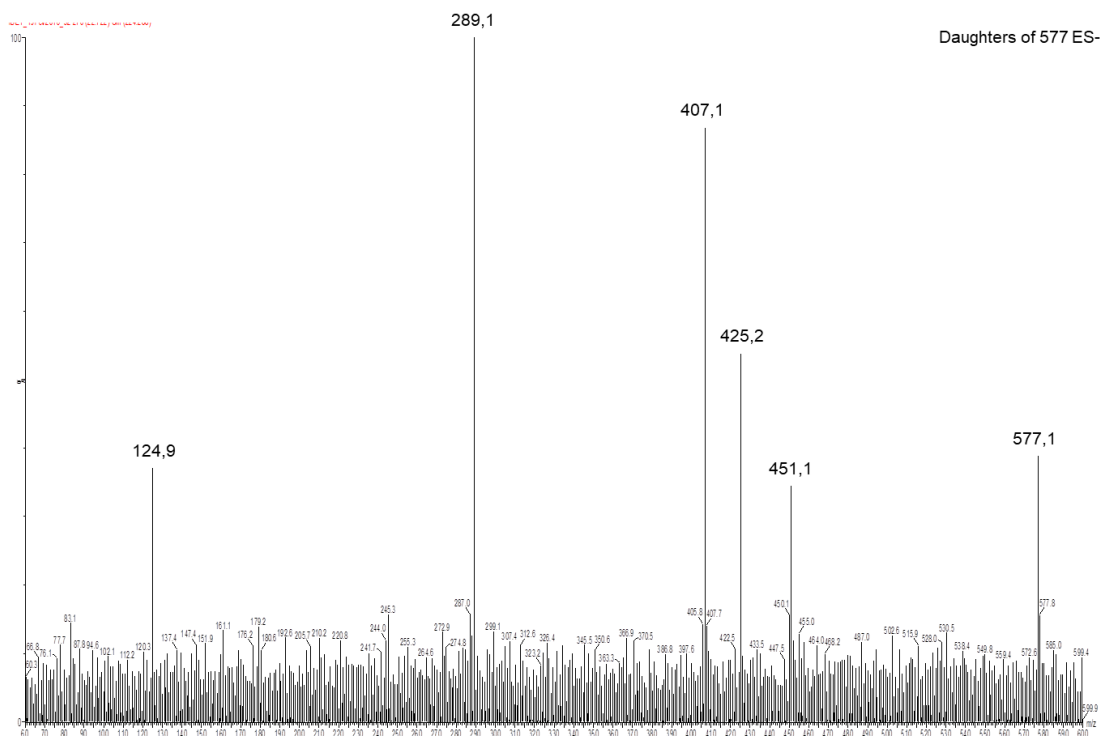
Fenóis de alto peso molecular, também conhecidos como taninos condensados ou proantocianidinas, que são polímeros de catequina com ou sem glicosilação (Halsam et al. 1988; Sentandreu et al. 2015) foram já identificados neste tipo de amostras. As proantocianidinas constituídas por apenas epicatequina são chamadas de procianidinas (de la Iglesia et al. 2010). Matsuo (Matsuo 1978) identificou os taninos

no dióspiro japonês e descobriu que o tanino consistia em catequina, catequina-galhato, galhocatequina e galhocatequina-galhato. Mais tarde, Li *et al.* no estudo da estrutura das proantocianidinas presentes no dióspiro, verificou que estas consistem essencialmente em epigalocatequina-3-*O*-galhato, galhato de epicatequina e epicatequina (Li *et al.* 2010).

As proantocianidinas resultam de reações de polimerização (condensação) de monómeros de flavonóides ligados por carbonos (C4-C8). Existem 2 tipos de proantocianidinas, as proantocianidinas B que são constituídas por unidades de catequina e epicatequina ligadas pelo C4 e C6 ou C8 e as proantocianidinas A, que para além do já referido, possuem também ligações C2-C7 (de la Iglesia *et al.* 2010).

Vários estudos mais recentes vieram mostrar a associação das procianidinas do dióspiro a várias funções biológicas, como atividade antioxidante (Jang *et al.* 2010; Tian *et al.* 2011; Tian *et al.* 2012), atividade anti-inflamatória, antimicrobiana (Borges-Argaez *et al.* 2007), hipolipidémica (Gorinstein *et al.* 1998; Kondo *et al.* 2004; Fukai *et al.* 2009; Zou *et al.* 2012), antidiabéticas (Lee *et al.* 2006) e decréscimo do risco de aterosclerose (Park *et al.* 2008).

A presença de dímeros de procianidinas no extrato analisado (Fig. 1. 13) foi detetada aos 21,99 minutos e também aos 86,13 minutos. O composto com *m/z* 577 quando aplicado um potencial de 20eV gera os fragmentos 125, 289, 346, 407, 425, 451, 577 e foi identificado como procianidina dímero (B1 ou B2) por (Huang *et al.* 2010; Li *et al.* 2010; Jimenez-Sanchez *et al.* 2015; Heras *et al.* 2016) e no MassBank (M=578,14243).



**Figura 1. 13 - Espectro do ão precursor m/z 577 e fragmentos gerados por MS/MS. Composto com m/z 577, identificado como procianidina dímero (B1 ou B2).**

Os taninos do dióspiro (proantocianidinas) têm provado exercer significativos efeitos hipocolesterolêmicos em uma variedade de modelos. Os efeitos hipolipidêmicos dos taninos de elevado peso molecular foram investigados por Zou *et al*, suplementando a dieta de ratinhos machos *Sprague-Dawley* que consumiram uma dieta 2% elevada em colesterol e tratados com doses diferentes de taninos de elevado peso molecular ou sem eles, durante 9 semanas. Os taninos de elevado peso molecular efetivamente reduziram os triglicerídeos séricos e hepáticos, o colesterol total e as LDL enquanto aumentaram as HDL séricas e hepáticas. Um tratamento de 100mg taninos de elevado peso molecular/kg de peso corporal por dia, pode aumentar significativamente a atividade da *lecithin cholesterol acyl transferase* (LCAT) sérica e a excreção fecal de ácidos biliares. O depósito das gotículas lipídicas hepáticas e a esteatose hepática, induzidas pela dieta colesterol-elevada, foram marcadamente inibidas pelos taninos de elevado peso molecular. A dieta rica em colesterol induz stresse oxidativo em ratos mas os taninos de elevado peso molecular aumentam significativamente a atividade das superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GSH-Px), elevando a capacidade antioxidante total (T-AOC), e diminuem o malondialdeído (MDA) no soro e fígado (Zou *et al*. 2012).

A regulação genética envolvida na homeostasia do colesterol pelos taninos condensados do dióspiro em duas linhas celulares (HepG2 e Caco-2), foi elucidada por Ge *et al*. 2016 (Ge *et al*. 2016). Ge *et al*. encontraram evidências de que os taninos do dióspiro modulam extensivamente a expressão de genes envolvidos na absorção e

efluxo de colesterol em linhas celulares, células HepG2 e Caco-2 (Ge et al. 2016). O intestino age como detentor de um portão para absorção de colesterol. A inibição da absorção de colesterol contribui para a redução dos níveis de colesterol no plasma. Taninos do dióspiro podem efetivamente reduzir os níveis de colesterol celular tanto nas células HepG2 como Caco-2. Inibiram o acúmulo celular de colesterol através da redução do gene relacionado com a biossíntese de colesterol (SREBP-2), do gene relacionado à absorção de colesterol (NPC1L1) e dos genes relacionados ao regulador do efluxo de colesterol (por exemplo ABCA1, ABCG1, CYP7A1), mas independentemente da via de sinalização do LXR $\alpha$  (Ge et al. 2016).

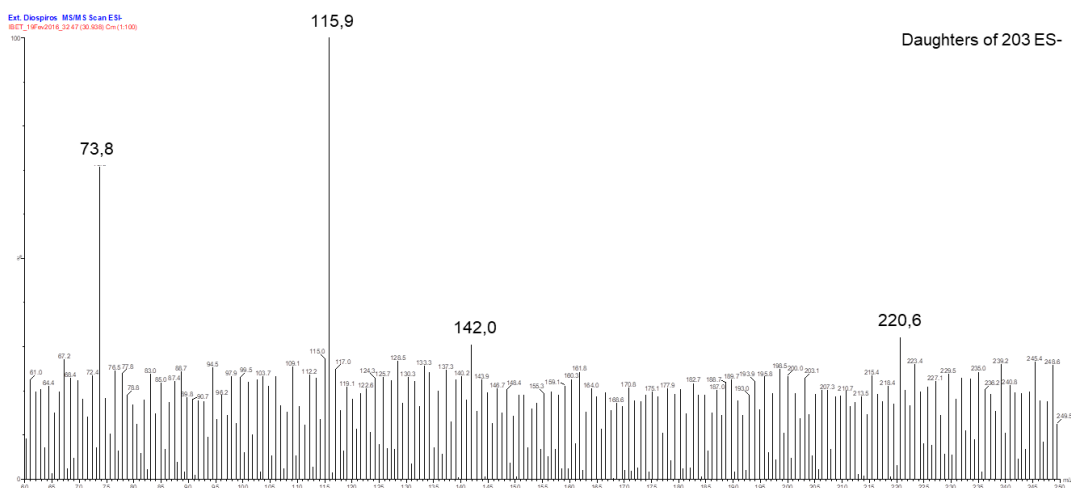
Um extrato etanólico de dióspiro adstringente estudado na linha celular HepG2 (linha celular de hepatoma humano) segundo Hwang *et al.* (Hwang et al. 2017) mostrou efeito na atividade antioxidante, supressão do colesterol e atividade da HMG-CoA redutase e o mecanismo molecular relacionado para LDL e HDL. O mesmo estudo demonstrou que o extrato elevou os recetores de LDL e SREBP-2, que controla o recetor de LDL, aumenta a expressão de ABCA1, um transportador de colesterol, diminuindo LDL e aumentando HDL. Estes resultados provaram que os diósipiros, têm efeitos antioxidantes e de prevenção de hipercolesterolemia e podem contribuir para prevenir a síndrome metabólica (Hwang et al. 2017).

Também Gato *et al* extraiu de diósipiros jovens o que designaram por fibras ricas em taninos com o objetivo de preparar barritas para integrar na alimentação diária de 40 pessoas, três vezes ao dia, antes das refeições, durante 12 semanas. Observou-se que ocorria uma redução significativa dos níveis de colesterol total e LDL, sem alterar os níveis de HDL nem de triglicérides no plasma (Gato et al. 2012). Os taninos dos diósipiros jovens incluem taninos altamente polimerizados, compostos por EC (epicatequina), EGC epigallocatequina, ECg (epicatechin-3-*O* -galhato), e EGCg (epigallocatequina-3-*O*-galhato) (Gato et al. 2012). Assim, as fibras ricas em taninos de diósipiros jovens podem ser um produto útil para prevenir e tratar hipercolesterolemia, uma vez que a sua ingestão diária reduziu os níveis plasmáticos de colesterol em humanos (Gato et al. 2012). Os níveis plasmáticos de HbA1c foram também significativamente reduzidos como resultado do consumo das barritas com altas doses de fibras ricas em taninos, o que foi relacionado por Gato *et al* com a capacidade dos taninos para ligarem ácidos biliares. Assim, fibras ricas em taninos podem ser efetivas na prevenção e/ou tratamento da diabetes tipo 2. (Gato et al. 2012).

Matsumoto *et al.* (2011) testaram *in vitro* e *in vivo* os taninos altamente polimerizados preparados a partir de dióspiro jovem tendo comprovado a capacidade destes se ligarem a ácidos biliares, promovendo a sua excreção fecal em ratinhos com suplementação alimentar de 1% (p/p) em taninos, o que leva estes autores a sugerir, que os taninos polimerizados do dióspiro são um produto alimentar benéfico para a prevenção e melhoria da síndrome metabólica (Matsumoto et al. 2011).

## 5.2.6 Aminoácidos

Com base na análise do composto detetado aos 47,67 minutos com ião precursor  $m/z$  203 e padrão de fragmentação com energia de colisão a 20eV iões  $m/z$  74, 116, 142, e 203 foi possível identificar a presença de *L*-triptofano ( $M=204.08988$ ) no extrato (Fig. 1. 14). Este aminoácido foi identificado em estudos recentes, no extrato aquoso de dióspiro quando analisado com base em técnicas de RMN (Ryu et al. 2016). Com a tecnologia HPLC-DAD-ESI-TOF/MS aplicada a sumo de dióspiro foi também identificado o ião precursor  $m/z$  203 como o aminoácido *L*-triptofano (Jimenez-Sanchez et al. 2015).



**Figura 1. 14 – Espectro MS/MS do composto com ião precursor 203 com fragmentos principais iões com  $m/z$  74, 116, 142, 221. Composto identificado como *L*-triptofano ( $M=204,08988$ ).**

Nos estudos de caracterização dos sumos de diósperos por metodologia de HPLC-DAD-ESI-TOF/MS de Jiménez-Sánchez *et al.*, foram detetadas proteínas e derivados. Iões precursores com  $m/z$  180, 164 e 203 foram identificados como *L*-tirosina, *L*-fenilalanina e *L*-triptofano. Estes autores reportaram a deteção dos iões precursores  $m/z$  395 e 383, que consideraram como péptidos, com possibilidade de serem *L*-lisina, *L*-serina, *L*-tirosina/*L*-serina, *L*-prolina, *L*-prolina, *L*-prolina para o primeiro e *L*-lisina, *L*-trionina e *L*-histidina para o segundo (Jimenez-Sanchez et al. 2015).

Em geral, a composição nutricional e o perfil fenólico do extrato de dióspiro analisado por HPLC-DAD e MS/MS está de acordo com os dados disponíveis na literatura (Gu et al. 2008; Xu et al. 2012; Denev et al. 2013; Sentandreu et al. 2014;

Jimenez-Sanchez et al. 2015; Sentandreu et al. 2015; Heras et al. 2016; Ryu et al. 2016).

Os estudos já reportados mostram que é importante a contribuição das proantocianidinas compostos fenólicos comprovadamente bioativos, que apresentam uma contribuição benéfica em diversas doenças crônicas. Atuam sobre as doenças cardiovasculares, diminuem a vasoconstrição e a oxidação da LDL; na diabetes, diminui a expressão de RAGE e os efeitos de AGEs, diminui a peroxidação lipídica no fígado; diminui a hiperglicémia, hiperlipidémia e stresse oxidativo, provoca diminuição de peso, melhora a resistência à insulina, melhora nefropatias, retinopatias e neuropatias; no cancro aumenta a apoptose e diminui a proliferação, diminui a angiogénese; nas infeções bacterianas, melhora atividade anti-adesiva e diminui mediadores inflamatórios (de la Iglesia et al. 2010).

No entanto não tem sido considerado o facto de nos extratos dos frutos testados existirem também, outros compostos fenólicos de cadeia curta que possuem atividade antioxidante (Rasmussen et al. 2005), como a epicatequina ou os ácidos benzóicos e derivados, vanílico e gálhico identificados ou ainda as flavonas e flavonóis e seus derivados.

Para além das vitaminas, como a vitamina C os carotenóides, aminoácidos, os ácidos orgânicos málico e cítrico, de que este fruto é fonte nutricional foram também identificados e podem contribuir para as propriedades benéficas associadas ao consumo deste tipo de fruto. No entanto neste trabalho não foi contemplada a sua análise.

### **5.3 Caracterização da atividade antioxidante do extrato *in vitro* (ORAC e HORAC)**

A atividade antioxidante do extrato foi avaliada por ensaios de ORAC e HORAC. Os resultados de ORAC e HORAC foram, respectivamente,  $1517 \pm 146 \mu\text{mol}$  equivalentes trolox por 100g de dióspiro fruto fresco ( $7,581 \pm 0,733$  equivalentes mol trolox por mL de extrato de dióspiro fresco) e  $984 \pm 67 \mu\text{mol}$  equivalentes de ácido cafeico por 100g de dióspiro fresco ( $4,919 \pm 0,334 \mu\text{mol}$  equivalentes de ácido cafeico por mL de extrato de dióspiro fresco).

O ensaio ORAC mede a capacidade das espécies de antioxidantes presentes nos extratos de *Diospyros kaki L.* para inibirem a oxidação da fluoresceína dissódica (FL) catalisada por radicais peróxido ( $\text{ROO}\bullet$ ) gerados pelo cloreto de 2,2'-azobis (2-metilamidinopropano) (AAPH).

O método HORAC avalia a capacidade de prevenção pela amostra do radical hidroxilo gerado por uma reação do tipo de Fenton mediada pelo  $\text{Co(II)}$ , com o fluoreto



de cobalto II (CoF<sub>2</sub>), usando a FL como a sonda e a curva de decaimento da fluorescência de FL para quantificar o valor HORAC. A reação de Fenton é uma importante fonte de ROS em sistemas biológicos, na qual o Fe<sup>2+</sup> ou Fe<sup>3+</sup> reage com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para produzir ROS como os radicais <sup>•</sup>OH, O<sub>2</sub><sup>-</sup> e <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

Como se pode ver na Tabela 1. 10, embora os valores obtidos no extrato de dióspiro sejam mais baixos que os descritos para alguns frutos vermelhos (amoras e mirtilos), são superiores aos apresentados por alguns autores referentes a estudo com amostras de maçãs e morangos.

**Tabela 1. 10- Atividade antioxidante.**

Frutos	ORAC (μmol TEAC/100g FF)	HORAC (μmol CAEAC/100g FF)	Referência
Dióspiro ( <i>Diospyros kaki</i> L.)	1517± 146	984± 67	-
Maçãs [ <i>Fuji</i> , <i>Starking</i> , <i>Reineta Parda</i> , <i>Gala Galaxy</i> and <i>Golden</i> ]	1133± 70	612± 79	(Serra et al. 2010)
Mirtilo [ <i>Vaccinium corymbosum</i> L. ( <i>Highbush</i> ), <i>Vaccinium ashei</i> Reade ( <i>Rabbiteye</i> ), <i>Vaccinium angustifolium</i> ( <i>Lowbush</i> ), and <i>Vaccinium myrtillus</i> L. ( <i>Bilberry</i> )]	1390-4590	1293	(Prior et al. 1998); (Denev et al. 2010)
Amoras ( <i>Rubus fruticosus</i> )	3550	834	(Sellappan et al. 2002); (Denev et al. 2010)
Morangos ( <i>Fragaria x. ananassa</i> )	1190	-	(Kevers et al. 2007)

O extrato de dióspiro mostrou maior atividade antioxidante do que outros extratos de frutas, como maçãs (Serra et al. 2010) e morangos (Kevers et al. 2007). No nosso estudo, o extrato de dióspiro mostrou 1517 ± 146 μmol TEAC/100g FF (7,581 ± 0,733 μmol de TEAC/mL) por ORAC e 984 ± 67 μmol CAEAC/100g FF (4,919 ± 0,334 μmol CAEAC/mL) por HORAC. Os estudos com maçãs (*Fuji*, *Starking*, *Reineta Parda*, *Gala Galaxy* e *Golden*) de Serra et al. 2010 (Serra et al. 2010) determinaram 1133 ± 70 μmol de TEAC/100g e 612 ± 79 μmol de CAEAC/100g, por ORAC e HORAC, respetivamente. Morango (*Fragaria x. Ananassa*) exibiu 1190 μmol TEAC/100g conforme determinado pelo ORAC (Kevers et al. 2007).

Os nossos resultados demonstram que o dióspiro é uma fruta com uma grande quantidade de antioxidantes fenólicos, em comparação com outras frutas como maçãs que possuem um conteúdo em compostos fenólicos totais de 422,5mg EAG/100g FF (Mikulic-Petkovsek et al. 2007) e 69,6-141,0mg EC/100g FF (Gu et al. 2004) em procianidinas totais, ou framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.) com 171mg de EAG/100g de FF em compostos fenólicos totais, 24,45mg EC/100 g FF do teor total em flavonóides e 17,71mg EC/100 g de FF do teor total em procianidinas (Figueira et al. 2014).

Em suma, o extrato para estudo neste trabalho foi preparado segundo a metodologia selecionada [amostra de dióspiro fruto liofilizado e solução extrativa acetona:água (80:20, v/v)], por permitirem obter o extrato mais rico em fenóis totais, flavonóides totais e procianidinas totais. Empregou-se aproximadamente  $360\text{g} \pm 0,1\text{g}$  de diósperos frescos (cultivados na região de Setúbal). Todos os solventes foram evaporados até à secura e reconstituído com água Milli-Q® (240mL). O extrato obtido foi dividido em alíquotas armazenadas em tubos *falcon* a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para as posteriores análises. Na caracterização em termos de teor em compostos fenólicos totais quantificou-se  $15530,56 \pm 277,43$  mg EAG/L extrato correspondendo a  $1035 \pm 18\text{mg}$  EAG/100g FF

## CAPÍTULO II

---

### Bioatividade do extrato de *Diospyros kaki* L.

---

## **CAPÍTULO II. BIOATIVIDADE DO EXTRATO DE *Diospyros kaki* L.**

Após a caracterização fenólica do extrato de dióspiro que permitiu escolher o que seria mais promissor para associar a efeitos biológicos fomos estudar alguma da sua bioatividade.

Assim, neste capítulo, foram estudadas as atividades antioxidante e anti-inflamatória. Foi avaliada a capacidade antioxidante intracelular do extrato e também o *burst* oxidativo dos neutrófilos.

Para estudar o possível efeito anti-inflamatório do extrato de dióspiro, neste trabalho foi utilizado o modelo de inflamação aguda induzida pela carragenina em ratos. De entre os modelos que simulam doenças inflamatórias crónicas escolhemos o da Artrite Reumatoide (AR) em ratos e o modelo de Colite Ulcerosa (CU) em murganhos.

# 1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

## 1.1 Experimental

### 1.1.1 Materiais

Para a avaliação da **Atividade Antioxidante Intracelular** foram utilizadas células de carcinoma de cólon humanas, Caco-2, da Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) (Braunschweig, DE); meio de cultura RPMI 1640; soro fetal de bovino (FBS) e glutamina da Invitrogen (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, UK);  $\geq 97\%$ ; quercetina  $\geq 98\%$  (HPLC) e tampão de fosfato padrão (PBS) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US); 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH); diacetato de 2-7-diclorofluoresceína (DCFH-DA),

Para a avaliação da **Atividade Antioxidante no *burst oxidativo dos neutrófilos*** foram utilizados os seguintes reagentes: solução de azul de tripano a 0,4%, luminol, Dihidrorodamina 123 (DHR); citocromo c de coração de cavalo; cloreto de potássio, dehidroepiandrosterona (DHEA), e luciferinaluciferase foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, US); tampão fosfato salino (PBS); solução salina equilibrada de Hank (HBSS); acetato de miristato de forbol (PMA); o cloreto de sódio, sulfato de magnésio, ácido perclórico, bicarbonato de potássio e cloreto de cálcio foram adquiridos na Merck (Darmstadt, DE); o tris(hidroximetil)aminometano foi obtido da Riedel de Haën (Hanover, DE).

## 1.2 Métodos

### 1.2.1 Atividade antioxidante celular [*Cellular Antioxidant Activity (CAA)*]

As células humanas do carcinoma do cólon Caco-2 adquiridas na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, (Braunschweig, DE) foram utilizadas para a avaliação *in ex vivo* da CAA em presença do extrato de dióspiro. Foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS, do inglês '*Fetal bovine serum*') e 2mM de glutamina para a cultura destas células. A cultura de células *stock* foi mantida em camadas, em frascos de cultura de 175 cm<sup>2</sup> e incubadas em estufa à temperatura de 37 C, numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

A avaliação da CAA do extrato de *Dipospyros kaki* L., em células Caco-2 implicou primeiramente o cultivo destas células. Assim, numa placa de 96 poços a uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço, em 100µL de meio de crescimento, a cada 48h o meio de cultura foi mudado até se atingir a confluência das células, 72h.

O procedimento para testar as amostras implicou ainda a remoção do meio de cultura e a lavagem por duas vezes das células com PBS, solução tampão de fosfato padrão, para remoção de células não aderidas.

Poços com células diferenciadas foram preparados em triplicados com 100µL de diferentes concentrações da amostra e 25µM de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) diluídos em PBS. A formação intracelular de ROS é revelada pelo DCFH-DA que funciona como um indicador. Em alguns poços, o meio de cultura das células foi removido e substituído por PBS contendo 600µM AAPH, um indutor de stresse químico que gera a produção intracelular de ROS à temperatura de 37 C. Em seguida a microplaca de 96 poços foi colocada num leitor de microplacas de fluorescência FL800 da BioTek Instruments (Winooski, VT, US), a 37 C.

A fluorescência emitida pelo DCFH-DA na sua forma reduzida foi monitorizada e registada a cada 5 minutos durante 1 hora. E foram usados filtros de fluorescência para os comprimentos de onda de emissão  $\lambda_{em}=530 \pm 25\text{nm}$  e de excitação de  $\lambda_{ex}=485 \pm 20\text{nm}$ .

Foram testados ainda poços de controlo em triplicado (células tratadas com DCFH-DA e o oxidante AAPH) e incluídos poços branco (células tratadas com DCFH-DA sem o oxidante). Foi utilizada quercetina como padrão. A quantificação da CAA dos extratos de *Diospyros kaki* L. foi feita de acordo com o descrito por Wolfe and Liu (2007) (Wolfe et al. 2007). Por fim, os valores de EC50 foram convertidos nos valores de CAA, expressa em micromoles de equivalentes de quercetina por g de dióspiro ( $\mu\text{mol EQ/g dióspiro}$ ), usando o valor EC50 médio da quercetina obtido dos triplicados.

### **1.2.2 Avaliação do *Burst* Oxidativo dos Neutrófilos**

Foram utilizados neutrófilos humanos para a avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante do extrato para inibir ROS e RNS geradas por esses neutrófilos quando entram em *burst* oxidativo, segundo o método descrito por Freitas *et al.* em 2008 (Freitas et al. 2008). As determinações foram feitas por quimioluminescência em leitor de microplacas de fluorescência Synergy HT da Bio-Tek Instruments (Winooski, VT, US).

Primeiramente os neutrófilos humanos foram isolados através do gradiente de densidade, e foram mantidos em gelo até à utilização. O meio de incubação utilizado foi o meio de Glicose Tris (Tris 25mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,26mM, KCl 5,37mM,  $\text{MgSO}_4$  0,81mM, NaCl 140mM e 5,55mM de D-glicose). As suspensões celulares preparadas tinham mais de 99% de neutrófilos e o controlo de viabilidade foi superior a 95% das células eram viáveis, excluindo as de azul de tripano a 0,4%.

A sonda quimioluminescente de luminol foi utilizada para monitorizar a produção de espécies reativas por neutrófilos, nomeadamente de radicais anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e anião peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Freitas et al. 2009).

Conforme descrito por Costa *et al.* (Costa et al. 2006), a medição do *oxidative burst* dos neutrófilos foi realizada por quimioluminescência, monitorizando a oxidação do luminol induzida por ROS. As preparações reacionais empregues neste ensaio continham neutrófilos ( $1 \times 10^6$  células/mL) e os reagentes seguintes, nas concentrações finais indicadas, num volume final de 250  $\mu$ L: extrato de dióspiro em diferentes concentrações, luminol (500  $\mu$ M) e acetato de miristato de forbol (PMA; 160 nM).

As células foram previamente incubadas, durante 5 minutos, com o luminol e com os compostos testados, antes da adição de PMA e as medições foram realizadas a 37 C, sob agitação suave e contínua. As leituras cinéticas foram imediatamente iniciadas, após a estimulação celular. Estas medidas realizaram-se no pico da curva que foi observado a cerca de 10 minutos. A atividade antioxidante do extrato de *Diospyros kaki* L. foi expressa como a percentagem de inibição da oxidação do luminol. Os resultados foram expressos em  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, como média  $\pm$  desvio padrão, a partir de quatro experiências individuais (no mínimo), efetuadas em triplicado em cada experiência.

### 1.2.3 Tratamento dos Resultados

Os resultados da avaliação da CAA e do *oxidative burst* pelos Neutrófilos foram comparados pelo método ANOVA de uma entrada seguido do teste pós-hoc de Bonferroni, tendo sido considerados significativos quando  $p < 0,05$ . A análise estatística foi realizada com a versão 5.0 do programa estatístico GraphPad da PRISM™ da GraphPad Software (San Diego, US).

## 1.3 Resultados e Discussão

### 1.3.1 Atividade antioxidante celular [Cellular Antioxidant Activity (CAA)]

Os resultados da CAA do extrato de *Diospyros kaki* L. em células da linhagem Caco-2 são apresentados na Tabela 2. 1.

**Tabela 2. 1 - Avaliação da atividade antioxidante celular *in vitro* do extrato de *Diospyros kak, L.* e outros frutos.**

Fruto	CAA ( $\mu\text{mol de QE}/100\text{g}$ )	Referência
Dióspiro	32,8	-
Laranja	13,7	(Wolfe et al. 2008)
Cereja	27,4	(Wolfe et al. 2008)
Pera	7,35	(Wolfe et al. 2008)
Manga	15,3	(Wolfe et al. 2008)
Maçã	21,9	(Wolfe et al. 2008)
Pêssego	9,47	(Wolfe et al. 2008)
Abacate	3,58	(Wolfe et al. 2008)
Ameixa	33,5	(Wolfe et al. 2008)

CAA – Cellular antioxidant activity; EQ equivalentes de quercetina.

Este método possibilita a quantificação da atividade antioxidante de um modo mais significativo em termos biológicos do que os ensaios de avaliação da capacidade antioxidante química ORAC e HORAC. Medir a atividade antioxidante de frutas, por exemplo, em cultura de células é um passo importante na triagem de potenciais bioatividades e é mais biologicamente representativo do que os dados obtido a partir de ensaios de atividade antioxidante puramente químicos (Wolfe et al. 2008).

Este é um modelo relevante pois ao empregar células intestinais humanas faz uma abordagem importante em termos de absorção intestinal (Deprez et al. 2001; Markopoulos et al. 2014). Estas células da linhagem Caco-2 têm a capacidade de se diferenciarem em monocamadas e com morfologia que mimetizam a das células epiteliais intestinais humanas (Yokomizo et al. 2006).

Neste método, o stresse oxidativo celular foi induzido por um agente químico, o AAPH. Resultando na geração de radicais peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ). Os  $\text{ROO}^\bullet$  são biologicamente muito importantes, nomeadamente por serem considerados importantes intermediários em vias metabólicas ligadas ao stresse oxidativo (Domazou et al. 2012). Assim sendo, os seres vivos têm elevada probabilidade de formação de  $\text{ROO}^\bullet$ . Da oxidação do colesterol e das proteínas também se geram  $\text{ROO}^\bullet$ , neste último caso produzidos dos resíduos dos aminoácidos (Gebicki et al. 2010; Porter 2013). No processo de peroxidação lipídica, por exemplo, formam-se espécies reativas derivadas dos PUFA, incluindo radicais alquilo peroxilo ( $\text{LOO}^\bullet$ ) (Fukuzawa 2008). Estes  $\text{LOO}^\bullet$  têm um papel importante no processo de propagação da peroxidação lipídica, donde se geram mais radicais livres com potencial impacto genotóxico e cardiovascular (Porter 2013).

O ensaio CAA é uma ferramenta valiosa para medir a atividade antioxidante de antioxidantes, suplementos dietéticos e alimentos em cultura celular (Wolfe et al. 2007). As células Caco-2 têm sido usadas com sucesso para estudar a



biodisponibilidade e a conversão metabólica de antioxidantes da dieta, nomeadamente de carotenóides e flavonóides (Cheli et al. 2011).

Neste contexto é importante que as linhagens celulares mantenham as respostas funcionais ao stresse oxidativo induzido (Cheli et al. 2011).

Os estudos *in vitro* levados a cabo com células desta linhagem evidenciaram que a nível celular, estes antioxidantes podem interromper e prevenir a propagação do radical peróxido e reduzir a peroxidação das membranas via redução ou resgate das ROS produzidas na célula (Cheli et al. 2011).

O extrato de dióspiro testado revelou-se eficiente no resgate do radical peróxido *in vitro*. O ensaio CAA considera aspetos da absorção, do metabolismo e da localização de compostos antioxidantes no interior das células, ao contrário dos métodos ORAC e HORAC anteriormente testados (Capítulo I, secção 5.3, Tabela 1. 10).

O extrato de *Diospyros kaki* L. analisado apresentou uma CAA de 32,8µmol equivalentes de quercetina (EQ)/100g de dióspiro ou 0,1641µmol de equivalentes quercetina/mL extrato. Importa realçar que estes dióspiros são ricos em compostos fenólicos (558,9mg EAG/100g de dióspiro), sobretudo procianidinas (459,5mg EC/100g de dióspiro) e flavonóides (144,8mg EC/100g de dióspiro). Vários estudos têm mostrado que as procianidinas estão associadas a várias funções biológicas, incluindo a antioxidante (Jang et al. 2010; Tian et al. 2011; Tian et al. 2012).

Os resultados do dióspiro quando comparados a outros frutos tradicionalmente considerados como importantes para a dieta como a maçã, a pera, o abacate e a laranja, revelaram que o dióspiro tem maior poder antioxidante a nível celular. Nos estudos de Wolf *et al.* com 25 frutos comuns na dieta americana (onde não se inclui o dióspiro), verificou-se que os valores de CAA foram significativamente associados ao teor de fenóis totais e ORAC, embora os coeficientes de correlação fossem muito menores entre os valores CAA e ORAC do que entre CAA e valores de fenólicos totais (Wolfe et al. 2008).

A CAA do extrato de dióspiro tem sido estudada em outros tipos celulares, como por exemplo nas células do hepatoma humano (HepG2). O extrato do fruto dióspiro adstringente cv. Sangjudungsi (*D. kaki* Thunb.) foi testado nestas células, que quando sujeitas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desencadeiam stresse oxidativo, conseguindo restaurar a viabilidade celular de forma dose dependente e em concentrações não tóxicas, tendo também atenuado o stresse oxidativo intracelular. Os compostos presentes no extrato parecem agir na remoção dos oxidantes, como o que foi observado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células do fígado humano, sugerindo que o dióspiro pode ser uma boa fonte de antioxidantes (Lee et al. 2014). Noutro tipo de células, que mimetizavam as condições de isquemia cerebral *in vitro*, foi ainda possível verificar a atividade antioxidante do

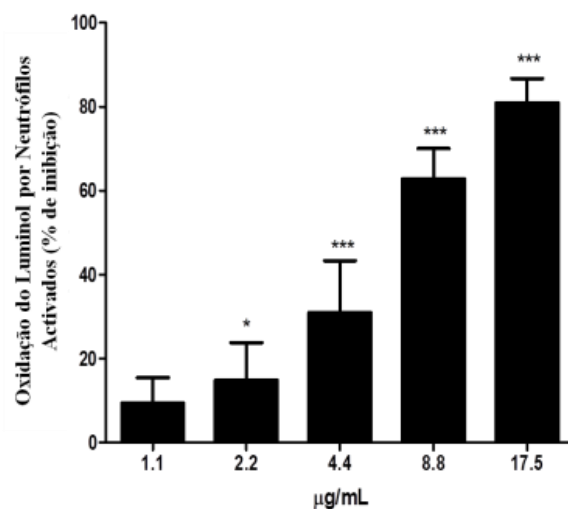
extrato de dióspiro que demonstrou ter efeito neuroprotetor Forouzanfar *et al.* (2016). Estes autores relatam que o extrato de dióspiro protegeu as células PC12 do stresse oxidativo gerado pela privação de glucose, oxigénio e soro (*Glucose-Oxygen-Serum Deprivation-Induced PC12 Cells Injury*) via mecanismo antioxidante, com redução da produção de ROS intracelular (Forouzanfar *et al.* 2016).

Vários estudos mostraram a atividade antioxidante do dióspiro (Jung *et al.* 2005; Chen *et al.* 2008; Park *et al.* 2008; Fukai *et al.* 2009; Jang *et al.* 2010; Gorinstein *et al.* 2011; Jang *et al.* 2011) mas maioritariamente foram usados ensaios DPPH e ABTS. Estas técnicas são muito rápidas e fáceis de executar, mas têm algumas limitações. Por exemplo, o radical DPPH é um radical de azoto resistente. Há também evidências de que a DPPH<sup>•</sup> reage reversivelmente com alguns compostos fenólicos, o que pode levar a valores alterados de eliminação de radicais (Huang *et al.* 2005). Os métodos escolhidos abrangem diferentes aspetos da ação antioxidante e oferecem uma visão abrangente sobre o potencial antioxidante do extrato investigado. Isto é importante, uma vez que se recomenda a utilização de mais de um ensaio antioxidante para a compreensão detalhada dos princípios das propriedades antioxidantes dos compostos a que é atribuída esta capacidade.

### 1.3.2 Avaliação do *Burst* Oxidativo dos Neutrófilos

Não querendo apenas determinar a eficácia de compostos antioxidantes exógenos num ambiente celular (avaliado pela CAA), quisemos avaliar a capacidade do extrato inibir ativamente a resposta de *burst* oxidativo dos neutrófilos infiltrados no tecido lesado.

Considerando o efeito inibitório do extrato de dióspiro (1,1-17,5µg mL<sup>-1</sup>) no *burst* oxidativo de neutrófilos humanos foi determinada uma IC<sub>50</sub> de 7,5 ± 1,0µg mL<sup>-1</sup> (Fig. 2. 1). Em ambos os casos o extrato demonstrou, não apenas a capacidade de atuar como antioxidante intracelular (CAA) mas também de interferir com a função dos neutrófilos, inibindo a libertação de espécies deletérias reativas de oxigénio, que amplificariam os sinais inflamatórios já desencadeados.



**Figura 2. 1 – *Burst* oxidativo dos neutrófilos humanos e o efeito inibitório do extrato de *Diospyros kaki* L..**

\* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com o ensaio controlo (PMA sozinho). Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP.

Os neutrófilos são células centrais na defesa de um organismo contra lesões, nomeadamente a infeção, através da sua capacidade de sintetizar metabolitos de oxigénio e libertar várias enzimas. No entanto, esses agentes também podem ser tóxicos para os tecidos circundantes normais e potencialmente induzir doenças inflamatórias. Como resultado, há uma regulação negativa rápida (Ryan et al. 1977; Doherty et al. 1988; Melnicoff et al. 1989). Uma característica da inflamação aguda é que, inicialmente, o infiltrado leucocitário é principalmente neutrofílico (Ryan et al. 1977; Doherty et al. 1988; Melnicoff et al. 1989). Assim, a inflamação aguda é uma resposta benéfica limitada, particularmente durante o desafio infeccioso, enquanto que a inflamação crónica é um fenómeno persistente que pode levar ao dano tecidual. A capacidade de um agente infeccioso e hospedeiro induzir e sustentar a inflamação crónica é o mecanismo focal envolvido na etiologia infecciosa da maioria das doenças e a maioria das NCDs são caracterizadas patologicamente por evidenciar inflamação crónica (Ogoina et al. 2009). Sendo assim qualquer composto que tenha a capacidade de inibir ou modelar a *burst* oxidativo dos neutrófilos para que não se exceda o seu papel na defesa e se evite a sua toxicidade só pode ser benéfico, como o efeito dependente da dose demonstrado pelo extrato de dióspiro.

A maioria dos efeitos exercidos pelos compostos fenólicos nos neutrófilos é baseada na inibição da produção de aniões superóxido. Flavonóides como as procianidinas isoladas da *Garcinia brasiliensis* demonstraram um potente efeito

inibidor no *burst* oxidativo de neutrófilos humanos, inibindo a produção de ROS pelos neutrófilos estimulados (Arwa et al. 2015).

É provável que os resultados obtidos por nós neste estudo sejam igualmente devidos à riqueza em procianidinas do fruto dióspiro.

O efeito de cinco compostos de flavonóides isolados das folhas de *Diospyros kaki* na geração de superóxido induzida por um estímulo e fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas de neutrófilos humanos foi investigado por Chen *et al.* 2002. Os cinco compostos examinados foram canferol 3-*O*- $\beta$ -*D*-galactopiranosídeo, canferol 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosídeo, isorramnetina 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosídeo, quercetina 3-*O*- $\beta$ -*D*-galactopiranosídeo, quercetina 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -*L*-ramnopiranosídeo. Estes flavonóides suprimiram a geração de superóxido induzida pelo estímulo e a fosforilação do tirosil (Chen et al. 2002). Em 2009 o efeito inibitório do extrato aquoso das folhas do diospireiro, bem como os seus principais compostos fenólicos (canferol, quercetina e miricetina) foram testados por Che *et al.* (2009) na produção induzida por N-formil-metionil-leucil-fenilalanina [N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)] do radical superóxido por neutrófilos humanos. Os flavonóides suprimiram a geração de superóxido induzida pelo estímulo e a fosforilação do tirosil (Chen et al. 2002). Estes resultados indicaram o potencial valor na proteção da saúde, do chá das folhas de diospireiro (Chen et al. 2009).

Outros autores também discutiram os efeitos do dióspiro enquanto fruto ou do extrato do fruto no *burst* oxidativo em neutrófilos humanos e, embora os resultados sejam semelhantes, nenhum deles baseou as suas conclusões no mesmo ensaio que o nosso estudo.

Os resultados para a atividade antioxidante do extrato de dióspiro, tanto por ORAC, como por HORAC, como por CAA e no *burst* oxidativo dos neutrófilos são promissores dos potenciais efeitos benéficos para a saúde do dióspiro e levam-nos a investigar os possíveis efeitos anti-inflamatórios que podem estar ou não relacionados com estes efeitos antioxidantes.

## **2. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA EM MODELOS ANIMAIS**

### **2.1 Experimental**

#### **2.1.1 Materiais**

**Modelo inflamação aguda induzida pela carragenina:** ácido acético glacial e formaldeído da Carlo Erba Reagents (Sabadell, ES); ácido acético p.a., ácido 6-hidroxi-



Long – Lench Vertical Apelem Baccara e processador de imagem Kodak DirectView System CR975 - Leitor de Ip; microscópio óptico Zeiss com uma câmara fotográfica Leica DFC490 da Leica Microsystems (Wetzlar, DE), equipada com um programa informático de captura de imagens Leica IM50 da Leica Microsystems (Wetzlar, DE) e equipamento microscópio AxioScope de campo brilhante (Zeiss, Göttingen, Alemanha).

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Atividade anti-inflamatória no Modelo animal de edema da pata induzido pela carragenina

Para avaliar a atividade anti-inflamatória aguda local do extrato usámos o modelo do edema da pata induzido pela  $\lambda$ -carragenina em rato. Os resultados obtidos são comparados com o efeito da indometacina, trolox e tempol, usados como anti-inflamatórios.

#### A) Animais

36 ratos Wistar machos (Harlan Ibérica, Barcelona, ES), com 5 semanas e peso compreendido entre 100 e 150g, foram empregues no modelo da inflamação aguda local. Os animais foram submetidos a um esquema de aclimação, de pelo menos duas semanas, no Biotério de Manutenção da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Nesse período os animais foram mantidos à temperatura de 25°C, com ciclos de luz diários de 14 horas, com uma dieta de manutenção IPM-R20 da *Letica* (Barcelona, ES) e água *ad libitum*. 24h. Na véspera da realização da experiência os animais foram mantidos em jejum, mantendo-se apenas o livre acesso a água.

O protocolo desta experiência foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Farmácia e a equipa de investigação tinha dois elementos com licença da Direcção-Geral de Veterinária para coordenar e conduzir as pesquisas com animais de modo independente.

As experiências foram conduzidas de acordo com as orientações do *Home Office Guidance* para utilização de animais para fins científicos (Procedimentos Científicos, Act 1986), publicada por *Her Majesty's Stationary Office*, London, UK e o Guia do Comité de Pesquisa Animal para o cuidado e uso de animais de laboratório publicados pelos Institutos Nacionais dos EUA Institutos Nacionais de Saúde (Publicação NIH nº 85-23, revista em 1996), bem como a regulação CE adotada atualmente, regulamentos (Diretiva 2010/63/UE). Os estudos foram realizados em conformidade com as Diretrizes ARRIVE para Relatórios de Pesquisa Animal resumidas em <http://www.nc3rs.org.uk>.

## B) Protocolo Experimental

No início do ensaio a articulação da pata esquerda de cada animal foi marcada com tinta resistente à água ao nível do maléolo, eminência óssea do tornozelo. O edema da pata foi induzido com uma única injeção subplantar de 0,1mL de uma solução de soro fisiológico estéril com 1% de  $\lambda$ -carragenina na pata posterior esquerda do rato. O volume da pata foi medido através método do volume deslocado num pletismómetro (Digital Plethysmometer LE7500 – Letica® Scientific Instruments, Letica, ES). Quando se imergiu a pata posterior esquerda dos ratos no vaso do pletismómetro (Fig. 2. 2), fez-se coincidir a marcação feita inicialmente ao nível do maléolo com a marcação do vaso. A variação do volume resultante da imersão da pata foi lida diretamente no pletismómetro. As medições foram feitas imediatamente após a injeção da  $\lambda$ -carragenina ( $V_{0h}$  ou volume basal) e 6h depois ( $V_{6h}$ ). O aumento do volume da pata foi considerado como edema. Calculado em termos de % através da Equação 1, para cada rato.

### Equação 1

$$\text{Edema da pata (\%)} = [(V_{6h} - V_{0h}) / V_{0h}] * 100$$

Os 36 animais usados neste modelo foram pesados e aleatoriamente divididos e distribuídos pelos seguintes grupos:

- (i) controlo negativo - injeção subplantar na pata posterior esquerda dos ratos, de 0,1mL de soro fisiológico estéril e administração com soro fisiológico ( $1\text{mL Kg}^{-1}$ , p.o.) (n=6);
- (ii) controlo positivo (grupo da carragenina) - indução do edema da pata por injeção subplantar na pata posterior esquerda de 0,1mL de uma dispersão a 1% de  $\lambda$ -carragenina em soro fisiológico e administração com soro fisiológico ( $1\text{mL Kg}^{-1}$ , p.o.) (n=6);
- (iii) grupo do dióspiro (grupo teste) - animais submetidos à indução do edema da pata e pré-tratados com extrato de dióspiro ( $15\text{mg Kg}^{-1}$ , p.o.), 30 minutos antes da injeção com  $\lambda$ -carragenina (n=6);
- (iv) grupo da indometacina - animais sujeitos à indução do edema da pata e pré-tratados com indometacina ( $10\text{mg Kg}^{-1}$ , p.o.), 30 minutos antes da injeção com  $\lambda$ -carragenina (n=6);

- (v) grupo do Trolox - animais submetidos à indução do edema da pata, pré-tratados com trolox ( $30\text{mg Kg}^{-1}$ , p.o.), 30 minutos antes da injeção com  $\lambda$ -carragenina ( $n=6$ ),
- (vi) grupo de tempol ( $30\text{mg kg}^{-1}$ , p.o.), 30 minutos antes da injeção com  $\lambda$ -carragenina ( $n=6$ ).



**Figura 2. 2 - Medição do volume da pata no pletismómetro.**

### **2.2.2 Atividade anti-inflamatória no Modelo Animal de Artrite Induzida pelo Colagénio (CIA)**

Neste modelo experimental a artrite é que induzida no rato pelo colagénio. O modelo de indução de artrite reumatoide com colagénio é o mais usado, pelas muitas semelhanças à AR no humano, partilhando diversas das suas características patológicas, como a quebra da tolerância ao self e produção de auto-anticorpos. O colagénio tipo II é um dos maiores constituintes da cartilagem, o tecido alvo na AR. Entre os métodos que incluem proteínas da cartilagem e são definidos pela existência de um antigénio, este é o que tem o menor intervalo de tempo entre a imunização e a manifestação da doença. Este modelo já foi utilizado para identificar mecanismos patogénicos de autoimunidade e no teste de novas terapêuticas (Brand et al. 2007).

#### **A) Animais**

Foram usados 22 ratos Wistar machos (Harlan Ibérica, Barcelona, ES), com pesos entre 180 e 225g. Foram seguidas as normas de manipulação e tratamento animal já referidas acima.



## B) Protocolo Experimental

Este protocolo experimental tem a duração de 35 dias.

No 1º dia procedeu-se à indução da artrite com colagénio tipo II bovino (CII) injetando intradermicamente, na base da cauda dos ratos, 100µL emulsão (contendo 100 µg de CII) em adjuvante de *Freund* (CFA) de acordo com o descrito por Szabó *et al.* (Szabo et al. 1998) e Cuzzocrea *et al.* (Cuzzocrea et al. 2000). O CFA foi preparado pela adição de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra numa concentração de 2mg.mL<sup>-1</sup>. O CII foi dissolvido em ácido acético 0,01M numa concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup> e mantido em agitação durante a noite, à temperatura de 4 C. O CII dissolvido foi congelado a -70 C até à sua utilização. No dia 21, foi administrada a segunda injeção de CII em CFA. A indução da AR foi feita em todos os animais, exceto nos animais do grupo controlo negativo que, nos dias 1 e 21, foram injetados com soro fisiológico na base da cauda, por via intradérmica.

Os animais foram pesados e aleatoriamente distribuídos por três grupos de estudo:

- (i) controlo negativo onde não foi induzida artrite (n=6);
- (ii) controlo positivo (AR), com indução da artrite pelo CII (n=6);
- (iii) grupo dióspiro (grupo teste) com indução de artrite e posterior administração do extrato de dióspiro (n=10), oralmente por gavagem (p.o. 15mg fenóis totais (EAG)/Kg).

O tratamento diário dos animais do grupo teste (iii) iniciou-se no 23º dia com administração do extrato de dióspiro na dose de 15mg/Kg de peso vivo, por via oral através do uso de gavagem. Este procedimento foi repetido diariamente até ao 34º dia do estudo. Os animais dos grupos i e ii foram administrados oralmente, por gavagem, com 1 mL de soro fisiológico estéril, do dia 23º ao 34º. Foi feita a avaliação diária dos animais para os sinais clínicos de artrite como descrito por Szabó *et al.* (Szabo et al. 1998). A severidade clínica da artrite foi também determinada quantitativamente através da medição do aumento de volume da pata dos animais, por pletismometria no 35º dia. Este aumento de volume, considerado o volume do edema, foi calculado pela diferença entre os volumes da pata no 35º dia dos animais dos grupos ii a iii, e o volume da pata dos ratos do grupo i, avaliado no mesmo dia. Os resultados foram expressos em percentagem de aumento do volume da pata.

Depois da medição do volume das patas, os animais foram anestesiados e as patas foram radiografadas. Após o sacrifício dos animais, uma das patas de cada animal foi removida e conservada em formalina para exame histológico. Na Tabela 2. 2 descreve-se o desenho do protocolo experimental desenvolvido.

**Tabela 2. 2 – Desenho do protocolo experimental com o modelo de artrite reumatoide (CIA), para o estudo do efeito anti-inflamatório de um extrato de dióspiro.**

GRUPO	Dia 1	Dia 21	Dias 23-34	Dia 35
(i) <b>CONTROLO NEGATIVO</b> (n=6)	1ª Injeção intradérmica de soro fisiológico	2ª Injeção intradérmica de soro fisiológico	Sem qualquer tratamento	Avaliação das patas por pletismometria, radiografia, sacrifício e conservação para histologia
(ii) <b>CONTROLO POSITIVO</b> (n=6)	<b>INDUÇÃO DE ARTRITE</b>			
(iii) <b>Ext. Diosp.</b> (n=10)	1ª Injeção de CII em FCA (100µL; 100µg de CII)	2ª Injeção de CII em FCA (100µL; 100µg de CII)	Administração diária de extrato de dióspiro por via oral (15mg EAG/Kg)	

Ext. Diosp. – extrato de dióspiro; p.o. – administração por via oral, através de gavagem

### C) Avaliação radiológica da artrite

Após anestesiados com pentobarbital sódico (45mg/kg, por via intraperitoneal) os ratos foram colocados numa caixa de exame radiográfico, que se encontra uma distância de 90cm da fonte de raios-X. Nas patas posteriores dos animais, saudáveis (grupo i) e com artrite (grupos ii e iii), foram feitas radiografias utilizando uma máquina de raios-X, com uma exposição de 40 kW para 0,01 segundos. Este exame foi executado por um investigador que não conhecia o protocolo experimental a que os animais tinham sido submetidos.

Com a análise das radiografias obtidas procedeu-se também à classificação das características morfológicas observadas num score radiológico de 0 a 3. Em que 0 = sem dano ósseo, 1 = edema do tecido e edema da pata, 2 = erosão nas articulações, e 3 = erosão óssea e formação de osteófitos.

### D) Avaliação histológica da artrite

Após anestesia e sacrifício dos animais, as patas foram removidas no 35º dia, por corte acima do joelho e foram colocadas a fixar em formalina para exame histológico. A fixação foi feita com solução de paraformaldeído (PFA) em solução salina de tampão fosfato 0,1M (PBS, pH 7,4) (10 % v/v), à temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram descalcificadas em ácido fórmico (10 %), por um período mínimo de 8 dias, após o qual foram desidratadas. A desidratação fez-se através de um gradiente de etanol e após esta etapa, as amostras foram incluídas em blocos de parafina. Para análise de microscopia de luz foram feitos corte com 3 µm. Todas essas secções foram desparafinadas com xileno e hidratadas em soluções progressivamente menos concentradas de etanol. A hidratação foi finalizada com água destilada. Após este processo as amostras foram coradas com hematoxilina-eosina, desidratadas, diafanizadas e colocadas num fluido de montagem. A observação ao

microscópio óptico foi feita em todas as secções da lâmina. Utilizaram-se as lentes de 10x e 40x e foram recolhidas fotografias. O microscópio óptico usado nesta análise é Zeiss com uma câmara fotográfica Leica DFC490 da Leica Microsystems (Wetzlar, DE), esta por sua vez equipada com um programa informático de captura de imagens Leica IM50 da Leica Microsystems (Wetzlar, DE). As características histopatológicas presentes em amostras articulares de joelho, nomeadamente inflamação, formação de pannus, danos na cartilagem e de reabsorção óssea foram analisadas. O investigador que fez a análise histológica não conhecia o protocolo que tínhamos feito aos animais. Este exame compreendeu para além da avaliação histológica das amostras, uma classificação das características morfológicas observadas. Essa escala usada pontua de 0 a 3, onde 0 = nenhum dano, 1 = edema, 2 = células inflamatórias e 3 = reabsorção óssea.

#### **E) Imunocitoquímica para iNOS e COX-2**

Os tecidos foram fixados em 4% de PFA em PBS durante 72h à temperatura ambiente, descalcificados, desidratados em séries de etanol graduado e embebidos em parafina. A imunocoloração foi feita em secções cortadas com 6 mm de espessura e foram sujeitas à recuperação de antigénios, em tampão de citrato 20 mM com 1,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante 15 minutos à temperatura ambiente no escuro, incubadas durante 10 min em tampão Tris/EDTA a 84°C e bloqueadas durante 1h, à temperatura ambiente em 1% de albumina sérica bovina (BSA) em PBS. Ao que se seguiu a aplicação dos anticorpos primários, de coelho anti-COX-2 e de rato anti-iNOS em 0,5% de BSA em PBS, durante a noite a 4°C. Após lavagem em PBS, as secções foram incubadas durante 1h à temperatura ambiente com anticorpos anti-coelho e anti-rato ligados a peroxidase de rábano-silvestre em 0,5% BSA em PBS e incubadas durante 10min em SIGMAFAST™ DAB com um intensificador de metais, montado com Entellan<sup>®</sup>. Estas amostras de tecido foram analisadas num microscópio de campo claro Axioskop e foram obtidas imagens com uma câmara DFC 490 (Leica), que as transformou em imagens invertidas e em ficheiros de 8 bit. A intensidade da coloração da proteína corresponde ao nível de expressão da COX-2 e da iNOS.

#### **2.2.3 Atividade anti-inflamatória no modelo colite ulcerosa**

Neste modelo animal que simula a colite ulcerosa no humano a doença é induzida quimicamente pelo ácido trinitrobenzeno sulfúrico (TNBS) dissolvido em etanol por instilação intrarretal. (Morris et al. 1989).

A lesão intestinal foi caracterizada *in vivo* e histologicamente através da observação microscópica do tecido intestinal e foram avaliadas as alterações estruturais do tecido de forma qualitativa e quantitativa.

O modelo de colite por TNBS tem sido muito útil para estudar muitos aspetos importantes da inflamação do intestino, incluindo os padrões de secreção de citocinas, os mecanismos de tolerância oral, a adesão celular e imunoterapia (Wirtz et al. 2007).

## **A) Animais**

No ensaio de colite foram usados murganhos machos CD-1, entre 25 a 30g de peso e 5 a 6 semanas de idade (Harlan Iberica, Barcelona, Espanha), foram alojados em gaiolas de polipropileno padrão com acesso *ad libitum* a alimentos e água, dentro de uma sala de ambiente controlada mantida a  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  com ciclos de 12h de luz e 12h de escuro no Biotério da Faculdade de Farmácia Animal, Universidade de Lisboa.

As experiências foram conduzidas de acordo com as orientações do *Home Office Guidance* para utilização de animais para fins científicos (Procedimentos Científicos, Act 1986), publicada por *Her Majesty's Stationary Office*, London, UK e o Guia do Comité de Pesquisa Animal para o cuidado e uso de animais de laboratório publicados pelos Institutos Nacionais dos EUA Institutos Nacionais de Saúde (Publicação NIH nº 85-23, revista em 1996), bem como a regulação CE adotada atualmente, regulamentos (Diretiva 2010/63/UE). Os estudos foram realizados em conformidade com as Diretrizes ARRIVE para Relatórios de Pesquisa Animal resumidas em <http://www.nc3rs.org.uk>. O protocolo experimental também foi aprovado pelo Comité de Ética da Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.

## **B) Protocolo Experimental**

O ensaio envolveu 32 animais que foram deixados em jejum durante 24 horas antes do ensaio. Todos os animais foram pesados e aleatoriamente divididos por 4 grupos. No dia da indução (dia 0), todos os murganhos foram anestesiados com cetamina 100mg/kg + xilazina 10mg/kg.

Grupos experimentais (Tabela 2. 3):

grupo controlo negativo – administração intracolónica com 100µL de solução salina. Durante os 4 dias do protocolo, os animais foram oralmente administrados com 10mL/Kg de água destilada (n=6);

grupo etanol – animais sujeitos a administração intracolónica, com 100µL de 50% etanol (v/v). Durante os 4 dias do protocolo, os animais foram administrados oralmente com 10mL/Kg de água destilada (n=6);

grupo TNBS – animais administrados intracolonicamente com 100µL de 2,5% TNBS (w/v) em 50% de etanol (v/v). Durante os 4 dias do protocolo, os animais foram administrados oralmente com 10mL/Kg de água destilada (n=10);

grupo TNBS + extrato de dióspiro – animais administrados com 100µL de 2.5% TNBS (p/v) em 50% de etanol (v/v). Durante os 4 dias do protocolo, os animais foram administrados oralmente com 15mg EAG/Kg de extrato de *Diospyros kaki* L. por gavagem 3h após da administração inicial de TNBS (n=10).

O TNBS foi instalado intracolonicamente como uma única dose como descrito anteriormente por Impellizzeri *et al.* (Impellizzeri et al. 2014) e todas as administrações quer de TNBS ou água destilada foram feitas através de um cateter cuidadosamente inserido até 4.5cm do cólon. Os murganhos foram mantidos durante 1 minuto na posição de *Tredelenburg* para evitar o refluxo.

No 5º dia os murganhos foram anestesiados, sacrificados e removido o colon.

**Tabela 2. 3 - Protocolo experimental de indução do modelo de colite *in vivo*, para o estudo da atividade anti-inflamatória do extrato de *Diospyros kaki* L.**

Grupos	Administração intracolónica	Administração oral
Controlo negativo (n=6)	100µL de solução salina	10mL/Kg de água destilada
Etanol (n=6)	100µL de 50% etanol	
TNBS (n=10)	100µL TNBS em 50% de etanol	15mg EAG/Kg de extrato de dióspiro
TNBS+ED (n=10)		

ED – extrato de dióspiro

### C) Avaliação macroscópica da gravidade da colite

Após a remoção do cólon, uma incisão longitudinal foi realizada para a observação do conteúdo e classificação da gravidade da diarreia por um observador cego em relação aos grupos experimentais (Tabela 2. 4). Em seguida, o cólon foi lavado com solução salina e analisado com um microscópio cirúrgico para melhor observação do tecido e captura de imagens das lesões. O cólon foi então medido, bem como a extensão da lesão (se presente).

**Tabela 2. 4 - Pontuação da gravidade da diarreia.**

Score	Consistência das fezes
0	Normal ( <i>pellets</i> duros)
1	Levemente mucosas
2	Moles
3	Líquidas

### D) Avaliação da lesão hemorrágica

A hemoglobina fecal, como índice de lesão hemorrágica, foi medida usando um método quantitativo por imunoturbidimetria (Kroma Systems).

### E) Procedimentos de histologia e imunohistoquímica

Depois de removidos e lavados os cólons foram fixados com paraformaldeído a 4% (p/v) em PBS durante 72h à temperatura ambiente, desidratados através de uma

série gradativa de etanol e incorporados em parafina (n=3 por grupo). A coloração com hematoxilina e eosina (H & E) foi realizada como previamente descrito (Rocha et al. 2015), e as imagens foram adquiridas usando um microscópio *Axioscop* de campo brilhante (Zeiss, Göttingen, Alemanha).

O grau de inflamação e o dano no cólon nas secções transversais microscópicas foi medido semi-quantitativamente de 0 a 3 (Tabela 2. 5):

0, cólon normal sem lesões, mucosa de espessura uniforme, criptas retas, arquitetura normal da cripta, sem infiltração celular, edema ou exsudato não significam sinais de inflamação;

1, cólon com lesões leves, erosão da mucosa e pequenas úlceras superficiais espalhadas ao longo do cólon, com pequena perda de criptas e infiltração de células mononucleares;

2, cólon com lesões moderadas, intestinos com erosão extensa e ulceração, com perda moderada de criptas e infiltração de neutrófilos;

3, colon com ulceração muito grave, mucosa fina com perda de criptas e aumento marcado da infiltração de neutrófilos e exsudato inflamatório agudo.

**Tabela 2. 5 - Classificação semi-quantitativamente da gravidade da lesão do cólon, por avaliação microscópica.**

Grau	Lesão	Espessura da mucosa	Criptas	Infiltrado celular
0	-	Uniforme	Retas	-
1	Leve ulceração superficial	Erosão pequena	Pequena perda	Células mononucleares
2	Úlceras moderadas	Erosão extensa	Perda moderada	Neutrófilos
3	Ulceração grave	Fina	Perda acentuada	Muitos neutrófilos

Para a imunohistoquímica, secções de cólon de 6 µm foram submetidas à recuperação de antigénios em tampão de citrato 20 mM com 1,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 min à temperatura ambiente no escuro, incubado durante 10 min em tampão Tris/EDTA a 84 °C e bloqueado durante 1 h à temperatura ambiente com 1% de albumina sérica bovina (BSA) em PBS. Anticorpos primários de coelho anti-COX2 e de rato anti-iNOS foram utilizados em BSA a 0,5% em PBS durante a noite a 4 °C. Após a lavagem em PBS, as secções foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com anticorpos anti-coelho e anti-rato acoplados à peroxidase de rábano em BSA a 0,5% em PBS, incubadas durante 10 min em SIGMAFAST DAB com *Metal Enhancer* e montado com Entellan. Secções de tecido foram visualizadas com um microscópio de campo claro AxioScope (Zeiss, Göttingen, Alemanha).

## 2.2.4 Análise estatística

Os tratamentos estatísticos relativos ao estudo dos efeitos anti-inflamatórios *in vivo* em modelos animais, de inflamação aguda e crónica com indução da AR, foram realizados utilizando o programa informático GraphPad PRISM™ (versão 5.0; GraphPad Software). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de *n* observações, onde *n* representa o número de animais estudados. A comparação estatística entre grupos foi calculada usando a análise de uma via da variância (ANOVA), seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni usando o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Em todos os casos, os valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

## 2.3 Resultados e Discussão

### 2.3.1 Estudo da atividade anti-inflamatória aguda no modelo de inflamação induzida pela carragenina

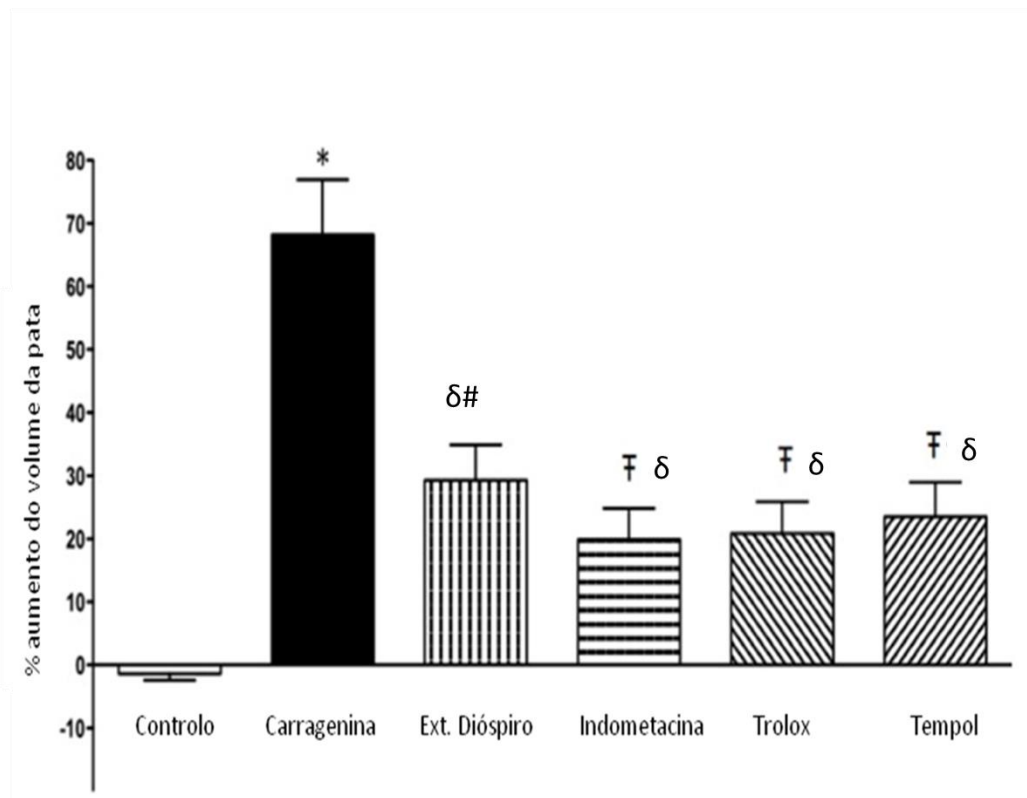
O extrato de dióspiro testado tem um perfil fenólico onde ácido gálico, epicatequina, procianidinas entre outros compostos fenólicos (item 5.2, capítulo I) são encontrados. A capacidade deste extrato de reduzir ou prevenir o edema induzido pela  $\lambda$ -carragenina na pata de rato foi avaliada para a dose ensaiada de 15 mg de EAG/kg peso vivo.

Se consultarmos o gráfico da Fig. 2. 3 podemos concluir que:

A 1ª evidência dos nossos resultados é que a carragenina causou edema na pata dos animais, como era suposto, o que pode ser verificado por um aumento enorme no volume medido.

A medição do volume das patas dos ratos após 6 horas mostrou que qualquer dos compostos ensaiados (indometacina, trolox e tempol) reduziu drasticamente o edema provocado pela carragenina ( $p < 0,001$ ) bem como o grupo a que foi administrado o extrato de dióspiro ( $p < 0,01$ ).

As percentagens de aumento do volume da pata neste modelo, para o grupo administrado com extrato de dióspiro foi comparado com os resultados obtidos nos grupos administrados com indometacina (medicamento anti-inflamatório não esteróide clássico que inibe a COX e, conseqüentemente a produção de PG e leucotrienos), com Trolox (potente antioxidante hidrossolúvel análogo da vitamina E) e ainda com o Tempol (mimético da superóxido dismutase de baixo peso molecular (Fig. 2. 3)).



**Figura 2. 3 – Impacto da administração de extrato de dióspiro, indometacina, trolox e tempol no aumento do volume da pata induzido pela carragenina.**

Os resultados correspondem à média ± erro padrão da média (E.P.M.). \* P <0,001 vs grupo de controlo.

°P<0,05 vs grupo controlo; #P<0,01 vs grupo carragenina; †P<0,001 vs grupo carragenina.

O efeito de uma única administração do extrato de dióspiro, teve um efeito bastante significativo na diminuição do edema induzido pela carragenina e muito semelhante aos efeitos da indometacina, trolox e tempol. Assim, o efeito observado foi de magnitude semelhante ao efeito observado com um inibidor de ciclooxygenase clássica, como a indometacina, com um antioxidante potente clássico, como o trolox e como um mimético de superóxido dismutase de baixo peso molecular, como o tempol.

A fase inicial da inflamação induzida por carragenina está relacionada à produção de leucotrienos, histamina, fatores de ativação plaquetária e produtos da ciclooxygenase. Esta enzima tem a indometacina como inibidor, no entanto o efeito observado com a administração do extrato foi de magnitude próxima da observada com a administração deste inibidor. Na fase tardia do processo inflamatório verifica-se a infiltração de neutrófilos e a produção de espécies reativas de oxigénio produzidas pelos neutrófilos ativados, tais como peróxido de hidrogénio, superóxido e radicais hidroxilo, bem como a libertação de outros mediadores inflamatórios derivados de neutrófilos. O tempol e o trolox com efeitos antioxidantes mostraram efeitos de magnitude semelhante ao observado para o extrato de dióspiro.

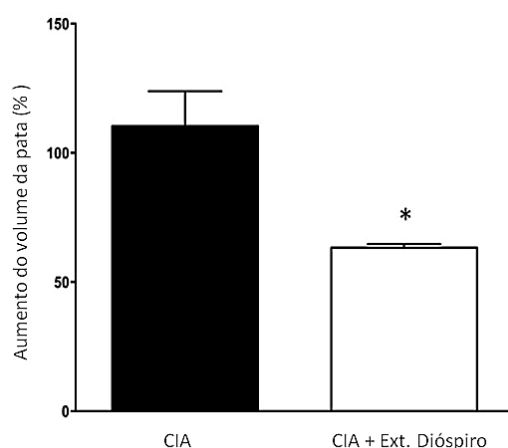


Embora os efeitos fossem semelhantes aos dos 3 anti-inflamatórios testados não podemos saber qual foi o mecanismo de ação do extrato para contrariar a inflamação provocada pela carragenina.

Compostos fenólicos como proantocianidinas, ácido gálico, epicatequina, ácido vanílico e derivados glicosilados deste e outros compostos antioxidantes naturais como ácido ascórbico poderão ter estado envolvidos na atividade anti-inflamatória demonstrada pelo extrato de *Diospyros kaki* L. no local da inflamação.

### 2.3.2 Estudo da atividade anti-inflamatória crónica num modelo animal de artrite induzida pelo colagénio (CIA)

As Fig. 2. 4 e Fig. 2. 5 mostram o efeito da administração do extrato de dióspiro na inflamação crónica induzida por CII.



**Figura 2. 4 – Percentagem de aumento do volume da pata associado à CIA (artrite induzida por colagénio) e após tratamento com extrato de dióspiro (CIA + Ext. dióspiro).**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \*P < 0,001 vs. Grupo CIA.

Como era previsto o CII induziu um edema de mais de 100% nas patas posteriores dos ratos. Os resultados mostram que a primeira evidência macroscópica da CIA apareceu como eritema periarticular e edema das patas traseiras. A incidência da CIA foi de 100% ao dia 23 em todos os ratos imunizados com CII e a gravidade da CIA progrediu durante o período de 35 dias. O eritema e o edema das patas posteriores aumentaram em severidade até ao último de experiência.

No entanto, pode verificar-se na Fig. 2. 4 que os animais tratados com extrato de dióspiro apresentaram um edema significativamente menor comparativamente aos animais do controlo positivo, o que sugere que o extrato em estudo teve uma ação

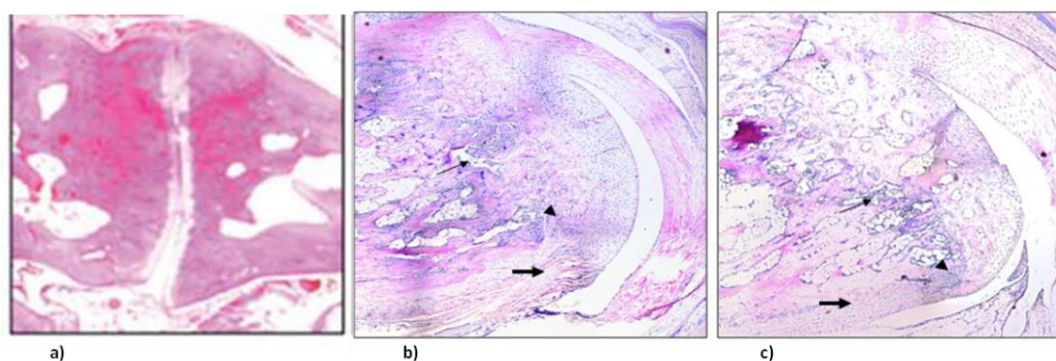
anti-inflamatória e, embora, não evitasse totalmente o desenvolvimento de edema pelo CII, conseguiu atenuar, em cerca de 47%, esse edema.

Se analisarmos as imagens radiológicas representadas na Fig. 2. 5 pode ver-se que o tratamento com o extrato do fruto dióspiro ( $15\text{mg kg}^{-1}$ ), administrado por via oral suprimiu significativamente a patologia articular e o edema do tecido mole, na pata traseira, dos ratos contrariando a reabsorção óssea e a significativa erosão da articulação induzida pelo CII e observada nas patas dos animais do grupo controlo positivo (CIA).



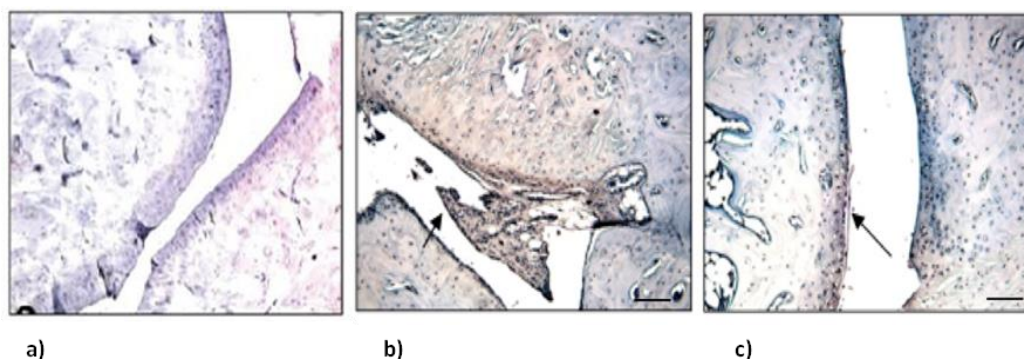
**Figura 2. 5 – Radiografias das articulações tibiotársicas dos ratos do modelo da CIA. a) Controlo negativo; b) Controlo positivo; c) Extracto de dióspiro p.o. 15mg/Kg. As imagens de raios-X são representativas de pelo menos 3 experiências realizadas em dias diferentes.**

As radiografias revelaram que não existe evidência de alterações patológicas nas articulações tibiotarsais de animais do controlo negativo (normais), (Fig. 2. 5a). As patas traseiras de ratos com CIA ao dia 35 demonstram reabsorção óssea com formação de osteofitos na articulação tibiotársica, significativa erosão da articulação e edema dos tecidos moles (Fig. 2. 5b). O tratamento com o extracto do fruto dióspiro ( $15\text{mg kg}^{-1}$  por dia), administrado por via oral, a partir do início da artrite (dia 23) atrasou o desenvolvimento dos sinais clínicos nos dias 24-35, suprimiu significativamente a patologia articular e o edema do tecido mole, na pata traseira (Fig. 2. 5c).



**Figura 2. 6 - Tecido das patas e articulação tibiotársica dos ratos do modelo CIA. (a) Espécime de um rato controlo negativo (sem AR). (b) Cortes histopatológicos de ratos controlo positivo em que a artrite foi induzida pelo colagénio (CIA), evidenciavam sinovite severa, danos na cartilagem (seta grande), infiltração acentuada, *pannus* (seta pequena) e reabsorção óssea (cabeça da seta). (c) Os cortes histopatológicos de amostras provenientes de animais CIA, tratados com o extrato (15mg/Kg/day, *p.o.*), exibem menos danos na cartilagem (seta grande), mantendo a infiltração (seta pequena) e a reabsorção óssea (cabeça de seta). (H&E, ampliação 100X).**

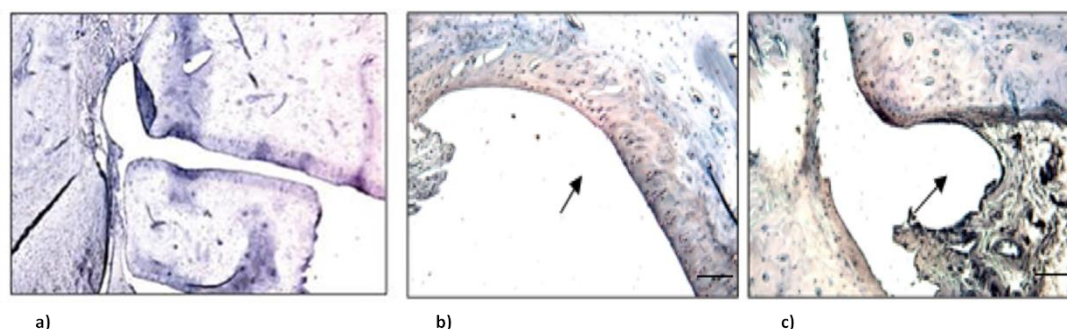
A análise histológica revelou que o tecido e a articulação da pata de um rato controlo negativo (sem CIA e sem extrato) (Fig. 2. 6a) apresentavam uma membrana sinovial normal e ausência de danos na cartilagem. Amostras histológicas do controlo positivo (com CIA e sem tratamento com extrato) (Fig. 2. 6b) apresentavam sinovite grave, danos na cartilagem, infiltração marcada, *pannus* e reabsorção óssea. Os cortes histopatológicos de amostras provenientes de animais com CIA, tratados com o extrato (15mg/Kg/day, *p.o.*) (Fig. 2. 6c), exibem menos danos na cartilagem, mantendo a infiltração e a reabsorção óssea do que aqueles do grupo controlo positivo. Assim, obtendo melhores pontuações histológicas e radiológicas. O que demonstra proteção à atividade articular do rato.



**Figura 2. 7 - Coloração imunohistoquímica para pesquisa de COX-2. (a) Amostra de tecido do rato do controlo negativo (saudável); (b) grupo positivo (CIA), exibem uma produção maciça de COX-2, nomeadamente perto dos infiltrados (coloração castanha - seta grande); (c) tecido de animais tratados com o extrato de dióspiro (15mg kg<sup>-1</sup>, *p.o.*) revelam que não modificou a ativação de COX-2 no modelo de CIA (coloração castanha - seta grande). (Ampliação 100X). A barra de escala é igual a 500µm.**

Os ratos que foram tratados com o extrato de dióspiro evidenciaram nas amostras histológicas preparadas com coloração de imunohistoquímica para a expressão de COX-2, que a administração do extrato de dióspiro não modifica a ativação de COX-2 no modelo de CIA (Fig. 2. 7c). As amostras de um rato do controlo negativo (saudável) não apresentam quase expressão de COX-2 (Fig. 2. 7a), enquanto

os do grupo positivo (CIA) exibem uma produção maciça de COX-2 nomeadamente perto dos infiltrados leucocitários (Fig. 2. 7b).



**Figura 2. 8 - Coloração imunohistoquímica para expressão de iNOS. (a) As amostras de um rato do controlo negativo, exibem quase nenhuma expressão de iNOS. (b) Os ratos artríticos do controlo positivo exibem uma produção maciça de iNOS, nomeadamente, perto dos infiltrados (coloração castanha - seta grande). (c) As amostras de animais tratados com o extrato de dióspiro ( $15 \text{ mg kg}^{-1}$ , *p.o.*) administrados por gavagem não reduziram significativamente a coloração para a expressão iNOS. (Ampliação 100X). A barra de escala é igual a  $500\mu\text{m}$ .**

A medição da expressão de COX-2 e iNOS foi realizada para contribuir para o esclarecimento dos mecanismos pelos quais o extrato exibiu o efeito anti-inflamatório. Os resultados mostraram que, neste modelo de CIA e com este cronograma de administração, não se observou alteração na expressão de COX-2 e iNOS nos tecidos das articulações artríticas (Fig. 2. 7 e Fig. 2. 8). Esses resultados estão de acordo com a ausência de efeito na infiltração de neutrófilos nos estudos histológicos, embora os marcadores histológicos de lesões artríticas tenham sido atenuados (menos danos na cartilagem).

Em suma, as radiografias relativas à progressão da CIA nas articulações tibiotársicas de animais dos 3 grupos considerados neste estudo apresentam-se na Fig. 2. 5b e Fig. 2. 5c. As radiografias obtidas revelaram um quadro clínico de artrite bem estabelecido, com reabsorção focal do osso, formação de osteófitos na articulação tibiotársica e edema dos tecidos moles (animais do grupo ii) Fig. 2. 5b. A administração do extrato de *Diospyros kaki* L. aos animais (ratos do grupos iii) traduziu-se na obtenção de melhorias histológicas e radiológicas das articulações do joelho e da pata em relação às dos animais doentes sem tratamento (ratos do grupo ii), (Fig. 2. 5b).

Juntamente com os efeitos observados do extrato na redução *in vitro* do *burst* oxidativo de neutrófilos (Fig. 2. 1), os efeitos benéficos do extrato de dióspiro neste modelo podem estar relacionados a uma atenuação da ativação de neutrófilos e consequente redução da libertação de produtos pró-inflamatórios derivados dos neutrófilos. Isso também está de acordo com os resultados positivos, também

observados nos estudos de edema de pata, tipicamente modelos de inflamação com alta correlação com a ativação de neutrófilos.(Rocha et al. 2015). De todas as células implicadas na patologia da artrite reumatoide, os neutrófilos possuem o maior potencial citotóxico, devido à sua capacidade de libertar enzimas degradativas e espécies reativas de oxigénio, inclusivamente é um facto bem conhecido de que o ácido hipocloroso derivado de neutrófilos, um produto da enzima mieloperoxidase, desempenha um papel importante na destruição da cartilagem durante a artrite reumatoide (Schiller et al. 1995).

Os nossos resultados sugerem que o extrato de dióspiro apresenta um efeito anti-inflamatório e protetor do desenvolvimento da AR.

Os efeitos observados com a dose diária testada *in vivo* no modelo de CIA, para se verificarem no consumo humano diário (para um adulto de 60kg), correspondem a 960 mg EAG, que se encontram em aproximadamente 100g de dióspiro fresco.

Assim, o consumo desta quantidade do fruto ou mesmo a ingestão do extrato do fruto pode ser uma ferramenta farmacológica útil na gestão de condições artríticas crónicas associadas a inflamação ativa, ou uma boa medida preventiva no aparecimento da doença.

### 2.3.3 Estudo da Atividade Anti-inflamatória Crónica no Modelo de Colite

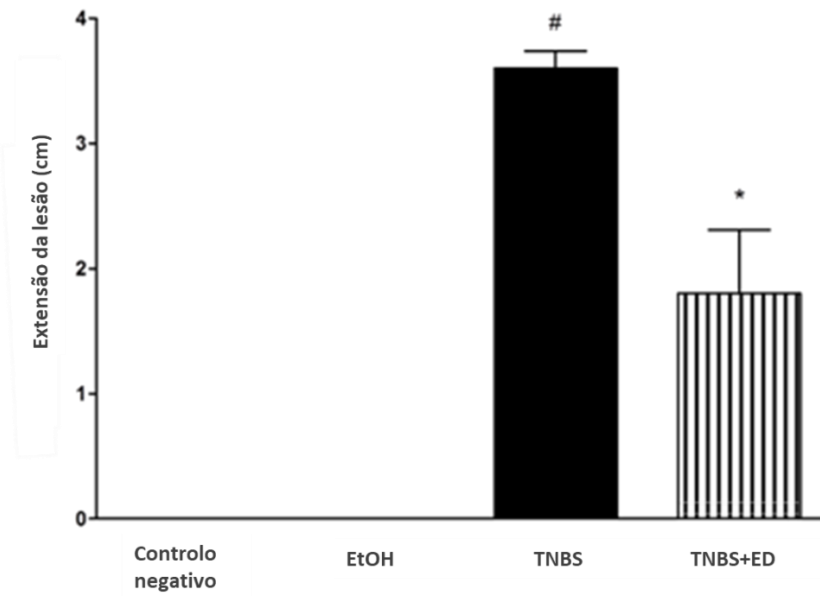
Da avaliação macroscópica e dos sinais funcionais do cólon dos animais de cada um dos grupos testados, obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 2. 6 e nas Fig. 2. 9, Fig. 2. 10 e Fig. 2. 11.

**Tabela 2. 6 - Observações morfológicas e funcionais do cólon, imediatamente após a colheita.**

	Comprimento do cólon	Extensão da lesão	Presença/Consistência da diarreia	Mortalidade (%)
Controlo negativo	14,5 ± 0,082	0	0	0%
EtOH 50%	14,1 ± 0,2	0	0	0%
TNBS + EtOH 50%	11,8 ± 0,19 <sup>#</sup>	3,6 ± 0,14 <sup>#</sup>	3 <sup>#</sup>	30%
TNBS + Dióspiro	14,6 ± 0,43*	1,8 ± 0,71*	0,29 ± 0,18*	20%

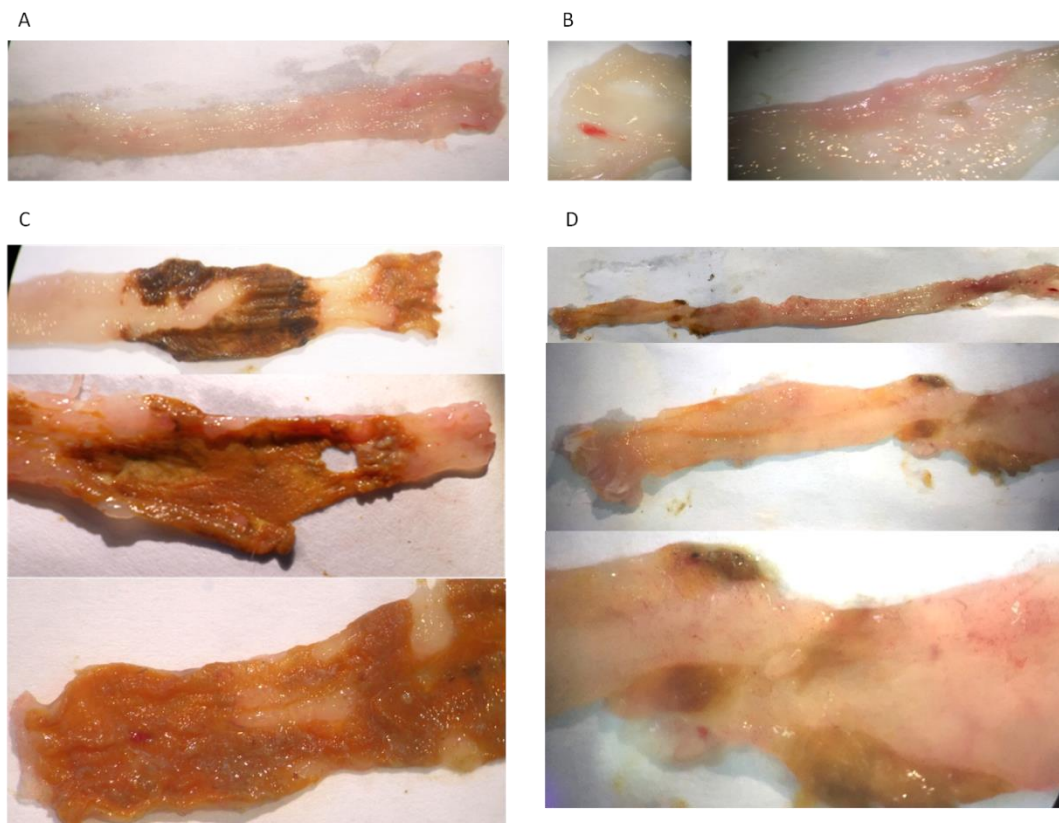
<sup>#</sup>P<0,05 vs Controlo; \*P<0,05 vs TNBS + EtOH 50%.

Estas diferenças são facilmente perceptíveis na observação macroscópica do cólon fresco e lavado imediatamente após a sua colheita no final das experiências. Quatro dias após a administração intracolónica de TNBS o cólon mostrava flacidez, lesões e estava cheio com fezes líquidas ao contrário do que foi observado no colon dos animais do controlo negativo e EtOH 50%. No caso do grupo TNBS tratado com extrato de dióspiro o colon tinha aspecto semelhante ao controlo negativo.



**Figura 2. 9 - Efeito da administração do extrato fenólico de dióspiro na extensão da lesão intestinal, dos grupos: Controlo negativo, EtOH, TNBS, TNBS + ED (extrato de dióspiro).**

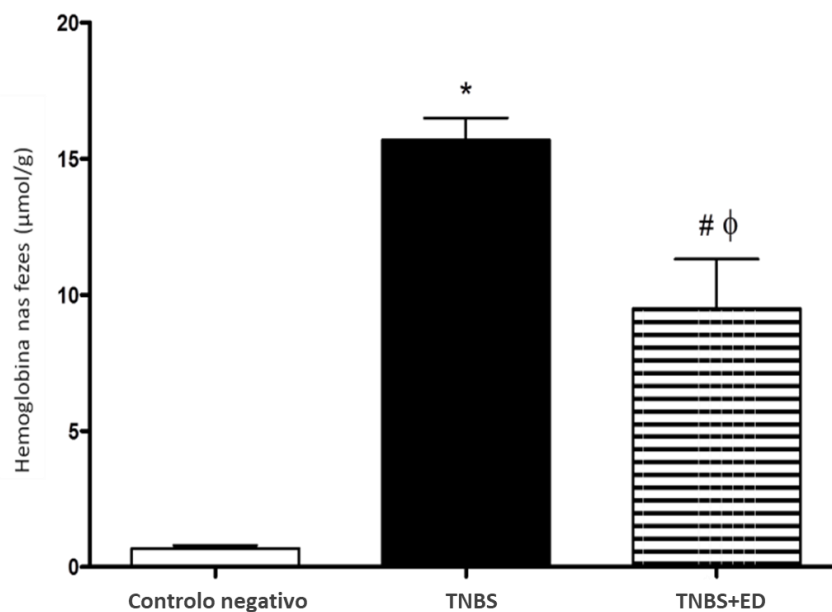
#P <0,001 vs grupo Controlo negativo, \* P <0,01 vs grupo TNBS.



**Figura 2. 10 - Efeito da administração do extrato fenólico de dióspiro na observação macroscópica do cólon. (A) grupo controlo negativo, (B) grupo EtOH, (C) grupo TNBS, (D) grupo TNBS + extrato de dióspiro.**

<sup>#</sup>P <0,001 vs grupo controlo negativo, \* P <0,01 vs grupo TNBS.

Observações de imagens obtidas com um microscópio cirúrgico, mostram claramente uma atenuação da lesão do cólon nos animais tratados com o extrato fenólico de dióspiro quando comparado com o grupo com colite induzida por TNBS (Fig. 2. 10), o que é confirmado no gráfico da Fig. 2. 11.



**Figura 2. 11 - Efeito da administração do extrato fenólico de dióspiro na concentração de hemoglobina nas fezes ( $\mu\text{mol/g}$  de fezes), nos grupos: Controlo negativo, TNBS e TNBS + ED (extrato de dióspiro).**

\*  $P < 0,001$  vs grupo controlo negativo, #  $P < 0,01$  vs grupo TNBS,  $\phi P < 0,01$  vs grupo controlo negativo.

A presença de hemoglobina nas fezes de ratos com colite induzida por TNBS indicou a presença de lesão hemorrágica na mucosa colónica, levando ao sangramento rectal. A administração do extrato fenólico de dióspiro levou a uma diminuição significativa da concentração de hemoglobina nas fezes, sugerindo que o grau de lesão mucosa foi reduzido no grupo administrado com o extrato fenólico (Fig. 2. 11)

Relativamente à avaliação histológica, os resultados dos efeitos do extrato de dióspiro ensaiado nesta experiência apresentam-se nas Fig. 2. 12 e Fig. 2. 13



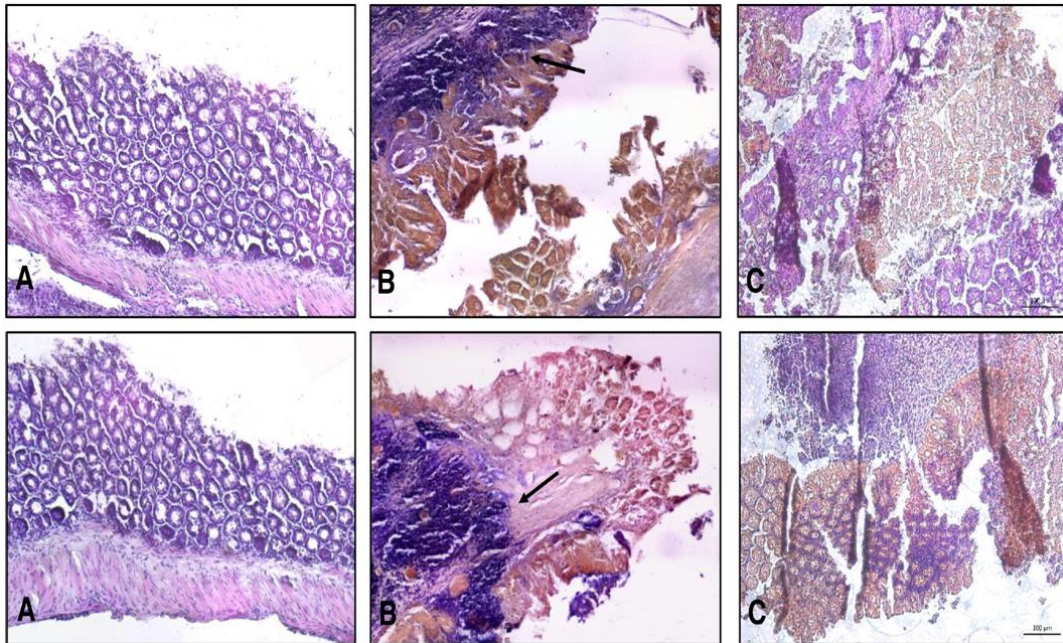


Figura 2. 12 - Efeito da administração do extrato fenólico de dióspiro nas características histológicas da inflamação do cólon. (A) grupo controlo negativo; (B) grupo TNBS, onde a infiltração marcadamente aumentada de neutrófilos se mostra com a seta preta (pontuação 3); (C) TNBS + extrato de dióspiro, com baixa infiltração de neutrófilos (pontuação 2). H&E, ampliação original  $\times 100$ . A barra de escala é igual a  $100\mu\text{m}$ .

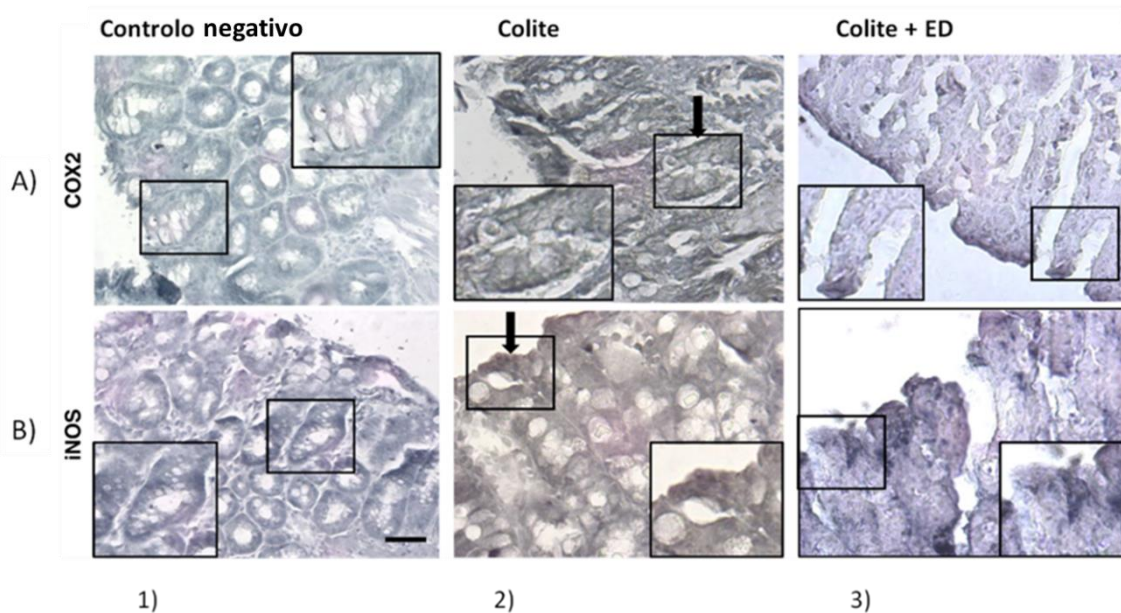


Figura 2. 13 - Efeito da administração do extrato fenólico de dióspiro na expressão do tecido do cólon de COX-2 e iNOS. (A) - expressão de COX-2: (1) grupo controlo negativo, (2) grupo TNBS, (3) grupo TNBS + ED; (B) - expressão de iNOS: (1) grupo controlo negativo, (2) grupo TNBS, (3) grupo TNBS + ED. Somente as amostras de animais submetidos a colite intestinal mostrou expressão marcada de COX-2 e iNOS (coloração castanha, setas), enquanto as amostras de animais tratados com extrato

**fenólico de dióspiro exibiram uma expressão reduzida daqueles marcadores inflamatórios. Ampliação original × 100. A barra de escala é igual a 200µm.**

Os resultados histológicos (Fig. 2. 12) revelaram que, enquanto as amostras do controlo exibem um cólon normal sem lesões, mucosa de espessura uniforme, arquitetura das criptas normal e sem sinais de inflamação, as amostras com colite apresentam ulceração grave com perda de criptas e mucosa mais fina com marcada infiltração de neutrófilos, equivalente a uma pontuação 3. Em comparação, as amostras de cólon dos animais administrados com extrato fenólico de dióspiro mostram lesões mais moderadas, com criptas parcialmente intactas e alguma infiltração de neutrófilos, indicando menor escore de danos de 2.

Conforme se mostra na Fig. 2. 13 a indução de colite induziu um aumento acentuado na expressão de COX-2 e iNOS ao longo das criptas restantes, indicadas pela cor castanha quando comparadas com amostras do controlo. De acordo com as observações histológicas, os animais tratados com extrato de dióspiro exibiram uma coloração reduzida tanto para COX-2 como para iNOS, indicando que a administração do extrato fenólico de dióspiro pode atenuar os processos inflamatórios do cólon através destas vias.

A administração do nosso extrato fenólico de dióspiro a murganhos que sofriam de colite induzida por TNBS levou a uma redução em vários marcadores funcionais e histológicos da inflamação do cólon, como a atenuação da diminuição do comprimento do cólon, redução na extensão da lesão visível (formação de úlcera), diminuição na gravidade da diarreia, redução da taxa de mortalidade, redução da hemorragia mucosa e redução das características histológicas gerais da inflamação do cólon.

O nosso estudo acrescentou a tentativa de esclarecer alguns dos mecanismos possivelmente responsáveis por esses efeitos benéficos, investigando alguns marcadores importantes de inflamação. Vários artigos atribuíram à ciclooxigenase-2 (COX-2) um papel importante na DII e mesmo na progressão do cancro colorretal. A ligação entre a sobre expressão de COX-2, a inflamação do cólon e o cancro colorretal está bem estabelecida e até levou a estudos epidemiológicos e clínicos para avaliar os efeitos benéficos dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) no tratamento e/ou prevenção do cancro colorretal em doentes com DII (Wang et al. 2010; Azer 2013). Embora os estudos clínicos atribuam um efeito benéfico da inibição da COX-2, o uso prolongado de altas doses de AINEs não é recomendado por causa de efeitos colaterais cardiovasculares e gástricos inaceitáveis. No entanto, estudos recentes mostram que o *celecoxib* (um inibidor seletivo de COX-2) pode ser seguro para a prevenção da formação e desenvolvimento de cancro colorretal em certas pessoas (Wang et al. 2010).

No nosso trabalho, mostrámos que a indução de inflamação do cólon levou a uma expressão aumentada de COX-2 (Fig. 2. 13). Este resultado está de acordo com estudos clínicos e epidemiológicos que demonstram o papel importante desempenhado pela COX-2 e prostaglandinas na progressão da inflamação intestinal em pacientes com IBD (Wang et al. 2010; Azer 2013). A administração de extrato fenólico de dióspiro levou à diminuição da expressão de COX-2 no tecido intestinal lesionado.

O papel fisiológico do óxido nítrico (NO) evoluiu ao longo dos anos de um mero neurotransmissor e vasodilatador para um modulador complexo de processos inflamatórios. Especificamente no intestino, a regulação ascendente da produção de NO através da expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) representa parte de uma resposta antibacteriana intestinal. No entanto, o NO também foi associado à iniciação e manutenção da inflamação na DII humana (Kolios et al. 2004) e vários estudos mostraram que o nível de NO derivado de iNOS se correlaciona bem com a atividade da doença na colite ulcerativa (Cross et al. 2003). O óxido nítrico é produzido e libertado localmente em quantidades muito maiores no intestino inflamado do que no intestino não inflamado e, na verdade, foi mesmo sugerido como um novo biomarcador clínico para diagnóstico e monitorização de doentes com DII (Lundberg et al. 2005). Da mesma forma que a COX-2, os ensaios de imunocoloração mostraram que houve, de fato, uma expressão aumentada de iNOS nos animais em que foi induzida a colite (Fig. 2. 13). Os nossos resultados mostram que a administração de extrato fenólico de dióspiro foi capaz de reduzir a expressão do iNOS e, portanto, contribuir para o comprometimento do processo inflamatório no cólon.

É de notar que após a ingestão, os compostos fenólicos são conhecidos por serem pobremente biodisponíveis e extensivamente metabolizados (Crozier 2009; Selma et al. 2009; González-Sarrías et al. 2017). Deste modo, o catabolismo de compostos fenólicos do dióspiro no cólon, e a formação de novos metabolitos bioativos, podem contribuir para os benefícios para a saúde observados para este fruto (Kim et al. 2013; Uddin et al. 2014; Martínez-Las Heras et al. 2017). Portanto, é provável que os efeitos aqui vistos resultem de metabolitos derivados dos fenóis do extrato do *Diospyros kaki* L..

A administração do extrato por via oral, permitiu evidenciar o efeito deste após a digestão *in vivo* do extrato, ou seja uma absorção limitada e metabolização mais ou menos intensa daqueles constituintes fenólicos com produção de metabolitos diversos. A microflora intestinal cataboliza os compostos fenólicos a moléculas menores que são melhor absorvidas podendo exercer efeitos biológicos benéficos para a saúde quer ao nível do intestino ou em outros locais, circulando no plasma. Por sua vez, os compostos fenólicos modulam a microflora promovendo o "*prebiotic-like effect*", com o crescimento de microrganismos benéficos como *Akkermansia* spp. e

*Faecalibacterium* spp. e decrescendo o rácio Firmicutes/Bacteroidetes, o qual é considerado um efeito benéfico. Diferenças na população da microflora intestinal determinam o metabolismo dos compostos fenólicos, produzindo diferentes metabólitos, ou seja diferentes metabotipos podem modular os diferentes efeitos na saúde. Na realidade, alguns metabotipos são mais abundantes em doenças ou desordens com disbiose da flora intestinal (obesidade, síndrome metabólica, e cancro colorretal) (Tomas-Barberan et al. 2016). As espécies bacterianas que desglicosilam compostos fenólicos alimentares no intestino incluem *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Eubacterium* e *Lactobacillus* (Braune et al. 2016). À microflora que cliva o núcleo do polifenol e reduz as ligações duplas, desidroxila e desmetila pertencem principalmente as famílias Coriobacteriaceae, incluindo espécies de *Eggerthella*, *Paraeggerthella*, *Slackia*, *Adler-creutzia* e *Gordonibacter* e *Clostridiaceae* (*Clostridium* e *Flavonifractor*). A família Coriobacteriaceae é particularmente interessante porque tem sido associada a efeitos metabólicos benéficos na obesidade e na diabetes (Clavel et al. 2014).

Os efeitos observados com a dose diária testada *in vivo* no modelo de colite, para se verificarem no consumo humano diário (para um adulto de 60kg), correspondem a 960mg EAG, que se encontram em aproximadamente 100g de dióspiro fresco.

Em suma, com o aumento atual de doentes com doenças inflamatórias crónicas, o recurso a alimentos funcionais anti-inflamatórios adequados pode tornar-se uma poderosa estratégia efetiva para controlar e/ou prevenir essas doenças que já estão a ter um impacto social e económico importante (Duggan et al. 2002). Uma vez que a DII está relacionada a estágios pré-cancerígenos, a prevenção da incidência de cancro colorretal pode passar por uma estratégia baseada na alimentação sendo uma alternativa fácil e económica (Stierum et al. 2001).

À luz do nosso conhecimento, o potencial da utilização dos fenóis do dióspiro como nutracêuticos para doença inflamatória intestinal nunca foi estudado antes. Os nossos resultados mostram pela primeira vez um efeito benéfico de um extrato fenólico de dióspiro na atenuação da colite experimental.

## CAPÍTULO III

---

Modelo *in vitro* do cancro colorretal com a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano: HT-29

---

### **CAPÍTULO III. MODELO *IN VITRO* DO CANCRO COLORRETAL COM A LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO: HT-29**

Para a avaliação da capacidade anti-carcinogénica do extrato do fruto dióspiro foram levados a cabo testes *in vitro* em células de adenocarcinoma de cólon humano, HT-29, que são células epiteliais intestinais humanas, com características aderentes e tumorigénicas. As suas estruturas morfológicas incluem microvilosidades, microfilamentos, mitocôndrias com grânulos escuros e lisos, retículo endoplasmático rugoso e ribossomas livres, gotículas lipídicas e muitos lisossomas secundários (Fogh et al. 1977).

Neste trabalho foi escolhida a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano HT-29 para o estudo da captação intestinal dos compostos fenólicos bioativos presentes num extrato de dióspiro e o efeito dos mesmos sobre células de cancro do cólon humano, no intuito de avaliar a implicação desses compostos fenólicos na prevenção do desenvolvimento do cancro colorretal.

A origem da linhagem HT-29 e a escassez de trabalhos em relação à mesma e aos compostos fenólicos presentes num extrato de dióspiro foram determinantes na escolha desta linhagem para o estudo.

Existem várias linhas de evidência em que o extrato de dióspiro e seus constituintes têm atividade antitumoral potente contra células tumorais humanas (Yoshioka et al. 2000; Jang et al. 2010; Khanal et al. 2010; Kim et al. 2011). No entanto, os mecanismos moleculares em atividades antitumorais não são ainda compreendidos.

#### **1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

O trabalho desenvolvido para testar o potencial do extrato de dióspiro como alimento funcional na prevenção e tratamento do CRC, teve como objetivos:

- I. Pesquisar o eventual efeito anticancerígenos do extrato fenólico do fruto ao testar o seu efeito na proliferação e invasão de células de carcinoma do cólon humano;
- II. Avaliar a atividade gelatinolítica no modelo *in vitro* e avaliar se os resultados observados poderiam estar relacionados a mecanismos de inibição de MMP.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes e Padrões

#### Avaliação da capacidade anti-proliferativa do extrato em células HT-29

**Cultura de células HT-29:** células do adenocarcinoma de cólon de *Homo sapiens sapiens* HT-29, linha celular ECACC, n ° 91,072,201. Meios de cultura do Instituto *Memorial Roswell Park* (RPMI), contendo 2mM glutamina e suplementadas com soro bovino fetal (SBF) a 10% (v/v), solução de penicilina a 0,5% (v/v) a  $2 \times 10^4$  UI/mL e a estreptomicina 34mM e atmosfera humedecida com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>.

**Ensaio de migração celular (*wound healing assay*):** placas de 6 poços; tampão fosfato salino (PBS) esterilizado em autoclave a 121°C.

**Determinação das MICs (*minimal inhibitory concentrations*):** placas estéreis de 96 poços (Greiner Bio-one, Germany).

#### Estudo da inibição da atividade de enzimas MMP9 e MMP2

**Atividade gelatinolítica de células do cancro do cólon:** gelatina *dye-quenched* (DQ) de substrato fluorogénico adquirida à Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA); *kit* EnzCheck© (Invitrogen); Tris-HCl 50mM pH 7,6; NaCl 150mM, CaCl<sub>2</sub> a 5mM; Tween 20 a 0,01% v/v; placa preta de micro-ensaio de 96 poços.

**Zimografia de substrato:** géis de SDS-poliacrilamida (12,5% p/v de acrilamida) copolimerizados com 1% (p/v) de gelatina; Tris-HCl 62,6mM pH 6,8, SDS a 2% (p/v); 10% (v/v) de glicerol; 0,01% (p/v) de azul de bromofenol; gel de acrilamida a 12% (p/v); gel de empilhamento de acrilamida a 4% (p/v); unidade de electroforese vertical a 100 V e 20mA por gel; 2,5% (v/v) de Triton X-100; Tris-HCl 50mM, pH 7,4; CaCl<sub>2</sub> 5mM; ZnCl<sub>2</sub> 1- $\mu$ M e azida de sódio a 0,01% p/v; *Coomassie Brilliant Blue* G-250 0,5% (p/v) em 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético; solução de 50% (v/v) de metanol; 10% (v/v) de ácido acético.

### 2.3 Equipamentos

Microscópio ótico (Leica Microsystems, CMS GmbH); câmara de fluxo (SCANLAF); centrífuga (ScanSpeed 1236); estufa (Panasonic, MCO-18ACUV-PE); espectrofotómetro (Synergy HT, Bio-TEK).

## 2.4 Métodos

### 2.4.1 Cultura de células HT-29

Foram usadas as células de adenocarcinoma de cólon de *Homo sapiens sapiens* HT-29, que foram rotineiramente semeadas em frascos de plástico e cultivadas em meios de cultura do Instituto *Memorial Memorial Roswell Park* (RPMI), contendo glutamina 2mM e suplementadas com soro de bovino fetal a 10% (v/v), solução de penicilina a 0,5% (v/v) a  $2 \times 10^4$  UI/mL e a estreptomicina 34mM. As células foram mantidas em uma atmosfera humidificada contendo 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>. A viabilidade celular foi verificada com observação diária num microscópio invertido. Às células foi fornecido meio fresco a cada segundo dia e foram tripsinizadas quando a confluência estava entre 80 e 100%.

### 2.4.2 Ensaio de migração celular (*wound healing assay*)

O extrato de dióspiro foi avaliado quanto à sua atividade inibidora nas células de adenocarcinoma do cólon HT-29. Para a análise da migração celular, o ensaio de *wound healing assay* foi realizado como descrito por Lima *et al.* (Lima et al. 2016). As células HT-29 ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas em placas de 6 poços e permaneceram em cultura até atingirem 80% de confluência. Após a remoção do meio foi realizado um risco na monocamada de células com uma ponta de micropipeta estéril de modo a criar uma abertura, simulando uma ferida de largura constante. Posteriormente, os detritos celulares foram lavados duas vezes com PBS. Cada poço foi então preenchido com meio fresco contendo o extrato fenólico em estudo, a uma concentração de 0, 250, 500, 1000 e 2000µg de compostos fenólicos/mL (volume total de 3 mL por poço) e as células foram deixadas a crescer por 48h. O fechar da “ferida” foi monitorizado e fotografado às 0 e às 48h. Para quantificar a células migratórias, as imagens iniciais das monocamadas “feridas” foram comparadas com as imagens correspondentes das células no final das 48 horas de incubação. Para facilitar a análise comparativa, foram desenhadas linhas artificiais sobre imagens das feridas originais e sobrepostas nas fotos após 48 horas de incubação. A migração de células em todas as linhas foi contada em três campos aleatórios de cada tratamento triplicado, e os dados são apresentados como a média  $\pm$  D.P.



## Estudo da inibição da atividade de enzimas MMP9 e MMP2

### 2.4.3 Atividade gelatinolítica de células do cancro do cólon

As células HT-29 foram tratadas com extrato com concentrações de 250, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g}$  de compostos fenólicos (EAG) / $\text{mL}^{-1}$  durante 48h, como descrito acima, e os meios extracelulares das culturas de células HT-29 foram colhidos para quantificar as respectivas atividades gelatinolíticas. A gelatina *dye-quenched* (DQ) de substrato fluorogénico foi utilizada para quantificar as atividades enzimáticas da MMP-9 e MMP-2. A *DQ-gelatin* foi dissolvida em água a 1 mg/mL de acordo com as instruções do fabricante. Todas as soluções e diluições foram preparadas em tampão de ensaio (Tris-HCl 50mM a pH 7,6, NaCl 150mM,  $\text{CaCl}_2$  a 5mM e Tween 20 a 0,01% v/v). Foi utilizada uma placa de microensaio de 96 poços. Cada poço foi carregado com 150 $\mu\text{L}$  meio para as células HT-29, para cada tratamento e a placa foi incubada durante 1h a 37°C (Lima et al. 2016). Posteriormente, adicionou-se *DQ-gelatin* (a uma concentração final de 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a cada poço e a placa foi deixada a incubar durante 1h. Os níveis de fluorescência foram medidos (ex. 485nm/em. 530nm). Todos os dados foram corrigidos subtraindo os seus controlos negativos correspondentes.

#### 2.4.3.1 Zimografia de substrato

Para determinar as atividades de metaloproteases nos sobrenadantes da cultura de células cancerígenas HT-29, obtidos após exposição celular aos extratos fenólicos de dióspiro, uma zimografia de gelatina foi realizada de acordo com métodos padrão (Toth et al. 2012), com as seguintes modificações: géis de SDS-poliacrilamida (12,5% m/v de acrilamida) foram copolimerizados com 1% (m/v) de gelatina. Os sobrenadantes das culturas celulares foram tratados com um tampão não redutor contendo Tris-HCl 62,6mM pH 6,8, SDS a 2% (m/v), 10% (v/v) de glicerol e 0,01% (p/v) de azul de bromofenol foram carregados em cada poço do SDS-gel. A electroforese foi realizada como descrito anteriormente (Laemmli 1970) num gel de resolução de acrilamida a 12% (p/v) e um gel de empilhamento de acrilamida a 4% (m/v), realizado em uma unidade de electroforese vertical a 100 V e 20mA por gel. Após a electroforese, os géis foram lavados três vezes em 2,5% (v/v) de Triton X-100 durante 90 minutos cada, para remover o SDS. Os géis foram então incubados durante a noite com tampão de desenvolvimento (50mM Tris-HCl, pH 7,4, 5mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  e 0,01% (m/v) azida de sódio). A coloração do gel ocorreu com 0,5% (m/v) *Coomassie Brilliant Blue* G-250 em 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético, durante 30 min, e descorados com uma solução de 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético. Bandas brancas visíveis contra um fundo azul marcaram a atividade gelatinolítica de cada proteinase (Toth et al. 2012).

#### **2.4.4 Determinação das concentrações mínimas inibitórias [*minimal inhibitory concentrations* (MIC)]**

A determinação das MICs foi realizada pelo método de microdiluição em placas estéreis de 96 poços (Greiner Bio-one, Germany), como descrito anteriormente por Bouhdid *et al.* (Bouhdid et al. 2010). Para isso foram distribuídos 50µL de meio RPMI a cada poço. Depois, 50µL de cada amostra foi adicionada ao primeiro poço e serialmente diluída de 1:2 no poço seguinte, até dez diluições.

Seguidamente, foram adicionados aos poços 50µL de uma suspensão com as células HT-29 com uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL. Foi realizado o controlo positivo de crescimento (50µL de meio RPMI + 50µL de suspensão celular) e o controlo negativo de crescimento (100µL de meio RPMI). As placas foram incubadas, durante 24h a 37°C e o crescimento celular foi medido pelo ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Carmichael et al. 1987). Após o tratamento, o meio extracelular foi cuidadosamente removido e foram adicionados 100µL de uma solução de MTT dissolvido em PBS com uma concentração final de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. As placas foram novamente incubadas durante 4h a 37°C. De seguida, foram adicionados 100µL de dimetil sulfóxido (DMSO) de forma a solubilizar os cristais de MTT. Finalmente, e após agitação das placas foi determinada a DO a um comprimento de onda de 570nm, num espectrofotómetro.

Para a determinação da MIC da MMP-9, os meios de cada poço foram colhidos, e as atividades gelatinolíticas foram determinadas com DQ-gelatina, como descrito acima.

#### **2.4.5 Atividade gelatinolítica no tecido do cólon**

As atividades das MMP-9 e MMP-2 também foram determinadas nos cólons dos murganhos submetidos a tratamentos com extrato de dióspiro. As amostras foram tratadas como descrito antes (Lima et al. 2016), com poucas alterações. Resumidamente, o tecido colónico foi homogeneizado numa proporção de 1/20 (peso / volume) em Tris HCl 50mM (pH 7,6), NaCl 150mM (as amostras foram sonicadas três vezes por 10s cada (a intervalos de 1 min). Após 10 minutos em gelo, os extratos de proteínas foram centrifugados durante 10 minutos a 13 000 g a 4°C, os sobrenadantes foram preservados e as concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Lowry (Lowry et al. 1951). As amostras foram armazenadas a -80°C até serem ensaiadas. As atividades de gelatinase e colagenase foram medidas nos homogeneizados dos tecidos colónicos por fluorometria, usando o kit de análise de gelatina DQ e análises zimográficas como descrito acima.

## 2.4.6 Análise estatística

Para os modelos *in vitro* com as células do cancro e as atividades gelatinolíticas, todas as experiências foram realizadas em triplicado, em pelo menos três tempos independentes, e os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (D.P.). O *software* SigmaPlot (Versão 12.5) foi usado para comparar diferentes tratamentos, usando análise de variância unidireccional e bidireccional (ANOVA). O teste de Tukey foi usado para comparar as diferenças entre os grupos, e as diferenças estatísticas com valor de P inferior a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas.

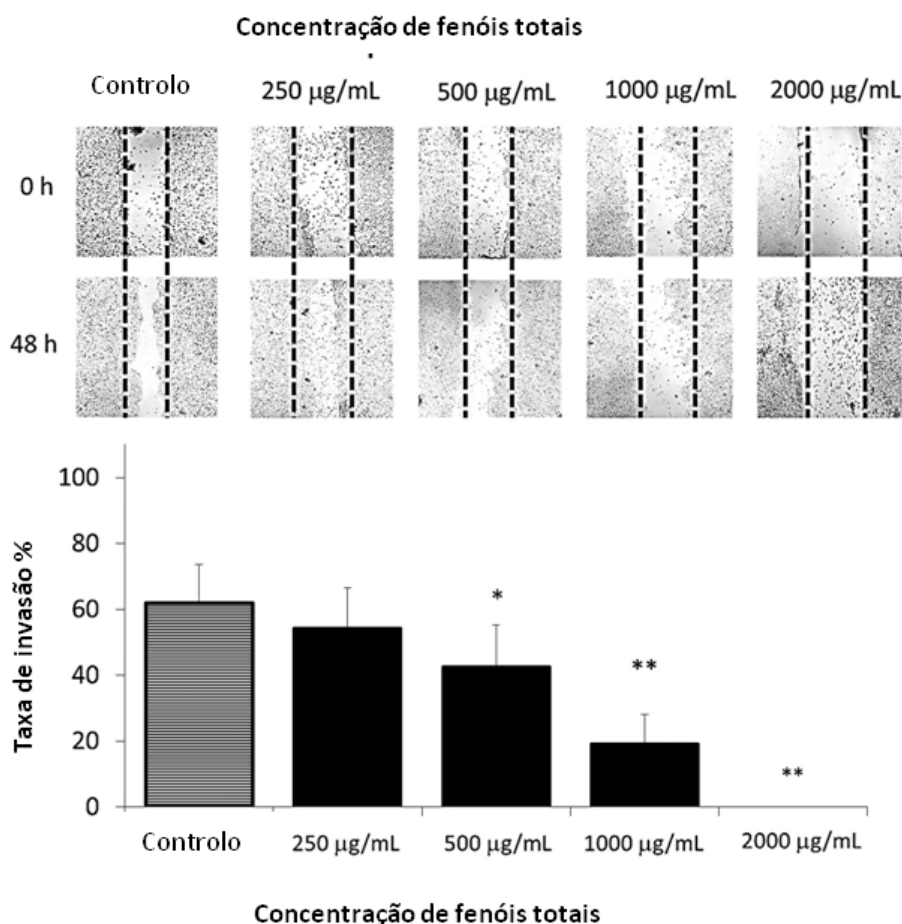
## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Avaliação da capacidade anti-proliferativa do extrato em células HT-29

#### 3.1.1 Cultura de células HT-29

##### 3.1.1.1 Ensaio de migração celular (*wound healing assay*)

Na Fig. 3. 1, podemos observar o padrão de migração de células HT-29 após uma exposição de 48 horas a extratos fenólicos de dióspiro e as imagens representativas dos fechos de “feridas” correspondentes. Os resultados mostram que a exposição a 250, 500, 1000 e 2000 $\mu$ g/mL de extratos fenólicos de dióspiro, de facto reduziu a capacidade de células HT-29 para invadir a lacuna da ferida, de uma maneira dose dependente. Apenas exposições superiores a 500 $\mu$ g/mL conseguiram reduzir significativamente a invasão celular (P <0,05). Embora as concentrações mais baixas não tenham induzido efeito significativo, a concentração mais alta utilizada (2000 $\mu$ g/mL) foi muito eficaz na inibição da migração celular, reduzindo-a para perto de nulo.

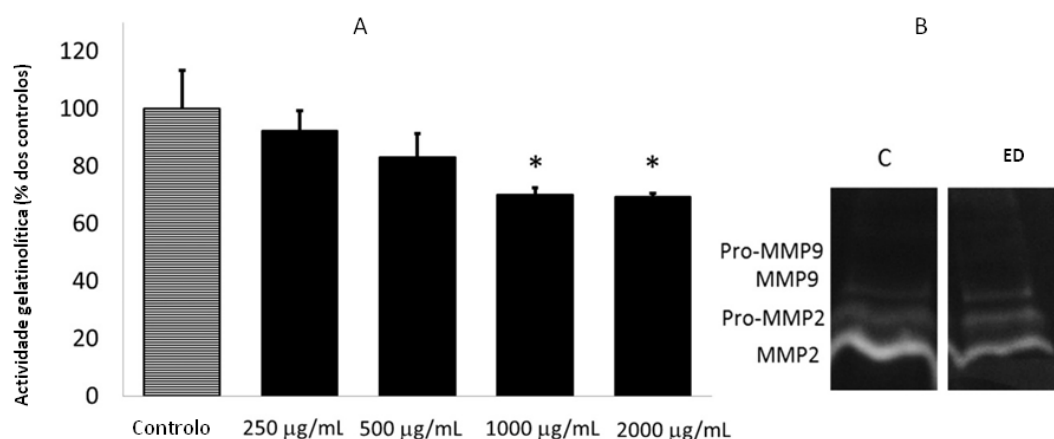


**Figura 3. 1 - Migração das células HT-29 após exposição ao extrato fenólico de dióspiro, determinada pelos ensaios de cicatrização de feridas. O histograma mostra as taxas de migração relativa, onde os valores são as médias de pelo menos três réplicas  $\pm$  D.P., e são expressos como percentagem de fechamento da ferida em relação ao tempo 0. As células foram cultivadas até atingir 80% de confluência e a monocamada foi arranhada com uma ponta de micropipeta (dia 0). As células foram então expostas a diferentes concentrações fenólicas do extrato de dióspiro e a migração celular foi registrada após 48h. \*P <0,05, \*\*P <0,001.**

### **3.2 A atividade gelatinolítica tanto nas células HT-29 cultivadas como no tecido fresco do cólon do estudo da colite *in vivo***

A Fig. 3. 2A demonstra que as atividades gelatinolíticas presentes no meio de cultura das células HT-29 foram inibidas pelos extratos fenólicos do dióspiro, mas que a suas atividades não foram fortemente reduzidas, já que mesmo nas mais altas concentrações fenólicas as inibições foram inferiores a 50%. Dado que o ensaio DQ-gelatina forneceu evidência de atividade gelatinolítica total no meio extracelular, também analisámos a atividade individual de ambas as gelatinases através da zimografia. A Fig. 3. 2B demonstra um exemplo de um perfil zimográfico do meio HT-29 após exposição à maior concentração de extratos fenólicos de dióspiro (2000µg/mL). Para ambas as gelatinases MMP-9 e MMP-2, nenhuma inibição visível foi

observada, quando comparada aos controles, corroborando os resultados obtidos na Fig. 3. 2A e sugerindo que, embora os extratos fenólicos de dióspiro inibissem fortemente a invasão celular, o(s) mecanismo(s) responsável(is) deve(m) envolver processos metabólicos que não sejam/além da inibição da atividade gelatinolítica.



**Figura 3. 2 - Efeito da administração de extrato fenólico de dióspiro nas atividades das gelatinases MMP-2 e MMP-9 do meio extracelular das células HT-29. (A) Atividade proteolítica das gelatinases presentes no meio extracelular das células HT-29 após uma exposição de 48h a 250, 500, 1000 e 2000µg de compostos fenólicos/mL do extrato de dióspiro, conforme quantificado pelo método DQ fluorogénico. Os resultados são expressos como fluorescência relativa, como % dos controles e representam a média de pelo menos três réplicas diferentes (n = 3) ± D.P. \*P <0,05. (B) Imagem representativa dos perfis zimográficos das atividades da MMP-9 e MMP-2 do meio extracelular das HT-29 após uma exposição de 48h à maior concentração fenólica de dióspiro (2000µg/mL). C = controlos e ED = extrato fenólico de dióspiro.**

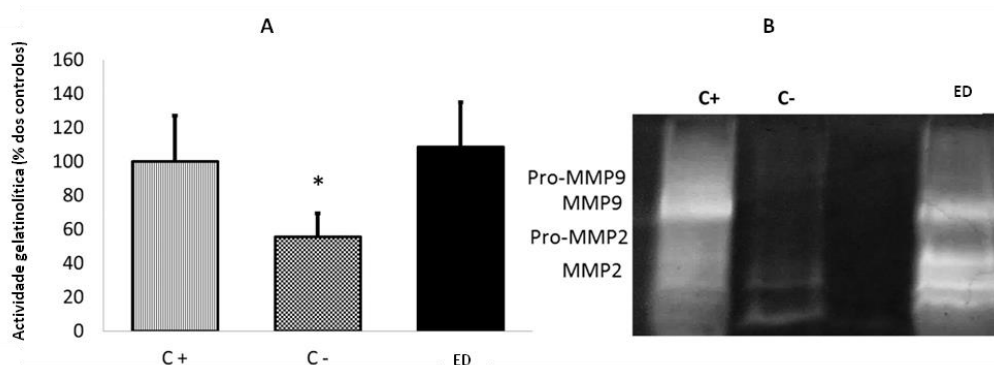
O efeito dos extratos fenólicos de dióspiro foi ainda analisado quanto à sua efetividade na redução da proliferação de células cancerígenas. As concentrações mínimas de inibição (MIC) foram avaliadas tanto para o crescimento celular como para a atividade gelatinolítica (Tabela 3. 1). As determinações das MIC mostram que a atividade gelatinolítica é inibida apenas em concentrações superiores a 2000µg/mL, o que está de acordo com os resultados apresentados nas Fig. 3. 1 e Fig. 3. 2, mas o crescimento celular foi prejudicado em uma concentração muito menor que 5,2µg/mL.

**Tabela 3. 1 - Concentrações mínimas inibitórias contra o crescimento das células HT-29 e a atividade da gelatinolítica.**

	MIC (µg de compostos fenólicos totais.mL <sup>-1</sup> )
Crescimento das células HT-29	5,2
Atividade da gelatinolítica no meio extracelular	2670

Legenda: Os valores estão em µg de compostos fenólicos totais/mL.

Após a exposição das células HT-29 ao extrato fenólico de dióspiro, os cólons do modelo *in vivo* de colite, também foram avaliados quanto à sua atividade gelatinolítica, tanto com o ensaio DQ-gelatina quanto com a zimografia do substrato (Fig. 3. 3).



**Figura 3. 3 - Efeito da administração de extrato fenólico de dióspiro nas atividades das gelatinases, MMP-2 e MMP-9, do tecido do cólon dos ratinhos do modelo experimental de colite. (A) Atividade proteolítica das gelatinases presentes em cólons, quantificada pelo método fluorogénico DQ. Os resultados são expressos em percentagem, como fluorescência relativa em relação aos controlos e representam a média de pelo menos três réplicas diferentes ( $n = 3$ )  $\pm$  D.P. \*P <0,05. (B) Imagem representativa dos perfis zimográficos das atividades da MMP-9 e da MMP-2 dos mesmos cólons. Os extratos de proteína do cólon foram carregados em géis de poliacrilamida de 12,5% (m/v) com 1% (m/v) gelatina.**

**C + = grupo TNBS; C- = grupo controlo negativo e ED = cólon de animais tratados com o extrato fenólico de dióspiro.**

Da mesma forma que ocorreu nas células HT-29, a exposição de murganhos induzidos com colite experimentalmente a extratos fenólicos de dióspiro não reduziu a atividade de ambas as gelatinases (Fig. 3. 3A). Como esperado, os controlos negativos (C- na Fig. 3. 3B) mostram uma baixa atividade tanto para MMP-2 quanto para MMP-9, enquanto no tecido com colite induzida (C + na Fig. 3. 3B) existe uma atividade muito maior de ambas as gelatinases. Comparando esses resultados com os tratados com o extrato de dióspiro (ED na Fig. 3. 3B), é claro que a atividade das MMP's na presença destes compostos fenólicos é semelhante aos controlos positivos, sugerindo que os extratos fenólicos de dióspiro não inibiram efetivamente as atividades das MMP-9 ou MMP-2.

Neste trabalho, testámos o potencial anti-proliferativo do extrato fenólico de dióspiro em modelos de células de cancro de cólon. Extratos fenólicos ou fenóis isolados de diferentes géneros alimentícios vegetais já foram estudados em várias linhas celulares de cancro (Wahle et al. 2010). Verificou-se que os compostos fenólicos naturais suprimem a migração celular maligna, invasão e metastização *in vitro* e *in vivo* (Kampa et al. 2002; Kampa et al. 2004; Ogasawara et al. 2007; Chen et al. 2014; Ademosun et al. 2016). Estudos *in vitro* apresentados no nosso trabalho também

mostraram que o extrato fenólico de dióspiro comprometeu com sucesso a proliferação celular e invasão em células do carcinoma do cólon humano (HT-29), sugerindo que os compostos fenólicos do dióspiro podem exercer um efeito semelhante e podem ser utilizados em dietas preventivas ou curativas. Os efeitos inibitórios foram considerados dependentes da dose, com maiores níveis de inibição obtidos para maiores concentrações fenólicas.

Um ponto comum entre os estados inflamatórios no desenvolvimento de DII e CCR é o envolvimento de um grupo de metaloproteínases de matriz (MMPs), uma família de endopeptidases dependentes de zinco envolvidas na remodelação do tecido conjuntivo (Herszenyi et al. 2012; Lee et al. 2013). Dois membros da família MMP, as gelatinases MMP-9 e MMP-2, foram há muito reconhecidos como desempenhando papéis importantes no turnover e na degradação das proteínas da matriz extracelular durante o recrutamento celular na inflamação (Gu et al. 2008), bem como em outros importantes processos oncológicos associados a patologias, como tumorigênese, adesão celular e metástase (Baugh et al. 1999; Garg et al. 2009). Por exemplo, o efeito de inibição exibido por compostos fenólicos na invasão de células cancerígenas mostrou-se relacionado com a sua capacidade de regular a MMP-2 e a MMP-9, bem como o ativador da urocinase plasminogénio (uPA) e a expressão do recetor do uPA (uPAR) (Kim et al. 2006).

Sob este contexto, na última década, os metabolitos bioativos de plantas que visam e inibem as atividades das MMPs, como os compostos fenólicos, tornaram-se um alvo terapêutico desejável na DII e CCR tanto em abordagens preventivas quanto curativas (Kuppusamy et al. 2014). Embora o objetivo de ter as MMPs como alvo se tenha mostrado difícil (Coussens et al. 2002), poderia ser alcançado, pelo menos em parte, através da ingestão prolongada de inibidores naturais de MMP específicos dos alimentos que estão disponíveis no cólon, ao invés de biodisponíveis no soro.

Embora muitos estudos mostrem o efeito antioxidante do dióspiro, muito poucos se concentram em atividades específicas de inibição das MMPs. No nosso trabalho, foram realizados ensaios gelatinolíticos para determinar se os extratos fenólicos do dióspiro poderiam inibir a MMP-9 e -2 e se isso poderia ser relacionado com os resultados anteriores obtidos nos modelos *in vivo* e *in vitro*. Na verdade, os nossos resultados mostram que os extratos fenólicos do dióspiro podem inibir a atividade gelatinolítica, mas apenas para as maiores concentrações fenólicas testadas. Além disso, embora houvesse redução das atividades de MMP-9 e -2 em cultura de células HT-29, isso não acontecia no tecido de cólon fresco do estudo de colite *in vivo*. Isto pode resultar em parte do modelo de animal de colite, onde as concentrações de fenólicos utilizados foram muito mais reduzidas que as necessárias para inibir a MMP-9, como observado nas MICs encontradas neste trabalho (Tabela 3. 1).

Mas o que é de realçar é que estes resultados sugerem que, embora o extrato fenólico do dióspiro possa inibir as atividades de MMPs, esta inibição é fortemente dependente da dose e certamente não será a única responsável pelas bioatividades observadas. A enorme diferença entre os valores de MIC obtidos para o crescimento de células HT-29 e para as atividades das gelatinases em cultura de células HT-29 (Tabela 3. 1) corroboram ainda mais esta hipótese.

Em suma, os resultados mostram que o extrato de dióspiro tem um potencial efeito anti-proliferativo e anti-invasivo em cultura de células do cancro do cólon e também indicam alguns dados sobre o seu possível mecanismo de ação. Tendo em conta os resultados globais, particularmente a diminuição observada na expressão de COX-2 e iNOS observada nos modelos de colite, os dados da literatura apresentam evidências suficientes que sugerem que a bioatividade do dióspiro pode ser multifacetada e envolve vários mecanismos. Por exemplo, Kim *et al.* (Kim et al. 2013) estudaram o efeito de um extrato aquoso de dióspiro sobre inflamação alérgica mediada por mastócitos, para determinar seus possíveis mecanismos de ação usando modelos *in vitro* e *in vivo*, e demonstraram que o extrato foi capaz de diminuir a expressão génica e a secreção das citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , inibindo o factor nuclear  $\kappa$ B, um mediador intracelular crítico da cascata inflamatória (D'Acquisto et al. 2002).

A fisetina, um flavonóide que está abundantemente presente em muitos vegetais e frutas, incluindo dióspiros, também mostrou reduzir a gravidade da colite e aliviar os sinais macroscópicos e microscópicos da doença, reduzindo a expressão de COX-2 e iNOS no tecido do cólon em colite induzida experimentalmente (Sahu et al. 2016), à semelhança dos nossos resultados. Nesse artigo, os autores sugeriram que a fisetina exercia essa atividade anti-inflamatória através da inibição da sinalização via Akt, p38 MAPK e NF- $\kappa$ B, nos tecidos do cólon (Sahu et al. 2016). Resultados anteriores do nosso laboratório também mostraram que a fisetina não tem efeito sobre a atividade da MMP-9 (dados não mostrados).

Além disso, já foi descrito que a miricetina, um flavonóide natural nas espécies de dióspiros, mostrava atividade anti-inflamatória *in vitro*, reduzindo a produção de mediadores inflamatórios e a expressão de COX-2 e iNOS em macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS (Zhao et al. 2013).

Curiosamente, até mesmo a expressão de MMP pode ser regulada e induzida por meio da ativação da via NF- $\kappa$ B (Yan et al. 2007), sugerindo que a via NF- $\kappa$ B é um alvo possível para os efeitos benéficos do extrato fenólico de dióspiro, evidenciado nestas experiências.

Em geral, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o extrato fenólico de dióspiro pode atuar através de múltiplos mecanismos e/ou atuar num mediador a



montante de processos inflamatórios que diminui a expressão de COX-2 e iNOS (Yokozawa et al. 2007; Sun et al. 2014).

Em conclusão, dado o papel dos processos inflamatórios na progressão do cancro colorretal e a ligação importante entre inflamação e cancro, os nossos resultados evidenciam o grande potencial dos fenóis do dióspiro como ferramenta co-adjuvante no tratamento farmacológico de doentes com DII e também para prevenção de CCR. Se tivermos em conta a quantidade de dióspiro fresco requerido para o efeito anti-inflamatório e anti-invasão observado neste trabalho, um a dois diósperos por dia, fica claro que mesmo a própria fruta exibe um bom potencial em dietas preventivas ou na forma de suplementos alimentares.

## CAPÍTULO IV

---

### Desenvolvimento de uma formulação do extrato para administração oral

---

## **CAPÍTULO IV. DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO DO EXTRATO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL**

### **1. INTRODUÇÃO**

As plantas medicinais, vegetais, leguminosas e frutos são uma fonte interessante de produtos naturais bioativos com potenciais aplicações farmacêuticas, como suplementos alimentares e como parte de uma alimentação saudável na prevenção de doenças como DCV, cancro e diabetes tipo 2 (Figueira 2010; Pinto et al. 2010; Matias et al. 2015). Estudos epidemiológicos têm consistentemente mostrado que uma dieta rica em frutos e vegetais, bem como em grãos inteiros de leguminosas está fortemente associada à redução do risco de desenvolvimento destas doenças crónicas (Willett 1994; Temple 2000; Willett 2002; Liu 2004; Lima et al. 2016).

As propriedades terapêuticas atribuídas aos suplementos alimentares são vastas. Muitos destes têm atividade antioxidante marcada, sendo utilizados devido a esta propriedade. Outros são maioritariamente agentes inibitórios ou estimulantes do metabolismo enzimático e interferem no mecanismo de reparação do DNA (Figueira 2010; Pinto et al. 2010; Matias et al. 2015).

Mas, foi precisamente em 1989 que se introduziu pela primeira vez o conceito de alimentos funcionais. Este termo, inventado no Japão, abordava os objetivos do programa *FOSHU* (que significa alimentação para uso específico da saúde). Estes alimentos funcionais contêm uma ou mais substâncias fisiologicamente ativas que, em quantidades suficientes e adequadas, promovem a saúde e o bem-estar e podem ser associadas à redução de fatores de risco do desenvolvimento de certas doenças crónicas. Para ser classificado alimento funcional significa não ser suficiente um alimento conter determinadas substâncias com propriedades fisiológicas, para que ele seja imediatamente classificado como funcional (Figueira 2010; Pinto et al. 2010; Matias et al. 2015), pois depende das quantidades em que os compostos com atividade estão presentes. Evidentemente, se para se fazer sentir o efeito tiverem de ser consumidas porções exageradas do alimento, o conceito deixa de fazer sentido.

Assim, extrair os compostos com atividade e dar-lhe uma fórmula farmacêutica (suplemento alimentar) em que as doses são bem definidas e em que há um controlo de qualidade que garanta a segurança será, nalguns casos, a solução ideal.

O uso de suplementos dietéticos e alimentos funcionais está a aumentar à medida que a indústria responde às exigências dos consumidores. No entanto, para garantir sua eficácia e segurança são necessárias mais informações sobre os benefícios para a saúde e os possíveis riscos da dieta suplementada. Está descrito na literatura que os extratos fitoquímicos de frutas e vegetais têm uma forte atividade antioxidante e antiproliferativa, e a maior parte da atividade antioxidante total é devida à

combinação de fitoquímicos (Somani et al. 2015; Serra et al. 2018). Os efeitos aditivos e sinérgicos dos fitoquímicos em frutas e legumes são responsáveis pelas suas potentes atividades antioxidantes e anticancerígenas (Liu 2004; Freag et al. 2018).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo incide na preparação de fitossomas contendo um extrato bioativo de *Diospyros kaki* L. e o estudo comparativo da atividade biológica destes nanossistemas contendo os compostos fenólicos do extrato e extrato não encapsulado.

Neste capítulo pretende-se preparar uma formulação do extrato numa forma farmacêutica oral que reúna as condições de qualidade para garantir ou mesmo melhorar a bioatividade detetada para o extrato. Assim, foram efetuadas as seguintes tarefas:

- I. Preparou-se um extrato vegetal com atividade antioxidante e teor conhecido em compostos fenólicos;
- II. Preparou-se o complexo fitossoma;
- III. Os fitossomas foram caracterizados física e morfológicamente;
- IV. Determinou-se a eficiência de encapsulação (EE) por diferentes metodologias de determinação de compostos fenólicos totais e também relativamente a cada composto detetado;
- V. A avaliação da atividade antioxidante e o conteúdo em compostos fenólicos foi realizada ao longo do tempo tanto na formulação, como no extrato não encapsulado.

## 3. MATERIAIS

### 3.1 Materiais

Fosfatidilcolina (48% purificada a partir da lecitina de soja), 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), reagente *Folin & Ciocalteu's phenol* e Quercetina 3- $\beta$ -glucoside ( $\geq 90\%$  pureza) foram adquiridos à Sigma-Aldrich, Co (St. Louis, MO, EUA). O ácido acético foi adquirido à Panreac (Barcelona, Espanha). O carbonato de sódio anidro foi adquirido à VWR® Prolabo®, VWR International (Cidade, País). O ácido gálgico (98%) foi adquirido à Merck (Darmstadt, Alemanha). O metanol (99.9%) foi adquirido à Carlo Erba Reagents (Rodano, Itália). A água Milli-Q® (18.2 M $\Omega$  cm) foi adquirida à Millipore –

Direct Q3 UV System (Molsheim, França). Os solventes de cromatografia foram todos de grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha) e os restantes reagentes foram de grau analítico e adquiridos à Sigma-Aldrich, Co (St. Louis, MO, EUA). O filtro de porosidade 0,22  $\mu\text{m}$  foi adquirido à VWR® (Lisboa). Óleo alimentar de girassol e milho refinados foram adquiridos numa grande superfície (marca Continente ISO 9001).

## **4. MÉTODOS**

### **4.1 Preparação dos fitossomas**

Os fitossomas foram preparados por adição do extrato à fosfatidilcolina dissolvida em 20mL de etanol (1:1 ou 1:2, relação molar). Esta mistura foi aquecida a 25°C com uma rotação de 300 rpm (HTS 1003, LMS, Tokyo, Japão) durante 2 horas. Em seguida, adicionaram-se 40mL de uma solução de ácido acético a 2% e a mistura ficou durante 24 horas na mesma condição anteriormente descrita. A metodologia de formulação foi baseada em trabalhos anteriores de Matias *et al.* 2015 (Matias et al. 2015).

#### **4.1.1 Caracterização física e morfológica dos fitossomas**

Os fitossomas foram diluídos com água destilada e analisados num Delsa Nano C (Coulter, CA, EUA). O tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão (PI), o potencial Zeta ( $\zeta\text{P}$ ) foram avaliados neste equipamento à temperatura ambiente com um ângulo de 165° para o tamanho e de 30° para o potencial zeta. A morfologia foi avaliada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM, 5200LV, JEOL, Tóquio, Japão) a 20Kv após secagem e revestimento de ouro (500 nm) das amostras da formulação 1:1 e 1:2 aos 0, 3 e 6 meses.

#### **4.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação (EE)**

A eficiência de encapsulação (EE, %) do extrato nos fitossomas foi determinada pela avaliação da fração do extrato não-encapsulado (Rasaie et al. 2014; Rijo et al. 2014). Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e analisado em HPLC-DAD. Resumidamente, uma alíquota de 2mL da formulação fitossomal foi adicionada a 2mL de óleo de girassol e milho comercial e homogeneizada por agitação. Em seguida, esta suspensão foi centrifugada a 15000 x *g* (centrífuga Eppendorf 5804 R, Hamburg, Alemanha) durante 30 minutos a 4°C. A fase inferior foi separada e filtrada com filtro de 0,22 $\mu\text{m}$  e injetada para análise cromatográfica por HPLC. Foi preparado um branco segundo o mesmo procedimento.

Posteriormente utilizou-se um sistema de HPLC com cromatógrafo líquido de alta pressão (Spectra System, San Jose, EUA) equipado com uma bomba binária de gradiente (Spectra System P2000, San Jose, EUA), amostrador automático (Spectra

System AS1000, San Jose, EUA), detetor de díodos (Spectra System UV6000LP, San Jose, EUA) e controlador UV (Spectra System SN4000, San Jose, EUA). A separação cromatográfica realizou-se numa coluna C18 de fase reversa (Thermo Scientific), com diâmetro de partícula de 5µm e comprimento de 15cm, com varrimento entre 190 e 700nm, com um intervalo de 1nm e também aos comprimentos de onda específicos, 280 e 360nm. O volume de injeção foi de 20µL. Para a separação cromatográfica, a fase móvel foi bombeada a um fluxo de 0,7mL min<sup>-1</sup> e consistia em água Milli-Q®-ácido fosfórico (99,9: 0,1, v/v) (eluente A) e água Milli-Q®-acetonitrilo-ácido fosfórico (59,9: 40,0: 0,1, v/v/v), (eluente B). O gradiente foi de 0-15 minutos de 0% a 20% de eluente B; 10min com 20% de eluente B; 25-70min, de 20% a 70% de eluente B; 70-75min, com 70% de eluente B; 75-85min de 70% a 100% de eluente B; 85-110min, com 100% de eluente B; 111-120min 100% do eluente A. A aquisição de cromatogramas e espectros de UV-Vis foi realizada recorrendo ao *software*Xcalibur™ 2.0.6 (Thermo Fisher Scientific Corporation).

A análise foi feita para o extrato (correspondendo ao extrato adicionado à formulação) e para o sobrenadante (correspondente aos compostos fenólicos não encapsulados) da preparação fitossomal. A EE do extrato nos fitossomas foi determinada com base a área total do cromatograma gerado entre os 0 e 60 minutos a 280nm e 360nm, para o extrato e para o sobrenadante. Donde, o extrato encapsulado foi calculado pela diferença entre a área total de extrato e a área total do cromatograma do sobrenadante (Abd El-Fattah et al. 2017). Aplicando a equação (Equação 2), a EE (%) do extrato nos fitossomas foi determinada a 280 e 360nm. A EE foi ainda calculada para compostos individuais detetados por HPLC, que estavam presentes no sobrenadante. Tendo-se baseado na área do pico do composto no cromatograma do extrato, à qual se subtraiu a área do pico correspondente ao mesmo composto no sobrenadante, calculando-se o extrato encapsulado. E aplicando-se a equação anterior (Equação 2), a EE por composto fenólico, a cada um dos comprimentos de onda testado por HPLC foi determinada.

## Equação 2

$$EE \% = \frac{A (\text{extrato inicial}) - A (\text{extrato no sobrenadante})}{A (\text{extrato inicial})} \times 100$$

A EE foi ainda estimada utilizando os dados da quantificação espectrométrica (765nm), por meio da técnica de *Folin-Ciocalteu*. A diferença entre o teor de compostos fenólicos totais no extrato inicial e o teor de compostos fenólicos totais presentes no sobrenadante, determina o teor de extrato encapsulado. A eficiência de

encapsulação (EE, %) do extrato nos fitossomas foi calculada aplicando a equação (Equação 2).

### **4.3 Ensaio de estabilidade**

Os estudos de estabilidade em produtos farmacêuticos permitem evidenciar de que forma a qualidade do produto se mantém ao longo do tempo, sob a influência de diferentes fatores ambientais tais como a temperatura, a humidade e a exposição à luz, estabelecendo, por exemplo, as condições de armazenamento adequadas (Medicines 2004; Organization 2009).

#### **4.3.1 Condições de Armazenamento (curto prazo, longo prazo e acelerado)**

Em geral, as condições de armazenamento (com tolerâncias apropriadas) devem ser estabelecidas e, se aplicável, avaliando a sua sensibilidade à humidade ou potencial perda devido ao solvente. As condições de armazenamento e a duração dos estudos escolhidos devem ser suficientes para cobrir o armazenamento, transporte e utilização subsequente (Medicines 2004).

##### **4.3.1.1 Condições de armazenamento**

Num estudo de longo prazo, para um produto final, o período de tempo mínimo deve ser de 12 meses, onde as condições de armazenamento geralmente são  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\%$  humidade (RH)  $\pm 5\%$  ou  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\%$  RH  $\pm 5\%$  de HR (Organization 2009). Num estudo intermediário, o período de tempo mínimo é de 6 meses e as condições de armazenamento geralmente são  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\%$  RH  $\pm 5\%$  RH (Medicines 2004; Organization 2009).

As condições de armazenamento acelerado do estudo são de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\%$  RH  $\pm 5\%$  RH;  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\%$  RH  $\pm 5\%$  RH e  $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}/55\%$  RH  $\pm 5\%$  RH, num período de tempo de 6 meses.

Na condição de armazenamento acelerado é recomendado um mínimo de três pontos de tempo, incluindo os pontos de tempo inicial e final (por exemplo, 0,3 e 6 meses), de um estudo de 6 meses (Medicines 2004; Organization 2009).

#### **4.3.2 Especificações**

Os estudos de estabilidade devem incluir testes a compostos bioativos que são suscetíveis a alterações durante o armazenamento e tendem a influenciar qualidade,

segurança e/ou eficácia. O teste deve cobrir as propriedades físicas, químicas, biológicas e microbiológicas (Medicines 2004; Organization 2009).

#### **4.3.3 Sistema de acondicionamento**

O extrato não encapsulado ou após encapsulação nos fitossomas foram armazenados em vidros âmbar tipo II. Os estudos de estabilidade foram conduzidos armazenando o extrato polifenólico concentrado em diferentes condições. Duas formulações (1:1 e 1:2, relação molar), com 30mL cada, ficaram armazenadas durante 6 meses, em frascos de vidro de cor âmbar e ao abrigo da luz à temperatura ambiente (25°C) e 60% RH, no frigorífico a 4°C a 55% RH e a 40°C na estufa (Vötsch Industrietechnik, VC2033 mit TC-Steuerung) com 75% de RH. Em cada frasco foram colocadas seis alíquotas de 7mL do extrato concentrado sob as mesmas condições, bem como as soluções de padrão quercetina (10mL).

#### **4.3.4 Frequência dos testes**

Na condição de estabilidade acelerada foi realizado um mínimo de três pontos de tempo, incluindo os pontos de tempo inicial e final (por exemplo, 0, 3 e 6 meses) (Medicines 2004; Organization 2009), com 6 frascos de vidro de cor âmbar com extrato de dióspiro concentrado, dois frascos com fitossomas (1:1 e 1:2) e solução de quercetina como controlo positivo. Em períodos de tempo definidos foi determinada a atividade antioxidante, através do método 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e o teor de fenóis totais pelo método de *Folin-Ciocalteu*.

#### **4.4 Análise por *High-performance liquid chromatography* (HPLC)**

Uma alíquota do extrato concentrado foi diluída em água Milli-Q para uma concentração igual à utilizada na formulação (1:7) e foi analisada usando o método e condições de análise descritas acima, sendo identificados os componentes maioritários do extrato com base no tempo de retenção ( $t_R$ ), comprimentos de onda, cromatogramas de padrões puros, sempre que disponíveis e por comparação com os prévios resultados descritos no Capítulo I e ainda por recurso à literatura.

Por comparação e sobreposição dos cromatogramas obtidos com o extrato, comprimentos de onda e  $t_R$ , foram identificados os compostos presentes no sobrenadante da formulação.

#### **4.5 Determinação do teor em compostos fenólicos totais**

A quantificação do conteúdo polifenólico total foi estimada pelo método de *Folin-Ciocalteu* com algumas modificações (Stamatakis et al. 2009). Uma alíquota da amostra (100 $\mu$ L) foi adicionada a 200 $\mu$ L do reagente de *Folin-Ciocalteu* (diluído em



água 1:10). Após 3 min foram adicionados 1mL de carbonato de sódio (15%, p/v) e 2mL de água. Após 1h de incubação à temperatura ambiente, a absorvância foi medida num espectrofotómetro UV-Visível a 765nm. Como branco foi preparada uma mistura de água e restantes reagentes na mesma proporção da amostra teste. Foi construída uma curva de calibração do ácido gálico numa faixa de concentração de 2 e 500mg/L. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (mg EAG) por 100g de fruto fresco e por mililitro de extrato. As análises foram feitas em triplicado (n = 3; média ± DP).

#### 4.6 Determinação da atividade antioxidante

O potencial de eliminação de radicais livres pelo extrato e pela formulação fitossomal (1:1 e 1:2) foi determinado de acordo com o procedimento previamente descrito na literatura (Sucupira et al. 2012). Resumidamente, alíquotas de 10µL de cada amostra foram misturadas com 990 µL de solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (0,002% em etanol 70%). A mistura reacional foi incubada a temperatura ambiente durante 30 min ao abrigo da luz. O controlo positivo foi quercetina a 10 mg.mL<sup>-1</sup> em água. Como controlo de absorvância (i.e. a 100%), preparou-se uma amostra contendo 10µL de água e 990µL de DPPH. O potencial de eliminação de radicais livres das amostras de extrato de dióspiro e de fitossomas (razão molar 1:1 e 1:2) foi expresso através da avaliação da absorvância medida a 517nm contra um branco de etanol 70% usando um espectrofotómetro UV-Visível (Hitachi L-2000 da Hitachi High Technology, Tokyo, Japão). Cada amostra foi testada em triplicado. A capacidade de sequestro do DPPH foi calculada utilizando a seguinte fórmula (Equação 3):

#### Equação 3

$$\text{Actividade de sequestro (\%)} = \frac{\text{Absorvância controlo} - \text{Absorvância amostra}}{\text{Absorvância controlo}} \times 100$$

#### 4.7 Avaliação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta ao longo do tempo

Os parâmetros de caracterização da formulação fitossomal foram determinados por DLS ao longo de 0, 3 e 6 meses de armazenamento.

#### 4.8 Análise estatística

A análise estatística dos resultados compreendeu, quando aplicável: (i) a determinação da média e do desvio-padrão; (ii) a comparação de valores médios entre grupos através da análise de variância ANOVA, seguida do teste de comparação

múltipla de Tukey's ou Sidak's. Em todos os casos, os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização física e morfológica dos fitossomas

Os parâmetros de caracterização da formulação fitossomal por *Dynamic Laser Scattering* (DLS) encontram-se descritos na Tabela 4. 1. Os fitossomas revelaram-se monodispersos com um tamanho inferior a 300nm ( $PI < 0,3$ ) independentemente da temperatura de armazenamento para a formulação 1:1, exceto para a formulação 1:2 a 25° e 4°C (Fig. 4. 1 e Fig. 4. 2). O valor do potencial zeta desses fitossomas foi negativo (Tabela 4. 1). O potencial zeta situou-se entre -41,74 e -27,62mV.

**Tabela 4. 1 - Caracterização do tamanho médio (nm), distribuição de tamanhos (PI) e potencial zeta (mV) dos fitossomas preparados a 1:1 e 1:2 (razão molar, fosfatidilcolina:extracto).**

		Fitossomas 1:1			Fitossomas 1:2		
		4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
0 meses	Tamanho médio ± D.P. (nm)	134,8 ± 36,0	177,1 ± 70,0	236,6 ± 65,6	92,8 ± 26,6	193,3 ± 92,2	153,7 ± 42,3
	PI	0,184	0,184	0,236	0,347	0,347	0,288
	Zeta (mV)	-41,74 ± 0,02	-40,15 ± 0,03	-27,62 ± 0,01	-41,07 ± 0,01	-41,31 ± 0,02	-27,62 ± 0,01
3 meses	Tamanho médio ± D.P. (nm)	134,8 ± 36,0	177,1 ± 70,0	324,0 ± 146,2	92,8 ± 26,6	193,3 ± 92,2	226,6 ± 150,8
	PI	0,184	0,184	0,236	0,347	0,347	0,288
	Zeta (mV)	-41,74 ± 0,01	-40,15 ± 0,01	-27,62 ± 0,01	-40,15 ± 0,01	-41,31 ± 0,01	-30,19 ± 0,03
6 meses	Tamanho médio ± D.P. (nm)	165,2 ± 57,6	174,4 ± 82,8	161,1 ± 62,5	228,0 ± 37,4	241,1 ± 129,4	183,5 ± 126,9
	PI	0,103	0,220	0,141 0,210	0,197	0,233	0,300
	Zeta (mV)	-20,07 ± 0,01	-22,10 ± 0,02	-21,03 ± 0,01	-20,07 ± 0,01	-21,03 ± 0,01	-20,02 ± 0,01

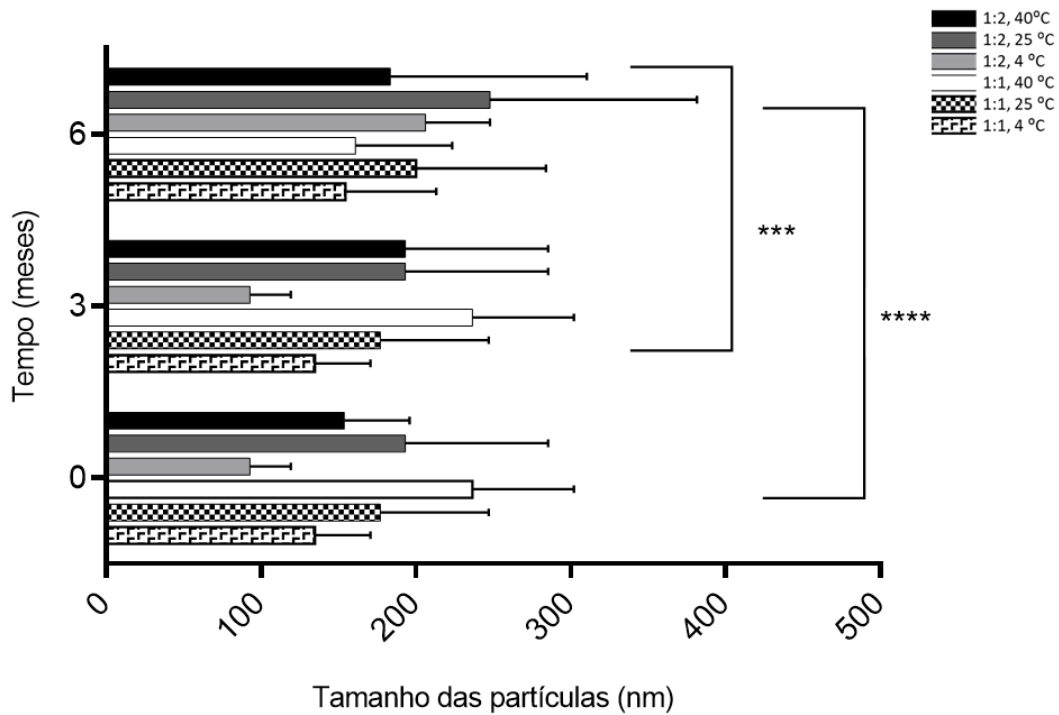


Figura 4. 1 - Influência da temperatura de armazenamento no tamanho dos fitossomas.

\*\*\*\* $p < 0,0001$  - 0 meses vs 6 meses, \*\*\* $p < 0,05$  - 3 meses vs 6 meses.

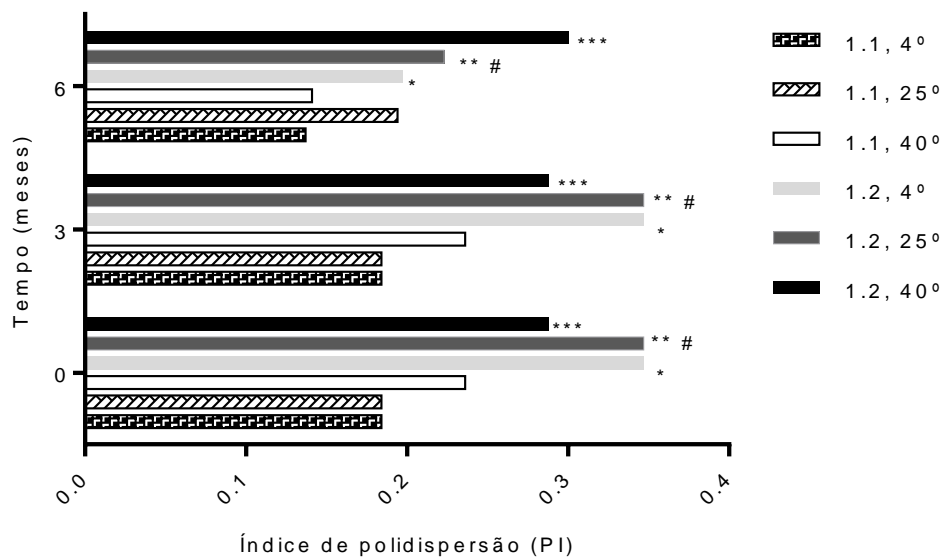


Figura 4. 2 - Influência da temperatura de armazenamento no PI dos fitossomas.

\*  $p < 0,05$  vs 1:1, 4°C; \*\*  $p < 0,05$  vs 1:1, 4°C; \*\*\*  $p < 0,05$  vs 1:1, 25°C; #  $p < 0,05$  vs 1:1, 25°C.

O tamanho dos fitossomas obtido, menor que 300nm, sugere um bom indicativo para uma boa absorção oral uma vez que está descrito que o tamanho reduzido e, conseqüentemente, a elevada área de superfície versus volume ocupado permitem estabelecer um contacto próximo com a barreira intestinal (Huang et al. 2011). Estudos publicados anteriormente demonstraram que a complexação de compostos naturais com fosfolípidos aumentou a estabilidade de uma formulação (Semalty et al. 2010; Nicolai et al. 2016). Nestes estudos, o tamanho reduzido desses nanossistemas teve um grande impacto na sua absorção oral, confirmando uma relação inversamente proporcional entre a taxa de absorção e o tamanho de partícula (Jani et al. 1990; Hussain et al. 2001). É igualmente descrito que um tamanho menor que 300nm conduziu à formação de emulsões estáveis de vitamina E (Parthasarathi et al. 2016). Porém, partículas muito pequenas poderão levantar outras questões. Por exemplo, um dado curioso relaciona-se com os tamanhos de partículas muito reduzidos. Foram preparadas nanoemulsões de licopeno com tamanhos de partículas entre 100 e 200nm e estas últimas exibiram maior atividade antioxidante do que as de 100nm provavelmente devido a reações mais rápidas com os reagentes DPPH e ABTS (Ha et al. 2015).

Além do tamanho, o valor do PI, indicativo do grau de heterogeneidade em relação ao tamanho da amostra, é outro parâmetro muito importante. A distribuição de tamanho pode ser monodispersa ou polidispersa (Koppel 1972). A monodistribuição de tamanhos dos sistemas de veiculação contribui para uma administração mais uniforme e previsível de compostos bioativos (Solans et al. 2005). Uma polidispersão inerente, dentro de qualquer lote de nanopartículas, precisa ser controlada, caso contrário lotes diferentes do mesmo nanomaterial poderão exibir resultados diferentes em estudos, por exemplo, interação com células (Verma et al. 2010). Neste nosso estudo, o PI foi inferior a 0,3 para a formulação 1:1 a qualquer temperatura e para a formulação fitossomal 1:2 a 40°C, o que demonstra a obtenção de fitossomas monodispersos nestas preparações ao longo dos seis meses do estudo. A formulação fitossomal 1:2 a 4°C e a 25°C durante os primeiros três meses obteve PI superior a 0,3.

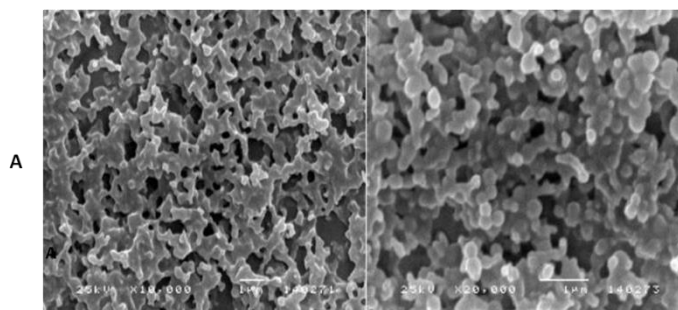
Neste caso, sabe-se que um pequeno valor de PI (<0,3) é indicativo de uma população homogênea, enquanto PI maior que 0,3 significa uma elevada heterogeneidade (Koppel 1972; Zhang et al. 2012). Este fato é crucial para prever o comportamento *in vivo* de cada formulação fitossomal (Elmowafy et al. 2016; El-Far et al. 2018).

O potencial zeta é um outro importante parâmetro físico-químico que influencia a estabilidade das nanossuspensões, podendo influenciar a estabilidade, a biodistribuição e internalização celular de bioativos (Kraft et al. 2014). Encontra-se descrito na literatura que valores de potencial zeta extremamente positivos ou negativos poderão desencadear forças repulsivas maiores, impedindo a agregação das

partículas e, portanto, garantindo uma redispersão fácil (Puttipatkhachorn et al. 2001; Patil et al. 2007). No caso de uma estabilização eletrostática e estérica combinada, um potencial zeta mínimo de  $\pm 20\text{mV}$  é desejável (Honary et al. 2013). Um alto potencial zeta (positivo ou negativo), normalmente superior a  $30\text{mV}$ , em módulo, mantém um sistema estável (Prokop et al. 2002). Além disso, o comportamento *in vivo* das formulações é condicionado por este valor. Este tópico ainda não se encontra esclarecido e não é consensual entre os investigadores destas áreas. Por exemplo, num estudo com nanopartículas carregadas negativamente, estas foram removidas mais lentamente do sangue em comparação com as nanopartículas carregadas positivamente após a administração a modelos animais e permaneceram na corrente sanguínea por mais tempo (Unger et al. 2007). Por isso, a modificação de carga de nanossistemas oferece uma oportunidade para prolongar o tempo de circulação de compostos bioativos no sangue, aumentando a possibilidade de sua interação com células-alvo de interesse e alterando as propriedades farmacêuticas de nanossistemas (Verma et al. 2010; Honary et al. 2013).

A morfologia dos fitossomas foi avaliada por SEM. A Fig. 4. 3 apresenta partículas com um tamanho na escala nanométrica, independentemente da razão molar entre a fosfatidilcolina e o extrato, confirmando, por isso, os resultados da técnica DLS. Os fitossomas preparados revelaram ser esféricos. A forma esférica é importante para ter uma área superficial elevada de contato com as células. A morfologia ideal das nanopartículas para melhor absorção oral ainda não se encontra elucidada. Sabe-se que depende da natureza dos materiais utilizados, dos métodos de preparação das nanopartículas, entre outros fatores. O efeito da forma das nanopartículas na sua internalização foi investigado em muitos artigos. Num desses artigos é descrito que partículas esféricas de tamanho similar foram internalizadas 500% mais do que partículas em forma de bastonetes (Jiang et al. 2008).

Por outro lado, avaliar a influência da forma e tamanho dos nanomateriais nas interações celulares é crucial na toxicidade (Nel et al. 2009).



**Figura 4. 3- Imagens de SEM dos fitossomas. A, esquerda: ampliação = 10.000x, barra de escala =  $1\mu\text{m}$ ; A, à direita: ampliação = 20.000x, barra de escala =  $1\mu\text{m}$ .**

## 5.2 Determinação da eficiência de encapsulação (EE)

### 5.2.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Os perfis cromatográficos obtidos por HPLC encontram-se descritos nas Fig. 4. 4 a Fig. 4. 6. Observa-se na que a EE se situou em valores próximos de 100%, quer isto dizer que o extrato foi encapsulado com sucesso nas formas fitossomais, conforme descreve a Tabela 4. 2. A Tabela 4. 2 descreve com mais detalhe a análise cromatográfica das amostras. Os fitossomas foram capazes de encapsular 97,4% do total de fenóis: 99,38% de catequina; 99,25% de ácido gálgico e 99,81% de monogalhoil-glucósido (Tabela 4. 2).

O perfil cromatográfico do sobrenadante (Fig. 4. 6) demonstrou pouca abundância de compostos fenólicos, comparado ao perfil do extrato livre, por sobreposição dos cromatogramas do extrato de dióspiro com o do sobrenadante. Utilizando o *software Xcalibur*™ 2.0.6 e a ferramenta de integração de área cromatográfica entre 0 e 60 minutos foi possível somar as áreas de todos os picos detetados a 280 e 360nm, tanto para o extrato quanto para o sobrenadante dos fitossomas (Tabela 4. 3).

**Tabela 4. 2 - Eficiência de encapsulação (EE,%) do extrato nos fitossomas.**

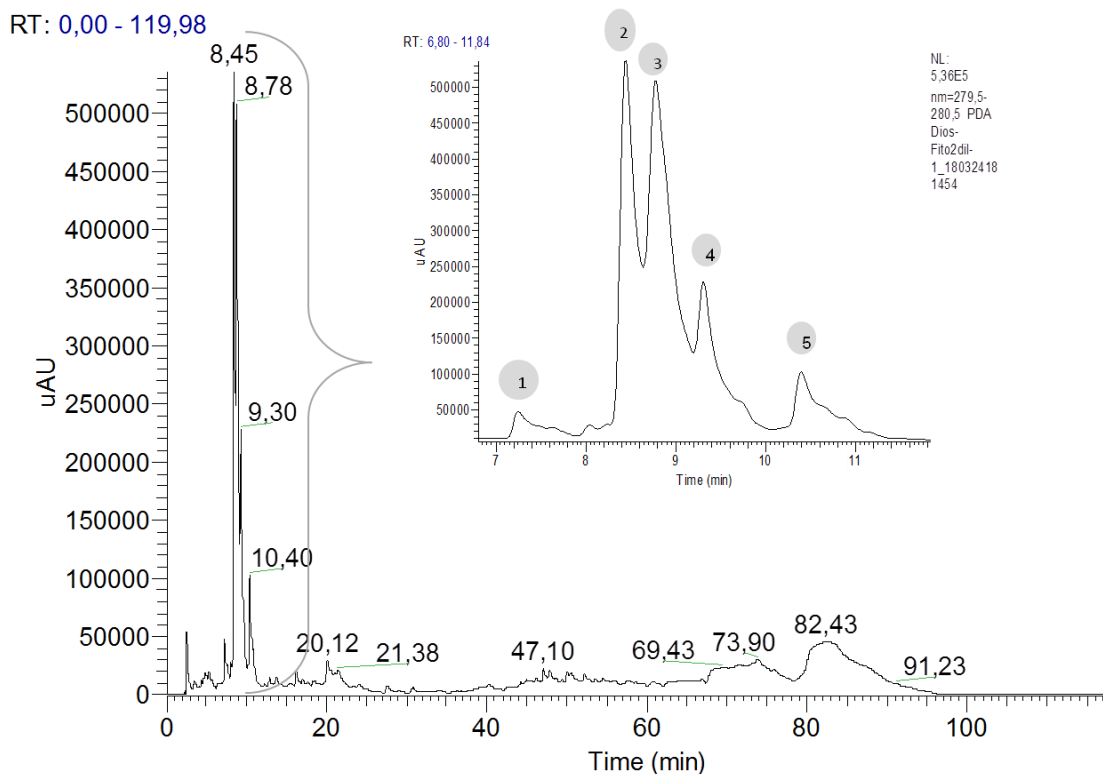
Metodologia de determinação	Compostos detetados	Eficiência de encapsulação (EE %)
HPLC (280nm)	$\Sigma$ (fenóis totais, catequinas totais; ácidos hidroxibenzóicos)	97,4
	<b>Compostos individuais:</b>	
	catequina	99,38
	ácido gálgico	99,25
	monogalhoil-glucósido	99,81
HPLC (360nm)	$\Sigma$ (flavonóides totais)	94,5
	<b>Compostos individuais:</b>	
	Flavonol ou flavona	92,61
	Quercetin trisacaride	95,17
	Flavonol glucósido	95,76
Flavonol hexósido	92,69	

**Tabela 4. 3 - Área de cada pico identificado com correspondência no sobrenadante da formulação.**

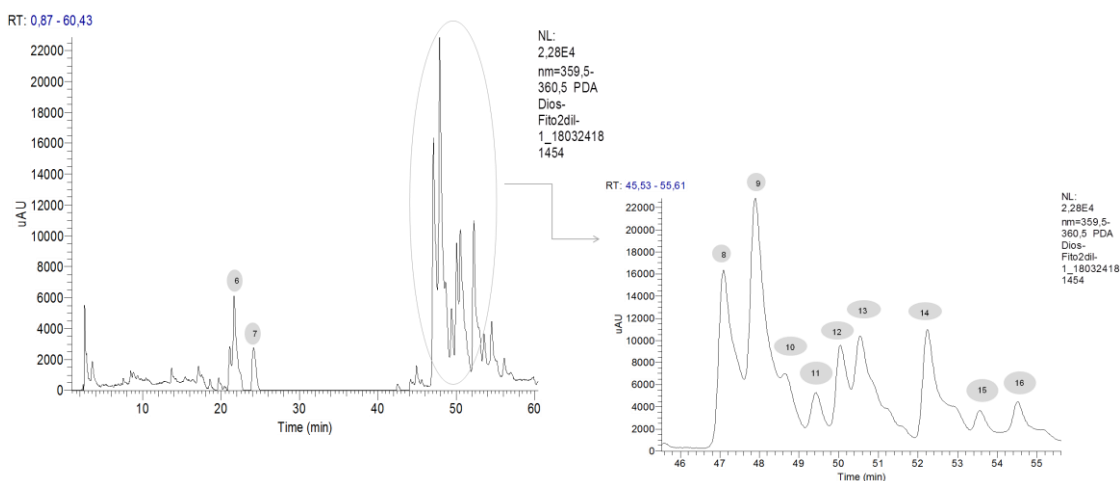
Extrato dióspiro inicial				Extrato no Sobrenadante			
HPLC (280nm)				HPLC (280nm)			
Pico t <sub>R</sub> (min)	Área	λ <sub>max</sub> (nm)	ID	Pico Rt (min)	Área	λ <sub>max</sub> (nm)	ID
7,25	937803,18	278	catequina	6,67	5819,23	278	catequina
8,78	9908293,47	272	ácido gálgico	9,12	74596,48	270	ácido gálgico
10,4	2353831,82	274	monogalhoil-glucósido	11,47	4548,86	274	monogalhoil-glucósido
HPLC (360nm)				HPLC (360nm)			
47,1	434966,39	254;357	flavonol ou flavona	48,32	32140,26	368	flavonol glucósido
47,9	674195,85	256;354	quercetin trissacarídeo	48,65	32537,30	368	flavonol hexósido
48,63	151382,89	254;359	flavonol glucósido	53,82	6415,90	368	flavonol glucósido
49,42	40327,70	262;359	flavonol hexósido	49,68	2946,24	368	flavonol hexósido

De acordo com a análise por HPLC, os compostos mais abundantes no extrato foram identificados a 280nm (Fig. 4. 4), sendo catequina e ácido gálgico a 8,45 e 8,78min, respetivamente. A avaliação em 360nm também foi realizada (Fig. 4. 5), e compostos como canferol e quercetina em formas glicosiladas foram igualmente identificados. Estas observações encontram-se de acordo com a literatura (Gu et al. 2008; Engels et al. 2012; Jimenez-Sanchez et al. 2015). Na verdade, os dióspiros são ricos em compostos fenólicos, como ácido p-cumárico e gálgico (Gorinstein et al. 1994), e são conhecidos por conter proantocianidinas (Halsam et al. 1988). Matsuo (Matsuo 1978) identificou o kaki-tanino no dióspiro japonês e descobriu que os taninos encontrados consistiam em catequina, catequina-galhato, galhocatequina e galhocatequina-galhato. Sattar, Bibi e Chaudry (1992) (Sattar et al. 1992). Catequinas (flavan-3-ols) são outros compostos fenólicos que podem oferecer benefícios potenciais à saúde humana, relacionados a várias funções fisiológicas, incluindo um papel protetor contra doenças relacionadas ao stresse oxidativo e capacidades antimutagénicas e anticarcinogénicas (Suzuki et al. 2005).

Mais, as catequinas bem como extratos de dióspiro são conhecidos ainda por induzir apoptose de células Molt 4B (Achiwa et al. 1997). Em estudos *in vitro*, a exposição a 250, 500, 1000 e 2000µg/mL de extratos fenólicos de dióspiro reduziu a capacidade de invasão de células HT-29 em feridas de forma dose-dependente. Para a maior concentração utilizada (2000µg/mL), observou-se que esta foi muito eficaz na inibição da migração celular, reduzindo-a para perto de zero (Direito et al. 2017).



**Figura 4. 4 - Perfil cromatográfico por HPLC a 280nm do extrato presente nos fitossomas. Os compostos maioritários identificados foram: 1) e 2) catequina; 3) ácido gálgico; 4) monogalhoil-hexósido; 5) monogalhoil-glucósido.**



**Figura 4. 5 - Perfil cromatográfico do extrato por HPLC a 360nm. Os principais compostos identificados foram: 6) e 7) isómeros de flavonas, isómeros metilados p.ex.; 8) flavonol ou flavona; 9) quercetina trissacarídeo; 10) flavonol glucósido; 11) flavonol hexósido; 12) quercetina-*O*-hexósido-galhatto; 13) canferol 3-*O*-glucósido; 14) canferol 3-*O*-rutinósido; 15) canferol 3-*O*-diglucósido; 16) canferol 3-*O*-hexósido.**

A capacidade anti-melanogénica das proantocianidinas, quercetina-3-*O*-glucósido e quercetina-3-*O*-galactosídeo foi verificada pela inibição da tirosinase e da

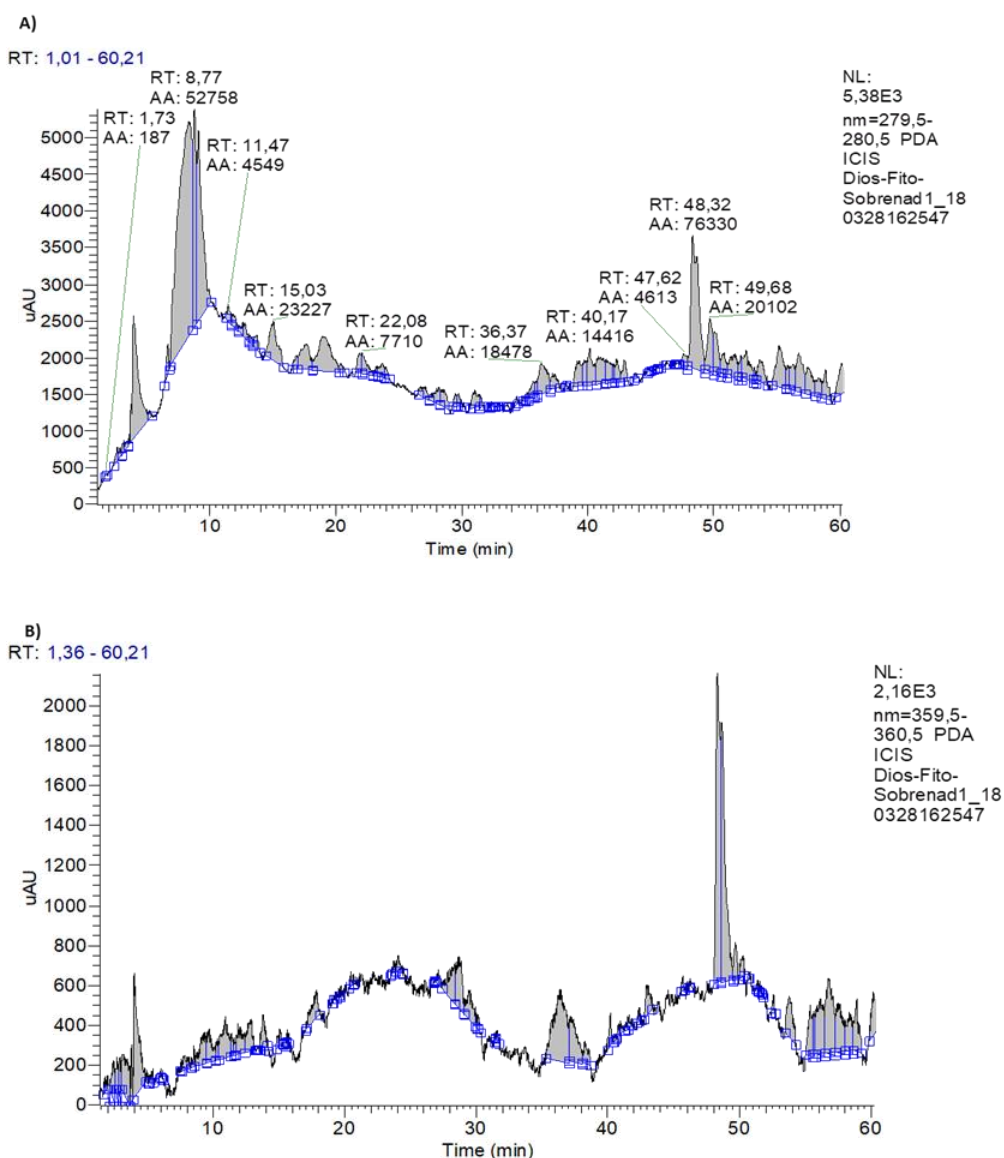


síntese de melanina. A modulação do stresse oxidativo foi observada com as proantocianidinas que têm a capacidade de modular o total de espécies reativas, a peroxidação lipídica e o balanço redox em células B16 (Kim et al. 2009; Ohguchi et al. 2010). Também Tatsuno *et al.* (2012) verificou que as proantocianidinas oligoméricas têm efeitos anti-inflamatórios e podem inibir a síntese de melanina pela atividade inibitória da tirosinase (Tatsuno et al. 2012).

Em estudos anteriores foram identificados as procianidinas e catequinas como os principais flavonóides do dióspiro (Sentandreu et al. 2015). Esta análise mostrou algumas dificuldades analíticas dada a complexidade da matriz (Giordani et al. 2011). O trabalho de Engels e colegas (2010) identificou a quercetina 3-*O*-glucopiranosídeo ou rutinosídeo, 3-*O*-glicosídeo canferol, canferídeo hexosil pentósido (Engels et al. 2012). Um outro estudo desenvolvido por Jiménez-Sánchez *et al.* (2015) identificaram a quercetina-3-*O*-glicosídeo (Jimenez-Sanchez et al. 2015). A quercetina trissacarídeo foi relatada por Choi e colaboradores (Choi et al. 2010). No estudo da estrutura das proantocianidinas no dióspiro, estes compostos foram essencialmente epigalhocatequina-3-*O*-galhato, epicatequina galhato e epicatequina (Li et al. 2010).

Quercetina, canferol, rutina, astragalina, hiperina e isoquercitrina parecem desempenhar um papel importante na melhoria do estado redox, inibindo a apoptose e aumentando a viabilidade celular sob stresse oxidativo em células NG108-15 (Bei et al. 2005). Segundo estudos anteriores, os flavonóides das folhas de diospireiro (*Diospyros kaki*) inibiram a apoptose em células MC3T3-E1 ativadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com supressão de NO, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), COX-2, melanona dialdeído (MDA), indicando que a atividade anti-apoptose foi mediada pela supressão da translocação do NF-κB/p65 para o núcleo. Por conseguinte, o efeito protetor desses flavonóides poderia então ser considerada uma abordagem promissora para o tratamento da osteoporose (Sun et al. 2014).

A abundância de compostos fenólicos no sobrenadante foi também avaliada (Fig. 4. 6A, 4. 6B).



**Figura 4. 6 - Área cromatográfica do sobrenadante a 280nm A) e a 360nm B).**

No caso da análise por HPLC recorrendo ao comprimento de onda 280 nm, o valor de EE foi de 97,4%, demonstrando claramente a elevada capacidade de encapsulação dos fitossomas pelo extrato, deixando fora dos complexos muito poucos compostos, da ordem de  $5 \times 10^3$  uAU no sobrenadante (Fig. 4.6 A) e  $5 \times 10^5$  uAU no extrato (Fig. 4. 4).

A escolha deste sistema de veiculação para a aplicação do extrato de dióspiro foi inicialmente desenhada devido a baixa biodisponibilidade oral e/ou errática dos compostos fenólicos. (Belcaro et al. 2010; Rasaie et al. 2014). A atividade medicinal destes complexos tem sido descrita em vários campos de aplicação, como a cardiovascular (Panda et al. 2009), anti-inflamatória (Bombardelli et al. 1991), hepatoprotectora (Loguercio et al. 2007; Bares et al. 2008), anticancerígena (Flaig et al.

2007) e mesmo como cosméticos (anti-envelhecimento da pele) (Bombardelli et al. 1991).

Os nossos resultados demonstraram que esta formulação fitossomal apresenta características físico-químicas adequadas que poderão conduzir a uma boa biodisponibilidade dos compostos fenólicos. Estas formulações fitossomais também mostraram ser formulações adequadas que permitem uma alta EE do conteúdo fenólico do dióspiro.

### 5.2.2 Análise espectrofotométrica

A EE do extrato pelos fitossomas foi posteriormente verificada por metodologia espectrofotométrica utilizando a técnica de determinação dos compostos fenólicos totais, *Folin-Ciocalteu*. A curva do padrão de ácido gálico entre 2 e 500mg/L, de equação  $y = 0,002x + 0,0236$  e  $R^2 = 0,9868$ , permitiu a determinação da concentração de fenóis totais no extrato concentrado, no extrato presente na formulação e no sobrenadante da formulação (Tabela 4. 4). O valor de EE aplicando a Equação 2 foi de 93,6%.

**Tabela 4. 4 - Concentração dos compostos fenólicos totais determinados pela técnica espectrofotométrica de *Folin-Ciocalteu*.**

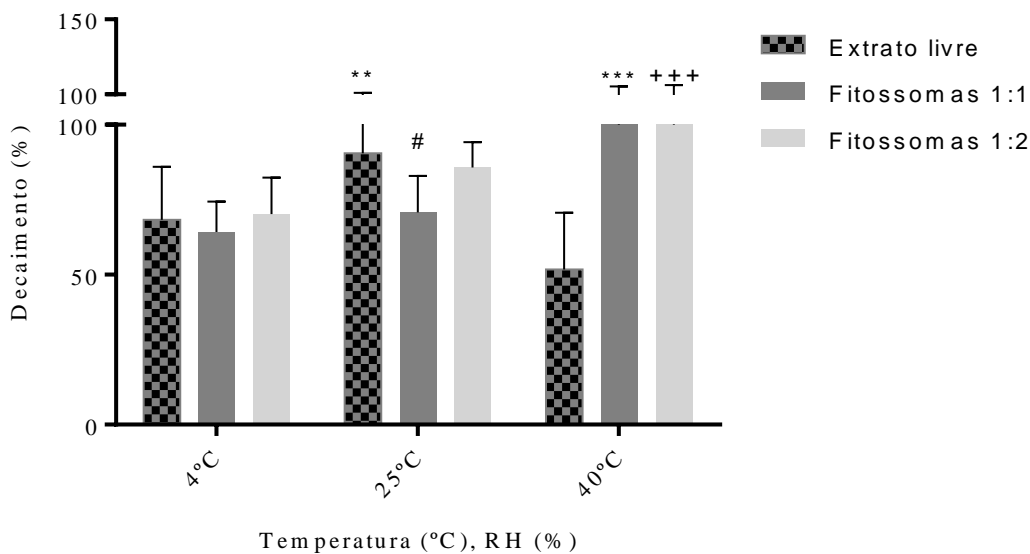
Amostras	[Compostos Fenólicos] (mg/L)
Extrato inicial	1112 ± 34,6
Extrato no Sobrenadante	70,9 ± 4,9

A ligeira diferença encontrada pela determinação espectrofotométrica de fenóis totais pela técnica de *Folin-Ciocalteu* em relação àquela determinada por HPLC deve-se provavelmente ao fato de a técnica de *Folin-Ciocalteu* ser mais inespecífica, reagindo também com compostos não fenólicos (Huang et al. 2005; de Oliveira et al. 2009; Everette et al. 2010).

### 5.3 Determinação do teor em compostos fenólicos totais

Durante o período de armazenamento, o teor em compostos fenólicos presentes em cada uma das amostras armazenadas foi doseado ao longo do tempo (0, 3 e 6 meses), em condições diferentes de T e RH. As Fig. 4. 7 mostram a percentagem de degradação de compostos fenólicos totais do extrato na forma livre e encapsulado nos fitossomas.

De forma resumida, a Fig. 4. 7 representa o decaimento do teor em compostos fenólicos de 68,3% a 4°C, 90,5% a 25°C e 51,7% a 40°C no extrato livre, durante os 6 meses de armazenamento.



**Figura 4.7 - Percentagem de degradação de compostos fenólicos totais ao longo de 6 meses no extrato livre e nos fitossomas. Nas condições de T e RH estabelecidas para o armazenamento.**

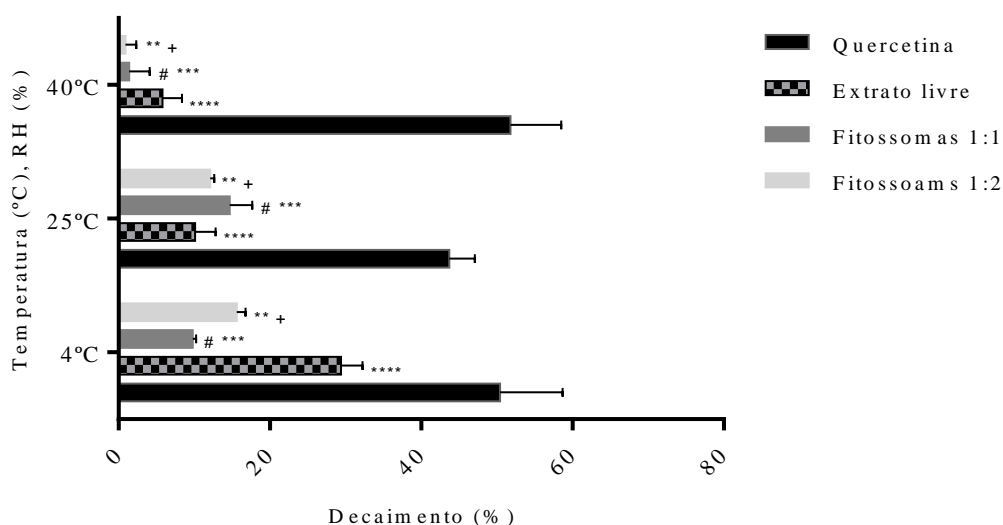
**\*\* p <0,0001 extrato livre a 25°C vs fitossomas 1:1 a 25°C; # p <0,0001 fitossomas 1:1 a 25°C vs fitossomas 1:2 a 25°C; \*\*\* p <0,0001 extrato livre a 40°C vs fitossomas 1:1 a 40°C; +++ p <0,0001 fitossomas 1:2 a 40°C vs extrato livre a 40°C.**

A 4°C, o decaimento do conteúdo em compostos fenólicos no extrato livre foi maior que o de decaimento nos fitossomas 1:1. Aos 25°C, o extrato livre apresentou o maior decaimento no conteúdo em compostos fenólicos (70,8% na formulação 1:1, 85,7% na 1:2 e 90,5% no extrato livre). A 40°C, o extrato livre apresentou metade da degradação do conteúdo em compostos fenólicos que as formulações fitossomais tiveram. Em resumo, o menor decaimento observado neste estudo foi para a formulação 1:1 a 4°C, seguindo-se a 25°C. A 40°C o extrato livre mostrou metade do decaimento do conteúdo em compostos fenólicos das formulações.

#### **5.4 Determinação da atividade antioxidante (DPPH)**

Os resultados encontram-se descritos na Fig. 4. 8. Observa-se que estes fitossomas mantiveram o comportamento do extrato, amplificando seu potencial antioxidante ao longo do tempo de estudo sob as condições de armazenamento. Em contraste com o extrato livre, os fitossomas com extrato apresentaram maior atividade antioxidante durante 6 meses (Fig. 4. 8). Especificamente, a 40°C, o decaimento da atividade antioxidante demonstrado pelos fitossomas 1:1 e 1:2 foi quatro e seis vezes menor do que os demonstrados pelo extrato nas mesmas condições, respetivamente. O padrão de quercetina apresentou um decaimento de 51.8%, aproximadamente nove vezes maior que o do extrato, nas mesmas condições de T e RH. Em relação aos

fitossomas, o padrão de quercetina decaiu 38 vezes mais do que a formulação 1:1 e 57 vezes mais que a formulação 1:2.



**Figura 4. 8 - Atividade antioxidante do extrato, fitossomas (1:2 e 1:1) e controlo positivo (quercetina), nas condições de T e RH estabelecidas, em termos de percentagem de decaimento (% DPPH<sub>t0</sub> -% DPPH<sub>t6</sub>). \*\*\*\* p<0,0001 vs quercetina, #p<0,0001 vs quercetina, \*\*p<0,0001 vs quercetina, \*\*\*p<0,0001 vs extrato livre, +p<0,0001 vs extrato livre.**

A 25°C, o decaimento da atividade antioxidante do extrato e dos fitossomas segue aproximadamente a mesma percentagem de decaimento, aproximadamente entre 10% e 15%. O decaimento da atividade antioxidante para a quercetina foi de quatro vezes superior ao observado no extrato e três vezes maior do que os fitossomas (1:1) e aproximadamente quatro vezes maior que os fitossomas 1:2 sob as mesmas condições de armazenamento.

Verifica-se, globalmente, que os fitossomas têm uma menor perda da atividade ao longo dos 6 meses, particularmente aos 40°C, o que sugere que estes fitossomas mantiveram o comportamento do extrato, amplificando a sua atividade antioxidante ao longo do tempo de estudo nas condições de armazenamento (Tabela 4. 5). Uma possível explicação foi que a maioria dos compostos bioativos nas formulações de fitossomas encontra-se protegida. Por exemplo, os grupos hidroxilo dos compostos fenólicos do extrato não foram expostos ao meio quando se encontram encapsulados nos fitossomas, como descrito em estudos anteriores com nanoencapsulação de flavonóides do extrato de folha de *Diopyros kaki* (Li et al. 2011).

**Tabela 4. 5 - Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH no extrato e nos fitossomas, às diferentes condições de T e RH ao longo do tempo de estudo.**

DPPH (%)				
	Tempo (meses)	t <sub>0</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>6</sub>
Amostras	Extrato livre 4°C	67,2 ± 2,48	37,76±5,331	37,76±5,331
	Extrato livre 25°C	62,08 ± 3,15	51,96 ± 0,433	51,96 ± 0,433
	Extrato livre 40°C	47,17 ± 3,37	62,21 ± 3,37	61,21 ± 3,37
	Quercetina	63,41 ± 5,33	55,64±1,473	55,64±1,473
	Quercetina rep.	68,16 ± 1,90	-	-
	Quercetina 4°C	-	11,032 ± 4,294	11,032 ± 4,294
	Quercetina 25°C	-	17,67 ± 9,192	17,67 ± 9,192
	Quercetina 40°C	-	9,59 ± 5,866	9,59 ± 5,866
	Fitossomas 4°C			
	01:01	0	25,35±5,567	25,35±5,567
	01:02	17,63 ± 2,15	2,23±0,981	2,23±0,981
	Fitossomas 25°C			
	01:01	-	3,21±0,777	3,21±0,777
	01:02	-	6,29±3,989	6,29±3,989
	Fitossomas 40°C			
	01:01	13,55 ± 2,92	12,2±5,645	12,2±5,645
	01:02	6,36 ± 1,49	5,45±2,931	5,45±2,931

**Legenda:** - não determinado; Quercetina rep.– repetição da determinação.

A todas as temperaturas, a quercetina exibiu um decaimento de atividade antioxidante muito superior ao extrato nas mesmas condições seguido dos fitossomas. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores; Jang *et al.* (2010) observaram que o extrato de dióspiro possui uma atividade antioxidante superior aos controlos utilizados (vitamina C e BHT) (Jang et al. 2010). Neste último estudo, todos os extratos de dióspiro testados inibiram os danos ao DNA induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugerindo que os extratos de dióspiro podem ter efeitos benéficos sobre o efeito oxidante e protetor do DNA (Jang et al. 2010).

A 40°C observou-se uma menor redução de atividade antioxidante e a menor redução de compostos fenólicos no extrato, o que pode estar relacionado a descrições prévias que relacionaram a atividade antioxidante desse fruto, com a abundância de compostos fenólicos totais (Chen et al. 2008; Li et al. 2011; Pu et al. 2013). Chen *et al.* (2008) descreveram que o conteúdo total de 6 compostos fenólicos (catequina, epicatequina, epigalocatequina, ácido clorogénico, ácido cafeico e ácido gálico) estava significativamente correlacionado ( $R^2 = 0,831$ ,  $P < 0,05$ , radical ABTS;  $R^2 = 0,745$ ,  $P < 0,05$ , radical DPPH) com a atividade de eliminação de radicais nas amostras testadas, maçã, uva, tomate e dióspiro. Embora o conteúdo total dos 6 compostos fenólicos não seja superior a 20% do total de fenólicos no dióspiro *Mopan*, e tendo o ácido gálico exibido a atividade antioxidante mais forte de todos os 6 compostos fenólicos e o seu conteúdo é o maior no dióspiro de *Mopan*, presumivelmente

responsável por sua atividade antioxidante muito maior em comparação com maçãs, uvas e tomates (Chen et al. 2008).

Em estudos com nanopartículas, Shyam *et al.* (Shyam et al. 2012) desenvolveram o complexo de fosfolípidos e ácido gálico em diferentes proporções para melhorar as propriedades lipofílicas do ácido gálico e para superar sua má absorção por causa da menor lipofilicidade. Estes investigadores analisaram as suas propriedades por espectrometria ultravioleta visível (UV), espectrometria de infravermelho (IR), calorimetria diferencial de varredura (DSC), solubilidade, dissolução, etc. Finalmente, estes autores sugeriram que o complexo fosfolípido-gálico forma um novo composto que elimina eficazmente os radicais DPPH com forte atividade antioxidante (Shyam et al. 2012). Maiti *et al.* (Maiti et al. 2007) observaram que os fitossomas de curcumina (flavonóide do açafrão, *Curcuma longa*) e naringenina (flavonóide do fruto da toranja, *vitis vinifera*) apresentaram uma maior atividade antioxidante quando comparada com a curcumina pura, em todas as doses testadas (Maiti et al. 2007). Esta última observação está de acordo com nossos resultados, onde a quercetina pura por si só mostrou uma atividade antioxidante menor do que o extrato livre e os fitossomas testados.

Os nossos resultados sugerem que o extrato polifenólico do dióspiro permite a obtenção de uma forma farmacêutica com características e propriedades de interesse, por exemplo, na área da oncologia. Existem várias linhas de evidência de que o extrato de dióspiro e seus constituintes têm atividade anticancerígena potente. Embora seus mecanismos moleculares ainda não sejam totalmente compreendidos, estudos mostraram que o ácido 24-hidroxiursólico, um triterpenóide encontrado no dióspiro ativa a proteína cinase ativada por AMP (AMPK), inibindo a expressão da ciclooxigenase (COX-2) em células HT-29 e induzindo a apoptose por ativação de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), caspase-3 e fosforilação de p53 em Ser15. Está igualmente descrito que também induziu fortemente a fragmentação do DNA em células HT-29 e inibiu significativamente a formação de colónias de células HT-29 em ágar mole (Khanal et al. 2010). Outros estudos *in vitro* também mostraram que o extrato fenólico de dióspiro impediu a proliferação celular e a invasão de células HT-29. Estudos posteriores em ratinhos administrados com extrato fenólico de dióspiro demonstraram uma expressão diminuída de COX-2 e iNOS no tecido colónico dos murganhos com colite, dois importantes mediadores da inflamação intestinal, mas não houve inibição da atividade das gelatinases MMP-9 e MMP- 2 (Direito et al. 2017). Dado o papel dos processos inflamatórios na progressão do cancro colorretal e a importante ligação entre inflamação e cancro, esses resultados destacam um outro potencial dos compostos fenólicos de dióspiro como uma ferramenta farmacológica no tratamento de pacientes com doenças inflamatórias intestinais num futuro próximo (Direito et al. 2017).

Agora, com este estudo, fundamenta-se a aplicação destes nanossistemas como candidatos promissores para uma administração futura de agentes bioativos do extrato do fruto dióspiro, com alto interesse farmacêutica e/ou nutracêutico. No entanto são necessárias, pesquisas integradas e meta-análises no sentido de aprofundar o mecanismo de ação e a sua utilização crónica, por exemplo.

Uma prova de conceito aplicada em modelos animais poderá responder a algumas destas questões. A avaliação toxicológica em modelos *in vitro* e em modelos *in vivo* poderá elucidar a sua aplicação na prevenção e/ou tratamento de doenças.

Por fim, não menos importante, é crucial que num futuro próximo se avalie possibilidade de transposição do processo de preparação à escala industrial, de forma a ser exequível a sua ampla e difusa utilização.



## CAPÍTULO V

---

### Conclusões

---

## CAPÍTULO V. CONCLUSÕES

### Capítulo I

A análise dos resultados da avaliação fitoquímica do extrato permitiu-nos escolher qual a amostra assim como a mistura extrativa a utilizar no restante trabalho. Como tal escolhemos a amostra de dióspiro liofilizado e a solução extrativa de acetona 80% por permitir obter o extrato mais rico em fenóis.

Os cromatogramas obtidos por HPLC-DAD-MS/MS mostraram que 280nm foi o comprimento de onda que permitiu a deteção de mais compostos e com área superior pelo que foi o comprimento de onda escolhido para os posteriores estudos.

A caracterização química do extrato preparado demonstrou que este é uma fonte nutricional, de açúcares como glucose e frutose mas não de sacarose. O aminoácido *L*-triptofano foi identificado. O conteúdo em ácido ascórbico presente no extrato demonstrou ser moderado. A presença dos ácidos orgânicos ácido málico e cítrico foi também comprovada. Foram identificados no extrato os ácidos fenólicos benzóicos e derivados do ácido gálico (glicosilados e acetilados) e do ácido vanílico (glicosilados). Bem como procianidinas diméricas e monómeros de flavanols (epicatequina), derivados glicosilados de flavonas e derivado de flavonol.

Estes compostos correlacionam-se positivamente com a atividade antioxidante registada para o extrato. A atividade antioxidante do extrato foi avaliada por ensaios de ORAC e HORAC. Os resultados mostram que os valores obtidos no extrato de dióspiro embora sejam mais baixos que os descritos para alguns frutos vermelhos são superiores aos apresentados por alguns autores referentes a estudos com amostras de maçãs e morangos. Valores que se correlacionam diretamente com o teor em compostos fenólicos de cada amostra.

Este fruto pode ser uma potencial fonte de antioxidantes naturais na alimentação e em aplicações como suplementos alimentares.

### Capítulo II

A atividade antioxidante do extrato foi avaliada por ensaios de CAA e *burst* oxidativo pelos neutrófilos. O extrato mostrou maior atividade antioxidante do que outros extratos de frutas, como laranjas, peras ou maçãs. Em ambos os casos o extrato demonstrou, não apenas a capacidade de atuar como antioxidante intracelular (CAA) mas também de interferir com a função dos neutrófilos, inibindo a libertação de

espécies deletérias reativas de oxigénio, que amplificariam os sinais inflamatórios já desencadeados.

A administração oral do extrato na dose de 15mg EAG/Kg, mostrou atividade anti-inflamatória num modelo animal de inflamação aguda, bem como nos modelos animais de inflamação crónica de artrite induzida pelo colagénio e de colite ulcerosa.

A ação anti-inflamatória aguda do extrato de *Diospyros kaki* L. *p.o.* poderá ter resultado da intervenção dos seus principais compostos fenólicos e/ou antioxidantes naturais.

No modelo animal de inflamação crónica, artrite reumatoide induzida pelo colagénio, a administração do extrato fenólico de dióspiro diminuiu o edema, os danos na cartilagem e a reabsorção óssea da articulação dos membros posteriores, demonstrando assim um significativo efeito protetor na progressão da AR. Estes efeitos podem ser observados na prática considerando o consumo médio de dióspiro na população.

Este consumo de fruta ou de um extrato desta fruta pode ser uma ferramenta farmacológica útil na gestão de condições artríticas crónicas associadas a inflamação ativa, ou uma boa medida preventiva no aparecimento da doença.

A administração do extrato de dióspiro reduz os sinais macroscópicos e funcionais da lesão por colite. A administração do extrato fenólico de dióspiro atenua as características histológicas e os marcadores inflamatórios da lesão por colite em modelo animal. O extrato de dióspiro inibiu a inflamação em modelo animal de colite ulcerosa.

Estes efeitos podem ser observados na prática considerando o consumo médio de menos de um dióspiro por dia.

### **Capítulo III**

O extrato fenólico de dióspiro reduz a invasão e proliferação de células de cancro do cólon HT-29.

A atividade gelatinolítica tanto nas células HT-29 cultivadas como no tecido fresco do cólon proveniente do estudo do modelo da colite *in vivo* são ligeiramente reduzidas. Os extratos fenólicos do dióspiro não são potentes inibidores das metaloproteinases da matriz e esta inibição é fortemente dependente da dose.

## Capítulo IV

Este estudo propõe pela primeira vez a preparação de fitossomas com extrato aquoso de dióspiro para potencial aplicação em suplementos alimentares ou cosméticos. Os fitossomas obtidos com um tamanho inferior a 300nm revelaram ser monodispersos e foram preparados com sucesso. Em contraste com o extrato livre, os fitossomas com o extrato apresentaram maior atividade antioxidante durante 6 meses e sob condições de armazenamento de de T (4°C, 25°C e 40°C) e RH (55%, 60% e 75%) estabelecidas.

Estes nanossistemas também foram capazes de encapsular 97,4% do total de fenóis, sugerindo que estes nanossistemas poderão despertar interesse para a indústria alimentar e farmacêutica, desenvolvendo sistemas de veiculação estáveis.

Este estudo sugere que o extrato fenólico de dióspiro tem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias importantes e mostra efeito anti-proliferativo nas células de cancro de cólon não sendo, no entanto, potente inibidor das metaloproteinases de matriz. A sua fácil incorporação em fitossomas, com manutenção de atividade antioxidante durante 6 meses, pode ser uma alternativa para a produção de um suplemento alimentar com benefícios para a saúde.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El-Fattah, A. I., M. M. Fathy, Z. Y. Ali, A. A. El-Garawany and E. K. Mohamed (2017). "Enhanced therapeutic benefit of quercetin-loaded phytosome nanoparticles in ovariectomized rats." Chem Biol Interact **271**: 30-38.
- Abraham, C. and J. H. Cho (2009). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med **361**(21): 2066-2078.
- Achiwa, Y., H. Hibasami, H. Katsuzaki, K. Imai and T. Komiya (1997). "Inhibitory effects of persimmon (*Diospyros kaki*) extract and related polyphenol compounds on growth of human lymphoid leukemia cells." Biosci Biotechnol Biochem **61**(7): 1099-1101.
- Achiwa, Y., H. Hibasami, H. Katsuzaki, K. Imai and T. Komiya (1997). "Inhibitory effects of persimmon (*Diospyros kaki*) extract and related polyphenol compounds on growth of human lymphoid leukemia cells." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **61**(7): 1099-1101.
- Ademosun, A. O., G. Oboh, S. Passamonti, F. Tramer, L. Ziberna, A. A. Boligon and M. L. Athayde (2016). "Phenolic composition of orange peels and modulation of redox status and matrix metalloproteinase activities in primary (Caco-2) and metastatic (LoVo and LoVo/ADR) colon cancer cells." European Food Research and Technology **242**(11): 1949-1959.
- Aggarwal, B. B. and S. Shishodia (2004). "Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning." Ann N Y Acad Sci **1030**: 434-441.
- Ajazuddin and S. Saraf (2010). "Applications of novel drug delivery system for herbal formulations." Fitoterapia **81**(7): 680-689.
- Akagi, T., Y. Suzuki, A. Ikegami, H. Kamitakahara, T. Takano, F. Nakatsubo and K. Yonemori (2010). "Condensed Tannin Composition Analysis in Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) Fruit by Acid Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol." Journal of the Japanese Society for Horticultural Science **79**(3): 275-281.
- Aletaha, D., T. Neogi, A. J. Silman, J. Funovits, D. T. Felson, C. O. Bingham, 3rd, N. S. Birnbaum, G. R. Burmester, V. P. Bykerk, M. D. Cohen, B. Combe, K. H. Costenbader, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J. M. Hazes, K. Hobbs, T. W. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, T. K. Kvien, T. Laing, P. Mease, H. A. Menard, L. W. Moreland, R. L. Naden, T. Pincus, J. S. Smolen, E. Stanislawski-Biernat, D. Symmons, P. P. Tak, K. S. Upchurch, J. Vencovsky, F. Wolfe and G. Hawker (2010). "2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative." Arthritis Rheum **62**(9): 2569-2581.
- Alex, P., N. C. Zachos, T. Nguyen, L. Gonzales, T. E. Chen, L. S. Conklin, M. Centola and X. H. Li (2009). "Distinct Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS and TNBS-induced Colitis." Inflamm Bowel Dis **15**(3): 341-352.
- Alzabin, S. and R. O. Williams (2011). "Effector T cells in rheumatoid arthritis: lessons from animal models." FEBS Lett **585**(23): 3649-3659.
- Aoki, H., T. Hisada, T. Ishizuka, M. Utsugi, T. Kawata, Y. Shimizu, F. Okajima, K. Dobashi and M. Mori (2008). "Resolvin E1 dampens airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma." Biochem Biophys Res Commun **367**(2): 509-515.

- Araujo, V., C. Arnal, M. Boronat, E. Ruiz and C. Dominguez (1998). "Oxidant-antioxidant imbalance in blood of children with juvenile rheumatoid arthritis." Biofactors **8**(1-2): 155-159.
- Arita, M., M. Yoshida, S. Hong, E. Tjonahen, J. N. Glickman, N. A. Petasis, R. S. Blumberg and C. N. Serhan (2005). "Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(21): 7671-7676.
- Arwa, P. S., M. L. Zeraik, V. F. Ximenes, L. M. da Fonseca, V. D. Bolzani and D. H. S. Silva (2015). "Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage." J Ethnopharmacol **174**: 410-418.
- Asgari, S., H. J. Rohrborn, T. Engelhorn and D. Stolke (2003). "Intra-operative characterization of gliomas by near-infrared spectroscopy: possible association with prognosis." Acta Neurochir (Wien) **145**(6): 453-459; discussion 459-460.
- Aslan, M., Y. Nazligul, C. Bolukbas, F. F. Bolukbas, M. Horoz, A. C. Dulger, F. M. Erdur, H. Celik and A. Kocyigit (2011). "Peripheral lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with ulcerative colitis." Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej-Polish Archives of Internal Medicine **121**(7-8): 223-229.
- Asquith, D. L., A. M. Miller, I. B. McInnes and F. Y. Liew (2009). "Animal models of rheumatoid arthritis." Eur J Immunol **39**(8): 2040-2044.
- Ayaz, F. A. and A. Kadioglu (1999). "Fatty acid compositional changes in developing persimmon (*Diospyros lotus* L.) fruit."
- Azer, S. A. (2013). "Overview of molecular pathways in inflammatory bowel disease associated with colorectal cancer development." Eur J Gastroenterol Hepatol **25**(3): 271-281.
- Barea-Álvarez, M., C. Delgado-Andrade, A. Haro, M. Olalla, I. Seiquer and J. Á. Rufián-Henares (2016). "Subtropical fruits grown in Spain and elsewhere: A comparison of mineral profiles." Journal of Food Composition and Analysis **48**: 34-40.
- Bares, J. M., J. Berger, J. E. Nelson, D. J. Messner, S. Schildt, L. J. Standish and K. V. Kowdley (2008). "Silybin treatment is associated with reduction in serum ferritin in patients with chronic hepatitis C." J Clin Gastroenterol **42**(8): 937-944.
- Bauerova, K. and S. Bezek (2000). "Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis." Gen Physiol Biophys **18**: 15-20.
- Baugh, M. D., M. J. Perry, A. P. Hollander, D. R. Davies, S. S. Cross, A. J. Lobo, C. J. Taylor and G. S. Evans (1999). "Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease." Gastroenterology **117**(4): 814-822.
- Baumgart, D. C. and S. R. Carding (2007). "Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology." The Lancet **369**(9573): 1627-1640.
- Baumgart, D. C. and W. J. Sandborn (2012). "Crohn's disease." The Lancet **380**(9853): 1590-1605.
- Bei, W., W. Peng, Y. Ma and A. Xu (2005). "Flavonoids from the leaves of *Diospyros kaki* reduce hydrogen peroxide-induced injury of NG108-15 cells." Life Sci **76**(17): 1975-1988.
- Belcaro, G., M. R. Cesarone, M. Dugall, L. Pellegrini, A. Ledda, M. G. Grossi, S. Togni and G. Appendino (2010). "Efficacy and safety of Meriva(R), a curcumin-

- phosphatidylcholine complex, during extended administration in osteoarthritis patients." Altern Med Rev **15**(4): 337-344.
- Benavente-Garcia, O. and J. Castillo (2008). "Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity." J Agric Food Chem **56**(15): 6185-6205.
- Bendele, A., J. McComb, T. Gould, T. McAbee, G. Sennello, E. Chlipala and M. Guy (1999). "Animal models of arthritis: relevance to human disease." Toxicol Pathol **27**(1): 134-142.
- Bernhard, E. J., S. B. Gruber and R. J. Muschel (1994). "Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4293-4297.
- Bernstein, C. N., J. F. Blanchard, E. Kliewer and A. Wajda (2001). "Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study." Cancer **91**(4): 854-862.
- Bibi, N., A. B. Khattak and Z. Mehmood (2007). "Quality improvement and shelf life extension of persimmon fruit (*Diospyros kaki*)." Journal of food engineering **79**(4): 1359-1363.
- Biesalski, H. K. (2007). "Polyphenols and inflammation: basic interactions." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **10**(6): 724-728.
- Bignotto, L., J. Rocha, B. Sepodes, M. Eduardo-Figueira, R. Pinto, M. Chaud, J. de Carvalho, H. Moreno, Jr. and H. Mota-Filipe (2009). "Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw oedema and hepatic ischaemia-reperfusion in the rat." Br J Nutr **102**(1): 126-133.
- Bing, Y., X. HuaLong and L. Ping (2006). "Content and Chemical Composition of Carotenoids in Persimmon Fruit [J]." Chinese Agricultural Science Bulletin **10**: 065.
- Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo and J. A. Engler (1993). "Matrix metalloproteinases: a review." Crit Rev Oral Biol Med **4**(2): 197-250.
- Bjorklund, M. and E. Koivunen (2005). "Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells." Biochim Biophys Acta **1755**(1): 37-69.
- Blade, C., L. Arola and M. J. Salvado (2010). "Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms." Mol Nutr Food Res **54**(1): 37-59.
- Bloch, A. and C. A. Thomson (1995). "Position of the American Dietetic Association- Phytochemicals and Functional Foods." Journal of the American Dietetic Association **95**(4): 493-496.
- Block, G., B. Patterson and A. Subar (1992). "Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence." Nutr Cancer **18**(1): 1-29.
- Bochkov, V., B. Gesslbauer, C. Mauerhofer, M. Philippova, P. Erne and O. V. Oskolkova (2017). "Pleiotropic effects of oxidized phospholipids." Free Radic Biol Med **111**: 6-24.
- Bogdan, C., M. Rollinghoff and A. Diefenbach (2000). "Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity." Current Opinion in Immunology **12**(1): 64-76.

- Bombardelli, E., S. Curri, R. DELLA LOGGIA, P. Del Negro, P. Gariboldi and A. Tubaro (1989). "Complexes between phospholipids and vegetal derivatives of biological interest." *Fitoterapia* **60**: 1-9.
- Bombardelli, E., R. DELLA LOGGIA, S. Sosa, M. Spelta and A. Tubaro (1991). "Aging skin: protective effect of Silymarin-Phytosome (R)." *Fitoterapia* **62**: 115-122.
- Bombardelli, E. and M. Spelta (1991). "Phospholipid-polyphenol complexes: a new concept in skin care ingredients." *Cosmetics and toiletries* **106**(3): 69-76.
- Boots, A. W., G. R. Haenen and A. Bast (2008). "Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical." *Eur J Pharmacol* **585**(2-3): 325-337.
- Borges-Argaez, R., C. I. Canche-Chay, L. M. Pena-Rodriguez, S. Said-Fernandez and G. M. Molina-Salinas (2007). "Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*." *Fitoterapia* **78**(5): 370-372.
- Bouhdid, S., J. Abrini, M. Amensour, A. Zhiri, M. J. Espuny and A. Manresa (2010). "Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil." *J Appl Microbiol* **109**(4): 1139-1149.
- Braegger, C., S. Nicholls, S. Murch, T. MacDonald and S. Stephens (1992). "Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation." *The Lancet* **339**(8785): 89-91.
- Brand, D. D., K. A. Latham and E. F. Rosloniec (2007). "Collagen-induced arthritis." *Nat Protoc* **2**(5): 1269-1275.
- Braune, A. and M. Blaut (2016). "Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut." *Gut Microbes* **7**(3): 216-234.
- Bravo, L. (1998). "Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." *Nutr Rev* **56**(11): 317-333.
- Bredt, D. S., P. M. Hwang, C. E. Glatt, C. Lowenstein, R. R. Reed and S. H. Snyder (1991). "Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase." *Nature* **351**(6329): 714-718.
- Brennan, F. M. and I. B. McInnes (2008). "Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis." *J Clin Invest* **118**(11): 3537-3545.
- Briand, C. (2005). "The common persimmon (*Diospyros virginiana* L.): The history of an underutilized fruit tree (16th–19th centuries)." *Huntia* **12**(1): 71-89.
- Brosseau, L., G. A. Wells, P. Tugwell, M. Egan, C. J. Dubouloz, L. Casimiro, V. A. Robinson, L. Pelland and J. McGowan (2004). "Ottawa Panel Evidence-Based Clinical Practice Guidelines for Therapeutic Exercises in the Management of Rheumatoid Arthritis in Adults." *Physical Therapy* **84**(10): 934-972.
- Bruce, W. R., A. Giacca and A. Medline (2000). "Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**(12): 1271-1279.
- Bureau, S., C. M. G. C. Renard, M. Reich, C. Ginies and J. M. Audergon (2009). "Change in anthocyanin concentrations in red apricot fruits during ripening." *Lwt-Food Science and Technology* **42**(1): 372-377.
- Burisch, J., N. Pedersen, S. Cukovic-Cavka, M. Brinar, I. Kaimakliotis, D. Duricova, O. Shonova, I. Vind, S. Avnstrom, N. Thorsgaard, V. Andersen, S. Krabbe, J. F. Dahlerup, R. Salupere, K. R. Nielsen, J. Olsen, P. Manninen, P. Collin, E. V. Tsianos, K. H. Katsanos, K. Ladefoged, L. Lakatos, E. Bjornsson, G. Ragnarsson, Y. Bailey, S. Odes, D. Schwartz, M. Martinato, G. Lupinacci, M. Milla, A. De Padova, R. D'Inca, M. Beltrami, L. Kupcinskis, G. Kiudelis, S. Turcan, O. Tighineanu, I.



- Mihu, F. Magro, L. F. Barros, A. Goldis, D. Lazar, E. Belousova, I. Nikulina, V. Hernandez, D. Martinez-Ares, S. Almer, Y. Zhulina, J. Halfvarson, N. Arebi, S. Sebastian, P. L. Lakatos, E. Langholz and P. Munkholm (2014). "East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort." Gut **63**(4): 588-597.
- Butt, M. S., M. T. Sultan, M. Aziz, A. Naz, W. Ahmed, N. Kumar and M. Imran (2015). "Persimmon (Diospyros Kaki) Fruit: Hidden Phytochemicals and Health Claims." Excli Journal **14**: 542-561.
- Bylund, D., S. H. Norström, S. A. Essén and U. S. Lundström (2007). "Analysis of low molecular mass organic acids in natural waters by ion exclusion chromatography tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1176**(1-2): 89-93.
- Calder, P. C. (2009). "Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale." Biochimie **91**(6): 791-795.
- Calder, P. C. (2010). "Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes." Nutrients **2**(3): 355-374.
- Calder, P. C. and P. Yaqoob (2013). Diet, immunity and inflammation, Elsevier.
- Cam, M. and Y. Hisil (2010). "Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels." Food Chemistry **123**(3): 878-885.
- Cancer, W., R. Fund and A. I. f. C. Research (2007). "Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective." Washington DC: AICR, 2007
- Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna and J. B. Mitchell (1987). "Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing." Cancer Res **47**(4): 936-942.
- CCFA, Crohn's, & Colitis and F. o. America (2015). "What is Crohn's Disease?" © 2015 Crohn's & Colitis Foundation of America.
- Chahoud, G., Y. W. Aude and J. L. Mehta (2004). "Dietary recommendations in the prevention and treatment of coronary heart disease: do we have the ideal diet yet?" Am J Cardiol **94**(10): 1260-1267.
- Chambers, A. F. and L. M. Matrisian (1997). "Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis." J Natl Cancer Inst **89**(17): 1260-1270.
- Chapple, I. (1997). "Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases." Journal of clinical periodontology **24**(5): 287-296.
- Cheli, F. and A. Baldi (2011). "Nutrition-Based Health: Cell-Based Bioassays for Food Antioxidant Activity Evaluation." J Food Sci **76**(9): R197-R205.
- Chen, G., H. Lu, C. Wang, K. Yamashita, M. Manabe, Z. Meng, S. Xu and H. Kodama (2002). "Effect of five flavonoid compounds isolated from leaves of Diospyros kaki on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils." Clinica Chimica Acta **326**(1-2): 169-175.
- Chen, G., J. Xue and X. Z. Feng (2009). "Inhibitory Effect of Water Extract and Its Main Contents of Persimmon Leaves on Stimulus-Induced Superoxide Generation in Human Neutrophils." Journal of Food Biochemistry **33**(1): 113-121.
- Chen, H., K. L. Tucker, B. I. Graubard, E. F. Heineman, R. S. Markin, N. A. Potischman, R. M. Russell, D. D. Weisenburger and M. H. Ward (2002). "Nutrient intakes and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach." Nutr Cancer **42**(1): 33-40.

- Chen, L., H. Teng, Z. Jia, M. Battino, A. Miron, Z. Yu, H. Cao and J. Xiao (2017). "Intracellular signaling pathways of inflammation modulated by dietary flavonoids: The most recent evidence." Crit Rev Food Sci Nutr: 1-17.
- Chen, Q.-y., Y. Zheng, D.-m. Jiao, F.-y. Chen, H.-z. Hu, Y.-q. Wu, J. Song, J. Yan, L.-j. Wu and G.-y. Lv (2014). "Curcumin inhibits lung cancer cell migration and invasion through Rac1-dependent signaling pathway." J Nutr Biochem **25**(2): 177-185.
- Chen, X. N., J. F. Fan, X. Yue, X. R. Wu and L. T. Li (2008). "Radical scavenging activity and phenolic compounds in persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Mopan)." J Food Sci **73**(1): C24-28.
- Cheon, G. J., Y. Cui, D.-S. Yeon, S.-C. Kwon and B.-G. Park (2012). "Mechanisms of motility change on trinitrobenzenesulfonic Acid-induced colonic inflammation in mice." The Korean Journal of Physiology & Pharmacology **16**(6): 437-446.
- Cho, Y. G., M. L. Cho, S. Y. Min and H. Y. Kim (2007). "Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis." Autoimmun Rev **7**(1): 65-70.
- Choi, S.-H., S.-H. Lee, H.-J. Kim, I.-S. Lee, N. Kozukue, C. E. Levin and M. Friedman (2010). "Changes in free amino acid, phenolic, chlorophyll, carotenoid, and glycoalkaloid contents in tomatoes during 11 stages of growth and inhibition of cervical and lung human cancer cells by green tomato extracts." J Agric Food Chem **58**(13): 7547-7556.
- Chow, A. K., J. Cena and R. Schulz (2007). "Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature." Br J Pharmacol **152**(2): 189-205.
- Choy, E. H. and G. S. Panayi (2001). "Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis." N Engl J Med **344**(12): 907-916.
- Chung, K. T., C. I. Wei and M. G. Johnson (1998). "Are tannins a double-edged sword in biology and health?" Trends in Food Science & Technology **9**(4): 168-175.
- Citernes, U. and M. Sciacchitano (1995). "Phospholipid/active ingredient complexes." Cosmetics and toiletries **110**(11): 57-68.
- Ciz, M., H. Cizova, P. Denev, M. Kratchanova, A. Slavov and A. Lojek (2010). "Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables." Food Control **21**(4): 518-523.
- Clavel, T., C. Desmarchelier, D. Haller, P. Gérard, S. Rohn, P. Lepage and H. Daniel (2014). "Intestinal microbiota in metabolic diseases: from bacterial community structure and functions to species of pathophysiological relevance." Gut Microbes **5**(4): 544-551.
- Clinton, S. K. (1998). "Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease." Nutr Rev **56**(2 Pt 1): 35-51.
- Costa, D., A. P. Marques, R. L. Reis, J. L. Lima and E. Fernandes (2006). "Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives." Free Radic Biol Med **40**(4): 632-640.
- Costa, D., A. P. Marques, R. L. Reis, J. L. F. C. Lima and E. Fernandes (2006). "Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives." Free Radical Biology & Medicine(40): 632 – 640.
- Coussens, L. M., B. Fingleton and L. M. Matrisian (2002). "Cancer therapy - Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations." Science **295**(5564): 2387-2392.

- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-867.
- Cragg, G. M., D. J. Newman and R. B. Weiss (1997). "Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents." Semin Oncol **24**(2): 156-163.
- Cross, R. K. and K. T. Wilson (2003). "Nitric oxide in inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **9**(3): 179-189.
- Crozier, A. (2009). "Dietary phenolics, absorption, mammalian and microbial metabolism and colonic health." Mol Nutr Food Res **53 Suppl 1**: S5-6.
- Crozier, A., I. B. Jaganath and M. N. Clifford (2009). "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health." Nat Prod Rep **26**(8): 1001-1043.
- Cruvinel, W. d. M., D. Mesquita Júnior, J. A. P. Araújo, T. T. T. Catelan, A. W. S. d. Souza, N. P. d. Silva and L. E. C. Andrade (2010). "Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response." Revista brasileira de reumatologia **50**(4): 434-447.
- Cuzzocrea, S., M. C. McDonald, E. Mazzon, H. M. Filipe, G. Costantino, A. P. Caputi and C. Thiemermann (2000). "Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of splanchnic artery occlusion and reperfusion." Shock **14**(2): 150-156.
- D'Acquisto, F., M. J. May and S. Ghosh (2002). "Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies." Mol Interv **2**(1): 22-35.
- D'Archivio, M., C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini and R. Masella (2007). "Polyphenols, dietary sources and bioavailability." Ann Ist Super Sanita **43**(4): 348-361.
- Daayf, F. and V. Lattanzio (2008). "Recent Advances in Polyphenol Research." Blackwell Publishing Ltd. vol I.
- Dai, J., D. P. Jones, J. Goldberg, T. R. Ziegler, R. M. Bostick, P. W. Wilson, A. K. Manatunga, L. Shallenberger, L. Jones and V. Vaccarino (2008). "Association between adherence to the Mediterranean diet and oxidative stress." American Journal of Clinical Nutrition **88**(5): 1364-1370.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini and A. Milzani (2006). "Biomarkers of oxidative damage in human disease." Clin Chem **52**(4): 601-623.
- Danese, S., M. Sans and C. Fiocchi (2004). "Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors." Autoimmun Rev **3**(5): 394-400.
- Das, N. P. and L. A. Griffiths (1969). "Studies on flavonoid metabolism. Metabolism of (+)-[14C] catechin in the rat and guinea pig." Biochem J **115**(4): 831-836.
- de la Iglesia, R., F. I. Milagro, J. Campion, N. Boque and J. A. Martinez (2010). "Healthy properties of proanthocyanidins." Biofactors **36**(3): 159-168.
- de Mejia, E. G. and V. P. Dia (2010). "The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells." Cancer Metastasis Rev **29**(3): 511-528.
- de Oliveira, A. C., I. B. Valentim, C. A. Silva, E. J. H. Bechara, M. P. d. Barros, C. M. Mano and M. O. F. Goulart (2009). "Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues." Food chemistry **115**(2): 469-475.

- Del Bubba, M., E. Giordani, L. Pippucci, A. Cincinelli, L. Checchini and P. Galvan (2009). "Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth and ripening and in response to different postharvest treatments." Journal of Food Composition and Analysis **22**(7-8): 668-677.
- Denev, P., M. Ciz, G. Ambrozova, A. Lojek, I. Yanakieva and M. Kratchanova (2010). "Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties." Food chemistry **123**(4): 1055-1061.
- Denev, P. and A. Yordanov (2013). "Total polyphenol, proanthocyanidin and flavonoid content, carbohydrate composition and antioxidant activity of persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit in relation to cultivar and maturity stage." Bulg J Agric Sci **19**(5): 981-988.
- Deprez, S., I. Mila, J. F. Huneau, D. Tome and A. Scalbert (2001). "Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells." Antioxid Redox Signal **3**(6): 957-967.
- Deryugina, E. I. and J. P. Quigley (2006). "Matrix metalloproteinases and tumor metastasis." Cancer Metastasis Rev **25**(1): 9-34.
- Direito, R., A. Lima, J. Rocha, R. B. Ferreira, J. Mota, P. Rebelo, A. Fernandes, R. Pinto, P. Alves, R. Bronze, B. Sepodes and M.-E. Figueira (2017). "Dyospiros kaki phenolics inhibit colitis and colon cancer cell proliferation, but not gelatinase activities." J Nutr Biochem **46**: 100-108.
- Dixon, R. A., D. Y. Xie and S. B. Sharma (2005). "Proanthocyanidins--a final frontier in flavonoid research?" New Phytol **165**(1): 9-28.
- Doherty, D., G. Downey, G. Worthen, C. Haslett and P. Henson (1988). "Monocyte retention and migration in pulmonary inflammation. Requirement for neutrophils." Lab Invest **59**(2): 200-213.
- Domazou, A. S., V. Zelenay, W. H. Koppenol and J. M. Gebicki (2012). "Efficient depletion of ascorbate by amino acid and protein radicals under oxidative stress." Free Radical Biology and Medicine **53**(8): 1565-1573.
- Dornas, W., T. T. d. Oliveira, R. Rodrigues-das-Dores, A. F. d. Santos and T. J. Nagem (2009). "Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo." Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada **28**(3): 241-249.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiological Reviews **82**(1): 47-95.
- Duarte, A. M., D. Caixeirinho, M. G. Miguel, V. Sustelo, C. Nunes, M. M. Fernandes and A. Marreiros (2012). "Organic Acids Concentration in Citrus Juice from Conventional versus Organic Farming." Xxviii International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (Ihc2010): International Symposium on Organic Horticulture: Productivity and Sustainability **933**: 601-606.
- Duggan, C., J. Gannon and W. A. Walker (2002). "Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract." Am J Clin Nutr **75**(5): 789-808.
- Duricova, D., N. Pedersen, M. Elkjaer, M. Gamborg, P. Munkholm and T. Jess (2010). "Overall and cause-specific mortality in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based studies." Inflamm Bowel Dis **16**(2): 347-353.
- Ebert, G. and J. Gross (1985). "Carotenoid changes in the peel of ripening persimmon (*Diospyros kaki*) cv Triumph." Phytochemistry **24**(1): 29-32.

- Egan, L. J., D. C. Mays, C. J. Huntoon, M. P. Bell, M. G. Pike, W. J. Sandborn, J. J. Lipsky and D. J. McKean (1999). "Inhibition of interleukin-1-stimulated NF-kappaB RelA/p65 phosphorylation by mesalamine is accompanied by decreased transcriptional activity." *J Biol Chem* **274**(37): 26448-26453.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." *Nat Rev Cancer* **2**(3): 161-174.
- Ek, M., D. Engblom, S. Saha, A. Blomqvist, P. J. Jakobsson and A. Ericsson-Dahlstrand (2001). "Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier." *Nature* **410**(6827): 430-431.
- Ekdahl, C. and G. Broman (1992). "Muscle strength, endurance, and aerobic capacity in rheumatoid arthritis: a comparative study with healthy subjects." *Ann Rheum Dis* **51**(1): 35-40.
- El-Far, S. W., M. W. Helmy, S. N. Khattab, A. A. Bekhit, A. A. Hussein and A. O. Elzoghby (2018). "Phytosomal bilayer-enveloped casein micelles for codelivery of monascus yellow pigments and resveratrol to breast cancer." *Nanomedicine* **13**(5): 481-499.
- Elmowafy, M., A. Samy, M. A. Raslan, A. Salama, R. A. Said, A. E. Abdelaziz, W. El-Eraky, S. El Awdan and T. Viitala (2016). "Enhancement of Bioavailability and Pharmacodynamic Effects of Thymoquinone Via Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Formulation." *Aaps Pharmscitech* **17**(3): 663-672.
- Engels, C., D. Grater, P. Esquivel, V. M. Jimenez, M. G. Ganzle and A. Schieber (2012). "Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry." *Food Research International* **46**(2): 557-562.
- Esposito, K. and D. Giugliano (2006). "Diet and inflammation: a link to metabolic and cardiovascular diseases." *Eur Heart J* **27**(1): 15-20.
- Estruch, R., M. A. Martinez-Gonzalez, D. Corella, J. Salas-Salvado, V. Ruiz-Gutierrez, M. I. Covas, M. Fiol, E. Gomez-Gracia, M. C. Lopez-Sabater, E. Vinyoles, F. Aros, M. Conde, C. Lahoz, J. Lapetra, G. Saez and E. Ros (2006). "Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial." *Ann Intern Med* **145**(1): 1-11.
- Everette, J. D., Q. M. Bryant, A. M. Green, Y. A. Abbey, G. W. Wangila and R. B. Walker (2010). "Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent." *J Agric Food Chem* **58**(14): 8139-8144.
- Fang, Y.-Z., S. Yang and G. Wu (2002). "Free radicals, antioxidants, and nutrition." *Nutrition* **18**(10): 872-879.
- Fanjul-Fernandez, M., A. R. Folgueras, S. Cabrera and C. Lopez-Otin (2010). "Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models." *Biochim Biophys Acta* **1803**(1): 3-19.
- FAO (2016). "Food and Agricultural Organization of the United Nations." Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data>.
- Farzaei, M. H., R. Bahramsoltani, A. H. Abdolghaffari, H. R. Sodagari, S. A. Esfahani and N. Rezaei (2016). "A mechanistic review on plant-derived natural compounds as dietary supplements for prevention of inflammatory bowel disease." *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **10**(6): 745-758.
- Farzaei, M. H., F. F. El-Senduny, S. Momtaz, F. Parvizi, A. Iranpanah, D. Tewari, R. Naseri, A. H. Abdolghaffari and N. Rezaei (2018). "An update on dietary

- consideration in inflammatory bowel disease: anthocyanins and more." Expert Rev Gastroenterol Hepatol: 1-18.
- Feliciano, R. P., M. N. Bravo, M. M. Pires, A. T. Serra, C. M. Duarte, L. V. Boas and M. R. Bronze (2009). "Phenolic Content and Antioxidant Activity of Moscatel Dessert Wines from the Setubal Region in Portugal." Food Analytical Methods **2**(2): 149-161.
- Ferguson, L. R. (2001). "Role of plant polyphenols in genomic stability." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **475**(1-2): 89-111.
- Fernandez-Garcia, E., I. Carvajal-Lerida and A. Perez-Galvez (2009). "In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency." Nutrition Research **29**(11): 751-760.
- Fernandez-Panchon, M. S., D. Villano, A. M. Troncoso and M. C. Garcia-Parrilla (2008). "Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence." Crit Rev Food Sci Nutr **48**(7): 649-671.
- Ferrari, E., L. Cravello, S. Precerutti, D. Camozzi, A. A. Ferrari and F. Magri (2001). "[Neuroendocrine features of obesity]." Minerva Gastroenterol Dietol **47**(4): 163-167.
- Figueira, M. (2010). "Nutracêuticos na fronteira com os Alimentos Funcionais." Nutracêuticos e Alimentos Funcionais: 46-62.
- Figueira, M., M. Câmara, R. Direito, J. Rocha, A. Serra, C. Duarte, A. Fernandes, M. Freitas, E. Fernandes and M. Marques (2014). "Chemical characterization of a red raspberry fruit extract and evaluation of its pharmacological effects in experimental models of acute inflammation and collagen-induced arthritis." Food Funct **5**: 3241–3251.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**(6809): 239-247.
- Fiocchi, C. (1998). "Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis." Gastroenterology **115**(1): 182-205.
- Firestein, G. S. (2003). "Evolving concepts of rheumatoid arthritis." Nature **423**(6937): 356-361.
- Flaig, T. W., D. L. Gustafson, L.-J. Su, J. A. Zirrolli, F. Crighton, G. S. Harrison, A. S. Pierson, R. Agarwal and L. M. Glodé (2007). "A phase I and pharmacokinetic study of silybin-phytosome in prostate cancer patients." Invest New Drugs **25**(2): 139-146.
- Fogh, J., J. M. Fogh and T. Orfeo (1977). "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice." J Natl Cancer Inst **59**(1): 221-226.
- Food, U. and D. Administration (2012). National nutrient database for standard reference Release 24.
- Forouzanfar, F., S. Torabi, V. R. Askari, E. Asadpour and H. R. Sadeghnia (2016). "Protective Effect of Diospyros kaki against Glucose-Oxygen-Serum Deprivation-Induced PC12 Cells Injury." Adv Pharmacol Sci **2016**: 5.
- Freag, M. S., W. M. Saleh and O. Y. Abdallah (2018). "Self-assembled phospholipid-based phytosomal nanocarriers as promising platforms for improving oral bioavailability of the anticancer celastrol." Int J Pharm **535**(1): 18-26.

- Freitas, M., V. M. Costa, D. Ribeiro, D. Couto, G. Porto, F. Carvalho and E. Fernandes (2013). "Acetaminophen prevents oxidative burst and delays apoptosis in human neutrophils." Toxicology Letters (219): 170-177.
- Freitas, M., J. L. Lima and E. Fernandes (2009). "Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review." Anal Chim Acta **649**(1): 8-23.
- Freitas, M., J. L. F. C. Lima and E. Fernandes (2009). "Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review." Analytica Chimica Acta(649): 8–23.
- Freitas, M., G. Porto, J. L. Lima and E. Fernandes (2008). "Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection." Clin Biochem **41**(7-8): 570-575.
- Fu, X., S. Y. Kassim, W. C. Parks and J. W. Heinecke (2003). "Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation." J Biol Chem **278**(31): 28403-28409.
- Fukai, S., S. Tanimoto, A. Maeda, H. Fukuda, Y. Okada and M. Nomura (2009). "Pharmacological activity of compounds extracted from persimmon peel (Diospyros kaki THUNB.)." J Oleo Sci **58**(4): 213-219.
- Fukuzawa, K. (2008). "Dynamics of lipid peroxidation and antioxidant of alpha-tocopherol in membranes." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **54**(4): 273-285.
- Furst, D. E. and R. W. Ulrich (2007). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, disease-modifying antirheumatic drugs, nonopioid analgesics, & drugs used in gout." Basic and clinical pharmacology. **10th ed.**(Singapore: McGraw-Hill): 573-575.
- Garg, P., M. Vijay-Kumar, L. Wang, A. T. Gewirtz, D. Merlin and S. V. Sitaraman (2009). "Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **296**(2): G175-184.
- Gato, N., A. Kadowaki, N. Hashimoto, S. I. Yokoyama and K. Matsumoto (2012). "Persimmon Fruit Tannin-Rich Fiber Reduces Cholesterol Levels in Humans." Ann Nutr Metab **62**(1): 1-6.
- Ge, Z., W. Zhu, J. Peng, X. Deng and C. Li (2016). "Persimmon tannin regulates the expression of genes critical for cholesterol absorption and cholesterol efflux by LXR $\alpha$  independent pathway." Journal of Functional Foods **23**: 283-293.
- Gebicki, J. M., T. Nauser, A. Domazou, D. Steinmann, P. L. Bounds and W. H. Koppenol (2010). "Reduction of protein radicals by GSH and ascorbate: potential biological significance." Amino Acids **39**(5): 1131-1137.
- Gewirtz, A. T., L. S. Collier-Hyams, A. N. Young, T. Kucharzik, W. J. Guilford, J. F. Parkinson, I. R. Williams, A. S. Neish and J. L. Madara (2002). "Lipoxin a4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis." J Immunol **168**(10): 5260-5267.
- Gioia, M., G. F. Fasciglione, S. Marini, S. D'Alessio, G. De Sanctis, O. Diekmann, M. Pieper, V. Politi, H. Tschesche and M. Coletta (2002). "Modulation of the catalytic activity of neutrophil collagenase MMP-8 on bovine collagen I. Role of

- the activation cleavage and of the hemopexin-like domain." J Biol Chem **277**(26): 23123-23130.
- Giordani, E., S. Doumett, S. Nin and M. Del Bubba (2011). "Selected primary and secondary metabolites in fresh persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.): A review of analytical methods and current knowledge of fruit composition and health benefits." Food Research International **44**(7): 1752-1767.
- Giovanelli, G., V. Lavelli, C. Peri and S. Nobili (1999). "Variation in antioxidant components of tomato during vine and post-harvest ripening." J Sci Food Agric **79**(12): 1583-1588.
- Glade, M. J. (1999). "Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997." Nutrition **15**(6): 523-526.
- Glade, M. J. (2008). World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: A Global Perspective 2007 American Institute for Cancer Research Washington, D. C ISBN: 978-0-9722522-2-5, Elsevier.
- Goel, G., A. K. Puniya, C. N. Aguilar and K. Singh (2005). "Interaction of gut microflora with tannins in feeds." Naturwissenschaften **92**(11): 497-503.
- Gonçalves, R. F. S., J. T. Martins, C. M. M. Duarte, A. A. Vicente and A. C. Pinheiro (2018). "Advances in nutraceutical delivery systems: From formulation design for bioavailability enhancement to efficacy and safety evaluation." Trends in Food Science & Technology **78**: 270-291.
- González-Sarrías, A., J. C. Espín and F. A. Tomás-Barberán (2017). "Non-extractable polyphenols produce gut microbiota metabolites that persist in circulation and show anti-inflammatory and free radical-scavenging effects." Trends in Food Science & Technology **69**(Part B): 281-288.
- Gorinstein, S., E. Bartnikowska, G. Kulasek, M. Zemser and S. Trakhtenberg (1998). "Dietary persimmon improves lipid metabolism in rats fed diets containing cholesterol." J Nutr **128**(11): 2023-2027.
- Gorinstein, S., G. W. Kulasek, E. Bartnikowska, M. Leontowicz, M. Zemser, M. Morawiec and S. Trakhtenberg (1998). "The influence of persimmon peel and persimmon pulp on the lipid metabolism and antioxidant activity of rats fed cholesterol." Journal of Nutritional Biochemistry **9**(4): 223-227.
- Gorinstein, S., G. W. Kulasek, E. Bartnikowska, M. Leontowicz, M. Zemser, M. Morawiec and S. Trakhtenberg (2000). "The effects of diets, supplemented with either whole persimmon or phenol-free persimmon, on rats fed cholesterol." Food Chem **70**: 303-308.
- Gorinstein, S., H. Leontowicz, M. Leontowicz, I. Jesion, J. Namiesnik, J. Drzewiecki, Y. S. Park, K. S. Ham, E. Giordani and S. Trakhtenberg (2011). "Influence of two cultivars of persimmon on atherosclerosis indices in rats fed cholesterol-containing diets: Investigation in vitro and in vivo." Nutrition **27**(7-8): 838-846.
- Gorinstein, S., O. Martín-Belloso, Y.-S. Park, R. Haruenkit, A. Lojek, M. Číž, A. Caspi, I. Libman and S. Trakhtenberg (2001). "Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits." Food chemistry **74**(3): 309-315.
- Gorinstein, S., Z. Zachwieja, M. Folta, H. Barton, J. Piotrowicz, M. Zemser, M. Weisz, S. Trakhtenberg and O. Martin-Belloso (2001). "Comparative contents of dietary



- fiber, total phenolics, and minerals in persimmons and apples." J Agric Food Chem **49**(2): 952-957.
- Gorinstein, S., M. Zemser, M. Weisz, S. Halevy, J. Deutsch, K. Tilus, D. Feintuch, N. Guerra, M. Fishman and E. Bartnikowska (1994). "Fluorometric analysis of phenolics in persimmons." Biosci. Biotech. Biochem. **58**: 1087-1092.
- Gostner, J. M., K. Becker, D. Fuchs and R. Sucher (2013). "Redox regulation of the immune response." Redox Rep **18**(3): 88-94.
- Goto, M., Y. Tanaka, M. Murakawa, K. Kadoshima-Yamaoka, H. Inoue, H. Murafuji, A. Nagahira, S. Kanki, Y. Hayashi, K. Nagahira, A. Ogata, K. Miura, T. Nakatsuka, K. Chamoto, Y. Fukuda and T. Nishimura (2009). "Inhibition of phosphodiesterase 7A ameliorates Concanavalin A-induced hepatitis in mice." Int Immunopharmacol **9**(11): 1347-1351.
- Gravallese, E. M., C. Manning, A. Tsay, A. Naito, C. Pan, E. Amento and S. R. Goldring (2000). "Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor." Arthritis Rheum **43**(2): 250-258.
- Gregory, J. F. (2007). Vitamins. Cambridge (UK), CRC Press.
- Greten, F. R., L. Eckmann, T. F. Greten, J. M. Park, Z. W. Li, L. J. Egan, M. F. Kagnoff and M. Karin (2004). "IKK beta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer." Cell **118**(3): 285-296.
- Gu, H. F., C. M. Li, Y. J. Xu, W. F. Hu, M. H. Chen and Q. H. Wan (2008). "Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp." Food Research International **41**(2): 208-217.
- Gu, L., M. A. Kelm, J. F. Hammerstone, G. Beecher, J. Holden, D. Haytowitz, S. Gebhardt and R. L. Prior (2004). "Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption." J Nutr **134**(3): 613-617.
- Guevara-Cruz, M., C.-Q. Lai, K. Richardson, L. D. Parnell, Y.-C. Lee, A. R. Tovar, J. M. Ordoñas and N. Torres (2013). "Effect of a GFOD2 variant on responses in total and LDL cholesterol in Mexican subjects with hypercholesterolemia after soy protein and soluble fiber supplementation." Gene **532**(2): 211-215.
- Ha, T. V., S. Kim, Y. Choi, H. S. Kwak, S. J. Lee, J. Wen, I. Oey and S. Ko (2015). "Antioxidant activity and bioaccessibility of size-different nanoemulsions for lycopene-enriched tomato extract." Food Chem **178**: 115-121.
- Hagen, S. F., G. I. A. Borge, G. B. Bengtsson, W. Bilger, A. Berge, K. Haffner and K. A. Solhaug (2007). "Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation." Postharvest Biology and Technology **45**(1): 1-10.
- Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?" Lancet **344**(8924): 721-724.
- Halliwell, B. (1997). "Antioxidants and human disease: A general introduction." Nutr Rev **55**(1): S44-S49.
- Halliwell, B. (1999). "Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)." Free Radic Res **31**(4): 261-272.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." Methods Enzymol **186**: 1-85.
- Halsam, E. and T. H. Lilley (1988). "Natural astringency in foodstuffs--a molecular interpretation." Crit Rev Food Sci Nutr **27**(1): 1-40.

- Hanauer, S. B. (2004). "Review article: aminosalicylates in inflammatory bowel disease." Aliment Pharmacol Ther **20**: 60-65.
- Harikumar, K. B. and B. B. Aggarwal (2008). "Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases." Cell Cycle **7**(8): 1020-1035.
- Haslam, E. (1996). "Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action." J Nat Prod **59**(2): 205-215.
- Hau, M., H. Schultz, H. P. Tony, M. Keberle, R. Jahns, R. Haerten and M. Jenett (1999). "Evaluation of pannus and vascularization of the metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints in rheumatoid arthritis by high-resolution ultrasound (multidimensional linear array)." Arthritis & Rheumatism **42**(11): 2303-2308.
- Haworth, O., M. Cernadas, R. Yang, C. N. Serhan and B. D. Levy (2008). "Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon- $\gamma$  and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation." Nat Immunol **9**(8): 873-879.
- Head, K. A. and J. S. Jurenka (2003). "Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options." Altern Med Rev **8**(3): 247-283.
- Heras, R. M.-L., P. Quifer-Rada, A. Andrés and R. Lamuela-Raventós (2016). "Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS)." Journal of Functional Foods **23**: 370-377.
- Heras, R. M. L., A. Pinazo, A. Heredia and A. Andres (2017). "Evaluation studies of persimmon plant (*Diospyros kaki*) for physiological benefits and bioaccessibility of antioxidants by in vitro simulated gastrointestinal digestion." Food chemistry **214**: 478-485.
- Herren, B., B. Levkau, E. W. Raines and R. Ross (1998). "Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases." Mol Biol Cell **9**(6): 1589-1601.
- Herszenyi, L., I. Hritz, G. Lakatos, M. Z. Varga and Z. Tulassay (2012). "The Behavior of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Colorectal Cancer." International Journal of Molecular Sciences **13**(10): 13240-13263.
- Herszenyi, L., I. Hritz, G. Lakatos, M. Z. Varga and Z. Tulassay (2012). "The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer." Int J Mol Sci **13**(10): 13240-13263.
- Hibino, G., T. Nadamoto, F. Fujisawa and T. Fushiki (2003). "Regulation of the peripheral body temperature by foods: a temperature decrease induced by the Japanese persimmon (*kaki*, *Diospyros kaki*)." Biosci Biotechnol Biochem **67**(1): 23-28.
- Hipps, D. S., R. M. Hembry, A. J. P. Docherty, J. J. Reynolds and G. Murphy (1991). "Purification and Characterization of Human 72-Kda Gelatinase (Type-Iv Collagenase) - Use of Immunolocalization to Demonstrate the Non-Coordinate Regulation of the 72-Kda and 95-Kda Gelatinases by Human Fibroblasts." Biological Chemistry Hoppe-Seyler **372**(4): 287-296.
- Hitaka, Y., A. Nakano, K. Tsukigawa, H. Manabe, H. Nakamura, D. Nakano, J. Kinjo, T. Nohara and H. Maeda (2013). "Characterization of carotenoid fatty acid esters

- from the peels of the persimmon *Diospyros kaki*." Chem Pharm Bull (Tokyo) **61**(6): 666-669.
- Hogan, S. P., H. F. Rosenberg, R. Moqbel, S. Phipps, P. S. Foster, P. Lacy, A. B. Kay and M. E. Rothenberg (2008). "Eosinophils: biological properties and role in health and disease." Clin Exp Allergy **38**(5): 709-750.
- Holmdahl, R., L. Jansson, A. Larsson and R. Jonsson (1990). "Arthritis in Dbal/1 Mice Induced with Passively Transferred Type-Ii Collagen Immune Serum - Immunohistopathology and Serum Levels of Anti-Type-Ii Collagen Autoantibodies." Scandinavian Journal of Immunology **31**(2): 147-157.
- Honary, S. and F. Zahir (2013). "Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2)." Tropical Journal of Pharmaceutical Research **12**(2): 265-273.
- Hua, J. and R. J. Muschel (1996). "Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system." Cancer Res **56**(22): 5279-5284.
- Huang, D., B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan and R. L. Prior (2002). "High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format." J Agric Food Chem **50**(16): 4437-4444.
- Huang, D., B. Ou and R. L. Prior (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays." J Agric Food Chem **53**(6): 1841-1856.
- Huang, M. T., G. Ghai and C. T. Ho (2004). "Inflammatory process and molecular targets for anti-inflammatory nutraceuticals." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **3**(4): 127-139.
- Huang, P.-L., C.-W. Chi and T.-Y. Liu (2010). "Effects of Areca catechu L. containing procyanidins on cyclooxygenase-2 expression in vitro and in vivo." Food and Chemical Toxicology **48**(1): 306-313.
- Huang, W., A. Xue, H. Niu, Z. Jia and J. W. Wang (2009). "Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from Folium eucommiae and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro." Food chemistry **114**(3): 1147-1154.
- Huang, Y.-B., M.-J. Tsai, P.-C. Wu, Y.-H. Tsai, Y.-H. Wu and J.-Y. Fang (2011). "Elastic liposomes as carriers for oral delivery and the brain distribution of (+)-catechin." J Drug Target **19**(8): 709-718.
- Huhtala, P., A. Tuuttila, L. T. Chow, J. Lohi, J. Keski-Oja and K. Tryggvason (1991). "Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells." J Biol Chem **266**(25): 16485-16490.
- Huscher, D., S. Merkesdal, K. Thiele, H. Zeidler, M. Schneider and A. Zink (2006). "Cost of illness in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and systemic lupus erythematosus in Germany." Ann Rheum Dis **65**(9): 1175-1183.
- Hussain, N., V. Jaitley and A. T. Florence (2001). "Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics." Adv Drug Deliv Rev **50**(1-2): 107-142.
- Hwang, K.-A., Y.-J. Hwang, I. G. Hwang, J. Song and S. M. Cho (2017). "Cholesterol-lowering effect of astringent persimmon fruits (*Diospyros kaki* Thunb.) extracts." Food Science and Biotechnology **26**(1): 229-235.

- Ignat, I., I. Volf and V. I. Popa (2011). "A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables." Food chemistry **126**(4): 1821-1835.
- Impellizzeri, D., G. Bruschetta, R. Di Paola, A. Ahmad, M. Campolo, S. Cuzzocrea, E. Esposito and M. Navarra (2014). "The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (BJe) in an experimental model of inflammatory bowel disease." Clin Nutr.
- Inaba, A., Y. Sobajima and M. Ishida (1971). "Seasonal changes in the major components of kaki fruits." Kyoto Prefect Univ Fac Agr Sci Rep.
- Indena. (2018). "PHYTOSOME® PRODUCTS." Retrieved 27-06-2018, 2018.
- INSA and I. N. d. S. D. R. Jorge (2018). "Tabela da Composição de Alimentos (TCA) ".
- Itoh, T., M. Tanioka, H. Yoshida, T. Yoshioka, H. Nishimoto and S. Itohara (1998). "Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice." Cancer Res **58**(5): 1048-1051.
- Izuchi, R., Y. Nakai, H. Takahashi, S. Ushiyama, S. Okada, T. Misaka and K. Abe (2011). "Hepatic Gene Expression of the Insulin Signaling Pathway Is Altered by Administration of Persimmon Peel Extract: A DNA Microarray Study Using Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats." J Agric Food Chem **59**(7): 3320-3329.
- Jacob, R. A. and B. J. Burri (1996). "Oxidative damage and defense." Am J Clin Nutr **63**(6): 985S-990S.
- Jang, I.-C., W.-G. Oh, G.-H. Ahn, J.-H. Lee and S.-C. Lee (2011). "Antioxidant activity of 4 cultivars of persimmon fruit." Food Science and Biotechnology **20**(1): 71-77.
- Jang, I. C., E. K. Jo, M. S. Bae, H. J. Lee, G. I. Jeon, E. Park, H. G. Yuk, G. H. Ahn and S. C. Lee (2010). "Antioxidant and antigenotoxic activities of different parts of persimmon (*Diospyros kaki* cv. Fuyu) fruit." Journal of Medicinal Plants Research **4**(2): 155-160.
- Jani, P., G. W. Halbert, J. LANGRIDGE and A. T. Florence (1990). "Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency." Journal of pharmacy and pharmacology **42**(12): 821-826.
- Jian, Y.-T., G.-F. Mai, J.-D. Wang, Y.-L. Zhang, R.-C. Luo and Y.-X. Fang (2005). "Preventive and therapeutic effects of NF-kappaB inhibitor curcumin in rats colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid." World journal of gastroenterology: WJG **11**(12): 1747-1752.
- Jiang, W., B. Y. Kim, J. T. Rutka and W. C. Chan (2008). "Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent." Nature nanotechnology **3**(3): 145.
- Jimenez-Sanchez, C., J. Lozano-Sanchez, N. Marti, D. Saura, M. Valero, A. Segura-Carretero and A. Fernandez-Gutierrez (2015). "Characterization of polyphenols, sugars, and other polar compounds in persimmon juices produced under different technologies and their assessment in terms of compositional variations." Food chemistry **182**: 282-291.
- Jones, D. T., M. T. Osterman, M. Bewtra and J. D. Lewis (2008). "Passive smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis." Am J Gastroenterol **103**(9): 2382-2393.
- Jung, S. T., Y. S. Park, Z. Zachwieja, M. Folta, H. Barton, J. Piotrowicz, E. Katrich, S. Trakhtenberg and S. Gorinstein (2005). "Some essential phytochemicals and the antioxidant potential in fresh and dried persimmon." Int J Food Sci Nutr **56**(2): 105-113.

- Jung, W. J. and M. K. Sung (2004). "Effects of major dietary antioxidants on inflammatory markers of RAW 264.7 macrophages." Biofactors **21**(1-4): 113-117.
- Kampa, M., V. I. Alexaki, G. Notas, A. P. Nifli, A. Nistikaki, A. Hatzoglou, E. Bakogeorgou, E. Kouimtoglou, G. Blekas, D. Boskou, A. Gravanis and E. Castanas (2004). "Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action." Breast Cancer Res **6**(2): R63-74.
- Kampa, M., A. Nistikaki, A. Hatzoglou, H. Kouimtoglou, D. Boskou, J. Vercauteren, A. Gravanis and E. Castanas (2002). "Phenolic acids and polyphenols are potent inhibitors of cancer cell proliferation: assessment and mechanisms of action." Polyphenols 2002: Recent Advances in Polyphenols Research: 62-93.
- Karar, M. E. and N. Kuhnert (2015). "UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) leaves, fruits and their herbal derived drops (*Crataegutt Tropfen*)." J Chem Biol Ther **1**(102): 2572-0406.1000102.
- Kaur, C. and H. C. Kapoor (2002). "Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables." International Journal of Food Science & Technology **37**(2): 153-161.
- Kawase, M., N. Motohashi, K. Satoh, H. Sakagami, H. Nakashima, S. Tani, Y. Shirataki, T. Kurihara, G. Spengler, K. Wolfard and J. Molnar (2003). "Biological activity of persimmon (*Diospyros kaki*) peel extracts." Phytother Res **17**(5): 495-500.
- Keisari, Y., L. Braun and E. Flescher (1983). "The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli." Immunobiology **165**(1): 78-89.
- Kevers, C., M. Falkowski, J. Tabart, J. O. Defraigne, J. Dommès and J. Pincemail (2007). "Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables." J Agric Food Chem **55**(21): 8596-8603.
- Khanal, P., W.-K. Oh, P. T. Thuong, S. D. Cho and H. S. Choi (2010). "24-Hydroxyursolic acid from the leaves of the *Diospyros kaki* (Persimmon) induces apoptosis by activation of AMP-activated protein kinase." Planta Med **76**(07): 689-693.
- Khanal, P., W. K. Oh, P. T. Thuong, S. D. Cho and H. S. Choi (2010). "24-Hydroxyursolic Acid from the Leaves of the *Diospyros kaki* (Persimmon) Induces Apoptosis by Activation of AMP-activated Protein Kinase." Planta Med **76**(7): 689-693.
- Kidd, P. and K. Head (2005). "A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin-phosphatidylcholine complex (*Siliphos*<sup>®</sup>)." Alternative medicine review **10**(3): 193.
- Kidd, P. M. (1996). "Phosphatidylcholine, a superior protectant against liver damage." Altern Med Rev **1**(4): 258-274.
- Kim, E. O., H. Lee, C. H. Cho, Y. J. Kim and D.-O. Kim (2011). "Antioxidant capacity and anti-inflammatory effect of the ethyl acetate fraction of dried persimmon (*Diospyros kaki* Thumb.) on THP-1 human acute monocytic leukemia cell line." Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry **54**(4): 606-611.
- Kim, H. H., D. S. Kim, S. W. Kim, S. H. Lim, D. K. Kim, T. Y. Shin and S. H. Kim (2013). "Inhibitory effects of *Diospyros kaki* in a model of allergic inflammation: role of cAMP, calcium and nuclear factor-kappaB." Int J Mol Med **32**(4): 945-951.

- Kim, T. D., K. S. Song, G. Li, H. Choi, H. D. Park, K. Lim, B. D. Hwang and W. H. Yoon (2006). "Activity and expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinases in human colorectal cancer." BMC Cancer **6**: 211.
- Kim, Y. J. and T. Yokozawa (2009). "Modulation of oxidative stress and melanogenesis by proanthocyanidins." Biol Pharm Bull **32**(7): 1155-1159.
- Klareskog, L., A. I. Catrina and S. Paget (2009). "Rheumatoid arthritis." Lancet **373**(9664): 659-672.
- Klein, T. and R. Bischoff (2011). "Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases." Amino Acids **41**(2): 271-290.
- Kobelt, G., K. Eberhardt, L. Jonsson and B. Jonsson (1999). "Economic consequences of the progression of rheumatoid arthritis in Sweden." Arthritis Rheum **42**(2): 347-356.
- Kolios, G., V. Valatas and S. G. Ward (2004). "Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle." Immunology **113**(4): 427-437.
- Kondo, S., H. Yoshikawa and R. Katayama (2004). "Antioxidant activity in astringent and non-astringent persimmons." Journal of horticultural science & biotechnology **79**(3): 390-394.
- Konig, D., A. Berg, C. Weinstock, J. Keul and H. Northoff (1997). "Essential fatty acids, immune function, and exercise." Exerc Immunol Rev **3**: 1-31.
- Koppel, D. E. (1972). "Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy - Method of Cumulants." Journal of Chemical Physics **57**(11): 4814-&.
- Kowalski, J., A. Samojedny, M. Paul, G. Pietsz and T. Wilczok (2005). "Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages." Pharmacol Rep **57**(3): 390-394.
- Kozuch, P. L. and S. B. Hanauer (2008). "Treatment of inflammatory bowel disease: a review of medical therapy." World J Gastroenterol **14**(3): 354-377.
- Kraft, J. C., J. P. Freeling, Z. Wang and R. J. Y. Ho (2014). "Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems." Journal of pharmaceutical sciences **103**(1): 29-52.
- Kumar, S. and A. K. Pandey (2013). "Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview." Scientific World Journal.
- Kuppusamy, P., M. M. Yusoff, G. P. Maniam, S. J. A. Ichwan, I. Soundharrajan and N. Govindan (2014). "Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: a review." Acta Pharmaceutica Sinica B **4**(3): 173-181.
- Labianca, R., G. D. Beretta, B. Kildani, L. Milesi, F. Merlin, S. Mosconi, M. A. Pessi, T. Prochilo, A. Quadri, G. Gatta, F. de Braud and J. Wils (2010). "Colon cancer." Crit Rev Oncol Hematol **74**(2): 106-133.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lamas, S., P. A. Marsden, G. K. Li, P. Tempst and T. Michel (1992). "Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6348-6352.

- Lapornik, B., M. Prosek and A. G. Wondra (2005). "Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time." Journal of food engineering **71**(2): 214-222.
- Lee, I. K., M. N. VanSaun, J. H. Shim, L. M. Matrisian and D. L. Gorden (2013). "Increased metastases are associated with inflammation and matrix metalloproteinase-9 activity at incision sites in a murine model of peritoneal dissemination of colorectal cancer." Journal of Surgical Research **180**(2): 252-259.
- Lee, J. E., G.-S. Kim, S. Park, Y.-H. Kim, M.-B. Kim, W. S. Lee, S. W. Jeong, S. J. Lee, J. S. Jin and S. C. Shin (2014). "Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity." Food chemistry **146**: 1-5.
- Lee, M. S., I. I. Lee, Y. Kim, Y. J. Kim, H. J. Heo and D.-O. Kim (2014). "Inhibitory effect of the ethyl acetate fraction from astringent persimmon on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in HepG2 cells." Food Science and Biotechnology **23**(4): 1247-1252.
- Lee, S. O., S. K. Chung and I. S. Lee (2006). "The antidiabetic effect of dietary persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Sangjudungsi) peel in streptozotocin-induced diabetic rats." J Food Sci **71**(3): S293-S298.
- Lee, Y. A., E. J. Cho and T. Yokozawa (2008). "Effects of proanthocyanidin preparations on hyperlipidemia and other biomarkers in mouse model of type 2 diabetes." J Agric Food Chem **56**(17): 7781-7789.
- Leong, L. and G. Shui (2002). "An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets." Food chemistry **76**(1): 69-75.
- Levy, B. D., C. B. Clish, B. Schmidt, K. Gronert and C. N. Serhan (2001). "Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution." Nat Immunol **2**(7): 612-619.
- Lewis, R. A., K. F. Austen and R. J. Soberman (1990). "Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases." N Engl J Med **323**(10): 645-655.
- Li, C. M., R. Leverence, J. D. Trombley, S. F. Xu, J. Yang, Y. Tian, J. D. Reed and A. E. Hagerman (2010). "High Molecular Weight Persimmon (*Diospyros kaki* L.) Proanthocyanidin: A Highly Galloylated, A-Linked Tannin with an Unusual Flavonol Terminal Unit, Myricetin." J Agric Food Chem **58**(16): 9033-9042.
- Li, P. M., G. R. Du and F. W. Ma (2011). "Phenolics concentration and antioxidant capacity of different fruit tissues of astringent versus non-astringent persimmons." Scientia Horticulturae **129**(4): 710-714.
- Li, W., S. Yi, Z. Wang, S. Chen, S. Xin, J. Xie and C. Zhao (2011). "Self-nanoemulsifying drug delivery system of persimmon leaf extract: optimization and bioavailability studies." Int J Pharm **420**(1): 161-171.
- Lila, M. A. (2007). "From beans to berries and beyond - Teamwork between plant chemicals for protection of optimal human health." Healthy Aging and Longevity **1114**: 372-380.
- Lima-Garcia, J., R. Dutra, K. Da Silva, E. Motta, M. Campos and J. Calixto (2011). "The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-

- hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats." Br J Pharmacol **164**(2): 278-293.
- Lima, A. I. G., J. Mota, S. A. V. S. Monteiro and R. M. S. B. Ferreira (2016). "Legume seeds and colorectal cancer revisited: Protease inhibitors reduce MMP-9 activity and colon cancer cell migration." Food chemistry **197**: 30-38.
- Liotta, L. A., U. P. Thorgeirsson and S. Garbisa (1982). "Role of collagenases in tumor cell invasion." Cancer Metastasis Rev **1**(4): 277-288.
- Lipinski, C. A., F. Lombardo, B. W. Dominy and P. J. Feeney (2001). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings1." Advanced Drug Delivery Reviews **46**(1-3): 3-26.
- Liu, R. H. (2004). "Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action." J Nutr **134**(12): 3479S-3485S.
- Loftus, E. V. (2004). "Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences." Gastroenterology **126**(6): 1504-1517.
- Loftus, E. V., Jr., P. Schoenfeld and W. J. Sandborn (2002). "The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review." Aliment Pharmacol Ther **16**(1): 51-60.
- Loguercio, C., A. Federico, M. Trappoliere, C. Tuccillo, I. De Sio, A. Di Leva, M. Niosi, M. V. D'Auria, R. Capasso and C. D. V. Blanco (2007). "The effect of a silybin-vitamin e-phospholipid complex on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study." Dig Dis Sci **52**(9): 2387-2395.
- Loizzo, M. R., A. Pugliese, M. Bonesi, M. C. Tenuta, F. Menichini, J. Xiao and R. Tundis (2016). "Edible Flowers: A Rich Source of Phytochemicals with Antioxidant and Hypoglycemic Properties." J Agric Food Chem **64**(12): 2467-2474.
- Lowenstein, C. J., J. L. Dinerman and S. H. Snyder (1994). "Nitric-Oxide - a Physiological Messenger." Ann Intern Med **120**(3): 227-237.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Lundberg, J. O., P. M. Hellström, M. K. Fagerhol, E. Weitzberg and A. G. Roseth (2005). "Technology insight: calprotectin, lactoferrin and nitric oxide as novel markers of inflammatory bowel disease." Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology **2**(2): 96-102.
- Maiti, K., K. Mukherjee, A. Gantait, B. P. Saha and P. K. Mukherjee (2007). "Curcumin-phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats." Int J Pharm **330**(1-2): 155-163.
- Mallavadhani, U. V., A. K. Panda and Y. R. Rao (1998). "Pharmacology and chemotaxonomy of Diospyros." Phytochemistry **49**(4): 901-951.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy and L. Jimenez (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." American Journal of Clinical Nutrition **79**(5): 727-747.
- Manda-Handzlik, A. and U. Demkow (2015). "Neutrophils: The Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Health and Disease." Adv Exp Med Biol **857**: 51-60.
- Mapp, P. I., M. C. Grootveld and D. R. Blake (1995). "Hypoxia, Oxidative Stress and Rheumatoid-Arthritis." Br Med Bull **51**(2): 419-436.



- Marchenko, G. N., B. I. Ratnikov, D. V. Rozanov, A. Godzik, E. I. Deryugina and A. Y. Strongin (2001). "Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin." Biochemical Journal **356**: 705-718.
- Markle, B., E. J. May and A. P. N. Majumdar (2010). "Do nutraceuticals play a role in the prevention and treatment of colorectal cancer?" Cancer and Metastasis Reviews **29**(3): 395-404.
- Markopoulos, C., F. Thoenen, D. Preisig, M. Symillides, M. Vertzoni, N. Parrott, C. Reppas and G. Imanidis (2014). "Biorelevant media for transport experiments in the Caco-2 model to evaluate drug absorption in the fasted and the fed state and their usefulness." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **86**(3): 438-448.
- Markovic, Z., D. Milenkovic, J. Dorovic, J. M. Dimitric Markovic, V. Stepanic, B. Lucic and D. Amic (2012). "Free radical scavenging activity of morin 2'-O(-) phenoxide anion." Food Chem **135**(3): 2070-2077.
- Martinez-Gonzalez, M. A., C. de la Fuente-Arrillaga, J. M. Nunez-Cordoba, F. J. Basterra-Gortari, J. J. Beunza, Z. Vazquez, S. Benito, A. Tortosa and M. Bes-Rastrollo (2008). "Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study." BMJ **336**(7657): 1348-1351.
- Martinez-Las Heras, R., E. F. Landines, A. Heredia, M. L. Castello and A. Andres (2017). "Influence of drying process and particle size of persimmon fibre on its physicochemical, antioxidant, hydration and emulsifying properties." J Food Sci Technol **54**(9): 2902-2912.
- Martínez-Las Heras, R., A. Pinazo, A. Heredia and A. Andrés (2017). "Evaluation studies of persimmon plant (*Diospyros kaki*) for physiological benefits and bioaccessibility of antioxidants by in vitro simulated gastrointestinal digestion." Food chemistry **214**(Supplement C): 478-485.
- Masuda, H., S. Iwai, T. Tanaka and S. Hayakawa (1994). "Expression of IL-8, TNF-alpha and IFN-gamma m-RNA in ulcerative colitis, particularly in patients with inactive phase." J Clin Lab Immunol **46**(3): 111-123.
- Mathy, C., K. Schneider, Y. Y. Chen, M. Varma, J. P. Terdiman and U. Mahadevan (2003). "Gross versus microscopic pancolitis and the occurrence of neoplasia in ulcerative colitis." Inflamm Bowel Dis **9**(6): 351-355.
- Matias, D., L. Roque, M. d. F. Simões, A. Diaz-Lanza, P. Rijo and C. P. Reis (2015). "Plectranthus madagascariensis phytosomes: formulation optimization."
- Matito, C., F. Mastorakou, J. J. Centelles, J. L. Torres and M. Cascante (2003). "Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7." European Journal of Nutrition **42**(1): 43-49.
- Matsumoto, K., A. Kadowaki, N. Ozaki, M. Takenaka, H. Ono, S. Yokoyama and N. Gato (2011). "Bile acid-binding ability of kaki-tannin from young fruits of persimmon (*Diospyros kaki*) in vitro and in vivo." Phytother Res **25**(4): 624-628.
- Matsumoto, K., Y. Watanabe, M. A. Ohya and S. Yokoyama (2006). "Young persimmon fruits prevent the rise in plasma lipids in a diet-induced murine obesity model." Biol Pharm Bull **29**(12): 2532-2535.
- Matsumoto, K., S. Yokoyama and N. Gato (2010). "Bile acid-binding activity of young persimmon (*Diospyros kaki*) fruit and its hypolipidemic effect in mice." Phytother Res **24**(2): 205-210.

- Matsuo, S. (1978). "The chemical structure of kaki-tannin from immature fruit of the persimmon (*Diospyros kaki* L.)." *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1637-1643.
- Maulidiani, M., A. Mediani, F. Abas, Y. S. Park, Y.-K. Park, Y. M. Kim and S. Gorinstein (2018). "1 H NMR and antioxidant profiles of polar and non-polar extracts of persimmon (*Diospyros kaki* L) - metabolomics study based on cultivars and origins." *Talanta*.
- Mauri, P., P. Simonetti, C. Gardana, M. Minoggio, P. Morazzoni, E. Bombardelli and P. Pietta (2001). "Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of terpene lactones in plasma of volunteers dosed with *Ginkgo biloba* L. extracts." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **15**(12): 929-934.
- Mayer, L. (2010). "Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD." *J Gastroenterol* **45**(1): 9-16.
- McInnes, I. B. (2001). "Rheumatoid arthritis. From bench to bedside." *Rheum Dis Clin North Am* **27**(2): 373-387.
- McInnes, I. B. and F. Y. Liew (2005). "Cytokine networks--towards new therapies for rheumatoid arthritis." *Nat Clin Pract Rheumatol* **1**(1): 31-39.
- McInnes, I. B. and G. Schett (2007). "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Nat Rev Immunol* **7**(6): 429-442.
- Medicines, R. o. (2004). "SADC GUIDELINE FOR STABILITY TESTING."
- Melnicoff, M. J., P. K. Horan and P. S. Morahan (1989). "Kinetics of changes in peritoneal cell populations following acute inflammation." *Cell Immunol* **118**(1): 178-191.
- Michels, K. B., G. Edward, K. J. Joshipura, B. A. Rosner, M. J. Stampfer, C. S. Fuchs, G. A. Colditz, F. E. Speizer and W. C. Willett (2000). "Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers." *J Natl Cancer Inst* **92**(21): 1740-1752.
- Mikhailov, T. A. and S. E. Furner (2009). "Breastfeeding and genetic factors in the etiology of inflammatory bowel disease in children." *World J Gastroenterol* **15**(3): 270-279.
- Mikulic-Petkovsek, M., F. Stampar and R. Veberic (2007). "Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.)." *Scientia Horticulturae* **114**(1): 37-44.
- Mir-Marqués, A., A. Domingo, M. L. Cervera and M. de la Guardia (2015). "Mineral profile of kaki fruits (*Diospyros kaki* L.)." *Food chemistry* **172**: 291-297.
- Molodecky, N. A., I. S. Soon, D. M. Rabi, W. A. Ghali, M. Ferris, G. Chernoff, E. I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, H. W. Barkema and G. G. Kaplan (2012). "Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review." *Gastroenterology* **142**(1): 46-54.e42.
- Moreland, L. W., M. C. Genovese, R. Sato and A. Singh (2006). "Effect of etanercept on fatigue in patients with recent or established rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **55**(2): 287-293.
- Morris, G. P., P. L. Beck, M. S. Herridge, W. T. Depew, M. R. Szewczuk and J. L. Wallace (1989). "Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon." *Gastroenterology* **96**(3): 795-803.
- Mowat, C., A. Cole, A. Windsor, T. Ahmad, I. Arnott, R. Driscoll, S. Mitton, T. Orchard, M. Rutter, L. Younge, C. Lees, G. T. Ho, J. Satsangi and S. Bloom (2011).

- "Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults." Gut **60**(5): 571-607.
- Murakami, A., H. Ashida and J. Terao (2008). "Multitargeted cancer prevention by quercetin." Cancer Lett **269**(2): 315-325.
- Murch, O., M. Collin, B. Sepodes, S. J. Foster, H. Mota-Filipe and C. Thiemermann (2006). "Lysophosphatidylcholine reduces the organ injury and dysfunction in rodent models of gram-negative and gram-positive shock." Br J Pharmacol **148**(6): 769-777.
- Murch, S. H., V. A. Lamkin, M. O. Savage, J. A. Walker-Smith and T. T. MacDonald (1991). "Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease." Gut **32**(8): 913-917.
- Murthy, S. (2006). Animal models of inflammatory bowel disease. In vivo models of inflammation, Springer: 137-174.
- Naczka, M. and F. Shahidi (2006). "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis." J Pharm Biomed Anal **41**(5): 1523-1542.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**(31): 21491-21494.
- Nandakumar, K. S. and R. Holmdahl (2007). "Collagen antibody induced arthritis." Methods Mol Med **136**: 215-223.
- Nel, A. E., L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova and M. Thompson (2009). "Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface." Nature materials **8**(7): 543.
- Neurath, M. F., I. Fuss, B. L. Kelsall, E. Stuber and W. Strober (1995). "Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice." J Exp Med **182**(5): 1281-1290.
- Newman, D. J. and G. M. Cragg (2012). "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010." J Nat Prod **75**(3): 311-335.
- Nicolai, M., P. Pereira, R. F. Vitor, C. P. Reis, A. Roberto and P. Rijo (2016). "Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants." Measurement **89**: 328-332.
- Nikkola, J., P. Vihinen, M. S. Vuoristo, P. Kellokumpu-Lehtinen, V. M. Kahari and S. Pyrhonen (2005). "High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma." Clin Cancer Res **11**(14): 5158-5166.
- Nishino, H., M. Murakoshi, T. Ii, M. Takemura, M. Kuchide, M. Kanazawa, X. Y. Mou, S. Wada, M. Masuda, Y. Ohsaka, S. Yogosawa, Y. Satomi and K. Jinno (2002). "Carotenoids in cancer chemoprevention." Cancer Metastasis Rev **21**(3-4): 257-264.
- Nogueira, E., A. C. Gomes, A. Preto and A. Cavaco-Paulo (2015). "Design of liposomal formulations for cell targeting." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **136**: 514-526.
- Nordberg, J. and E. S. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." Free Radical Biology and Medicine **31**(11): 1287-1312.
- NP-3030 (1985). "Instituto Português da Qualidade (IPQ), Portugal."
- OCDE (2014). "Health at a glance: Europe 2014." OECD Publishing: 1-142.

- Ogasawara, M., T. Matsunaga and H. Suzuki (2007). "Differential effects of antioxidants on the in vitro invasion, growth and lung metastasis of murine colon cancer cells." Biol Pharm Bull **30**(1): 200-204.
- Ognjanovic, S. and P. Hainaut (2010). "Inflammation in carcinogenesis." Comprehensive Toxicology 2nd ed(14): 401-415.
- Ognjanovic, S. and P. Hainaut (2010). "Inflammation in carcinogenesis." Comprehensive Toxicology.
- Ogoina, D. and G. C. Onyemelukwe (2009). "The role of infections in the emergence of non-communicable diseases (NCDs): Compelling needs for novel strategies in the developing world." Journal of Infection and Public Health **2**(1): 14-29.
- Ohguchi, K., C. Nakajima, M. Oyama, M. Inuma, T. Itoh, Y. Akao, Y. Nozawa and M. Ito (2010). "Inhibitory effects of flavonoid glycosides isolated from the peel of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* 'Fuyu') on melanin biosynthesis." Biol Pharm Bull **33**(1): 122-124.
- Ohuchi, E., K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki and Y. Okada (1997). "Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules." J Biol Chem **272**(4): 2446-2451.
- Oliviero, F., P. Spinella, U. Fiocco, R. Ramonda, P. Sfriso and L. Punzi (2015). "How the Mediterranean diet and some of its components modulate inflammatory pathways in arthritis." Swiss Med Wkly **145**: w14190.
- OMAIAA. (2011). "A Produção e Comercialização do Dióspiro em Portugal." Retrieved Janeiro 25, 2016, from [http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id\\_item=117](http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=117).
- Orak, H. H. (2007). "Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations." Scientia Horticulturae **111**(3): 235-241.
- Ordás, I., L. Eckmann, M. Talamini, D. C. Baumgart and W. J. Sandborn (2012). "Ulcerative colitis." The Lancet **380**(9853): 1606-1619.
- Organization, W. H. (2009). "WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations." WHO Technical Report Series(953).
- Organization, W. H. (2013). "Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020."
- Ortega, R. M. (2006). "Importance of functional foods in the Mediterranean diet." Public Health Nutrition **9**(8A): 1136-1140.
- Ou, B., M. Hampsch-Woodill, J. Flanagan, E. K. Deemer, R. L. Prior and D. Huang (2002). "Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe." J Agric Food Chem **50**(10): 2772-2777.
- Ozen, A., A. Colak, B. Dincer and S. Guner (2004). "A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., Ebenaceae)." Food chemistry **85**(3): 431-437.
- Page-McCaw, A., A. J. Ewald and Z. Werb (2007). "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 221-233.
- Pan, M.-H., C.-S. Lai, S. Dushenkov and C.-T. Ho (2009). "Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds." J Agric Food Chem **57**(11): 4467-4477.
- Panda, V. S. and S. R. N (2009). "Evaluation of cardioprotective activity of Ginkgo biloba and Ocimum sanctum in rodents." Altern Med Rev **14**(2): 161-171.

- Parada, J. and J. M. Aguilera (2007). "Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients." J Food Sci **72**(2): R21-32.
- Park, Y., H. Leontowicz, M. Leontowicz, J. Namiesnik, I. Jesion and S. Gorinstein (2008). "Nutraceutical value of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) and its influence on some indices of atherosclerosis in an experiment on rats fed cholesterol-containing diet." Advances in Horticultural Science **22**: 250-254.
- Park, Y. S., S. T. Jung, S. G. Kang, E. Delgado-Licon, A. L. M. Ayala, M. S. Tapia, O. Martin-Belloso, S. Trakhtenberg and S. Gorinstein (2006). "Drying of persimmons (*Diospyros kaki* L.) and the following changes in the studied bioactive compounds and the total radical scavenging activities." Lwt-Food Science and Technology **39**(7): 748-755.
- Parks, W. C., C. L. Wilson and Y. S. Lopez-Boado (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." Nature Reviews Immunology **4**(8): 617-629.
- Parsons, S. L., S. A. Watson, H. M. Collins, N. R. Griffin, P. A. Clarke and R. J. Steele (1998). "Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy." Br J Cancer **78**(11): 1495-1502.
- Parthasarathi, S., S. P. Muthukumar and C. Anandharamakrishnan (2016). "The influence of droplet size on the stability, in vivo digestion, and oral bioavailability of vitamin E emulsions." Food Funct **7**(5): 2294-2302.
- Patil, S., A. Sandberg, E. Heckert, W. Self and S. Seal (2007). "Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential." Biomaterials **28**(31): 4600-4607.
- Pattison, D. J., R. A. Harrison and D. P. Symmons (2004). "The role of diet in susceptibility to rheumatoid arthritis: a systematic review." J Rheumatol **31**(7): 1310-1319.
- Pauli, B. U., D. E. Schwartz, E. J. Thonar and K. E. Kuettner (1983). "Tumor invasion and host extracellular matrix." Cancer Metastasis Rev **2**(2): 129-152.
- Pei, X., Q. Zhang, D. Guo and Z. Luo (2013). "Effectiveness of the RO2 marker for the identification of non-astringency trait in Chinese PCNA persimmon and its possible segregation ratio in hybrid F1 population." Scientia Horticulturae **150**: 227-231.
- Pérez-Burillo, S., M. J. Oliveras, J. Quesada, J. A. Rufián-Henares and S. Pastoriza (2018). "Relationship between composition and bioactivity of persimmon and kiwifruit." Food Research International **105**(Supplement C): 461-472.
- Pettit, A. R., H. Ji, D. von Stechow, R. Muller, S. R. Goldring, Y. Choi, C. Benoist and E. M. Gravalles (2001). "TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis." Am J Pathol **159**(5): 1689-1699.
- Pietta, P. G. (2000). "Flavonoids as antioxidants." J Nat Prod **63**(7): 1035-1042.
- Pinto, J. F., C. Almeida, E. Carrilho, M. Figueira, M. Gonçalves, A. Martins, M. Mesquita, M. Soares, G. Soveral and O. Silva (2010). "Nutracêuticos e alimentos funcionais." Lidel-ed. Lisboa: 3-14.
- Piretti, M. V. (1991). "Polyphenol constituents of the *Diospyros kaki* fruit. A review. ." Fitoterapia **62**(1): 3-13

- Pithadia, A. B. and S. Jain (2011). "Treatment of inflammatory bowel disease (IBD)." Pharmacological Reports **63**(3): 629-642.
- Plant, M. J., P. W. Jones, J. Saklatvala, W. E. Ollier and P. T. Dawes (1998). "Patterns of radiological progression in early rheumatoid arthritis: results of an 8 year prospective study." J Rheumatol **25**(3): 417-426.
- Podolsky, D. K. (1991). "Inflammatory bowel disease." New England Journal of Medicine **325**(13): 928-937.
- Podolsky, D. K. (2002). "The current future understanding of inflammatory bowel disease." Best Pract Res Clin Gastroenterol **16**(6): 933-943.
- Porter, N. A. (2013). "A Perspective on Free Radical Autoxidation: The Physical Organic Chemistry of Polyunsaturated Fatty Acid and Sterol Peroxidation." Journal of Organic Chemistry **78**(8): 3511-3524.
- Prior, R. L., G. H. Cao, A. Martin, E. Sofic, J. McEwen, C. O'Brien, N. Lischner, M. Ehlenfeldt, W. Kalt, G. Krewer and C. M. Mainland (1998). "Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of Vaccinium species." J Agric Food Chem **46**(7): 2686-2693.
- Prochazkova, D., I. Bousova and N. Wilhelmova (2011). "Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids." Fitoterapia **82**(4): 513-523.
- Prokop, A., E. Kozlov, G. Carlesso and J. M. Davidson (2002). Hydrogel-based colloidal polymeric system for protein and drug delivery: physical and chemical characterization, permeability control and applications. Filled Elastomers Drug Delivery Systems, Springer: 119-173.
- Pu, F., X.-L. Ren and X.-P. Zhang (2013). "Phenolic compounds and antioxidant activity in fruits of six Diospyros kaki genotypes." European Food Research and Technology **237**(6): 923-932.
- Puttipipatkachorn, S., J. Nunthanid, K. Yamamoto and G. Peck (2001). "Drug physical state and drug-polymer interaction on drug release from chitosan matrix films." Journal of Controlled Release **75**(1-2): 143-153.
- Qin, H. Y., J. C. Wu, X. D. Tong, J. J. Sung, H. X. Xu and Z. X. Bian (2011). "Systematic review of animal models of post-infectious/post-inflammatory irritable bowel syndrome." J Gastroenterol **46**(2): 164-174.
- Quifer-Rada, P., A. Vallverdu-Queralt, M. Martinez-Huelamo, G. Chiva-Blanch, O. Jauregui, R. Estruch and R. Lamuela-Raventos (2015). "A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS)." Food chemistry **169**: 336-343.
- Rahman, I., S. K. Biswas and P. A. Kirkham (2006). "Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols." Biochem Pharmacol **72**(11): 1439-1452.
- Rao, A. V. and L. G. Rao (2007). "Carotenoids and human health." Pharmacol Res **55**(3): 207-216.
- Rasaie, S., S. Ghanbarzadeh, M. Mohammadi and H. Hamishehkar (2014). "Nano phytosomes of quercetin: A promising formulation for fortification of food products with antioxidants." Pharmaceutical sciences **20**(3): 96.
- Rasmussen, S. E., H. Frederiksen, K. Struntze Krogholm and L. Poulsen (2005). "Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease." Mol Nutr Food Res **49**(2): 159-174.

- Reagan-Shaw, S., M. Nihal and N. Ahmad (2008). "Dose translation from animal to human studies revisited." FASEB J **22**(3): 659-661.
- Redlich, K., S. Hayer, R. Ricci, J. P. David, M. Tohidast-Akrad, G. Kollias, G. Steiner, J. S. Smolen, E. F. Wagner and G. Schett (2002). "Osteoclasts are essential for TNF- $\alpha$ -mediated joint destruction." J Clin Invest **110**(10): 1419-1427.
- Ribeiro, D., M. Freitas, J. L. F. C. Lima and E. Fernandes (2015). "Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids." Medicinal Research Reviews **35**(5): 877-936.
- Ribeiro, D., M. Freitas, S. M. Tomé, A. M. S. Silva, G. Porto and E. Fernandes (2013). "Modulation of human neutrophils' oxidative burst by flavonoids." European Journal of Medicinal Chemistry(67): 280 - 292.
- Rice-Evans, C., N. Miller and G. Paganga (1997). "Antioxidant properties of phenolic compounds." Trends in plant science **2**(4): 152-159.
- Rijo, P., D. Matias, A. S. Fernandes, M. F. Simões, M. Nicolai and C. P. Reis (2014). "Antimicrobial plant extracts encapsulated into polymeric beads for potential application on the skin." Polymers **6**(2): 479-490.
- Rocha, J., M. Eduardo-Figueira, A. Barateiro, A. Fernandes, D. Brites, R. Bronze, C. M. Duarte, A. T. Serra, R. Pinto, M. Freitas, E. Fernandes, B. Silva-Lima, H. Mota-Filipe and B. Sepodes (2015). "Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation." Basic Clin Pharmacol Toxicol **116**(5): 398-413.
- Roda, J. and T. D. Eubank (2012). "The cellular component of chronic inflammation." Chronic inflammation: 21-34.
- Rogler, G. (2009). "Medical management of ulcerative colitis." Digestive Diseases **27**(4): 542.
- Romano, M., D. E. F. F, L. Zarantonello, C. Ruffolo, G. A. Ferraro, G. Zanus, A. Giordano, N. Bassi and U. Cillo (2016). "From Inflammation to Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Molecular Perspectives." Anticancer Res **36**(4): 1447-1460.
- Rossi, R., F. Basilico, G. Rossoni, A. Riva, P. Morazzoni and P. L. Mauri (2009). "Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization ion trap mass spectrometry of bilobalide in plasma and brain of rats after oral administration of its phospholipidic complex." J Pharm Biomed Anal **50**(2): 224-227.
- Roubenoff, R. (2009). "Rheumatoid cachexia: a complication of rheumatoid arthritis moves into the 21st century." Arthritis Res Ther **11**(2): 108.
- Roubenoff, R., R. A. Roubenoff, J. G. Cannon, J. J. Kehayias, H. Zhuang, B. Dawson-Hughes, C. A. Dinarello and I. H. Rosenberg (1994). "Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation." J Clin Invest **93**(6): 2379-2386.
- Roy, S., D. Bagchi and S. P. Raychaudhuri (2012). Chronic Inflammation: Molecular Pathophysiology, Nutritional and Therapeutic Interventions, CRC Press.
- Ryan, G. B. and G. Majno (1977). "Acute inflammation. A review." Am J Pathol **86**(1): 183.
- Ryu, S., K. Furihata, M. Koda, F. Wei, T. Miyakawa and M. Tanokura (2016). "NMR-based analysis of the chemical composition of Japanese persimmon aqueous extracts." Magn Reson Chem **54**(3): 213-221.

- Sabeh, F., X. Y. Li, T. L. Saunders, R. G. Rowe and S. J. Weiss (2009). "Secreted versus membrane-anchored collagenases: relative roles in fibroblast-dependent collagenolysis and invasion." J Biol Chem **284**(34): 23001-23011.
- Sahu, B. D., J. M. Kumar and R. Sistla (2016). "Fisetin, a dietary flavonoid, ameliorates experimental colitis in mice: Relevance of NF-kappaB signaling." J Nutr Biochem **28**: 171-182.
- Sakakibara, H., Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida and K. Kanazawa (2003). "Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas." J Agric Food Chem **51**(3): 571-581.
- Sánchez-Fidalgo, S., L. S. De Ibargüen, A. Cárdeno and C. A. de la Lastra (2012). "Influence of extra virgin olive oil diet enriched with hydroxytyrosol in a chronic DSS colitis model." European Journal of Nutrition **51**(4): 497-506.
- Santangelo, C., R. Vari, B. Scazzocchio, R. Di Benedetto, C. Filesi and R. Masella (2007). "Polyphenols, intracellular signalling and inflammation." Ann Ist Super Sanita **43**(4): 394-405.
- Santos, A. D. d. C., F. A. Fonseca, L. M. Dutra, M. d. F. C. Santos, L. R. A. Menezes, F. R. Campos, N. Nagata, R. Ayub and A. Barison (2018). "<sup>1</sup>H HR-MAS NMR-based metabolomics study of different persimmon cultivars (*Diospyros kaki*) during fruit development." Food chemistry **239**: 511-519.
- Saraf, S., J. Khan and A. Alexander (2013). "Ajazuddin & Saraf S., Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives." J. Control. Release **168**(1): 50-60.
- Sarkar, F. H., Y. Li, Z. Wang and D. Kong (2010). "The role of nutraceuticals in the regulation of Wnt and Hedgehog signaling in cancer." Cancer Metastasis Rev **29**(3): 383-394.
- Sattar, A., N. Bibi and M. A. Chaudry (1992). "Phenolic-Compounds in Persimmon during Maturation and on-Tree Ripening." Nahrung-Food **36**(5): 466-472.
- Sattar, N., D. W. McCarey, H. Capell and I. B. McInnes (2003). "Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis." Circulation **108**(24): 2957-2963.
- Saura-Calixto, F., J. Serrano and I. Goni (2007). "Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet." Food chemistry **101**(2): 492-501.
- Saxena, M., J. Saxena, R. Nema, D. Singh and A. Gupta (2013). "Phytochemistry of medicinal plants." Journal of pharmacognosy and phytochemistry **1**(6).
- Sbardella, D., G. F. Fasciglione, M. Gioia, C. Ciaccio, G. R. Tundo, S. Marini and M. Coletta (2012). "Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes." Mol Aspects Med **33**(2): 119-208.
- Scalbert, A., C. Manach, C. Morand, C. Remesy and L. Jimenez (2005). "Dietary polyphenols and the prevention of diseases." Crit Rev Food Sci Nutr **45**(4): 287-306.
- Scalbert, A. and G. Williamson (2000). "Dietary intake and bioavailability of polyphenols." J Nutr **130**(8S Suppl): 2073S-2085S.
- Schiller, J., J. Arnhold and K. Arnold (1995). "Action of hypochlorous acid on polymeric components of cartilage. Use of <sup>13</sup>C NMR spectroscopy." Z Naturforsch C **50**(9-10): 721-728.



- Schreck, R., P. Rieber and P. A. Baeuerle (1991). "Reactive Oxygen Intermediates as Apparently Widely Used Messengers in the Activation of the Nf-Kappa-B Transcription Factor and Hiv-1." Embo Journal **10**(8): 2247-2258.
- Scoditti, E., N. Calabriso, M. Massaro, M. Pellegrino, C. Storelli, G. Martines, R. De Caterina and M. A. Carluccio (2012). "Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer." Arch Biochem Biophys **527**(2): 81-89.
- Scott, D. L., F. Wolfe and T. W. Huizinga (2010). "Rheumatoid arthritis." Lancet **376**(9746): 1094-1108.
- Seeram, N. P., S. M. Henning, Y. J. Zhang, M. Suchard, Z. P. Li and D. Heber (2006). "Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours." Journal of Nutrition **136**(10): 2481-2485.
- Segal, B. H., T. L. Leto, J. I. Gallin, H. L. Malech and S. M. Holland (2000). "Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease." Medicine (Baltimore) **79**(3): 170-200.
- Seifried, H. E., D. E. Anderson, E. I. Fisher and J. A. Milner (2007). "A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species." Journal of Nutritional Biochemistry **18**(9): 567-579.
- Sellappan, S., C. C. Akoh and G. Krewer (2002). "Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries." J Agric Food Chem **50**(8): 2432-2438.
- Selma, M. V., J. C. Espin and F. A. Tomas-Barberan (2009). "Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health." J Agric Food Chem **57**(15): 6485-6501.
- Semalty, A., M. Semalty, M. S. M. Rawat and F. Franceschi (2010). "Supramolecular phospholipids–polyphenolics interactions: The PHYTOSOME® strategy to improve the bioavailability of phytochemicals." Fitoterapia **81**(5): 306-314.
- Senica, M., R. Veberic, J. J. Grabnar, F. Stampar and J. Jakopic (2016). "Selected chemical compounds in firm and mellow persimmon fruit before and after the drying process." J Sci Food Agric **96**(9): 3140-3147.
- Sentandreu, E., M. Cerdan-Calero, J. M. Halket and J. L. Navarro (2014). "Rapid screening of low molecular weight phenols from persimmon (*Diospyros kaki*) pulp using liquid chromatography-UV/Vis-electrospray mass spectrometry analysis." J Sci Food Agric.
- Sentandreu, E., M. Cerdan-Calero, J. M. Halket and J. L. Navarro (2015). "Rapid screening of low-molecular-weight phenols from persimmon (*Diospyros kaki*) pulp using liquid chromatography/UV-visible/electrospray mass spectrometry analysis." J Sci Food Agric **95**(8): 1648-1654.
- Senter, S., G. Chapman, W. Forbus and J. Payne (1991). "Sugar and nonvolatile acid composition of persimmons during maturation." J Food Sci **56**(4): 989-991.
- Sepodes, B., R. Maio, R. Pinto, E. Sharples, P. Oliveira, M. McDonald, M. Yaqoob, C. Thiernemann and H. Mota-Filipe (2006). "Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat." Transpl Int **19**(11): 919-926.

- Serhan, C., C. Clish, J. Brannon, S. Colgan, K. Gronert and N. Chiang (2000). "Anti-microinflammatory lipid signals generated from dietary N-3 fatty acids via cyclooxygenase-2 and transcellular processing: a novel mechanism for NSAID and N-3 PUFA therapeutic actions." Journal of Physiology and Pharmacology **51**(4, 1).
- Serhan, C. N., N. Chiang and T. E. Van Dyke (2008). "Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators." Nature Reviews Immunology **8**(5): 349-361.
- Serhan, C. N., C. B. Clish, J. Brannon, S. P. Colgan, N. Chiang and K. Gronert (2000). "Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2–nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing." J Exp Med **192**(8): 1197-1204.
- Serhan, C. N., S. Hong, K. Gronert, S. P. Colgan, P. R. Devchand, G. Mirick and R.-L. Moussignac (2002). "Resolvins a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals." J Exp Med **196**(8): 1025-1037.
- Serhan, C. N., A. Jain, S. Marleau, C. Clish, A. Kantarci, B. Behbehani, S. P. Colgan, G. L. Stahl, A. Merched, N. A. Petasis, L. Chan and T. E. Van Dyke (2003). "Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators." J Immunol **171**(12): 6856-6865.
- Serhan, C. N., P. A. Ward and D. W. Gilroy (2010). Fundamentals of inflammation, Cambridge University Press.
- Serra, A., A. Macia, M. P. Romero, J. Valls, C. Blade, L. Arola and M. J. Motilva (2010). "Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in in vitro and in vivo models." Br J Nutr **103**(7): 944-952.
- Serra, A. T., A. A. Matias, R. F. M. Frade, R. O. Duarte, R. P. Feliciano, M. R. Bronze, M. E. Figueira, A. de Carvalho and C. M. M. Duarte (2010). "Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2-Antioxidant and antiproliferative activities." Journal of Functional Foods **2**(1): 46-53.
- Serra, D., L. M. Almeida and T. C. P. Dinis (2018). "Dietary polyphenols: A novel strategy to modulate microbiota-gut-brain axis." Trends in Food Science & Technology **78**: 224-233.
- Serrano, J., R. Puupponen-Pimia, A. Dauer, A. M. Aura and F. Saura-Calixto (2009). "Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects." Mol Nutr Food Res **53**: S310-S329.
- Setha, S., S. Kondo, N. Hirai and H. Ohigashi (2004). "Xanthoxin, abscisic acid and its metabolite levels associated with apple fruit development." Plant Science **166**(2): 493-499.
- Shapiro, S. D. (1998). "Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 602-608.
- Shyam, K. R. and G. M. Kumar (2012). "Preparation, Characterization and Antioxidant Activities of Gallic Acid-Phospholipids Complex." International Journal of Research in Pharmacy & Science **2**(1): 138-148.
- Singh, S. and H. Joshi (2011). "Diospyros kaki (Ebenaceae): A Review." Asian J. Res. Pharm Sci **1**(3): 55-58.

- Singleton, V. and J. A. Rossi (1965). "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents." American journal of Enology and Viticulture **16**(3): 144-158.
- Sirtori, C. R., C. Galli, J. W. Anderson and A. Arnoldi (2009). "Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins." Atherosclerosis **203**(1): 8-17.
- Soberman, R. J. (2003). "The expanding network of redox signaling: new observations, complexities, and perspectives." J Clin Invest **111**(5): 571-574.
- Society, A. C. (2013). "Cancer Facts & Figures, 2013." American Cancer Society.
- Sodagari, H. R., M. H. Farzaei, R. Bahramsoltani, A. H. Abdolghaffari, M. Mahmoudi and N. Rezaei (2015). "Dietary anthocyanins as a complementary medicinal approach for management of inflammatory bowel disease." Expert Rev Gastroenterol Hepatol **9**(6): 807-820.
- Solans, C., P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar and M. J. Garcia-Celma (2005). "Nano-emulsions." Current Opinion in Colloid & Interface Science **10**(3-4): 102-110.
- Solberg, I. C., I. Lygren, J. Jahnsen, E. Aadland, O. Hoie, M. Cvancarova, T. Bernklev, M. Henriksen, J. Sauar, M. H. Vatn and B. Moum (2009). "Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study)." Scand J Gastroenterol **44**(4): 431-440.
- Somani, S. J., K. P. Modi, A. S. Majumdar and B. N. Sadarani (2015). "Phytochemicals and Their Potential Usefulness in Inflammatory Bowel Disease." Phytotherapy Research: n/a-n/a.
- Stamatakis, G., N. Tsantila, M. Samiotaki, G. N. Panayotou, A. C. Dimopoulos, C. P. Halvadakis and C. A. Demopoulos (2009). "Detection and isolation of antiatherogenic and antioxidant substances present in olive mill wastes by a novel filtration system." J Agric Food Chem **57**(22): 10554-10564.
- Stamenkovic, I. (2000). "Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis." Semin Cancer Biol **10**(6): 415-433.
- Steffensen, B., U. M. Wallon and C. M. Overall (1995). "Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen." J Biol Chem **270**(19): 11555-11566.
- Steinmetz, K. A. and J. D. Potter (1996). "Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review." Journal of the American Dietetic Association **96**(10): 1027-1039.
- Stewart BW, K. P., editors (2003). "World cancer repor." Lyon: IARC Press.
- Stierum, R., R. Burgemeister, A. van Helvoort, A. Peijnenburg, K. Schutze, M. Seidelin, O. Vang and B. van Ommen (2001). "Functional food ingredients against colorectal cancer. An example project integrating functional genomics, nutrition and health." Nutr Metab Cardiovasc Dis **11**(4 Suppl): 94-98.
- Strober, W., I. Fuss and P. Mannon (2007). "The fundamental basis of inflammatory bowel disease." Journal of Clinical Investigation **117**(3): 514.
- Strober, W., B. R. Ludviksson and I. J. Fuss (1998). "The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease." Ann Intern Med **128**(10): 848-856.
- Stryer, L., R. I. Gumpert, & and R. E. Koeppe (1995). Biochemistry.

- Su, M.-S. and P.-J. Chien (2007). "Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation." Food chemistry **104**(1): 182-187.
- Sucupira, N., A. Silva, G. Pereira and J. Costa (2012). "Methods for measuring antioxidant activity of fruits." UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde **14**(4): 263-269.
- Sun, L., J. Zhang, K. Fang, Y. Ding, L. Zhang and Y. Zhang (2014). "Flavonoids from persimmon (*Diospyros kaki*) leaves (FPL) attenuate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in MC3T3-E1 cells via the NF- $\kappa$ B pathway." Food Funct **5**(3): 471-479.
- Sun, Y. and L. W. Oberley (1996). "Redox regulation of transcriptional activators." Free Radic Biol Med **21**(3): 335-348.
- Surh, Y. J., J. K. Kundu, H. K. Na and J. S. Lee (2005). "Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals." J Nutr **135**(12 Suppl): 2993S-3001S.
- Suzuki, T., S. Someya, F. Hu and M. Tanokura (2005). "Comparative study of catechin compositions in five Japanese persimmons (*Diospyros kaki*)." Food chemistry **93**(1): 149-152.
- Suzuki, T., S. Someya, F. Y. Hu and M. Tanokura (2005). "Comparative study of catechin compositions in five Japanese persimmons (*Diospyros kaki*)." Food Chemistry **93**(1): 149-152.
- Swain, T. and H. WE (1959). "The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. — The quantitative analysis of phenolic constituents." Journal of the Science of Food and Agriculture **10**(1): 63-68.
- Szabo, C., L. Virag, S. Cuzzocrea, G. S. Scott, P. Hake, M. P. O'Connor, B. Zingarelli, A. Salzman and E. Kun (1998). "Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly(ADP-ribose) synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3867-3872.
- Taira, S. (1995). *Astringency in persimmon. Fruit analysis*, Springer: 97-110.
- Taleban, S., E. Elquza, C. Gower-Rousseau and L. Peyrin-Biroulet (2016). "Cancer and inflammatory bowel disease in the elderly." Dig Liver Dis **48**(10): 1105-1111.
- Targan, S. R. and L. K. Murphy (1995). "Clarifying the causes of Crohn's." Nat Med **1**(12): 1241-1243.
- Tatsuno, T., M. Jinno, Y. Arima, T. Kawabata, T. Hasegawa, N. Yahagi, F. Takano and T. Ohta (2012). "Anti-inflammatory and anti-melanogenic proanthocyanidin oligomers from peanut skin." Biol Pharm Bull **35**(6): 909-916.
- Teixeira, A. A. (2006). "Analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios não esteróides. Antigotosos." Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas 5ª ed(Porto Editora Guimarães S, Moura D, Silva PS, editores): 141-145.
- Temple, N. J. (2000). "Antioxidants and disease: More questions than answers." Nutrition Research **20**(3): 449-459.
- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1005-1028.
- Thebaudin, J., A. Lefebvre, M. Harrington and C. Bourgeois (1997). "Dietary fibres: nutritional and technological interest." Trends in Food Science & Technology **8**(2): 41-48.
- Thoreson, R. and J. J. Cullen (2007). "Pathophysiology of inflammatory bowel disease: an overview." Surgical Clinics of North America **87**(3): 575-585.

- Tian, Y., B. Zou, C. M. Li, J. Yang, S. F. Xu and A. E. Hagerman (2012). "High molecular weight persimmon tannin is a potent antioxidant both ex vivo and in vivo." Food Research International **45**(1): 26-30.
- Tian, Y., B. Zou, L. Yang, S. F. Xu, J. Yang, P. Yao and C. M. Li (2011). "High molecular weight persimmon tannin ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by D-galactose." Food Chem Toxicol **49**(8): 1728-1736.
- Tilley, S. L., T. M. Coffman and B. H. Koller (2001). "Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes." J Clin Invest **108**(1): 15-23.
- Tobón, G. J., P. Youinou and A. Saraux (2010). "The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: rheumatoid arthritis." J Autoimmun **35**(1): 10-14.
- Toda, D., T. Ota, K. Tsukuda, K. Watanabe, T. Fujiyama, M. Murakami, M. Naito and N. Shimizu (2006). "Gefitinib decreases the synthesis of matrix metalloproteinase and the adhesion to extracellular matrix proteins of colon cancer cells." Anticancer Res **26**(1A): 129-134.
- Toledano, E., G. Candelas, Z. Rosales, C. Martinez Prada, L. Leon, L. Abasolo, E. Loza, L. Carmona, A. Tobias and J. A. Jover (2012). "A meta-analysis of mortality in rheumatic diseases." Reumatol Clin **8**(6): 334-341.
- Tomas-Barberan, F. A., M. V. Selma and J. C. Espin (2016). "Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **19**(6): 471-476.
- Toth, M., A. Sohail and R. Fridman (2012). "Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography." Metastasis Research Protocols: 121-135.
- Trichopoulou, A., T. Costacou, C. Bamia and D. Trichopoulos (2003). "Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population." New England Journal of Medicine **348**(26): 2599-2608.
- Uchida, S., H. Ohta, M. Niwa, A. Mori, G. Nonaka, I. Nishioka and M. Ozaki (1990). "Prolongation of life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) ingesting persimmon tannin." Chem Pharm Bull (Tokyo) **38**(4): 1049-1052.
- Uchida, S., M. Ozaki, T. Akashi, K. Yamashita, M. Niwa and K. Taniyama (1995). "Effects of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (green tea tannin) on the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats." Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl **22**(1): S302-303.
- Uddin, G., A. Rauf, B. S. Siddiqui, N. Muhammad, A. Khan and S. U. Shah (2014). "Anti-nociceptive, anti-inflammatory and sedative activities of the extracts and chemical constituents of *Diospyros lotus* L." Phytomedicine **21**(7): 954-959.
- Ueda, K., R. Kawabata, T. Irie, Y. Nakai, Y. Tohya and T. Sakaguchi (2013). "Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: strong effects of extracts from persimmon (*Diospyros kaki*) on a broad range of viruses." PLoS One **8**(1): e55343.
- Unger, F., M. Wittmar and T. Kissel (2007). "Branched polyesters based on poly[vinyl-3-(dialkylamino)alkylcarbamate-co-vinyl acetate-co-vinyl alcohol]-graft-poly(d,l-lactide-co-glycolide): effects of polymer structure on cytotoxicity." Biomaterials **28**(9): 1610-1619.

- Vachier, I., P. Chanez, C. Bonnans, P. Godard, J. Bousquet and C. Chavis (2002). "Endogenous anti-inflammatory mediators from arachidonate in human neutrophils." Biochem Biophys Res Commun **290**(1): 219-224.
- Valko, M., M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes and J. Telser (2004). "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." Mol Cell Biochem **266**(1-2): 37-56.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- Vallverdú-Queralt, A., J. F. R. de Alvarenga, R. Estruch and R. M. Lamuela-Raventos (2013). "Bioactive compounds present in the Mediterranean sofrito." Food chemistry **141**(4): 3365-3372.
- Vallverdu-Queralt, A., J. Regueiro, M. Martinez-Huelamo, J. F. R. Alvarenga, L. N. Leal and R. M. Lamuela-Raventos (2014). "A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay." Food chemistry **154**: 299-307.
- van't Slot, G. and H. U. Humpf (2009). "Degradation and Metabolism of Catechin, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), and Related Compounds by the Intestinal Microbiota in the Pig Cecum Model." J Agric Food Chem **57**(17): 8041-8048.
- Van den Steen, P. E., B. Dubois, I. Nelissen, P. M. Rudd, R. A. Dwek and G. Opdenakker (2002). "Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)." Crit Rev Biochem Mol Biol **37**(6): 375-536.
- van Poppel, G. (1993). "Carotenoids and cancer: an update with emphasis on human intervention studies." European Journal of Cancer **29**(9): 1335-1344.
- Vanwart, H. E. and H. Birkedalhansen (1990). "The Cysteine Switch - a Principle of Regulation of Metalloproteinase Activity with Potential Applicability to the Entire Matrix Metalloproteinase Gene Family." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5578-5582.
- Veberic, R., J. Jurhar, M. Mikulic-Petkovsek, F. Stampar and V. Schmitzer (2010). "Comparative study of primary and secondary metabolites in 11 cultivars of persimmon fruit (*Diospyros kaki* L.)." Food Chemistry **119**(2): 477-483.
- Vemuri, S. and C. T. Rhodes (1995). "Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review." Pharm Acta Helv **70**(2): 95-111.
- Verma, A. and F. Stellacci (2010). "Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions." Small **6**(1): 12-21.
- Verma, S., K. Kesh, N. Ganguly, S. Jana and S. Swarnakar (2014). "Matrix metalloproteinases and gastrointestinal cancers: Impacts of dietary antioxidants." World J Biol Chem **5**(3): 355-376.
- Vieites, R. L. (2012). "Persimmon Tree." Revista Brasileira De Fruticultura **34**(3): li-li.
- Wahle, K. W., I. Brown, D. Rotondo and S. D. Heys (2010). "Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer." Adv Exp Med Biol **698**: 36-51.
- Walsmith, J., L. Abad, J. Kehayias and R. Roubenoff (2004). "Tumor necrosis factor-alpha production is associated with less body cell mass in women with rheumatoid arthritis." J Rheumatol **31**(1): 23-29.
- Wang, D. and R. N. Dubois (2010). "The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer." Oncogene **29**(6): 781-788.

- Weisburger, E. K. (2000). "Chemoprevention of cancer: a brief review." In Vivo **14**(5): 699-701.
- Weiss, S. J., G. Peppin, X. Ortiz, C. Ragsdale and S. T. Test (1985). "Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils." Science **227**(4688): 747-749.
- Whittle, B. J. R. and C. Varga (2010). "New light on the anti-colitic actions of therapeutic aminosalicylates: the role of heme oxygenase." Pharmacological Reports **62**(3): 548-556.
- Wibmer, A. G., A. J. Kroesen, J. Grone, H. J. Buhr and J. P. Ritz (2010). "Comparison of strictureplasty and endoscopic balloon dilatation for stricturing Crohn's disease--review of the literature." Int J Colorectal Dis **25**(10): 1149-1157.
- Wildman, R. E. (2006). Handbook of nutraceuticals and functional foods, CRC press.
- Willett, W. C. (1994). "Diet and health: what should we eat?" Science **264**(5158): 532-537.
- Willett, W. C. (2002). "Balancing life-style and genomics research for disease prevention." Science **296**(5568): 695-698.
- Wirtz, D., K. Konstantopoulos and P. C. Searson (2011). "The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis." Nature Reviews. Cancer **11**(7): 512-522.
- Wirtz, S., C. Neufert, B. Weigmann and M. F. Neurath (2007). "Chemically induced mouse models of intestinal inflammation." Nat. Protocols **2**(3): 541-546.
- Wirtz, S. and M. F. Neurath (2007). "Mouse models of inflammatory bowel disease." Advanced Drug Delivery Reviews **59**(11): 1073-1083.
- Wolfe, K. L., X. Kang, X. He, M. Dong, Q. Zhang and R. H. Liu (2008). "Cellular antioxidant activity of common fruits." J Agric Food Chem **56**(18): 8418-8426.
- Wolfe, K. L. and R. H. Liu (2007). "Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements." J Agric Food Chem **55**(22): 8896-8907.
- Wollgast, J. and E. Anklam (2000). "Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?" Food Res Intern **33** 449-459.
- Wu, P. W. and L. S. Hwang (2002). "Determination of soluble persimmon tannin by high performance gel permeation chromatography." Food Research International **35**(8): 793-800.
- Xiao, J. B. and P. Hogger (2015). "Dietary Polyphenols and Type 2 Diabetes: Current Insights and Future Perspectives." Curr Med Chem **22**(1): 23-38.
- Xie, D. Y. and R. A. Dixon (2005). "Proanthocyanidin biosynthesis--still more questions than answers?" Phytochemistry **66**(18): 2127-2144.
- Xie, Q. W., H. J. Cho, J. Calaycay, R. A. Mumford, K. M. Swiderek, T. D. Lee, A. Ding, T. Troso and C. Nathan (1992). "Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages." Science **256**(5054): 225-228.
- Xu, B. and S. K. Chang (2012). "Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines." Food chemistry **134**(3): 1287-1296.
- Xu, S. F., B. Zou, J. Yang, P. Yao and C. M. Li (2012). "Characterization of a highly polymeric proanthocyanidin fraction from persimmon pulp with strong Chinese cobra PLA2 inhibition effects." Fitoterapia **83**(1): 153-160.

- Yadav, V., F. Varum, R. Bravo, E. Furrer, D. Bojic and A. W. Basit (2016). "Inflammatory bowel disease: exploring gut pathophysiology for novel therapeutic targets." Transl Res **176**: 38-68.
- Yadav, V. R., S. Prasad, B. Sung, R. Kannappan and B. B. Aggarwal (2010). "Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer." Toxins **2**(10): 2428-2466.
- Yan, C. and D. D. Boyd (2007). "Regulation of matrix metalloproteinase gene expression." J Cell Physiol **211**(1): 19-26.
- Yang, B., F. Tang, B. Zhang, Y. Zhao, J. Feng and Z. Rao (2014). "Matrix metalloproteinase-9 overexpression is closely related to poor prognosis in patients with colon cancer." World J Surg Oncol **12**: 24.
- Yaqub, S., U. Farooq, A. Shafi, K. Akram, M. A. Murtaza, T. Kausar and F. Siddique (2016). "Chemistry and Functionality of Bioactive Compounds Present in Persimmon." Journal of Chemistry **2016**.
- Yeatman, T. J. (2001). Colon Cancer. eLS, John Wiley & Sons, Ltd.
- Yokomizo, A. and M. Moriwaki (2006). "Effects of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **70**(6): 1317-1324.
- Yokozawa, T., Y. A. Kim, H. Y. Kim, Y. A. Lee and G. Nonaka (2007). "Protective effect of persimmon peel polyphenol against high glucose-induced oxidative stress in LLC-PK(1) cells." Food Chem Toxicol **45**(10): 1979-1987.
- Yokozawa, T., C. H. Park, J. S. Noh and S. S. Roh (2014). "Role of Oligomeric Proanthocyanidins Derived from an Extract of Persimmon Fruits in the Oxidative Stress-Related Aging Process." Molecules **19**(5): 6707-6726.
- Yoon, J. H. and S. J. Baek (2005). "Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties." Yonsei Med J **46**(5): 585-596.
- Yoshida, H., S.-I. Hayashi, T. Kunisada, M. Ogawa, S. Nishikawa, H. Okamura, T. Sudo, L. D. Shultz and S.-I. Nishikawa (1990). "The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene."
- Yoshihara, E., S. Masaki, Y. Matsu, Z. Chen, H. Tian and J. Yodoi (2014). "Thioredoxin/Txnip: redoxosome, as a redox switch for the pathogenesis of diseases." Front Immunol **4**.
- Yoshioka, K., T. Kataoka, T. Hayashi, M. Hasegawa, Y. Ishi and H. Hibasami (2000). "Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines." Oncol Rep **7**(6): 1221-1224.
- Yu, L., S. Haley, J. Perret, M. Harris, J. Wilson and M. Qian (2002). "Free radical scavenging properties of wheat extracts." J Agric Food Chem **50**(6): 1619-1624.
- Zhang, A., L. Wan, C. Wu, Y. Fang, G. Han, H. Li, Z. Zhang and H. Wang (2013). "Simultaneous determination of 14 phenolic compounds in grape canes by HPLC-DAD-UV using wavelength switching detection." Molecules **18**(11): 14241-14257.
- Zhang, A., L. Wan, C. Wu, Y. Fang, G. Han, H. Li, Z. Zhang and H. Wang (2013). "Simultaneous Determination of 14 Phenolic Compounds in Grape Canes by HPLC-DAD-UV Using Wavelength Switching Detection." Molecules **18**(11): 14241-14257.



- Zhang, L., L. Han, X. Sun, D. Gao, J. Qin and J. Wang (2012). "The use of PEGylated liposomes to prolong the circulation lifetime of salvianolic acid B." Fitoterapia **83**(4): 678-689.
- Zhao, J., T. Hong, M. Dong, Y. Meng and J. Mu (2013). "Protective effect of myricetin in dextran sulphate sodium-induced murine ulcerative colitis." Mol Med Rep **7**(2): 565-570.
- Zheng, H., H. Takahashi, Y. Murai, Z. Cui, K. Nomoto, H. Niwa, K. Tsuneyama and Y. Takano (2006). "Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma." Anticancer Res **26**(5a): 3579-3583.
- Zhou, C., Y. Sheng, D. Zhao, Z. Wang and J. Tao (2010). "Variation of oleanolic and ursolic acid in the flesh of persimmon fruit among different cultivars." Molecules **15**(9): 6580-6587.
- Zhou, H. Y., E. M. Shin, L. Y. Guo, L. B. Zou, G. H. Xu, S. H. Lee, K. R. Ze, E. K. Kim, S. S. Kang and Y. S. Kim (2007). "Anti-inflammatory activity of 21(alpha, beta)-methylmelianodiols, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque." Eur J Pharmacol **572**(2-3): 239-248.
- Zou, B., C. M. Li, J. Y. Chen, X. G. Dong, Y. Zhang and J. Du (2012). "High molecular weight persimmon tannin is a potent hypolipidemic in high-cholesterol diet fed rats." Food Research International **48**(2): 970-977.
- Zucker, S. and J. Vacirca (2004). "Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer." Cancer Metastasis Rev **23**(1-2): 101-117.

