

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

“Atividade dos compostos fenólicos antioxidantes da romã  
(*Punica granatum*, L) - avaliação *in vivo* e em cultura de  
células”

Fernanda Archilla Jardim

Tese apresentada para obtenção  
do grau de DOUTOR  
Orientador: Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

“Atividade dos compostos fenólicos antioxidantes da romã  
(*Púnica granatum*, L.)- avaliação *in vivo* e em culturas de  
células”

Fernanda Archilla Jardim

Tese apresentada para obtenção  
do grau de DOUTOR  
Orientador: Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo  
2010

Fernanda Archilla Jardini

Avaliação da atividade antioxidante da romã (*Púnica granatum*, L.): efeitos da  
ação sobre sistemas *in vivo* e em culturas de células

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Jorge Mancini Filho  
orientador/presidente

---

1º examinador

---

2º examinador

---

3º examinador

---

4º examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de maio de 2010.

*Aos meus pais, Marcos e Iracema*

DEDICO

*“Deus não impôs aos ignorantes a  
obrigação de aprender, sem antes  
ter tomado aos que sabem o  
juramento de ensinar”*

*Provérbio árabe*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família: meus pais Marcos e Iracema e ao meu irmão, Marcos Fábio, pelo apoio emocional e material durante todo percurso deste trabalho.

Ao meu orientador, professor Jorge Mancini Filho, pela oportunidade para a continuidade do trabalho e

A todos os professores, funcionários e alunos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Especialmente à “família” do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Agradecimentos ao Conselho de Aperfeiçoamento Profissional de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e suporte financeiro ao projeto de pesquisa; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro ao projeto; ao Programa Santander de Mobilidade Internacional, pela concessão de bolsa para estudos em Portugal.

Obrigada aos companheiros e amigos do Laboratório de Lípidos: à nossa técnica responsável Rosângela Pavan Torres, e aos alunos Ana Mara, Eliane, Felipe, Gabriela, Illana Louise, Lucíllia, Milessa e Paula. Um obrigada especial ao professor Alexis Vidal e à sua aluna Ana Elsa Batista (Universidade de Havana – Cuba), pela contribuição nas oportunidades de suas visitas em trabalhos de colaboração com nosso laboratório.

Aos pesquisadores do Laboratório de Virologia do Instituto Butantan: Roseli, Luzia, Ricardo e Rita; e à sua diretora, Dra. Dalva A. Portari Mancini. Obrigada pelo suporte aos experimentos com culturas de células.

Agradecimentos especiais à Prof<sup>a</sup> Dra. Conceição Calhau, à Prof<sup>a</sup> Catedrática Izabel Azevedo, aos funcionários e alunos do Serviço de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Obrigada pelo ensino do método de transporte com cultura de células e pelas “quartas-feiras” de discussão científica. Aos alunos Ana Faria, Diogo Pestana e Rosário, agradecimentos especiais pela acolhida amiga.

Às nossas amigas do Bloco 14: Lurdinha e Joana e aos nossos amigos da secretaria: Cléo, Edílson e Mônica

Agradecimentos à equipe do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Aos Professores: José Morgado, do Instituto Nacional do Câncer (RJ), pela gentileza no envio das células da linhagem Caco-2; Alberto Cavalheiro e Luciana Polese, do Laboratório Nubbe do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, pelas análises com o CLAE na identificação dos compostos fenólicos no ensaio de transporte.

Minha gratidão também aqui é expressa a todos aqueles a quem direta ou indiretamente, citados aqui ou não, colaboraram para a realização deste trabalho.

---

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS E QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS	ix
LISTA DE ABREVIACÕES	xi
LISTA DE REAGENTES	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Os radicais livres	3
2.2. Organismo e equilíbrio redox	5
2.2.1. O desenvolvimento celular: regulação e Apoptose	5
<i>Apoptose</i>	6
2.3. Antioxidantes	7
2.3.1. O sistema de defesa antioxidante Endógeno	

---

<i>Superóxido dismutase (SOD)</i>	8
Catalase (CAT)	9
<i>Glutathiona peroxidase (GPx)</i>	9
2.3.2. Antioxidantes exógenos: os compostos Fenólicos	10
<i>Flavonóides</i>	10
<i>Ácidos fenólicos</i>	11
2.4. Métodos de avaliação da capacidade Antioxidante	13
2.5. Biodisponibilidade dos compostos fenólicos	16
<i>Absorção</i>	16
<i>Metabolização</i>	16
<i>Eliminação</i>	17
2.6. Os compostos fenólicos e seus efeitos no organismo e em cultura de células	20
2.7. Romã	21
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25

---

4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Amostra	26
4.2. Obtenção dos extratos da polpa e sementes da Romã	26
4.3. Obtenção das frações de ácidos fenólicos	27
4.3.1. Fração de ácidos fenólicos livres (AFL)	28
4.3.2. Fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis (AFES)	28
4.3.3. Fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos insolúveis (AFEI)	29
4.4. Determinação do conteúdo de compostos redutores totais	30
4.5. Perfil de ácidos fenólicos presentes nas frações por cromatografia gasosa	31
4.6. Determinação da atividade antioxidante	32
4.6.1. Método de co-oxidação do $\beta$ -caroteno e ácido linoléico	32
4.6.2. Método de redução do radical DPPH <sup>•</sup>	33
4.6.3. Método de capacidade de absorção do radical oxigênio – ORAC	34

---

4.7. Ensaio de transporte celular	35
4.8. Avaliação da inibição da formação de radicais livres em cultura de células	37
4.9. Avaliação da viabilidade celular	38
4.10. Ensaio de verificação da apoptose – teste TUNEL	39
4.11. Ensaio biológico	40
4.12. Obtenção dos homogenatos de tecidos	41
4.12.1. Tecidos cérebro, coração, fígado e rins	41
4.12.2. Homogenato para análise enzimática	41
4.13. Lipidograma	41
4.14. Avaliação do teor protéico	41
4.15. Avaliação da lipoperoxidação pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	42
4.16. Determinação das enzimas antioxidantes	43
4.16.1. Superóxido dismutase (SOD)	43
4.16.2. Catalase (CAT)	44
4.16.3. Glutathiona peroxidase (GPx)	44
4.17. Análises estatísticas	45

---

5.RESULTDOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Conteúdo de compostos redutores totais	46
5.2. Perfil de ácidos fenólicos presentes nas frações por cromatografia gasosa	48
5.3. Atividade antioxidante	50
5.3.1. Método de co-oxidação do $\beta$ -caroteno e ácido linoléico	50
5.3.2. Método de redução do radical DPPH <sup>*</sup>	53
5.3.1. Método de capacidade de absorção do radical oxigênio – ORAC	59
5.4. Ensaio de transporte celular	60
5.5. Avaliação da inibição da formação de radicais livres em cultura de células	63
5.6. Avaliação da viabilidade celular	65
5.7. Ensaio de verificação da apoptose – teste TUNEL	68
5.8. Ensaio biológico	70
5.8.1. Lipidograma	71

---

5.8.2. Avaliação da lipoperoxidação pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	72
5.9. Determinação das enzimas antioxidantes	73
5.9.1. Superóxido dismutase (SOD)	73
5.9.2. Catalase (CAT)	75
5.9.3. Glutathiona peroxidase (GPx)	75
4. CONCLUSÕES	79
5. BIBLIOGRAFIA	80

---

**LISTA DE TABELAS E QUADROS**

	página
QUADRO 1: Exemplos de radicais livres, estrutura e natureza radicalar	04
TABELA 1: Principais ácidos fenólicos presentes nas frações fenólicas da romã	49
TABELA 2: Inibição da oxidação para os extratos da romã pelo teste de co-oxidação	51
TABELA 3: Inibição da oxidação para as frações fenólicas da romã pelo teste de co-oxidação	52
TABELA 4: IC <sub>50</sub> relativa à redução do radical DPPH <sup>•</sup> para os extratos e frações da romã	53
TABELA 5: Porcentagens de redução do radical DPPH <sup>•</sup> para os extratos da romã	55
TABELA 6: Porcentagens de redução do radical DPPH <sup>•</sup> para os extratos da romã	56
TABELA 7: Atividade antioxidante das frações da romã pelo método ORAC	59
TABELA 8: Avaliação do transporte dos ácidos fenólicos em cultura de células	61

---

TABELA 9: Avaliação da emissão de fluorescência em células tratadas com a fração fenólica da romã	64
TABELA 10: Viabilidade e proliferação celular após exposição com a fração fenólica da romã	65
TABELA 11: Conteúdo e porcentagem de crescimento celular após exposição ao extrato hidroalcoólico da romã	66
TABELA 12: Conteúdo e viabilidade de células após exposição com a fração fenólica da romã	67
TABELA 13: Lipidograma dos animais tratados com o extrato e fração da romã	71
TABELA 14: Valores de TBARS em tecidos de animais tratados com o extrato e fração fenólica da romã	72
TABELA 15: Atividade da enzima SOD em tecidos de animais trat	74
TABELA 16: Atividade da enzima CAT em tecidos de animais tratados com o extrato e fração fenólica da romã	75
TABELA 17: Atividade da enzima GPx em tecidos de animais tratados com o extrato e fração fenólica da romã.	76

---

**LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS**

	página
FIGURA 1: Representação esquemática do ciclo celular	6
FIGURA 2: Estrutura dos flavonóides e de seus grupos	11
FIGURA 3: Estruturas dos grupos de ácidos fenólicos	12
FIGURA 4: Esquema de biodisponibilidade dos compostos fenólicos no organismo	19
FIGURA 5: Fotos da romã	24
FIGURA 6: Esquema da extração seqüencial para obtenção dos extratos da romã	27
FIGURA 7: Esquema para obtenção das frações de ácidos fenólicos da romã	30
FIGURA 8: Conteúdo de compostos redutores totais nos extratos e frações fenólicas da romã	47
FIGURA 9: Imagens de cultura de células tratadas com fração de ácidos fenólicos, submetidas ao teste TUNEL	69

GRÁFICO 1: Curva de calibração do ácido gálico 60

GRÁFICO 2: Evolução do ganho de peso dos animais durante tratamento com o extrato e fração fenólica da romã 70

---

## LISTA DE ABREVIações

AAPH: 2,2'- radical azobis amidinopropano

ABTS: radical 2,2- azino-bis- (3-etilbenzotiazolin)  
– 6- sulfônico

AFEI: ácidos fenólicos esterificados a compostos  
insolúveis

AFES: ácidos fenólicos esterificados a compostos  
solúveis

AFL: ácidos fenólicos livres

AOM: *active oxygen method* = método do oxigênio  
ativo

BHA: butil- hidroxianisol

BHT: butil – hidroxitolueno

CAT: catalase

CEAGESP: central de armazéns gerais de São  
Paulo

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

COX: ciclooxigenase

DNA: *desoxyribonuclei acid* = ácido  
desoxirriboniucleico

DPPH: radical 1,1- diphenyl- 2- picryldrazyl

ECG: *epigallocatechin galate* = galato de  
epigallocatequina

eqAG: equivalentes de ácido gálico

ERN: espécie reativa do nitrogênio

ERO: espécie reativa do oxigênio

GPx: glutathiona peroxidase

GSH: glutathiona

GSH-R: glutathiona redutase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

iNOS: (*inductible nitric oxide synthase*)= óxido  
sintase induzível

IC<sub>50</sub>: índice de concentração capaz de inibir em 50% a ação do radical

LDL: *low density lipoprotein* = lipoproteína de baixa densidade

MDA: *malonaldehyde acid* = malonaldeído

MAPK: (*mytogen- activated protein kinase*) = proteína kinase reguladas por mitógeno

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: ânion superóxido

OH<sup>•</sup>: radical hidroxila

ORAC: *oxygen radical absorbance capacity* = capacidade de absorção de radicais de oxigênio

PG: propilgalato

PKC: proteína kinase C

Pgp = p- glicoproteína

RNA: *ribonucleic acid* = ácido ribonucleico

SFB: soro fetal bovino

SOD: superóxido dismutase

TBARS: *tiobarbituric acid reactive species* = espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBHQ: terci- butil- hidroquinona

TEP: tetra hidroxipropano

THF: tetrahidrofurano

TNF: *tumor necrosis factor* = fator de necrose tumoral

TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP Nick-end labeling*

---

**LISTA DE REAGENTES**

AAPH (Sigma, 440914 );  
Acetona (Synth, A1017.01.BL);  
Ácido clorídrico (Merck, 1.00317.1000);  
Ácido acético (Synth, A1019.01.BL);  
Ácido linoléico (Sigma, L1258);  
Ácido tiobarbitúrico (Sigma- Aldrich T550-0);  
Ácidos fenólicos: Sigma: catequínico (C1251), clorogênico (C3878), elágico (E2250), ferúlico (F3500), gálico (G7384), o- cumárico (C4400), p- cumárico (C9008), protocatequínico (P5630), sináptico (D7927), vanílico (V2250);  
Acetato de etila (Synth, A1010.01.BJ);  
Álcool etílico (Synth, A1084.01.BL);  
Álcool metílico (Synth, A1085.01.BJ);  
Azul de Trypan (T 6146);  
 $\beta$ - caroteno (Sigma, C9750);  
BHT (Sigma B1378);  
Carbonato de sódio (Synth, C2011.01.AH);  
Citocromo c (Sigma C7752);  
Citrato de Sódio (Sigma C3434);  
Clorofórmio (Synth C1062.01.BJ);  
DCFH<sub>2</sub>-DA (Riedel, 28803 );  
DPPH (Sigma D9132);  
Éter etílico (Synth, E1017.01.BJ);  
Fluoresceína (Riedel 28803);  
Folin- Ciocalteau (Dinâmica)  
Formaldeído (Cinética);  
Glutaciona redutase (Sigma 3664);  
Glutaciona reduzida (Sigma 4251);  
Hexano (Merck grau ultra-puro, 1.04374.4000) ;  
(Synth, H1007.01.BJ);  
Hidróxido de sódio (Synth, H101.01.AH);  
Iodeto de propídio (Sigma P4170);

---

Kit lipidograma (Labtest, Triglicérides Liquiform (87-2/100) e colesterol (76-2/250);  
Kit TUNEL (Roche, 11.684.809.910);  
Meio Dulbecco Mem ( Cutilab 0460);  
Meio Leibovitz-15 ( Cutilab 0491);  
Metil éster de ácido heptadecanoato (C17:0) (Sigma, H3500);  
N- butanol (Sigma- Aldrich 154679);  
N,O- Bis (trimethylsilyl)- acetamida (Aldrich 128910);  
NADPH (Sigma N1630);  
Peridrol (Sigma- Aldrich H1009);  
Soro Fetal Bovino (Cutilab 063);  
Sulfato de sódio anidro (Synth, 52032.01.AH);  
Terc- butila (Sigma- Aldrich B2633);  
Tetrahidrofurano (Synth, T1008.01.BJ);  
Tetra hidroxipropano (Sigma T9889);  
Tripsina/EDTA (Cutilab 1057)  
Triton0 X100 (USB, 22686);  
Trolox (Sigma 238813 );  
Tween 40 (Sigma P1504);  
Xantina (Sigma X4002);  
Xantina- oxidase (Sigma X1875);

## RESUMO

Os radicais livres são formados constantemente em nosso organismo, e em quantidades controladas desempenham alguns papéis fisiológicos. Entretanto, sua presença em quantidades acima daquelas aceitáveis passa a ser um fator de risco para funcionamento adequado do organismo. Muitas doenças crônicas degenerativas têm sua origem no desequilíbrio do estado redox. Apesar de possuir um sistema de proteção antioxidante endógeno, o organismo pode ser beneficiado pela presença de compostos antioxidantes exógenos, como os compostos fenólicos encontrados em alguns alimentos. A romã (*Punica granatum, L*) é uma fruta que apresenta elevados conteúdos destes compostos. Foram obtidos os extratos e as frações de ácidos fenólicos da polpa e das sementes da fruta, e avaliou-se a capacidade antioxidante através de três métodos *in vitro*: o de co-oxidação de substratos ( $\beta$ - caroteno e ácido linoléico), o do radical DPPH<sup>•</sup> e o ORAC. Em todos os testes foram obtidos resultados que indicaram uma elevada atividade antioxidante, principalmente para a fração de ácidos fenólicos livres (AFL) da polpa. Frente a estes dados, a fração foi submetida a um ensaio de transporte celular, o qual foi possível verificar que os diferentes ácidos fenólicos ali encontrados foram capazes de atravessar a membrana celular. A fração AFL da polpa propiciou uma redução na produção de espécies reativas intracelulares e efeitos sobre a proliferação e a viabilidade em células das linhagens Caco-2, HeLa e MDCK. Por fim, o ensaio *in vivo* avaliou, sob condições fisiológicas normais, o efeito do extrato aquoso e da fração AFL sobre a oxidação lipídica e na atividade do sistema enzimático de defesa antioxidante. O tecido cerebral apresentou uma redução significativa nos níveis de lipoperoxidação. A atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase apresentou resultados bastante díspares e sugerem que as respostas não seguem um padrão único e podem variar de acordo com o órgão analisado, respondendo com o aumento ou a diminuição da atividade enzimática de acordo com suas funções fisiológicas.

## ABSTRACT

Free radicals are continuously formed in our organism, and under suitable amounts they play physiological roles. However, when there's a higher presence in their levels than the acceptable ones, they turn into a risk factor to the adequate work of the organism. Most of the degenerative illnesses are originated from the redox state disequilibrium. Although the organism has an endogenous antioxidant defence system, it may be benefited by the presence of antioxidant compounds of exogenous origin, as the phenolic compounds that are found in some kinds of food. The pomegranate (*Punica granatum*, L.) is a high phenolic compound fruit. The extracts and phenolic fractions both from the pulp and seeds of the fruit were obtained and their antioxidant activity was obtained using three *in vitro* methods: the co-oxidation of substrates ( $\beta$ -carotene and linoleic acid), the DPPH<sup>•</sup> radical and the ORAC. For all of them the results have showed a great antioxidant activity, higher than those of the free phenolics acids' fraction (FPA) of the pulp. Face to these data, the fraction was taken to a cellular transport assay, which was possible to verify that the different phenolic acids present at FPA were able to cross the cellular membrane. The FPA pulp's fraction provoked a down in production of the intracellular reactive species and had effects into the cellular proliferation and viability of the Caco-2, HeLa and MDCK cells. Finally, the *in vivo* tryout was made using rats submitted to normal physiologic conditions and the effects of the aqueous extract and FPA fraction over the lipidic oxidation and the activity of the enzymatic system of antioxidant defence were evaluated. The brain tissue showed a significant reduction about the lipoperoxidation levels. The results about the activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase were so different between themselves, which suggests that the enzymes don't follow an only standard of response, and the reply can vary in accordance with the analyzed organ. The increase or the reduction of the enzymatic activity can occur by the physiologic conditions that the organ is able to do.

## 1. INTRODUÇÃO

A pesquisa acerca de compostos antioxidantes vem evoluindo nos últimos 50 anos. A busca por compostos antioxidantes fenólicos de origem natural teve por finalidade o emprego destes na conservação dos alimentos, em substituição dos compostos fenólicos sintéticos como o butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terci-butil-hidroquinona (TBHQ), propilgalato (PG) dentre outros. Estudos mostraram que a exposição prolongada do organismos aos compostos sintéticos poderia acarretar em patologias como cânceres no trato gastrointestinal (JARDINI, 2005). Dentre os compostos fenólicos naturais destacam-se os flavonóides e os ácidos fenólicos, que mostraram ser eficientes, em testes *in vitro*, inibindo a reação de oxidação.

Os radicais livres estão envolvidos na iniciação de vários eventos patológicos crônicos como as inflamações, o diabetes, a catarata, transtornos circulatórios e diversos tipos de câncer (TRIPATHI, MOHAN e KAMAT, 2007). Seguidamente, estudos realizados *in vivo* mostraram evidências de que os compostos fenólicos atuam positivamente no controle da homeostase do organismo, atuando em mecanismos diversos e auxiliando o equilíbrio redox do mesmo (HALLIWELL, 2007).

Devido à variabilidade de suas estruturas, a biodisponibilidade dos compostos fenólicos difere os grupos. Entretanto, guardadas as devidas particularidades, os caminhos a serem seguidos por um composto a partir de sua ingestão são a absorção, no intestino delgado após a deglicosilação ou no cólon, onde será metabolizado pelas enzimas da microflora colônica; a metabolização no fígado, etapa de grande importância onde o composto é modificado e daí distribuído pelos órgãos e a eliminação, que se dá pela urina, bile ou fezes, de acordo com o tamanho de sua estrutura (STAHL, *et al.*, 2002; MANACH *et al.*, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2008).

Mais recentemente, o emprego da técnica de cultura celular nos permitiu estudar com maior precisão a ação de um composto fenólico sobre o metabolismo das células. Este avanço permitiu estudos onde se foi capaz de

---

verificar que a ação dos compostos na inibição da formação tumoral pode ser associado pela capacidade indução da apoptose, evento que foi mostrado em vários estudos (SALUCCI *et al.* 2002; GOMES *et al.*, 2003; LIU e FINLEY, 2005; LIU 2007).

A romã (*Punica granatum*, L.) é uma fruta originária do Oriente Médio. Ela é rica em compostos fenólicos que exibem forte atividade antioxidante *in vitro*. Estudos mostram que o consumo do suco da fruta traz benefícios relacionados com a prevenção de processos oxidativos que começam com a participação de radicais livres (LANSKI e NEWMAN, 2007; JURENKA 2008).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Os radicais livres

Os radicais livres são moléculas que possuem elétrons desemparelhados, o que as torna altamente reativas. Dentre estas espécies, algumas apresentam moléculas do nitrogênio- ERNs- e do oxigênio- EROs- em sua estrutura. Estas espécies reativas são formadas espontaneamente no organismo, como produto de reações fisiológicas e também desempenham funções como no suplemento de energia, na detoxificação, na sinalização química e na função imune. O equilíbrio das espécies reativas no organismo pode ser controlado endogenamente, pela ação de enzimas de ação antioxidante (superóxido-dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e também por antioxidantes de origem externa provenientes da alimentação, como as vitaminas A, C e E e os compostos fenólicos (DIMITRIOS, 2006; WOLFE *et al.*, 2008).

As mitocôndrias consomem mais de 90% do oxigênio disponível no organismo, e estas organelas são o principal local de formação das ERNs, EROs e de radicais livres (o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila). Os fagócitos também liberam compostos oxidantes como o óxido nítrico, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, dentre outros (VALKO *et al.*, 2006).

A homeostase do organismo depende do equilíbrio entre as substâncias oxidantes e antioxidantes. Em grandes quantidades, as espécies reativas reagem e causam danos a biomoléculas como as proteínas e os lipídeos. Por exemplo, a união dos produtos finais da lipoperoxidação à molécula do DNA pode provocar lesões mutagênicas. A formação do quadro de stress oxidativo atinge as células, os tecidos e os órgãos e como consequência, as doenças crônicas degenerativas não- transmissíveis como as inflamações, alguns tipos

de câncer e os distúrbios de circulação são instalados (BAGCHI *et al.*, 2000; LIU e FINLEY, 2005; AZZI, 2007; TRIPATHI, MOHAN e KAMAT, 2007).

O quadro 1 mostra os principais radicais livres que estão envolvidos em reações e sua estrutura.

QUADRO 1: Exemplos de radicais livres, estrutura e natureza radicalar.

Nome	Estrutura	Natureza
Átomo de hidrogênio	$H^\bullet$	Radical livre de estrutura mais simples
Triclorometil	$\bullet CCl_3$	Radical carbônico formado durante o metabolismo do $CCl_4$ no fígado
Superóxido	$O^\bullet$	Radical do oxigênio
Hidroxila	$OH^\bullet$	Radical do oxigênio
Tióis	$RS^\bullet$	Nome genérico do grupo de radicais sulfurônicos
Peroxila, alcóxila	$RO_2^\bullet, RO^\bullet$	radicais oxigênicos formados da quebra dos peróxidos orgânicos
Óxidos de nitrogênio	$NO^\bullet, NO_2^\bullet$	radicais do nitrogênio

(Adaptado de HALLIWELL *et al.*, 1995).

## **2.2. Organismo e equilíbrio redox**

Os efeitos deletérios causados pelo acúmulo de espécies reativas podem ser minimizados através da ação de compostos redutores. Os compostos antioxidantes são capazes de reagirem com os radicais livres e como resultados da reação, espécies estáveis e menos reativas são formadas, diminuindo os danos que podem suceder após o evento oxidativo. Além desta reação direta com as espécies reativas, os antioxidantes também podem participar de mecanismos diversificados como, por exemplo, na interação com os receptores celulares, na modulação de vias sinalizadoras, na ação sobre o ciclo celular, na expressão de genes supressores de tumor, na apoptose e na modulação da atividade das enzimas detoxificantes, dentre outros (NIJVELDT *et al.*, 2001; GIOVANNINI *et al.*; 2008; WOLFE *et al.* 2008).

### **2.2.1. O desenvolvimento celular: regulação e apoptose**

O desenvolvimento celular acontece através de diferentes etapas, às quais regulam o seu crescimento e a sua divisão. O ciclo celular é dividido em duas fases: a intérfase e a divisão celular (mitose e meiose). A intérfase é um período intermediário entre as divisões celulares, onde muitos eventos importantes estão envolvidos e subdivididos em fases. A fase G1 é conhecida como fase de crescimento, caracterizada pela intensa síntese de moléculas importantes para a sobrevivência da célula como proteínas estruturais, enzimas e o RNA. A fase S é marcada pela duplicação do material genético. E, por fim, a fase G2 é chamada de fase de preparação, pois nela ocorre a síntese de moléculas e organelas relacionadas ao processo da divisão celular. O ciclo ainda conta com duas importantes fases de checagem do material genético: entre as fases G1 e S (chamado de ponto R ou ponto de restrição) e entre as fases G2 e M (CARNERO, 2002).

A figura 1 apresenta de maneira esquematizada, o ciclo celular dividido por suas fases.

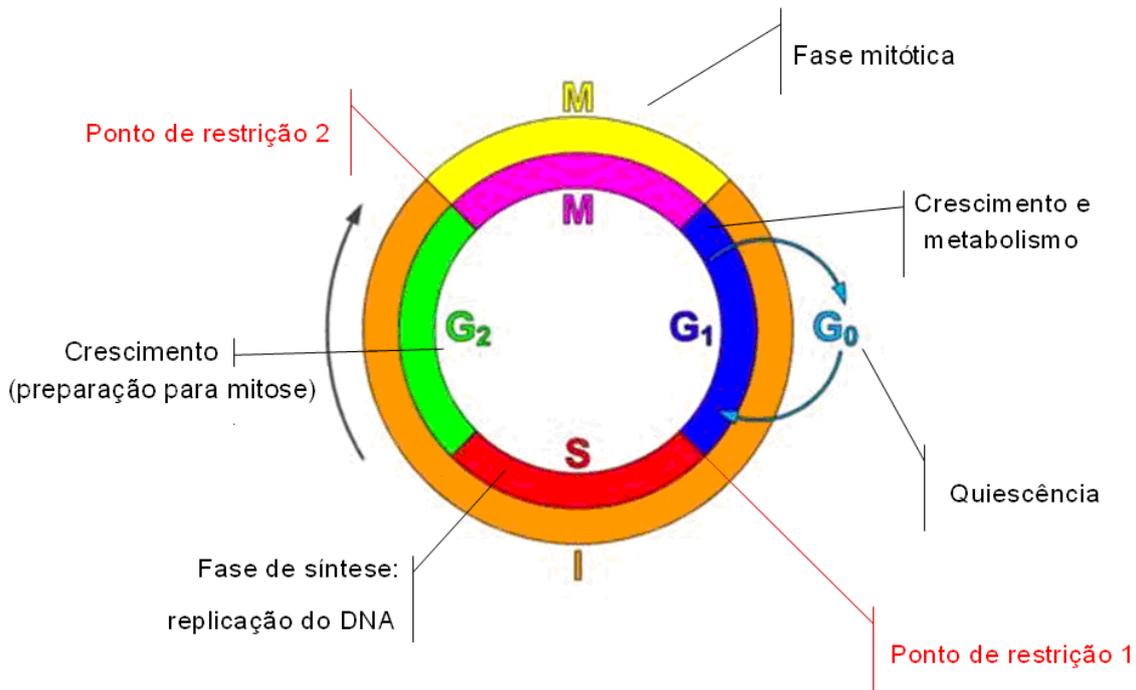


FIGURA 1: Representação esquemática do ciclo de reprodução celular (adaptado de [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell\\_Cycle\\_2.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell_Cycle_2.png)).

### *Apoptose*

A morte celular pode acontecer de duas maneiras: a primeira pode ocorrer através da necrose, que acontece de forma violenta e rápida em resposta a uma injúria sofrida, atingindo um grande número de células numa população. A necrose caracteriza-se pelo aumento no volume citoplasmático, a destruição de organelas e o rompimento da membrana citoplasmática, o que causa a liberação de fluidos para o meio extracelular.

A segunda forma pela qual uma célula pode finalizar seu ciclo de vida é através da morte celular programada, a denominada de apoptose. O seu objetivo é eliminar a célula que apresenta uma anormalidade funcional. A apoptose é caracterizada por uma série de eventos que incluem a

condensação da cromatina, a fragmentação do núcleo e da membrana celular, seguida pela formação dos corpos apoptóticos, e não há a liberação do conteúdo do citoplasma no meio extracelular (ADAMS, 2003; HETZ, TORRES e QUEST, 2005).

A apoptose pode ocorrer através de dois mecanismos. A via extrínica, onde receptores localizados na superfície celular, da família TNF (fator de necrose tumoral) são ativados. A via intrínica também é chamada de via mitocondrial e pode ocorrer em resposta à um aumento na produção de espécies reativas intracelulares. Quando ocorre um estímulo, o citocromo c é deslocado da membrana mitocondrial para o citoplasma, ativando as enzimas caspases que efetuam mecanismos que culminarão no “empacotamento” das células durante o evento, através da proteólise de diferentes substratos que irão acarretar a externalização de fosfolípidos, a condensação e fragmentação nuclear e a desmontagem do citoesqueleto (GREEN e MARTIN, 1995; BOATRIGT *et al.*, 2003; BOATRIGT e SELVESEN, 2003; SPIERINGS *et al.*; 2005; GIOVANNINI *et al.*,2007).

### **2.3. Antioxidantes**

Um composto antioxidante pode ser definido como aquele que em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação do substrato (HALLIWEL, 1995).

Dentre os mecanismos de ação dos antioxidantes, a sua capacidade em reagir com os radicais livres é a mais conhecida. Através dela, as espécies reativas são estabilizadas e a propagação da reação é diminuída. São características desejáveis em um composto antioxidante: a presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, a capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura, a propriedade de quelar metais de transição envolvidos no processo oxidativo e o acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofília ou lipofília e de seu coeficiente de partição (SHAHIDI *et al.*, 1992; MANACH e DONOVAN, 2004).

O mecanismo de ação antioxidante pelo qual um composto exerce sua ação permite classificá-los como primário ou secundário. Quando são capazes de doarem prótons ao radical livre impedindo o início do processo oxidativo, são classificados como primários e nesta classificação encaixam-se os compostos fenólicos, o tocoferol, os aminoácidos e os tocoferóis. Os antioxidantes classificados como secundários atuam no bloqueio e decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos (produtos da reação oxidativa), convertendo-os à forma inativa. São antioxidantes secundários: compostos fenólicos, as vitaminas A, C e E (DONNELI e ROBINSON, 1995; BRAVO, 1998).

### 2.3.1. O sistema de defesa antioxidante endógeno

O organismo conta com um sistema endógeno de defesa contra os radicais livres, formado pelas enzimas catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase. As enzimas participantes atuam de forma coordenada entre si e a ação antioxidante no organismo depende do equilíbrio entre fatores que levam à sua ativação ou inativação. A defesa antioxidante endógena também é completada pela presença de compostos de baixo peso molecular (a glutathione, o ácido úrico, a bilirrubina, a ubiquinona e a albumina) (ROVER JÚNIOR, HOER e VELASCO., 2001).

#### *Superóxido dismutase (SOD)*

A enzima superóxido dismutase (SOD) está presente no citoplasma em concentrações de  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  M. A SOD presente nas mitocôndrias tem seu sítio de ação ligado ao magnésio (MgSOD), e com o cobre ou zinco (Cu/ZnSOD), na enzima presente no citosol (QIN *et al.*, 2008).

A SOD é capaz de remover o oxigênio singlete, assim como o radical  $O_2^{\bullet-}$ , prevenindo a formação de  $OH^{\bullet}$ . A enzima também exerce um importante papel na dismutação de um elétron dos ânions superóxidos gerados,

---

transformando estes ânions em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $O_2$  (WANG *et al.*, 2005).

### *Catalase (CAT)*

A enzima catalase encontra-se amplamente distribuída no organismo humano. Nos eritrócitos, a catalase é encontrada no citoplasma e nas demais células, ela está presente nas mitocôndrias e nos peroxissomos. A maior concentração da enzima é encontrada no fígado e nos rins. A ação da CAT consiste na capacidade em degradar o  $H_2O_2$  quando presente em grandes quantidades, através da catálise de dois elétrons produzindo oxigênio e água (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999).

### *Glutathione Peroxidase (GPx)*

A GPx é uma selenoenzima localizada primariamente no citosol e na matriz mitocondrial. Ela tem papel principal na proteção da membrana celular frente à peroxidação lipídica, catalisando a reação de hidroperóxidos e do peróxido de hidrogênio com a glutathione (GSH), tendo como produto a glutathione na forma dissulfeto oxidada (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999; WANG *et al.*, 2005).

A glutathione redutase (GSH-R) promove a redução da GSSG para a forma tiol da glutathione (GSH), que posteriormente é utilizada pelas células na redução do  $H_2O_2$  e de outros substratos oxidantes num ciclo catalítico acoplado a NADPH.

A glutathione (GSH) está presente em abundância nos compartimentos celulares e subcelulares, distribuída em muitos tecidos. A sua ação na prevenção ao dano oxidativo pode dar-se através da reação com os radicais livres e também na restauração de moléculas danificadas (através de doação de átomos de hidrogênio), na estabilização da estrutura de membranas, na

eliminação de peróxidos formados ou ainda através da manutenção dos grupos tióis das proteínas em sua forma reduzida. A GSH também é capaz de reduzir o ácido ascórbico oxidado através de uma reação mediada pela enzima desidroascorbato redutase (CHADIÉRE e FERRARI-ILLIOU, 1999; ROVER JUNIOR, HOER, VELASCO, 2001).

### **2.3.2. Antioxidantes exógenos: os compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos de origem natural são produtos secundários do metabolismo de vegetais e têm como função a proteção da planta contra condições adversas. Eles contribuem para características como adstringência, cor, flavour e também para a estabilidade oxidativa da planta (NACZK e SHAHIDI, 2004).

A atividade antioxidante que os compostos fenólicos são capazes de oferecer ocorre dependente de fatores como a concentração e o tipo de composto presente. Ainda, a ação pode existir sob a forma de sinergismo entre os diferentes compostos (PEDRIELLI e SKIBSTED, 2002; HASSIMOTTO, GENOVESE e LAJOLO, 2005).

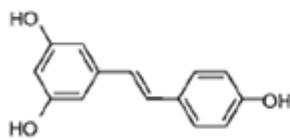
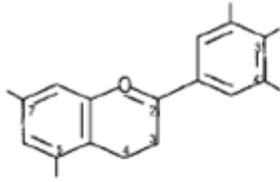
Dentre os compostos fenólicos de origem natural destacam-se os flavonóides e os ácidos fenólicos, e a classificação ocorre de acordo com as suas estruturas químicas (KARAKAYA, 2004).

#### *Flavonóides*

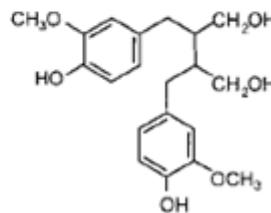
Os flavonóides formam uma extensa classe dentro dos compostos polifenólicos. Eles são formados por uma estrutura principal do tipo difenil-propânica ( $C_6-C_3-C_6$ ), que em dependência do grau de hidrogenação e da substituição do heterociclo ocorre a classificação em diferentes grupos: as flavonas, os flavonóis, as flavanonas, os flavanóis (catequinas), as antocianinas, as isoflavonas, os estilbenos e as chalconas (KARAKAYA, 2004;

MANACH e DONOVAN 2004). A estrutura funcional e os grupos dos flavonóides estão exemplificados na figura 2.

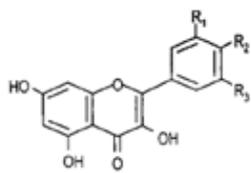
FLAVONÓIDES:



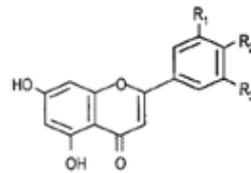
Stilbenos



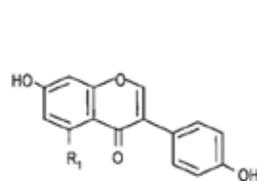
Lignanos



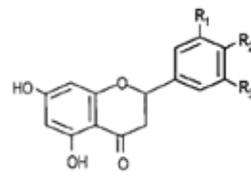
Flavonóis



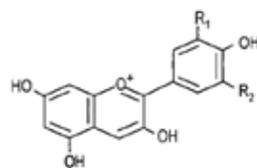
Flavonas



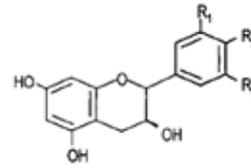
Isoflavonas



Flavanonas



Antocianidinas



Flavanóis

FIGURA 2: Estrutura dos flavonóides e de seus principais grupos (MANACH *et al.*,2004).

### Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são os compostos de estrutura mais simples dentre os compostos fenólicos. A sua estrutura compreende um anel aromático com grupos ligados à sua estrutura, dentre os quais o mais comum é a hidroxila. Outros grupos funcionais são os aldeídos, os álcoois ou os ácidos, que podem formar ésteres com os ácidos orgânicos ou unirem-se a açúcares.

Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos: os derivados do ácido cinâmico e os derivados do ácido benzóico. As estruturas diferenciais dos grupos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico estão presentes na figura 3.

#### Ácidos Fenólicos



Hidroxibenzóicos

Hidroxicinâmicos

FIGURA 3: Estruturas dos grupos de ácidos fenólicos: derivados do ácido benzóico e derivados do ácido cinâmico (MANACH *et al.*, 2004).

Os derivados hidroxibenzóicos são encontrados em quantidades pequenas nos vegetais e fazem parte de estruturas complexas como os taninos hidrolisáveis (galotaninos, elagiotaninos). Já os derivados hidroxicinâmicos são encontrados em maiores quantidades em relação aos hidroxíácidos nos vegetais (MANACH *et al.*, 2004).

#### 2.4. Métodos de avaliação da capacidade antioxidante

Frente à diversidade de compostos com capacidade antioxidante, sabendo-se que os mesmos são capazes de agir por um ou mais mecanismos na inibição da oxidação e que, ainda, comportam-se de maneira distinta de acordo com o meio onde estão presentes, é necessária que a determinação da capacidade antioxidante seja avaliada utilizando-se mais de um método.

A metodologia para mensurar a atividade antioxidante permite utilizar substratos lipídicos ou aquosos e também a capacidade protetora sobre moléculas biológicas (como a LDL, o DNA e lipossomas). O método colorimétrico TBARS (*tiobarbituric acid reactive species*) baseia-se na reação entre o ácido tiobarbitúrico e o malonaldeído (MDA), decorrente da quebra dos ácidos graxos insaturados na reação de oxidação. Os compostos antioxidantes são capazes de inibir a oxidação das moléculas de lipídeos e conseqüentemente, a concentração de MDA é diminuída (SANCHEZ-MORENO, LARRAURI, SAURA-CALIXTO, 1998).

O método desenvolvido por Marco (1968) e posteriormente modificado por Miller (1971) é baseado na técnica de co-oxidação dos substratos ácido linoléico e do  $\beta$ -caroteno, em um meio emulsionado. O ácido linoléico, ao ser exposto a condições que favorecem a sua oxidação (como a presença do oxigênio e a alta temperatura) produz estruturas radicalares que atacam as duplas ligações do  $\beta$ -caroteno, que ao perder o seu cromóforo provoca a descoloração da solução. O composto antioxidante prolonga o período de formação dos radicais na reação.

O aparelho Rancimat® (Metrohm AG, modelo CH-9100- Herisau, Switzerland) é utilizado para medir a capacidade de um composto em prolongar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. O aparelho reproduz a análise dos métodos como o teste de forno de Shaal, o do oxigênio ativo (AOM) ou o teste

de Swift (HASENHUETTI e WAN, 1992). A análise é realizada colocando-se o antioxidante sobre um óleo ou gordura, que são submetidos à alta temperatura (acima de 100 °C) e presença de fluxo de oxigênio. Os produtos secundários da oxidação são coletados em água ultrapura e através de condutividade é realizada a leitura pelo aparelho, que plota os sinais captados. O resultado do cálculo final corresponde ao período de indução da oxidação, a partir do tempo (horas) que o aparelho forneceu após a finalização.

O método do radical ABTS<sup>•</sup> consiste na produção do radical ABTS<sup>•</sup> a partir de seu precursor, o ácido 2,2-azino-bis- (3-etilbenzotiazolin)-6- sulfônico. Ele pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis, tornando-o um teste vantajoso, sendo empregado tanto na análise de compostos extraídos de alimentos, como em amostras biológicas (SCALFI *et al.*, 2000; MAZZA *et al.*, 2002).

O teste do radical DPPH<sup>•</sup> (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) consiste na colocação do composto sobre uma solução contendo o radical, cuja absorvância é lida em comprimento de onda de 515nm. Após a adição, o composto provoca a redução do radical, provocando a descoloração da cor inicial. As vantagens do método consistem em que o radical é comercializado na forma pronta para sua utilização e no tempo de reação curto (30 minutos), o que o torna um método comum para a análise de compostos provenientes de matrizes alimentares. Entretanto, por ser uma reação que ocorre em solvente metanol, seu uso é inapropriado para amostras biológicas, devido à precipitação das proteínas em meio alcoólico (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET.,1995).

Desenvolvido por Cão, Alessio e Culter (1993), o método ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio) utiliza como molécula alvo dos radicais livres de oxigênio as ficobiliproteínas  $\beta$ -ficoeritrinas ou R-ficoeritrina (PE), que são altamente fluorescentes e que contêm um pigmento vermelho fotorreceptor. O fundamento do método consiste na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas, como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer um dano oxidativo (PRIOR e CAO, 1999). O AAPH

é responsável pela geração do radical livre utilizado, a peroxila. O antioxidante padrão utilizado é o Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

A vantagem do método ORAC é que com o uso da fluorescência como medida do dano oxidativo, há uma menor interferência dos compostos coloridos na leitura, fator útil na análise de alimentos coloridos, como vinhos e frutas. Também é vantajoso o uso de radicais peroxila ou hidroxila como radicais, conferindo uma melhor aproximação na comparação de resultados *in vitro* com os padrões biológicos. O método também pode ser utilizado em fluidos biológicos como o plasma, o soro e a urina (CAO, ALESSIO e CULTER, 1993).

A importância do emprego de metodologias diferentes para obter uma melhor visão da atividade antioxidante dos compostos fenólicos de um dado alimento foi discutida por Giada e Mancini-Filho (2008). Os extratos hidroalcoólico e aquoso de sementes de girassol foram analisados pelos métodos ORAC, FRAP e DPPH<sup>•</sup>. O extrato aquoso respondeu com os maiores índices de inibição da oxidação, sugerindo que a interação dos diferentes compostos nele presentes são capazes de interagir de forma a poder oferecer uma melhor atividade antioxidante.

Vidal *et al.* (2009) avaliaram o potencial antioxidante das frações das algas *Halimeda opuntia* e *Halimeda monile* através dos métodos de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico e também pelo método de redução do radical DPPH<sup>•</sup>. Para a *H. opuntia*, a fração de ácidos fenólicos livres, rica em ácido cinâmico, apresentou os maiores índices em ambos os testes de atividade antioxidante. As três frações fenólicas (livre e ligadas a ésteres solúveis e insolúveis) da *H. monile* mostraram alta atividade antioxidante para o teste de co-oxidação, sem diferença significativa entre si. Entretanto, na redução do DPPH<sup>•</sup>, a fração de ácidos fenólicos ligados a ésteres insolúveis foi muito mais eficiente na redução do radical.

## 2.5. Biodisponibilidade dos compostos fenólicos

O conceito de biodisponibilidade pode ser definido como “a fração de um composto, presente numa dose ingerida, que alcança a circulação sistêmica” (STAHL *et al.*, 2002). Estão incorporados dentro desta definição, os conceitos de absorção, metabolização, distribuição (tecidual e bioatividade) e de eliminação. A biodisponibilidade é obtida pela mensuração das concentrações no plasma e na urina dos compostos fenólicos puros ou provenientes de alimentos com composição fenólica conhecida. A estrutura química é um fator determinante da proporção e extensão da absorção e da natureza dos metabólitos circulantes no plasma (GERMANO *et al.*, 2006).

No momento da ingestão não ocorre uma digestão prévia, uma vez que a saliva não tem o poder de realizar essa ação sobre os compostos fenólicos. Alguns compostos, como oligômeros de proantocianidinas podem ser quebrados em moléculas menores (monômeros e dímeros de epicatequina) por ação do suco gástrico (MANACH e DONOVAN, 2004).

### *Absorção*

A absorção de um composto vai depender do quão disponível o mesmo encontra-se para a liberação da matriz e ser absorvido no intestino delgado pelos enterócitos. Nas células intestinais ocorrem duas importantes ações: a deglicosilação dos compostos ligados (pelas enzimas glicosidases presentes na mucosa intestinal) e a glicuronação do composto fenólico na forma livre a uma molécula de albumina, ação que influencia na sua capacidade de difusão através das membranas biológicas.

### *Metabolização*

Após a absorção, o composto é transportado para o fígado, onde ainda pode ocorrer a adição de um grupo sulfato ou metila, ou mesmo de ambos, por

ação das enzimas catecol- o- metiltransferase, sulfotransferases, enzimas de fase I e II ou da UDP- glicuroniltransferase. Esta etapa tem a função de diminuir a toxicidade do composto e aumentar seu tempo de circulação pelo organismo antes da sua eliminação (NIJVELDT *et al.*, 2001; MANACH e DONOVAN, 2004; GERMANO *et al.*, 2006; HOLST e WILLIAMSON, 2008).

Os ácidos fenólicos são amplamente conjugados a sulfatos e glicuronatos. De acordo com a sua estrutura ocorre uma o-metilação e glicuronização (NARDINI *et al.*, 2006).

O conhecimento da metabolização dos compostos fenólicos ainda não é dominado por completo. A presença do composto na corrente sanguínea, tal qual na forma ingerida, é muito baixa e os testes que permitem o seu doseamento no sangue ainda não são capazes de detectar com precisão os compostos em todas as formas metabolizadas. Este fator prejudica a avaliação do potencial do composto na ação antioxidante *in vivo* (MANACH e DONOVAN, 2004).

### *Eliminação*

Um fator que tem influência na eliminação do composto é sua estrutura/tamanho da molécula. Os compostos fenólicos com elevados pesos moleculares e alto grau de polimerização não sofrem ação enzimática no trato gastrointestinal e não são absorvidos no intestino delgado, passando ao cólon, onde são hidrolisados ou degradados pelas enzimas da microflora colônica a ácidos fenólicos mais simples. A eliminação dos compostos de menor peso molecular é realizada pela urina ou pela bile, via pela qual os compostos ainda podem chegar ao duodeno e sofrer ação das enzimas bacterianas (especialmente da  $\beta$ -glicuronidase) e serem reabsorvidos. Por fim, os compostos fenólicos resistentes à degradação pela microflora colônica (como os taninos insolúveis) são excretados nas fezes (MANACH *et al.*, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2008).

---

A figura 4 traz o esquema de biodisponibilidade que um composto antioxidante percorre no organismo após a ingestão.

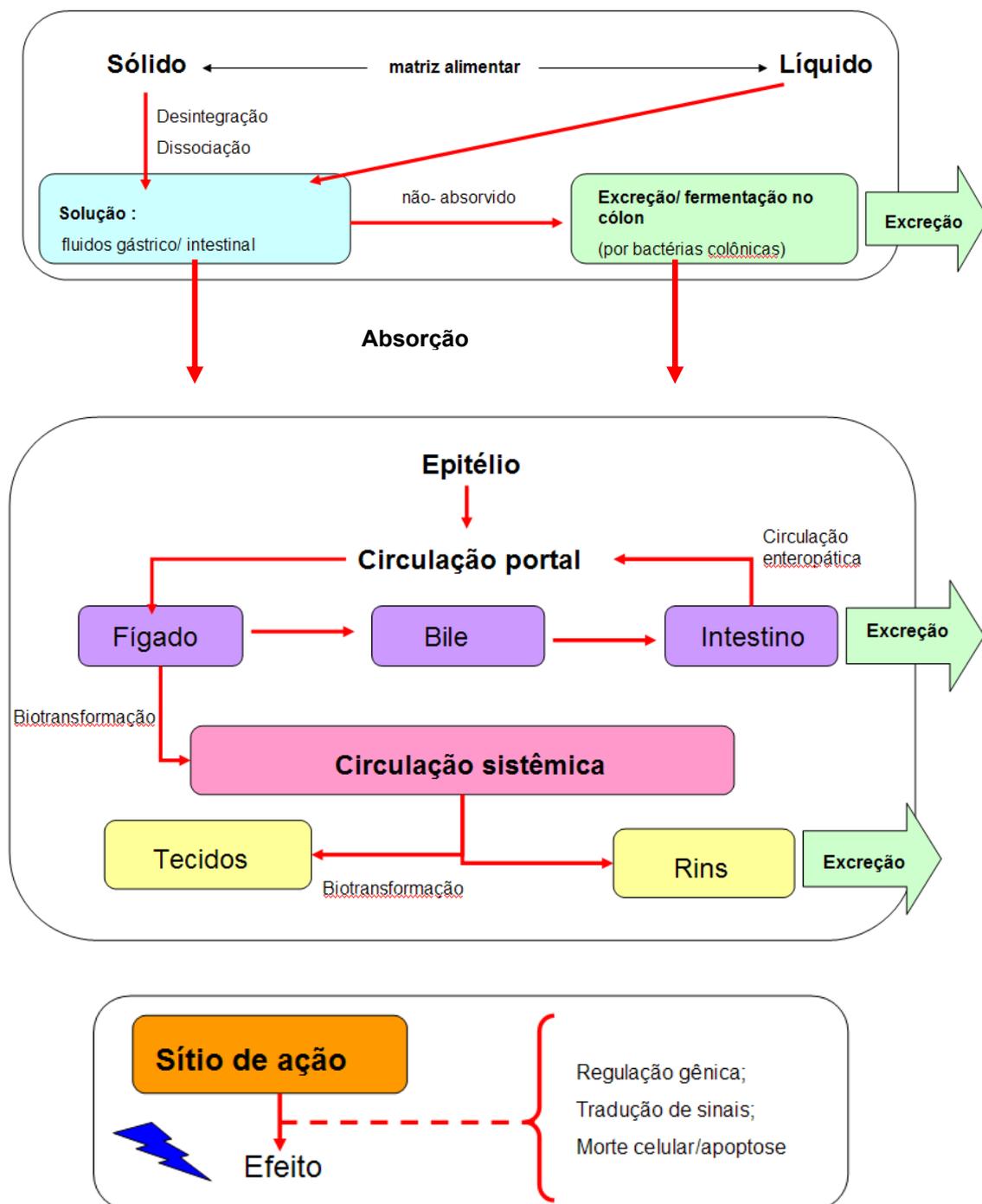


FIGURA 4: Esquema sobre a biodisponibilidade dos compostos fenólicos no organismo (STAHL *et al.*, 2002).

## 2.6. Os compostos fenólicos e seus efeitos no organismo e em cultura de células

Ao longo dos anos, estudos mostraram evidências que o consumo de compostos fenólicos traz benefícios ao organismo, e este fato estaria associado ao seu poder antioxidante. Como exemplos, podemos citar a ação dos fenólicos presentes no vinho tinto e que foram capazes de inibir a oxidação da LDL *in vitro*. Este fato sustenta a explicação para o “paradoxo francês”: apesar do alto consumo de lípidos, a população estudada apresenta boa equalização dos valores relativos às lipoproteínas, o que foi relacionado ao elevado teor de flavonóides provenientes da dieta. Também o estudo epidemiológico intitulado Zutphen, realizado na Holanda, mostrou a correlação inversa entre a incidência de risco de doença coronariana e o consumo diário de flavonóides (HALLIWELL *et al.*, 2007).

Os estudos na área da biologia molecular evidenciam que os compostos fenólicos podem exercer funções moduladoras sobre as células, através da ativação da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), da proteína kinase C (PKC). Os compostos podem ainda desempenhar papéis: na regulação das enzimas que ativam ou têm papel na detoxificação de agente carcinógenos (enzimas de fase I e II), interferência sobre a atividade (*downregulation*) de enzimas pro-inflamatórias (COX-2 e iNOS), regulação da homeostase do cálcio e do ciclo celular, dentre outras possíveis atuações (HALLIWELL *et al.*, 2007; SOOBRAATEE *et al.*, 2005; MOON, WANG e MORRIS, 2006).

Diferentes linhagens celulares responderam de maneira distinta à exposição com compostos fenólicos. Rahman, Biswas e Kirkham (2006) observaram que o resveratrol, um composto fenólico presente em grande quantidade nas uvas, e o galato de epigalocatequina – EGCG, que está presente no chá verde foram capazes de estimularem (em concentrações menores de 20  $\mu$ M) ou inibirem (quando em altas concentrações) a via MAPK, de grande importância para a proliferação celular. O EGCG em altas concentrações foi ainda capaz de causar a apoptose das células.

PENG *et al.* (2008) demonstrou que os fenólicos extraídos do chá de uma planta chinesa (*Duchesnea indica*) usada na medicina popular foram capazes de inibir a proliferação de células de diferentes linhagens de origem tumoral, após um período de exposição de 72 horas. Os autores também verificaram a apoptose em células da linhagem SKOV-3, após o tratamento com os compostos fenólicos nas concentrações de 40 a 160 µg/mL durante 36 horas.

O ácido fenólico paeonol, encontrado na *Paeonia Suffruticosa* (uma planta medicinal comum na China) foi capaz de induzir, de maneira dose- dependente (de 15,63 a 125 mg/L de concentração) a redução da viabilidade de células das linhagens SEG-1 e Eca-109. Sob as mesmas condições, o aumento no número de células em apoptose foi observado (SUN *et al.*, 2008).

A exposição à fração fenólica do morango, na concentração de 50 µg de equivalentes de ácido gálico/ mL foi capaz de provocar uma redução de 50% na viabilidade de células da linhagem HeLa. A linhagem Caco-2, respondeu com a diminuição da viabilidade em uma dose menor (25 µg de eqAG/ mL). Entretanto, na dose de 50 e 75 µg de eqAG/ mL, a segunda linhagem respondeu com índices de porcentagem de células inviáveis menores que àqueles obtidos pelas células HeLa, nas mesmas concentrações (McDOUGALL *et al.*; 2008).

## 2.7. Romã

A romã (*Púnica granatum*, L.) é uma fruta originária do Oriente Médio. Pertencente à família Punicaceae, a romanzeira cresce em regiões de clima árido, e sua frutificação acontece entre os meses de setembro a fevereiro. A figura 5 apresenta o fruto e a compartimentalização das sementes revestidas pela polpa, de coloração avermelhada, onde estão presentes os compostos fenólicos.

Entre os principais compostos fenólicos encontrados na parte interna da fruta, encontramos as antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina), flavonóides (quercetina, rutina), taninos hidrolisáveis (elagio e galotaninos) e também os ácidos fenólicos (principalmente os ácidos gálico e elágico) (JURENKA, 2008).

A atividade antioxidante do suco da romã foi superior às alcançadas pelo vinho tinto e pelo chá verde, duas bebidas reconhecidas e divulgadas pelo seu poder antioxidante (MERTENS-TALCOT *et al.*, 2006). A alta atividade antioxidante *in vitro* também foi verificada em trabalho com os extratos obtidos da polpa e das sementes da romã (JARDINI e MANCINI-FILHO, 2007).

Em seus trabalhos de revisão, Lanski e Neeman (2007) e Jurenka (2008) relataram que o suco da romã ou os extratos obtidos da fruta, ou ainda os seus compostos isolados já apresentaram resultados positivos em relação a doenças cardiovasculares, na inflamação e também no câncer.

Um dos primeiros trabalhos exibindo os benefícios dos compostos fenólicos da romã foi descrito por Schubert, Lanski e Neeman (1999). O trabalho mostrou que os flavonóides extraídos do suco fermentado e do óleo das sementes provocaram inibição da atividade das enzimas oxidantes ciclooxigenase e lipooxigenases, importantes no desenvolvimento do processo inflamatório. Seguidamente, trabalhos mostraram a contribuição benéfica do suco da romã na atenuação de fatores aterogênicos (AVIRAN *et al.*, 2000; AVIRAN e DORNFELD, 2001). O extrato feito com o pós da casca da fruta atuou na modulação das respostas antiinflamatórias (ROSS, SELVASUBRAMANIAN e JAYASUNDAR, 2001).

O extrato metanólico da fruta inibiu em até 74,21% a formação da úlcera gástrica, e juntamente também foi observado uma diminuição da lipoperoxidação local e o acréscimo dos níveis das enzimas do sistema de

---

defesa antioxidante GPx, CAT e SOD, e também da glutathione (AJAIKUMAR *et al.* 2005).

O trabalho de Mertens-Talcot *et al.* (2006) submeteu humanos à ingestão de uma cápsula 400mg de extrato de romã comercial (sendo 21,6mg de ácido elágico e 330,4mg de elagiotaninos), seguida de análise do plasma dos indivíduos. Os elagiotaninos não foram detectados, já a presença do ácido elágico e seus metabólitos foi positiva na primeira hora após a ingestão, em quantidades que variáveis entre indivíduos. A avaliação da atividade antioxidante do plasma foi avaliada pelo método ORAC e mostrou um aumento de 2,5 vezes na capacidade antioxidante do plasma, decaindo após 1 - 2 horas pós-ingestão. Os autores sugerem que os elagiotaninos não são absorvidos, mas hidrolisados e metabolizados no cólon a estruturas menores, como o ácido elágico, que na forma livre alcançariam a circulação, efetuando o papel da proteção antioxidante.

O ácido elágico e o punicalagin (um tanino encontrado na romã) inibiram a proliferação celular em células das linhagens Caco-2 e CCD-112Con, após 24 horas de exposição, nas concentrações de 30 e 100 $\mu$ M, respectivamente. Os autores do trabalho ainda encontraram que as células Caco-2 (origem tumoral) apresentaram um quadro apoptótico que não foi observado para a linhagem CCD-112Con, de origem sadia (LARROSA, TOMÁS- BARBERÁN e ESPÍN, 2006).



FIGURA 04: Fotos da romã, a fruta fechada e seu interior, contendo as sementes.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral:

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.), e seus efeitos sobre sistemas biológicos.

#### 3.2. Objetivos específicos:

Quantificar o conteúdo de compostos redutores totais nos extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa e sementes da romã e avaliar o potencial de inibição da oxidação dos mesmos utilizando-se três diferentes sistemas *in vitro*: o teste de co-oxidação de substratos  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico; o teste do radical DPPH<sup>•</sup> e o teste de capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC);

Em cultura de células das linhagens MDCK, HeLa e Caco-2 observar a capacidade de absorção dos diferentes compostos fenólicos presentes na fração de ácidos fenólicos da polpa (AFLp) e a ação que a sua capacidade antioxidante exerce sobre a proliferação e a viabilidade celular;

Verificar os efeitos que o extrato aquoso e a fração AFLp são capazes de produzir sobre a lipoperoxidação e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase, avaliadas através de ensaios *in vivo*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Amostra

As romãs, maduras, foram adquiridas no mês de janeiro de 2008, na Central de Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) da cidade de São Paulo, provenientes da cidade de Marília (SP). Após serem lavadas e abertas, foram retiradas as partes internas das frutas, que foram colocadas sobre um tecido do tipo estopa, que foi fechado e torcido manualmente. Com esta ação, coletou-se a polpa na forma de suco, que foi liofilizado. As sementes foram retiradas do tecido, secas em estufa ventilada à 40 °C durante 16 horas, minimizadas em moinho semi-analítico (IKA<sup>®</sup>, modelo A11 Basic) e padronizadas em tamis de malha 32 *mesh*. Ambos os materiais obtidos foram estocados à temperatura de -22 °C.

### 4.2. Obtenção dos extratos da polpa e sementes da romã

Os extratos etéreo, hidroalcoólico e aquoso da polpa e sementes foram obtidos de maneira seqüencial (JARDINI e MANCINI-FILHO, 2007). As extrações foram realizadas na proporção de 1:20 (amostra: solvente), utilizando-se os seguintes solventes em ordem de extração: o éter etílico, a solução hidroalcoólica (etanol 80%) e a água destilada. As amostras foram homogeneizadas durante uma hora, seguida de filtração em funil de Büchner com auxílio de uma bomba de vácuo. O resíduo proveniente da filtração foi seco, pesado e submetido à extração com o solvente subsequente. Os extratos obtidos foram coletados em frasco de vidro âmbar e estocados em congelador à -18 °C.

O esquema mostrando a obtenção seqüencial dos extratos está exposto na figura 6.

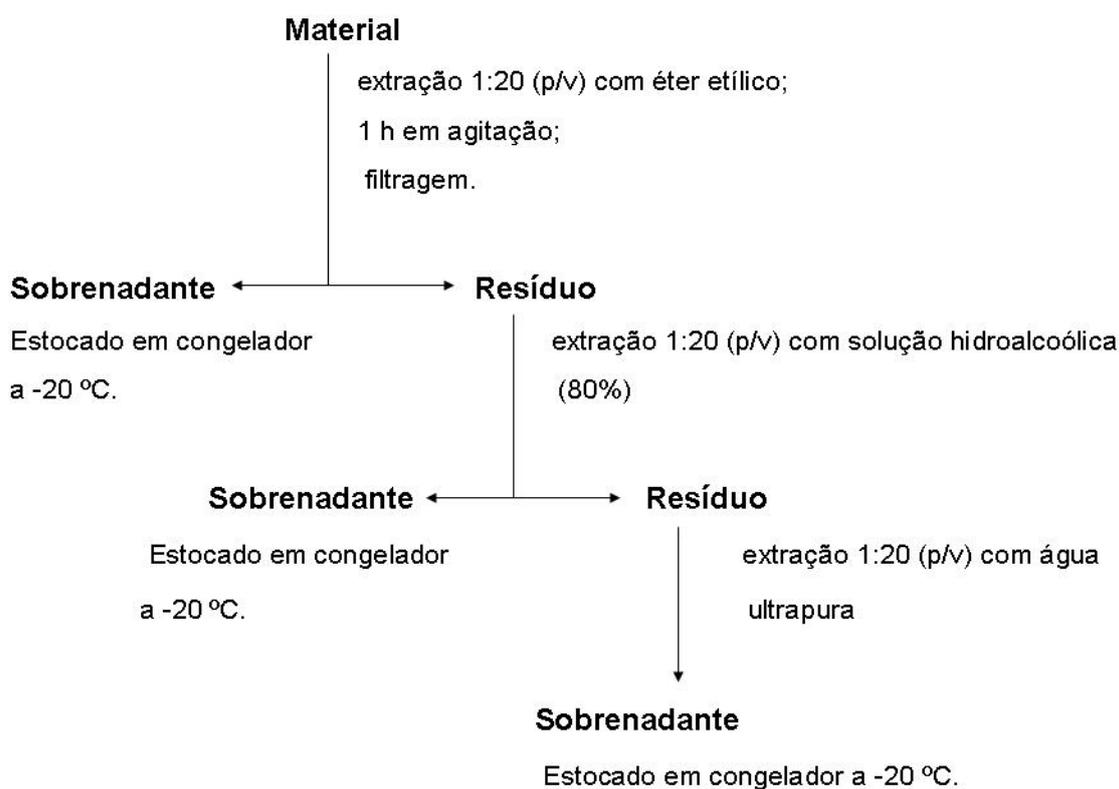


FIGURA 6: Esquema da extração seqüencial para obtenção dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso (JARDINI, 2003).

#### 4.3. Obtenção das frações de ácidos fenólicos

A obtenção das frações de ácidos fenólicos presentes na polpa e sementes liofilizadas da romã foi realizada pelo método descrito originalmente por Krygier, Sosulski e Hogge (1982), com adaptações descritas em Moreira e Mancini-Filho (2003).

A figura 7 traz o esquema para a obtenção das frações de ácidos fenólicos.

#### **4.3.1. Fração de ácidos fenólicos livres (AFL):**

A partir de 1g de amostra previamente desengordurada, realizaram-se seis extrações (20 mL THF/ 1 minuto cada) em aparelho turrax (IKA<sup>®</sup>, modelo DI 25 Basic). O material, obtido de cada extração, foi filtrado em sulfato de sódio anidro e coletado em um balão, para a etapa de retirada completa do solvente em rotaevaporador (Marconi<sup>®</sup>) a 40 °C. Após o procedimento, o material foi ressuspenso em 10 mL de metanol, acondicionado em frasco ambar e mantido à -22 °C.

#### **4.3.2. Fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis (AFES):**

Utilizando-se o resíduo proveniente da extração da fração AFL, foram realizadas seis extrações (20 mL/ 1 minuto cada) com uma mistura de metanol/ acetona/ água (6:6:7) em aparelho turrax. O material de cada extração foi filtrado em sulfato de sódio anidro, coletado em balão e concentrado em rotaevaporador (Marconi<sup>®</sup>) a 40 °C até a fase aquosa. A seguir, foi realizada a hidrólise, medindo-se o volume da amostra e adicionando igual quantidade de NaOH 4N, permanecendo sob agitação e em atmosfera de nitrogênio durante 4 horas. Após esta etapa, ajustou-se o pH para 2,0 (HCl 6N). Em um balão de separação, sucederam-se seis lavagens com 20 mL de hexano cada, e sucessivamente coletou-se a fase inferior, desprezando-se a superior. Após o procedimento descrito, o material proveniente da última lavagem foi transferido para outro balão de separação e adicionou-se a mistura de solventes éter etílico/ acetato de etila/ THF (1:1:1). Após a agitação manual, a fase superior foi coletada e filtrada em sulfato de sódio anidro e a fase inferior foi colocada novamente no balão e extraída, repetindo-se este procedimento por 6 vezes. Após a última extração, o material foi submetido à secagem em rotaevaporador (40 °C) e ressuspenso em 10 mL de metanol. A fração obtida foi acondicionada em frasco ambar e mantida à -22 °C.

---

#### **4.3.3. Fração de ácidos fenólicos esterificados a compostos insolúveis (AFEI):**

A partir do resíduo proveniente da extração da fração AFES, foram adicionados 20 mL NaOH 4N e realizou-se a hidrólise do material (4 horas, mantida sob agitação e atmosfera de nitrogênio). Após esta etapa, o pH da solução foi ajustado para 2,0 (HCl 6N). Em um balão de separação, sucederam-se seis lavagens com 20 mL de hexano cada, e coletou-se a fase inferior, desprezando-se a superior. Após a finalização do procedimento, o material proveniente da última lavagem foi transferido para outro balão de separação e adicionou-se a mistura de solventes éter etílico/ acetato de etila/ THF (1:1:1). Após a agitação manual do balão, a fase superior foi coletada e filtrada em sulfato de sódio anidro e a fase inferior foi colocada novamente no balão e novamente extraída, repetindo-se o procedimento por 6 vezes. Após a última extração, o material foi submetido à secagem em rotaevaporador (40 °C) e ressuspenso em 10mL de metanol. A fração obtida foi acondicionada em frasco ambar e mantida à -22 °C.

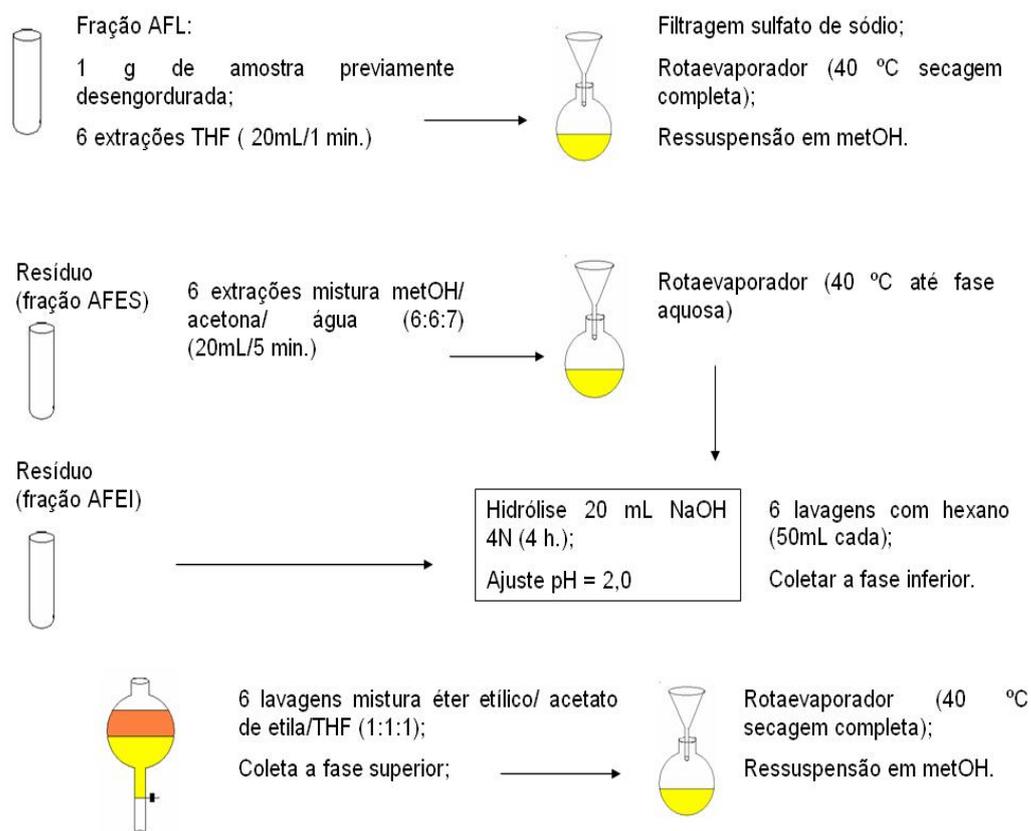


FIGURA 7: Esquema para obtenção das frações de ácidos fenólicos: AFL = ácidos fenólicos livres; AFES = ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis e AFEI = ácidos fenólicos esterificados a compostos insolúveis (Adaptado de JARDINI, 2003).

#### 4.4. Determinação do conteúdo de compostos redutores totais

O conteúdo de compostos redutores totais presentes nos extratos e nas frações de ácidos fenólicos da polpa e sementes da romã foi realizado pela técnica descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteu. Em tubos de ensaio, foram colocados em ordem:

0,2 mL das amostras (adicionando-se 0,3 mL do respectivo solvente, totalizando o volume de 0,5 mL);

0,5 mL de metanol;

7,0 mL de água destilada;

0,5 mL de reagente Folin- Ciocalteau (pausa de 3 minutos para tempo de reação);

1,0 mL de solução saturada de carbonato de sódio.

Os tubos foram agitados e mantidos em ambiente escuro durante 1 hora e realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Thermo Spectronic<sup>®</sup>, modelo Genesys 20) em comprimento de onda 720 nm.

Para a construção da curva-padrão, foi utilizada uma solução de ácido gálico. Os cálculos são realizados através das seguintes fórmulas:

$$K = A (\text{padrão}) / C (\text{padrão}) \quad \text{e} \quad C (\text{amostra}) = A (\text{amostra}) / K (\text{padrão})$$

Onde: K = constante da curva-padrão;

A = absorvância;

C = concentração

Os resultados foram expressos em µg equivalentes de ácido gálico/ mL de amostra.

#### **4.5. Perfil de ácidos fenólicos presentes nas frações por cromatografia gasosa**

A identificação dos principais ácidos fenólicos presentes nas frações da polpa e sementes da romã foi realizada em cromatógrafo a gás (Shimadzu<sup>®</sup> GC, modelo 17A) com detector de ionização de chama conectado a um integrador (Shimadzu<sup>®</sup>, modelo CBM 101) e a coluna utilizada foi uma DB5 semi-polar (25m x 0,25mm, J & W<sup>®</sup>) (BAGGIO *et al.*, 2007). Os parâmetros adotados foram os seguintes:

Temperatura inicial da coluna: 150 °C (isotérmica durante 3 minutos);  
Aquecimento: de 150 °C a 300 °C (5 °C/ minuto) e isotérmica a 300 °C durante 3 minutos;  
Temperatura de injeção: 250 °C;  
Temperatura do detector: 300 °C.

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção relativos aos picos obtidos para cada padrão de ácido fenólico analisado separadamente e para uma mistura dos mesmos. Para a quantificação, o padrão interno utilizado foi o metil heptadecanoato (C17:0), realizando-se o cálculo a partir da comparação da área cromatográfica dos picos dos compostos em relação à área do padrão interno.

#### **4.6. Determinação da atividade antioxidante**

A atividade antioxidante dos extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa e sementes da romã foi avaliada *in vitro* utilizando-se três diferentes métodos, a seguir descritos.

##### **4.6.1. Método de co-oxidação do $\beta$ -caroteno e ácido linoléico**

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada através do método de co-oxidação dos substratos  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico, descrito originalmente por Marco (1968) e Miller (1971). O meio de reação consiste numa emulsão, preparada com os seguintes reagentes:

0,02 mL de solução  $\beta$ -caroteno (20 mg/mL);  
0,06 mL de ácido linoléico;  
200 mg de Tween 40;  
2 mL de clorofórmio.

A mistura foi manualmente homogeneizada e o clorofórmio evaporado sob atmosfera de nitrogênio. A seguir, o conteúdo foi ressuspensão em 120 mL de água destilada previamente submetida a um fluxo de oxigênio (30 minutos). A absorbância da solução (470nm) foi estabelecida entre 0,6 - 0,7. A seguir, 5mL da solução preparada foi colocada em tubos de ensaio, onde previamente foram adicionadas as amostras (os extratos ou as frações) e também o BHT (padrão positivo de comparação) nas concentrações de 0,5; 1 e 2 µg/mL. Um tubo foi preparado somente com a solução, considerado o padrão negativo (branco) para a oxidação. Os tubos foram lacrados com plástico parafilme, agitados e mantidos em banho à temperatura de 50 °C, onde permaneceram durante 120 minutos. As leituras foram realizadas a cada 15 minutos, em espectrofotômetro (Thermo Spectronic®, modelo Genesys 20), em comprimento de onda de 470 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação, através do seguinte cálculo:

$$\% \text{ de inibição da oxidação} = 100 - [(A / B) * 100]$$

Onde: A = é a diferença entre a primeira (tempo 0 minutos) e a última (tempo 120 minutos) leituras realizadas para a amostra;

B= é a diferença entre a primeira (tempo 0 minutos) e a última (tempo 120 minutos) leituras realizadas para o branco.

#### **4.6.2. Método de redução do radical DPPH•**

A capacidade dos extratos e frações em reduzir o radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH•) foi avaliada, seguindo-se o método descrito por Blois (1958). Para o procedimento, foi preparada uma solução metanólica com o radical DPPH• na concentração  $6 \times 10^{-5}$  mol/L. Os tubos de ensaio foram previamente preenchidos com 0,5 mL das amostras a serem avaliadas e também os padrões positivos de comparação (ácido gálico e BHT). As concentrações testadas foram de 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 e 8 ppm. Em seguida, aos tubos já preparados, foi adicionada a solução metanólica contendo o

radical, no volume de 1,5 mL. Um tubo contendo apenas 0,5 de metanol e a solução foi preparado, como padrão negativo para a reação. Os tubos permaneceram durante 30 minutos em ambiente escuro e após foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Thermo Spectronic®, modelo Genesys 20) a 517nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem de redução do radical, através da seguinte fórmula:

$$1 - [(A-B)/A] \times 100$$

Onde: A = leitura do padrão negativo;

B= leitura da amostra.

#### **4.6.3. Método de capacidade de absorção do radical oxigênio – ORAC**

O método ORAC (oxygen radical absorbance capacity assay) foi descrito originalmente por Cao, Alessio e Culter (1993). A reação entre o AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) - que é um gerador de radical livre com a fluoresceína – que está adicionada à amostra- é capaz de produzir fluorescência, cuja intensidade é maior tanto quanto a quantidade de radicais presentes no meio de reação. Quanto menor a leitura da intensidade da fluorescência, maior é a capacidade antioxidante do composto.

Em cada cavidade de uma placa de 96 poços (Fisher Scientific) foram adicionados 25 µL do antioxidante padrão Trolox® (100µM) ou a mesma quantidade das frações da polpa e sementes da romã em diferentes concentrações, adicionando-se também 150 µL de fluoresceína (40µM). A placa foi incubada a 37 °C durante 30 minutos. A seguir, adicionou-se 25 µL de AAPH (153mM), agitou-se por 10 segundos e a seguir a placa foi colocada para a medida da fluorescência em um leitor de placas (BIOTEK®, modelo Synergy), com excitação de 493nm (filtro 485/20) e emissão em 515nm (filtro 528/20) com leituras realizadas a cada minuto, durante 1 hora.

O resultado foi calculado através da equação de regressão entre a concentração de Trolox<sup>®</sup> e a área sob a curva de decaimento da fluorescência (AUC), e expresso em micromoles equivalentes de Trolox<sup>®</sup> /g de amostra.

#### 4.7. Ensaio de transporte celular

A avaliação do transporte celular dos compostos fenólicos presentes na fração AFL da polpa foi realizado através da técnica descrita em Konishi, Kobayashi e Shimizu (2003). O método consiste no emprego de placas para cultivo celular do modelo *transwell*, que são adaptadas para propiciar a verificação do transporte apical/basal de um composto sobre uma cultura de células, através da inserção de um material na interface superior do suporte e coleta do mesmo, na cavidade da placa. A identificação é realizada através de CLAE.

*Preparo das amostras:* Após a eliminação do solvente da fração AFLp em rotaevaporador à 40 °C (Marconi<sup>®</sup>), o conteúdo foi ressuspensionado em solução salina Hanks pH 7,4. O conteúdo de fenólicos totais foi avaliado, utilizando-se o método descrito no item 4.4. O ácido gálico foi pesado e a mesma sequência descrita para a fração foi executada.

*Obtenção da suspensão celular:* As células da linhagem MDCK (passagem 219, obtidas no Instituto Adolfo Lutz e mantidas no Laboratório de Virologia do Instituto Butantan) foram cultivadas em garrafas para cultura de células (TPP<sup>®</sup>, modelo em poliestireno, volume de 75cm<sup>2</sup>) e mantidas em estufa à temperatura de 37 °C, até atingirem o estado de confluência total, quando foram tripsinizadas e ressuspensas (split 1:5) com o meio de cultura.

*Preparo das placas de cultura celular:* Foram utilizadas placas do modelo *transwell* (Corning Costar, modelo EW 19480-00), às quais sobre a membrana de cada cavidade, foram adicionados 0,2 mL da suspensão celular obtida como descrito acima. Em seguida, uma mistura de meio de cultura Leibovitz 15 (L-15) com adição de 10% de soro fetal bovino (SFB) foi adicionada (0,3 mL) sobre a

membrana contendo a suspensão celular e também na cavidade inferior à membrana (1,0 mL). Após seu preparo, a placa foi colocada em estufa à 37 °C e permaneceu aí durante 3 dias. Este período é necessário para a diferenciação celular, e após seu término, o meio de cultura foi removido e as cavidades foram lavadas duas vezes com uma solução salina Hanks. A seguir, sobre a membrana, a amostra AFLp foi colocada (1,0 mL) e à cavidade inferior, foi adicionado 1,0 mL da solução salina Hanks (pH 6,0). As placas foram mantidas em banho aquecido a 37 °C durante as coletas de alíquotas de 0,15 mL da cavidade inferior, nos tempos 10, 20, 30, 40 e 60 minutos, que foram estocadas em congelador à -20 °C. A cada alíquota que foi retirada, adicionou-se 0,15 mL de solução salina para repor o volume, evitando assim a concentração da amostra na cavidade.

A leitura foi realizada através de CLAE (aparelho *Shimadzu*® modelo LC-20AT) equipado com duas bombas e um detector de arranjo de diodos (*Shimadzu*® modelo SPD-M20A), um forno para coluna (*Shimadzu*® modelo CTO-20A) e um amostrador automático (*Shimadzu*® modelo SIL- 20A) e software LC-solution para aquisição e processamento dos dados. A coluna empregada foi uma C18 (*Shim-pack* CLC-ODS (M)) de dimensões: 25cm x 4,6mm d.i. x 5µm e também uma pré-coluna C18.

A bomba “A” foi preparada com uma solução de água e 0,1% de ácido fórmico e a bomba “B” foi preparada com uma solução de metanol e 0,1% de ácido fórmico.

A programação de temperatura obedeceu a seguinte ordem:

0 a 5 minutos: metanol/ água proporção 5:95;

5 a 30 minutos: metanol/ água proporção 70:30;

30 a 40 minutos: metanol/ água proporção 70:30;

40 a 43 minutos: metanol/ água proporção 5:95.

O tempo de vazão foi de 1,0 mL/ minuto. A temperatura do forno foi de 30 °C e o comprimento de onda do detector foi na faixa compreendida entre 200 e 400nm.

O cálculo foi realizado a partir da construção de uma curva-padrão obtida com os as áreas dos picos da amostra do ácido gálico.

#### **4.8. Avaliação da inibição da formação de radicais livres em cultura de células**

A proteção da fração fenólica AFLp sobre a formação de radicais livres, em cultura de células, foi avaliada pelo método descrito por Ischiropoulos *et al* (1999). Os radicais livres e as espécies reativas são capazes de, no citosol, reagirem com o DCFH<sub>2</sub>-DA, desacetilando-o e formando o composto 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFH), que produz fluorescência. A medida da fluorescência produzida corresponde à estimativa da presença de ROS e RNS intracelular.

*Preparo das amostras:* Após a eliminação do solvente da fração AFLp em rotaevaporador à 40 °C, o conteúdo foi ressuspenso no meio de cultura (L-15) e filtrado em membrana filtrante (Millipore® modelo Millex GP 0,22 µm). A concentração foi avaliada, empregando-se o método descrito no item 4.4.. O ácido gálico foi pesado e o procedimento empregado foi o mesmo previamente descrito.

As células da linhagem MDCK (passagem 233, obtidas do Instituto Adolfo Lutz e mantidas no Laboratório de Virologia do Instituto Butantan) foram cultivadas e uma suspensão celular foi obtida como descrita no item 4.7.. Em seguida utilizou-se uma placa de 24 orifícios (TPP), onde cada cavidade recebeu a adição de 0,2 mL da suspensão obtida e 0,3 mL do meio de cultura L-15 e 10% de soro fetal bovino. A placa foi mantida em estufa (37 °C) durante 48 horas, até as células apresentarem uma confluência superior a 90%. Após este período, adicionou-se o ácido gálico e a fração AFLp nas respectivas concentrações: 10, 25, 50 e 100 µg e 15, 50, 75, 100, 200 e 300 µg. Um conjunto de cavidades foi preenchido somente com o veículo de diluição (meio de cultura), e considerado controle-negativo. A placa foi novamente colocada

em estufa durante 1 hora e a seguir o conteúdo foi retirado e lavou-se 2 vezes cada cavidade com PBS. Uma solução contendo a sonda (DCFH-DA) diluída em PBS e na concentração de 20 $\mu$ M/100mL foi adicionada no volume de 0,5mL/ cavidade. Um conjunto de cavidades não recebeu a suspensão celular e foi preenchido com a sonda, considerando-se como o “branco” para o cálculo posterior dos resultados. A placa foi coberta com papel do tipo metalizado para proteção da luz e a medida da fluorescência foi realizada em leitor de placas (BIO-TEK, modelo FL 600 FA), com comprimentos de onda de excitação de 485nm e de emissão de 538nm.

O cálculo foi realizado através da diferença entre as amostras e o “branco”, sendo o valor correspondente à fluorescência emitida e esta, correspondente à quantidade de DCFH formado pela reação com as espécies reativas.

#### **4.9. Avaliação da viabilidade celular**

A capacidade das frações de ácidos fenólicos da polpa sobre a viabilidade celular foi avaliada, utilizando-se células das linhagens: HeLa (obtidas no Instituto Adolfo Lutz e mantidas no Laboratório de virologia do Instituto Butantan), originada de carcinoma de epitélio uterino humano (passagem 174); MDCK (obtidas no Instituto Adolfo Lutz e mantidas no Laboratório de virologia do Instituto Butantan), proveniente de epitélio renal canino, sadio (passagem 215) e Caco-2 (obtidas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro), originada de carcinoma de cólon intestinal humano ( passagem 36).

Após o preparo das placas de 24 cavidades (utilizando o procedimento descrito no item 4.8), as mesmas foram mantidas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Adicionou-se a fração AFL da polpa e o ácido gálico (as amostras foram preparadas como descritas no item 4.8), nas concentrações de 150, 75 e 15 ug. As placas foram mantidas durante 24 horas em estufa a 37 °C. Em seguida, o material foi retirado das cavidades, sucedendo-se 2 lavagens com solução PBS e as células foram descoladas utilizando-se tripsina, ressuspensas em

solução PBS e centrifugadas (Eppendorf<sup>®</sup>, modelo 5415R). Foi realizada a contagem das células totais em câmara de Neubauer, e a porcentagem de células viáveis foi obtida utilizando-se o corante azul de Trypan. O cálculo foi realizado da seguinte maneira:

$$\frac{A \times 10^4 \times B}{C} = n^\circ \text{ de células / mL}$$

Onde: A = n<sup>o</sup> total de células contadas;

B = fator de diluição;

C = n<sup>o</sup> de quadrados contados.

#### **4.10. Ensaio de verificação da apoptose- teste TUNEL**

Para a análise de verificação da indução da apoptose, foi utilizado o teste TUNEL, empregando-se o In Situ Cell Death Detection Kit, AP (Cat. N<sup>o</sup>. 11.684.809.910 (Roche-Diagnostics<sup>®</sup>).

As células da linhagem MDCK foram cultivadas em lâminas de microscopia e após 24 horas do cultivo inicial, as mesmas foram submetidas aos tratamentos com o ácido gálico na concentração de 200 ppm e da fração AFL da polpa da romã a 10 ppm. Após permanecerem em estufa a 37 °C durante 24 horas, o meio de cultura foi retirado e as células foram fixadas com solução formaldeído 4% em PBS, pH 7,4, durante 1 hora a 15-25 °C. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS e incubou-se com a solução permeabilizadora (0,1% Triton X-100 em solução 0,1% de citrato de sódio, preparada para o uso, durante 2 minutos em temperatura de 2-8 °C. A partir desta fase, foram utilizados os reagentes do kit: as lâminas foram lavadas com PBS e adicionou-se 50µL da solução de reação TUNEL sobre as lâminas, que após foram mantidas em atmosfera úmida até a leitura em microscópio confocal.

#### 4.11. Ensaio biológico

O ensaio biológico foi realizado no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, tendo duração de 30 dias. Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, v. *albinus*) da linhagem Wistar, recém desmamados. Durante o período, os animais foram mantidos em temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  em ciclo de claro/escuro de 12 horas, alimentados com água e ração comercial *ad libitum*.

O tratamento foi realizado via gavagem e o volume administrado foi calculado a partir do resultado da pesagem diária dos animais.

Os animais foram separados em cinco grupos, de acordo com o tratamento a receber:

Grupo controle (tratado com água);

Grupo Extrato aquoso da polpa da romã a 60mg/Kg de peso corpóreo (E60);

Grupo Extrato aquoso da polpa da romã a 240mg/Kg de peso corpóreo (E240);

Grupo Fração de ácidos fenólicos livres da polpa da romã a 20mg/Kg de peso corpóreo (F20);

Grupo Fração de ácidos fenólicos livres da polpa da romã a 80mg/Kg de peso corpóreo (F80).

Os animais receberam anestesia (mistura ketamina e xilocaína 2:1) e sacrificados por hipovolemia. Foi realizada a perfusão dos órgãos com solução NaCl 0,9%. A seguir, o cérebro, o coração, o fígado e o rim foram retirados, embalados e armazenados em congelador  $-80^\circ\text{C}$  para análises posteriores. O sangue foi coletado, centrifugado (Dupont Sorvall, modelo RC5C) e o soro coletado e armazenado em congelador  $-80^\circ\text{C}$ .

## **4.12. Obtenção dos homogenatos de tecidos**

### **4.12.1. Tecidos cérebro, coração, fígado e rins**

Para a obtenção dos homogenatos, foram pesados 1,0g dos tecidos obtidos e homogeneizou-se em turrax (IKA® DI 25 Basic) com solução tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0) (diluição 1:4 m/V e para o fígado 1:3 m/V). Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 3500rpm durante 20 minutos (temperatura de 4 °C). O sobrenadante foi coletado, transferido para tubos Eppendorfes e mantidos à temperatura de -80 °C.

### **4.12.2. Homogenato para análise enzimática**

A obtenção do homogenato para a avaliação das enzimas antioxidantes presentes nos tecidos foi realizada tomando-se 1mL do sobrenadante obtido do homogenato descrito em 4.12.1. Este material foi novamente centrifugado a 10500rpm durante 15 minutos (temperatura de 4°C). Para o homogenato hepático, tomou-se 1 mL e este foi submetido a ultracentrifugação a 105000g durante 60 minutos (temperatura de 4 °C). O sobrenadante foi coletado em Eppendorfes e prontamente congelados à temperatura de -80 °C.

## **4.13. Lipidograma**

Para a realização do lipidograma (análises de triglicérides, colesterol total e colesterol HDL) no plasma dos animais, foram utilizados os kits comerciais Liquiform® LABTEST.

## **4.14. Avaliação do teor protéico**

A avaliação do teor de proteínas presentes no soro do plasma e nos tecidos foi realizado pelo método de Lowry *et al.*, 1951.

Em cubetas de plástico, foram adicionados 0,5mL do material a ser analisado e 1,25mL de solução de mistura alcalina, permanecendo em repouso por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 0,15mL do reagente Folin-Ciocalteu, agitou-se, e o material permanece em repouso durante 30 minutos. Após realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Thermo Spectronic<sup>®</sup>, modelo Genesys 20) em comprimento de onda de 660nm.

Para os cálculos, foi realizada uma curva-padrão com solução de albumina (concentração inicial de 0,5mg/mL) e os resultados foram expressos em mg de proteína/g de tecido.

#### **4.15. Avaliação da lipoperoxidação pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A avaliação da lipoperoxidação foi realizada pela técnica de medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, seguindo o descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi., 1979.

As análises foram realizadas tomando-se uma alíquota de 0,2mL do soro obtido do soro e dos homogenatos dos tecidos (obtidos como descrito no item 4.12.1). A seguir, foram adicionados ao material biológico:

0,2mL de solução SDS 8,1%;

1,5mL de ácido acético a 20%;

1,5mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA);

0,6mL de água deionizada.

Os tubos foram agitados e colocados em banho aquecido à temperatura de 95 °C durante uma hora. A seguir, com os tubos à temperatura ambiente, foram adicionados 1,0mL de água deionizada e 3,0mL de N-butanol. Após a centrifugação a 2000g durante 10 minutos, coletou-se o sobrenadante e realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Thermo Spectronic<sup>®</sup>, modelo Genesys 20) em comprimento de onda de 532nm.

Os cálculos foram realizados a partir de uma curva-padrão com o TEP (concentração inicial de  $10 \times 10^{-5}$  M) e os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de TBARS/mg de proteína.

#### **4.16. Determinação das enzimas antioxidantes**

Para a determinação do teor das enzimas antioxidantes nos tecidos (cérebro, fígado e rins), foram empregados os homogenatos obtidos como descrito no item 4.13.2..

##### **4.16.1. Superóxido Dismutase (SOD)**

Para a análise da SOD, o seguiu-se o método descrito por McCord e Fridovich (1969).

Os homogenatos de cérebro (diluição 1:4), fígado e rins, no volume total de 15 $\mu\text{L}$ , foram colocados em cubetas de vidro. A seguir colocou-se 1 mL do meio de reação, composto por citocromo C 100 $\mu\text{M}$ , xantina 500  $\mu\text{M}$ , EDTA 1 mM e KCN 200  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,8). O volume de xantina oxidase a ser colocado foi determinado pela leitura de um branco formado ausente da SOD. As leituras (550nm) foram realizadas a cada minuto, totalizando 6 minutos (leitor de placas Varian<sup>®</sup>, modelo Cary 50 Probe UV-visible, acoplado a um banho Varian<sup>®</sup>, modelo Cary PCB 150).

Os resultados foram expressos em U/min/mg de proteína, sendo que uma unidade (U) corresponde à atividade enzimática que promove 50% de inibição da xantina, à temperatura de 25 °C, em pH 7,8.

#### 4.16.2. Catalase (CAT)

A análise da CAT foi seguida segundo o método descrito por Beutler (1975).

Os homogenatos do fígado (diluição 1:40) e rins (diluição 1:250), no volume final de 1mL, foram colocados em cubetas de quartzo. A seguir, colocou-se a solução de reação, composta por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM (10uL de peridol 30% em 10 mL de água deionizada) e tampão Tris- HCl 1M EDTA 5nM em pH 8,0. As cubetas permaneceram à temperatura de 37 °C, e foram realizadas seis leituras (230nm), a cada intervalo de um minuto.

Os resultados foram expressos em U/min/mg de proteína. Uma unidade (U) de catalase corresponde à atividade da enzima que realiza a hidrólise de 1umol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto a 37 °C, em solução pH 8,0.

#### 4.16.3. Glutathione Peroxidase (GPx)

A medida da enzima GPX foi realizada pelo método descrito em Sies *et al.*, (1979).

Em cubetas de quartzo, foram colocados os homogenatos de cérebro, fígado e rins (este, na diluição 1:10), no volume total de 10uL. O meio de reação foi formado por glutathione reduzida (GSH) 1mM, glutathione reductase 0,1 U/mL, NADPH 20mM, EDTA 5 mM (pH 7,0) e tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0). Esta solução foi incubada durante 1 minuto, à temperatura de 30 °C. Após, foram adicionados 10uL de uma solução de terc-butila 0,5 mM, incubou-se novamente e as leituras (340nm) foram realizadas a cada minuto, durante seis minutos.

---

Os resultados foram expressos em U/min/mg de proteína, sendo que uma unidade (U) corresponde à atividade enzimática que oxida 1  $\mu$ M de NADPH por minuto, à temperatura de 30 °C, em pH 7,0.

#### **4.17. Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism®, versão 3.02. Empregou-se a análise de variância pelo teste ANOVA, com posterior teste de Tukey, empregando-se o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  desvio-padrão. Para a análise de avaliação da viabilidade celular, os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  erro-padrão.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Conteúdo de compostos redutores totais**

Os resultados da análise dos compostos com capacidade redutora dos extratos e frações obtidos da polpa e sementes da romã estão expostos na figura 8.

Os extratos obtidos da polpa, hidroalcoólico e aquoso, apresentaram conteúdos de compostos redutores totais de 832,04 e 701,98 $\mu$ g equivalentes de ácido gálico/mL de amostra, respectivamente. Estes resultados foram significativamente maiores em relação àqueles alcançados pelos extratos obtidos das sementes: 183,47 (hidroalcoólico); 52,27 (aquoso) e 56,5 eq. AG/mL de amostra (etéreo).

Os resultados obtidos para as frações de ácidos fenólicos foram significativamente maiores em relação aos conteúdos encontrados para os extratos, destacando-se a fração AFL da polpa que apresentou o maior conteúdo de compostos redutores: 1.399,02  $\mu$ g de eq. AG/mL de amostra. Dentre as frações obtidas das sementes, a AFES alcançou 770,58  $\mu$ g de EAG/mL de amostra, e a fração AFEI foi aquela com menor quantidade de compostos redutores dentre todas as amostras analisadas (493,71  $\mu$ g EAG/mL de amostra).

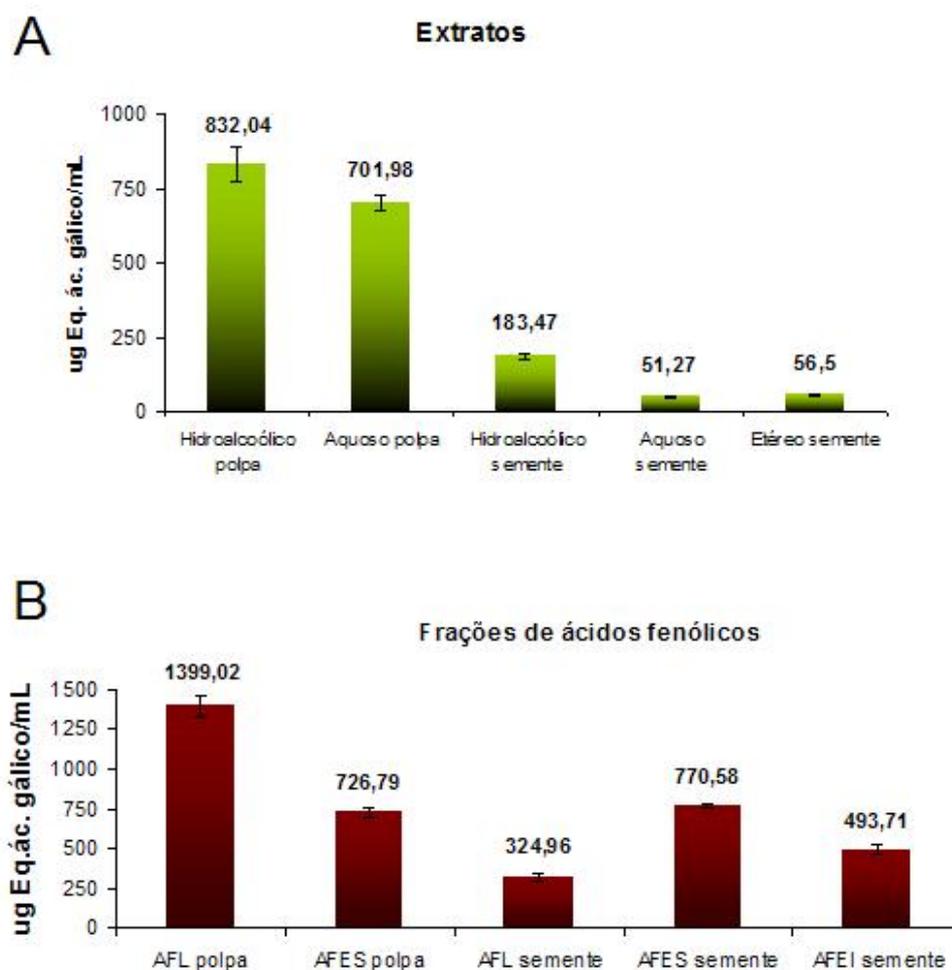


FIGURA 8: Conteúdo de compostos redutores totais presentes nos extratos (A) e frações de ácidos fenólicos (B) da polpa e sementes da romã, expressos em ug equivalentes de ácido gálico/mL de amostra.

Os resultados presentes nos gráficos A e B da figura 8 mostram que a romã possui grande quantidade de compostos redutores, reforçando o que foi descrito em trabalhos anteriores. O suco da romã integral, utilizado por Gil *et al.* (2000) apresentou 2.117 mg/mL de compostos eq. AG/mL de amostra. Wolfe *et al.* (2008) avaliou o teor destes compostos em extratos (obtidos com solução acetona a 80%) de diferentes frutas, e a romã alcançou o conteúdo de 338mg eq. AG/ 100g de amostra, que foi menor apenas que os resultados obtidos pela blueberry e pela amora.

Apesar dos diversos estudos existentes sobre o conteúdo de compostos com capacidade antioxidante para diversas fontes alimentares,

ainda é difícil a elaboração de uma tabela com os resultados obtidos. Os fatores que contribuem para tanto são: a diversidade qualitativa e quantitativa dos compostos presentes em um mesmo alimento (inclusive entre espécies diferentes do mesmo vegetal, por exemplo) e a influência de fatores externos como os climáticos e geográficos (MANACH *et al.*, 2004).

## **5.2. Perfil de ácidos fenólicos presentes nas frações por cromatografia gasosa**

Os resultados do perfil dos principais ácidos fenólicos encontrados nas frações de ácidos fenólicos da polpa e sementes da romã estão listados na tabela 1. O ácido gálico foi encontrado em maiores quantidades na fração AFES da polpa (35,97 mg/100g de amostra) e AFES (14,73 mg/100g) da semente, respectivamente. O ácido protocatequínico, que também apresenta importante atividade antioxidante, foi encontrado em quantidades superiores às do ácido gálico, nas frações AFL da semente (52,43 mg/100g), AFES da polpa (47,83 mg/100g) e AFL da polpa (34,07 mg/100g).

TABELA 1: Principais ácidos fenólicos (mg/100g de amostra) encontrados nas frações fenólicas da polpa e sementes da romã.

Acido fenólico	[mg/100g de amostra]				
	AFLp	AFESp	AFLs	AFESs	AFEIs
Benzóico			3,14 ± 0,05	1,33 ± 0,05	1,74 ± 0,15
Caféico		3,47 ± 0,6		0,73 ± 0,02	0,8 ± 0,08
Clorogénico		2,98 ± 0,02	2,06 ± 0,3		0,6 ± 0,01
o- cumárico	6,61 ± 1,89		1,96 ± 0,13		
p- cumárico	28,76 ± 13,41	26,50 ± 0,5	11,85 ± 1,33		
Elágico		3,3 ± 0,59	1,93 ± 0,17	0,83 ± 0,05	
Gálico	0,63 ± 0,14	35,97 ± 0,33	3,52 ± 0,87	14,73 ± 0,56	
Gentísico	5,05 ± 2,92				
Propilgalato*	4,65 ± 2,07	44,24 ± 13,63	4,11 ± 0,77	4,5 ± 0,41	1,72 ± 0,61
Protocatequínico	34,07 ± 5	47,83 ± 0,43	52,43 ± 7,46	0,84 ± 0,06	
Quínico	24,34 ± 7,02		5,62 ± 2,48		
Salicílico	193,33 ± 57,41	57,12 ± 11,47	175,33 ± 6,94	51,72 ± 8,71	149 ± 28,18
Sináptico		6,76 ± 1,39		2,38 ± 0,15	

Média ± Desvio- padrão (n= 3)

\*propil éster do ácido gálico

AFLp= fração de ácidos fenólicos livres da polpa; AFESp = ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis da polpa; AFLs = de ácidos fenólicos livres das sementes; AFESs = ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis das sementes e AFEIs = ácidos fenólicos esterificados a compostos insolúveis das semente.

A identificação dos ácidos fenólicos presentes nas frações fenólicas apresentou concordância com os ácidos fenólicos descritos em trabalhos anteriores, onde foram relatadas as presenças dos ácidos quínico, gálico, clorogênico, catequínico, caféico e o- e p-cumáricos (ARTIK, MURAKAMI e MORI, 1999; POYRAZOGLU, GÖKMEN E ARTIK, 2002).

### **5.3. Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante dos extratos e frações fenólicas da polpa e sementes da romã foi avaliada utilizando-se três metodologias: o método de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico, o de redução do radical DPPH e o método ORAC. Os resultados obtidos pelos três métodos estão dispostos nas seções 5.3.1, 5.3.2 e 5.3.3, a seguir.

#### **5.3.1. Método de co-oxidação do $\beta$ -caroteno e ácido linoléico**

Os resultados de porcentagem de inibição da oxidação para os extratos da polpa e sementes da romã estão mostrados na tabela 2, e os resultados de porcentagem obtidos pelas frações de ácidos fenólicos da polpa e sementes da romã estão apresentados na tabela 3.

TABELA 2: Inibição da oxidação para os extratos da polpa e sementes da romã pelo teste de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico.

	% de inibição da oxidação		
	0,5	1,0	2,0
BHT	14,73 $\pm$ 3,47	32,20 $\pm$ 6,26	52,30 $\pm$ 9,72
Extrato hidroalcoólico – polpa	18,21 $\pm$ 7,68	45,67 $\pm$ 3,37*	62,03 $\pm$ 5,08
Extrato aquoso - polpa	24,15 $\pm$ 4,52*	44,24 $\pm$ 3,23*	68,24 $\pm$ 1,70*
Extrato etéreo - semente	19,59 $\pm$ 3,20	40,45 $\pm$ 2,44	70,19 $\pm$ 6,04
Extrato hidroalcoólico - semente	14,97 $\pm$ 2,69	25,37 $\pm$ 3,16	44,14 $\pm$ 2,68
Extrato aquoso - semente	35,84 $\pm$ 4,93*	46,23 $\pm$ 5,07*	59,13 $\pm$ 1,08

Concentrações: 0,5; 1,0 e 2,0  $\mu$ g/mL;

Resultados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão; n = 3.

\* = resultado difere estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo BHT;

BHT = butil- hidroxitolueno (padrão positivo de comparação).

O extrato aquoso da polpa apresentou porcentagens maiores de inibição da oxidação em todas as concentrações em relação ao padrão utilizado, e também foi o extrato que possui a maior quantidade de compostos redutores (701,98  $\mu$ g AG/mL de amostra) dentre todos aqueles obtidos. Entretanto, a correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante não ocorre de maneira proporcional e isto pôde ser constatado com a observação dos resultados dos extratos etéreo e hidroalcoólico das sementes. Apesar do pequeno conteúdo de compostos redutores (56,5  $\mu$ g AG/mL de amostra), o extrato etéreo foi aquele que na maior concentração testada superou a porcentagem de inibição alcançada pelo BHT, exibindo 70,19% contra 52,2% do antioxidante padrão. O hidroalcoólico possui quantidade superior de compostos redutores (770,58  $\mu$ g AG/mL de amostra) e as suas porcentagens de inibição da oxidação não reproduziu resultados elevados e também não foram superiores aos índices obtidos pelo antioxidante sintético BHT.

TABELA 3: Inibição da oxidação para as frações de ácidos fenólicos da polpa e sementes da romã pelo teste de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico.

	% de inibição da oxidação		
	0,5	1,0	2,0
BHT	17,81 $\pm$ 4,35	35,25 $\pm$ 9,26	55,25 $\pm$ 14,09
AFL p	62,08 $\pm$ 1,22*	75,18 $\pm$ 0,51*	82,99 $\pm$ 1,59*
AFESp	54,81 $\pm$ 1,03*	67,31 $\pm$ 1,35*	80,70 $\pm$ 1,68*
AFLs	13,06 $\pm$ 2,29	31,64 $\pm$ 2,31	53,92 $\pm$ 3,22
AFESs	40,69 $\pm$ 0,73*	57,51 $\pm$ 4,90*	74,10 $\pm$ 2,95
AFEIs	58,67 $\pm$ 3,63*	75,58 $\pm$ 1,31*	87,51 $\pm$ 1,08*

Concentrações: 0,5; 1,0 e 2,0  $\mu$ g/mL;

Resultados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão; n = 3.

\* = resultado difere estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo BHT;

BHT = butil- hidroxitolueno (padrão positivo de comparação).

AFLp= fração de ácidos fenólicos livres da polpa; AFESp = ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis da polpa; AFLs = de ácidos fenólicos livres das sementes; AFESs = ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis das sementes e AFEIs = ácidos fenólicos esterificados a compostos insolúveis das semente.

De acordo com os dados que podem ser observados na tabela 03, a fração AFL da polpa e a AFEI das sementes destacaram-se sobre as demais frações em relação à capacidade de inibirem a oxidação. Enquanto que a primeira apresenta uma atividade elevada já esperada de acordo com o seu elevado conteúdo de compostos redutores (1399,02  $\mu$ g de EAG/ mL de amostra) apresentados na figura 8. Já a fração AFEI surpreende pois, apesar de seu conteúdo inferior de compostos redutores (493,71  $\mu$ g de EAG/ mL de amostra), o seu desempenho na inibição da oxidação superou não somente os resultados obtidos pelo padrão BHT, mas também por apresentarem-se maiores que a própria fração AFL da polpa.

A atividade dos extratos e das frações fenólicas obtidos de frutos como o chopé (GARCIA-TORRES *et al.*, 2009), romã (JARDINI e MANCINI-FILHO, 2007) e pequi (LIMA, 2008) foram avaliados utilizando-se a metodologia de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico. Dentre os

extratos, os aquosos das três frutas foram os que responderam com os índices mais altos de inibição do processo oxidativo. Já para as frações, a AFEI do pequi e a AFL do chope apresentaram a melhor atividade antioxidante.

### 5.3.2. Método de redução do radical DPPH•

Os dados exibidos na tabela 4 referem-se à IC<sub>50</sub> (dose capaz de reduzir em 50% a atividade do radical DPPH•) para os extratos e frações da polpa e sementes da romã, assim como para o ácido gálico e para o antioxidante sintético BHT.

TABELA 4: Redução do radical DPPH•, para os extratos e frações de ácidos fenólicos da polpa e sementes da romã e para o antioxidante sintético BHT e o ácido gálico.

Amostra	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
BHT	4,34
Acido gálico	1,96
Extrato hidroalcoólico polpa	1,92
Extrato aquoso polpa	1,87
Extrato etéreo semente	4,46
Extrato hidroalcoólico semente	2,23
Extrato aquoso semente	12,79
AFLp	1,9
AFESp	1,04
AFLs	2,14
AFESs	2,07
AFEIs	26,11

AFLp= fração de ácidos fenólicos livres da polpa; AFESp = ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis da polpa; AFLs = de ácidos fenólicos livres das sementes; AFESs = ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis das sementes e AFEIs = ácidos fenólicos esterificados a compostos insolúveis das semente.

De acordo com as IC<sub>50</sub> calculadas e expostas na tabela 4, a fração AFES da polpa é a amostra mais eficiente na redução do DPPH•, pois

---

requer a menor concentração (1,04  $\mu\text{g/mL}$ ) para inibir em 50% a atividade do radical. Dentre as amostras testadas, as que apresentaram menor eficiência foram a fração AFEIs (26,11 $\mu\text{g/mL}$ ) e os extratos aquoso (12,79 $\mu\text{g/mL}$ ) e etéreo (4,46 $\mu\text{g/mL}$ ) das sementes. Dentre os padrões analisados, o ácido gálico apresentou  $\text{IC}_{50}$  muito menor (1,96 $\mu\text{g/mL}$ ) em relação ao antioxidante sintético BHT (4,34 $\mu\text{g/mL}$ ).

Os resultados referentes à capacidade de redução do radical DPPH<sup>•</sup> são apresentados a seguir, nas tabelas 5 e 6.

TABELA 05: Porcentagens de redução do radical DPPH•, para os extratos da polpa e sementes da romã comparadas ao antioxidante sintético BHT e ao ácido gálico.

	% de redução do radical DPPH							
	0,1	0,25	0,5	1	2	4	8	
BHT	1,45 ± 0,09	4,53 ± 0,03	7,45 ± 0,28	14,08 ± 0,79	25,29 ± 0,75	46,11 ± 0,38	70,00 ± 0,72	
Ácido gálico	2,42 ± 1,80	6,05 ± 3,12	15,11 ± 0,91	26,73 ± 0,43	50,99 ± 0,85	78,28 ± 1,28	79,22 ± 0,43	
Extrato hidroalcoólico polpa	5,90 ± 1,51	13,38 ± 1,12	18,83 ± 0,82	29,63 ± 0,20	51,65 ± 1,41	89,26 ± 4,21*	93,09 ± 1,42	
Extrato aquoso polpa	3,24 ± 1,22	7,09 ± 0,10	16,01 ± 0,77	30,81 ± 4,21	53,43 ± 2,78	89,58 ± 1,88*	93,27 ± 0,48	
Extrato etéreo semente	2,17 ± 1,14	4,03 ± 0,09	7,69 ± 3,14	10,37 ± 0,36	30,83 ± 2,99	44,84 ± 2,16*	82,56 ± 4,45	
Extrato hidroalcoólico semente	1,45 ± 1,02	7,16 ± 1,02	13,14 ± 0,30	23,46 ± 2,01	44,74 ± 4,04	83,44 ± 3,24	95,93 ± 0,11	
Extrato aquoso semente	1,21 ± 0,73	2,28 ± 0,39	3,69 ± 0,55	5,32 ± 0,55	12,52 ± 0,48	20,57 ± 2,42	31,28 ± 8,34	

Concentrações: 0,1; 0,25; 0,5; 1, 2,4 e 8 µg/mL;

Resultados expressos em média ± desvio-padrão; n = 3;

\*= o resultado difere estatisticamente (p < 0,05) em relação ao grupo BHT;

BHT e ácido gálico = padrões positivos de comparação.

TABELA 06: Inibição da oxidação, pelo teste de DPPH\*, para as frações de ácidos fenólicos da polpa e sementes da romã comparadas ao antioxidante sintético BHT e para o ácido gálico.

	% de redução do radical DPPH							
	0,1	0,25	0,5	1	2	4	8	
BHT	1,45 ± 0,09	4,53 ± 0,03	7,45 ± 0,28	14,08 ± 0,79	25,29 ± 0,75	46,11 ± 0,38	70,00 ± 0,72	
Ácido gálico	2,42 ± 1,80	6,05 ± 3,12	15,11 ± 0,91	26,73 ± 0,43	50,99 ± 0,85	78,28 ± 1,28	79,22 ± 0,43	
AFLp	3,11 ± 2,23	7,56 ± 0,33	15,06 ± 2,71	29,80 ± 2,45	52,54 ± 0,69	70,65 ± 5,74*	83,48 ± 1,73	
AFESp	8,83 ± 1,10	24,18 ± 1,27	32,62 ± 0,11	47,90 ± 6,35	77,63 ± 2,78	90,52 ± 3,62*	93,36 ± 3,33	
AFLs	2,87 ± 0,46	8,08 ± 1,36	15,87 ± 0,53	28,45 ± 0,41	46,78 ± 0,98	70,96 ± 1,20*	85,77 ± 0,77	
AFESs	9,52 ± 1,72	12,54 ± 1,35	20,94 ± 0,51	26,04 ± 3,98	48,38 ± 1,52	70,77 ± 0,84	88,63 ± 3,50	
AFEIs	2,77 ± 1,54	8,32 ± 0,80	12,29 ± 1,13	9,58 ± 1,83	10,04 ± 3,61	11,96 ± 1,32	15,32 ± 1,21	

Concentrações: 0,1; 0,25; 0,5; 1, 2,4 e 8 µg/mL;

Resultados expressos em média ± desvio-padrão; n = 3.

\* = resultado difere estatisticamente (p < 0,05) em relação ao grupo BHT;

BHT e ácido gálico = padrões positivos de comparação.

AFLp= fração de ácidos fenólicos livres da polpa; AFESp = ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis da polpa; AFLs = de ácidos fenólicos livres das sementes; AFESs = ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis das sementes e AFEIs = ácidos fenólicos esterificados a compostos insolúveis das semente.

Os resultados das tabelas 5 e 6 mostram que o ácido gálico apresentou uma porcentagem de capacidade de redução do radical DPPH• ( $79,22 \pm 0,43$ ) superior à do antioxidante sintético BHT ( $70 \pm 0,72$ ), na concentração máxima testada de  $8\mu\text{g/mL}$ . Porém, a  $\text{IC}_{50}$  do ácido gálico é inferior à do BHT, como mostrado na tabela 4. Portanto, o ácido gálico tem uma capacidade antioxidante superior à do BHT para o teste realizado.

A capacidade dos extratos da polpa na inibição do DPPH foi de 93,09% para o hidroalcoólico e 93,27% para o aquoso. Os resultados foram superiores àquele obtido para o ácido gálico (79,22%), na concentração máxima testada de  $8\mu\text{g/mL}$ . Porém, não há diferença para a  $\text{IC}_{50}$  entre as três amostras. Ainda na mesma tabela, os resultados mostram na concentração de  $8\mu\text{g/mL}$  os extratos etéreo e hidroalcoólico apresentaram capacidade de redução do radical maiores (82,57 e 95,93%, respectivamente) em relação ao ácido gálico, que por sua vez foi superior ao extrato aquoso da semente (31,28%). Porém, a  $\text{IC}_{50}$  do padrão fenólico é menor em relação àquela exibida pelos três extratos, e este fato nos permite dizer que em relação às amostras comparadas, o ácido gálico apresentou melhor capacidade antioxidante.

Os resultados da tabela 6 demonstraram que as frações de ácidos fenólicos apresentaram uma porcentagem de redução do radical superiores à do ácido gálico, e na concentração máxima testada de  $8\mu\text{g/mL}$ , a fração AFL da polpa foi capaz de inibir em 83,48% a atividade radicalar, a fração AFES também da polpa alcançou 93,36% de inibição e o ácido gálico ficou com a marca de 79,22% de inibição. Nos resultados apresentados na tabela 4, pode-se comparar que entre as dose relativas à  $\text{IC}_{50}$ , a requerida para a fração AFES foi inferior à do ácido gálico (1,04 e  $1,96\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Esta observação possibilita dizer que a fração AFES possui uma atividade antioxidante acentuada maior do que a do ácido gálico. As frações de ácidos fenólicos AFL e AFES da semente apresentaram uma capacidade de redução do DPPH• (85,77 e 88,63% respectivamente) maiores em relação àquela

referente ao ácido gálico, que por sua vez foi muito superior à fração AFEI (15,32%). Porém, a IC<sub>50</sub> do ácido gálico é menor em relação às três frações fenólicas, o que demonstra que em relação às amostras comparadas, o ácido gálico apresentou melhor capacidade antioxidante.

A capacidade redutora do DPPH<sup>•</sup> que os ácidos fenólicos clorogênico, salicílico, caféico, protocatequínico e gálico foi descrita por Sroka e Cisowki (2003). O ácido gálico na concentração de 0,11mg/mL reduziu a atividade do radical em 75%, e o resultado está bastante próximo daquelas que foram obtidas nas tabelas 5 e 6.

As frações são constituídas por uma mistura de compostos e mostraram uma maior capacidade na redução do radical em relação ao ácido gálico e este, sobre o BHT, sendo que ambos são compostos isolados. A explicação pode ser o efeito sinérgico que pode acontecer quando dois ou mais compostos atuam em conjunto, e a atividade antioxidante é superior àquela observada quando o composto age isoladamente.

Podemos dizer que a fração AFES da polpa apresentou uma atividade antioxidante de forma mais eficiente para a redução do DPPH<sup>•</sup>. Além de de seus valores superiores de inibição, verificados na tabela 6, o perfil de seus ácidos fenólicos (tabela 1) revela que o ácido gálico está presente em elevadas quantidade, superior às dos ácidos protocatequínico e propilgalato. Os três ácidos apresentam uma considerável atividade antioxidante quando avaliados individualmente (SROKA E CISOWKI, 2003).

Dentre as frações de ácidos fenólicos da alga *Halimeda opuntia* e *Halimeda monile*, fontes do estudo realizado por Vidal *et al.* (2009), a fração AFL da primeira espécie, e a AFEI da segunda mostraram-se superiores, em relação às demais frações, na inibição da atividade do radical DPPH<sup>•</sup>.

### 5.3.3. Método de capacidade de absorção do radical oxigênio – ORAC

Os dados expostos na tabela 7 referem-se aos resultados da atividade antioxidante realizado com as frações de ácidos fenólicos, para o teste ORAC.

TABELA 7: Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos da polpa e sementes da romã expressos em micromoles de peso seco e equivalentes de Trolox®/ g.

Fração	µmoles/g de amostra
AFLp	4107,89 ± 476,28
AFESp	11762,81 ± 931,21
AFLs	974,8 ± 65,67
AFESs	12202,06 ± 419,08
AFEIs	740,72 ± 49,60

Resultados expressos em média ± desvio-padrão, n = 3.

\* = o resultado difere estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle;

AFLp= fração de ácidos fenólicos livres da polpa; AFESp = ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis da polpa; AFLs = de ácidos fenólicos livres das sementes; AFESs = ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis das sementes e AFEIs = ácidos fenólicos esterificados a compostos insolúveis das semente.

De acordo com os resultados expressos na tabela 7, as frações AFES da semente e da polpa apresentaram melhor atividade antioxidante em comparação às demais (12.202,06 e 11.762,81 µmoles equivalentes de Trolox®/g de amostra. O antioxidante Trolox® é um análogo hidrossolúvel sintético da vitamina E, apresenta potente atividade antioxidante e foi utilizado como padrão para o teste. A sua capacidade antioxidante é de 4.000µMol.

O extrato da romã, obtido utilizando-se a acetona como solvente extrator, apresentou um valor de 4.479 µMol de equivalente Trolox/ 100g, para o teste ORAC, no trabalho descrito por Wolfe *et al.* (2008).

O resultado obtido mostra que as frações, com exceção da AFL-semente e AFEI-semente, apresentaram resultados equivalentes ou superiores àquele atribuído ao antioxidante Trolox®.

#### 5.4. Ensaio de transporte celular

O gráfico 1 traz a curva de calibração realizada com o padrão ácido gálico.

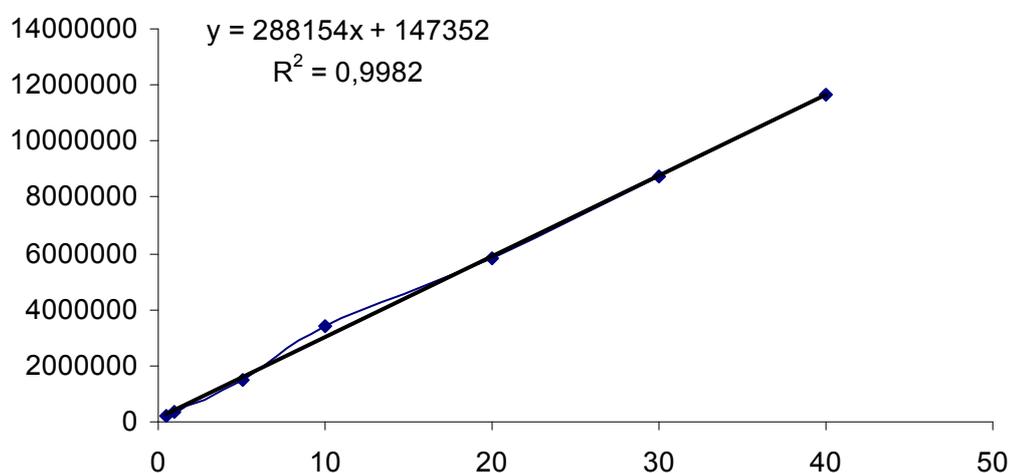


Gráfico 01: Curva de calibração, realizada a partir do ácido gálico.

A tabela 8 mostra os ácidos fenólicos encontrados na fração AFLp e suas respectivas quantidades coletadas durante o período de 1 hora, após passagem por uma cultura de células da linhagem MDCK.

TABELA 8: Avaliação do transporte de ácidos fenólicos presentes na fração fenólica AFL da polpa da romã.

ÁCIDO FENÓLICO	tempo (minutos)						total	
	0	10	20	30	40	60	absorção	absorção %
Caféico	0,71 ± 0,03	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,67	94,37
Catequínico	218,54 ± 25,00	0,45 ± 0,03	4,51 ± 0,43	3,35 ± 0,29	4,89 ± 0,45	4,69 ± 0,58	17,89	8,19
Clorogênico	17,96 ± 1,02	0,08 ± 0,00	0,53 ± 0,51	0,38 ± 0,03	0,5 ± 0,04	0,45 ± 0,04	1,94	10,80
Elágico	8,65 ± 0,76	0,09 ± 0,00	0,26 ± 0,21	0,27 ± 0,02	0,42 ± 0,03	0,36 ± 0,03	1,4	16,18
Ferúlico	2,7 ± 0,19	0,01 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,07	2,59
Gálico	2,13 ± 0,19	0,05 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,57	26,76
Gentísico	2,97 ± 0,21	0,02 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,72	24,24
N-propilgalato	12,88 ± 1,05	0,05 ± 0,00	0,36 ± 0,03	0,36 ± 0,02	0,43 ± 0,03	0,4 ± 0,04	1,6	12,42
O-cumárico	16,19 ± 1,58	0,09 ± 0,00	0,57 ± 0,05	0,57 ± 0,05	0,74 ± 0,07	0,67 ± 0,06	2,64	16,31
P-cumárico	21,14 ± 2,04	0,18 ± 0,01	0,79 ± 0,07	0,8 ± 0,07	0,89 ± 0,08	0,86 ± 0,07	3,52	16,65
Protocatequínico	13,48 ± 1,40	0,06 ± 0,00	0,55 ± 0,05	0,49 ± 0,04	0,55 ± 0,04	0,56 ± 0,06	2,21	16,39
Sináptico	4,21 ± 0,48	0,04 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,03	0,88	20,90
Vanílico	0,64 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,14 ± 0,02	0,45	70,31

Resultados expressos em média ± desvio-padrão (n = 3);

Coluna1, tempo 0 minutos: Resultados (em µg) referentes ao conteúdo dos respectivos ácidos fenólicos no volume de 1mL (volume total da cavidade apical);

Colunas 10, 20,30, 40 e 60 minutos: Resultados (em µg) referentes ao conteúdo dos respectivos ácidos fenólicos no volume de 0,15mL (volume das alíquotas tomadas na cavidade basal).

Os ácidos fenólicos apresentados na tabela 8, avaliados a cada 10 minutos durante 60 minutos referem-se às informações quanti e qualitativas obtidas na análise da amostra, previamente à sua adição sobre a cultura de células. O conteúdo de fenólicos totais (realizado pelo método descrito como no item 4.4) para a fração AFL foi avaliado e o resultado encontrado foi de 466 µg de equivalentes de ácido gálico/ mL de amostra.

De acordo com os resultados expostos na tabela 8, foi possível verificar que, a partir de 20 minutos, um conteúdo maior dos compostos fenólicos foi encontrado no lado basal da cavidade e o volume manteve-se então constante, até a última coleta, realizada aos 60 minutos. Em questão de porcentagem de absorção, os ácidos fenólicos caféico e vanílico apresentaram índices superiores à 50%: 94,37 e 70,31%, respectivamente. Em seguida, os ácidos gálico (26,76%), gentísico (24,24%) e sináptico (20,90%) apresentaram os maiores índices e os demais ácidos foram absorvidos em um nível menor de 20%.

O método de transporte celular constitui uma ferramenta capaz de fornecer uma informação importante para a avaliação da biodisponibilidade de um composto: a sua capacidade de ser absorvido através das células epiteliais. Os ácidos fenólicos p-cumárico (um derivado cinâmico) e gálico (um derivado benzóico) foram avaliados separadamente e foi concluído que os mesmos são transportados da face apical para a basal através de mecanismos diferentes. O ácido p-cumárico sofre sua passagem de forma transepitelial, via transportador ácido monocarboxílico, enquanto que a passagem do ácido gálico ocorreu de maneira não polarizada e mais lenta, supondo-se que o transporte foi executado através da via paracelular. As diferenças estruturais dos compostos podem ser a explicação para os resultados obtidos por Konishi, Kobayashi e Shimizu (2003). Não há dados disponíveis sobre ensaios de transporte utilizando-se amostras onde há uma mistura de compostos fenólicos, como são encontrados nos alimentos.

A diferenciação celular é um estágio onde as células encontram-se prontas em termos de características morfológicas e bioquímicas requeridas

---

para desempenharem sua função no organismo. As células Caco-2 são derivadas de um adenocarcinoma do cólon e de origem humana. O uso desta linhagem em ensaios de transporte de drogas é bastante comum, pois, quando diferenciadas, apresentam as junções apertadas, sendo capazes de expressarem proteínas como a Pgp (p- glicoproteína) e transportadores de dipeptídeos, os quais são importantes no papel de retenção de nutrientes e eliminação de xenobióticos nas barreiras intestinal e renal. As células da linhagem MDCK (derivadas de células renais de cão) possui características muito próximas daquelas observadas para a Caco-2, e os resultados apresentados no trabalho de Irvine *et al.* (1999) mostraram que não houve diferença significativa nos teores dos compostos absorvidos através das duas linhagens celulares. A vantagem da linhagem MDCK sobre a Caco-2 consistiria no tempo que as células requerem para atingirem sua diferenciação, uma vez que para a primeira, o tempo consiste em três dias e para a segunda, entre 14 a 21 dias.

#### **5.5. Avaliação da inibição da formação de radicais livres em cultura de células**

A tabela 9 traz os resultados obtidos na avaliação da capacidade de inibição na formação dos radicais livres, da fração AFLp e do ácido gálico, sobre a cultura de células da linhagem MDCK.

TABELA 9: Avaliação da fluorescência, de acordo com a presença de espécies reativas, em células MDCK tratadas com a fração de ácidos fenólicos da polpa (AFLp) e com o ácido gálico, no período de 1 hora.

GRUPO	FLUORESCÊNCIA
Controle	249,33 ± 16,21
Ác. Gálico 10	290,83 ± 14,33
Ác. Gálico 25	263,50 ± 21,48
Ác. Gálico 50	266,50 ± 50,65
Ác. Gálico 100	140,00 ± 4,56*
AFLp 15	274,83 ± 16,21
AFLp 50	241,17 ± 10,88
AFLp 75	266,50 ± 11,15
AFLp 100	164,67 ± 23,00*
AFLp 200	161,33 ± 29,94*
AFLp 300	139,33 ± 20,65*

Resultados expressos em média ± erro-padrão;

\* amostras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

O teste realizado estabelece uma correlação positiva como fator para a estimativa da quantidade de espécies reativas intracelulares, de acordo com a intensidade da fluorescência produzida pela 2'-7''- diclorofluoresceína (DCFH), formada na reação entre os radicais e a DCFH<sub>2</sub>. Assim, de acordo com os resultados expostos na tabela 12, verificou-se que, nas menores concentrações avaliadas, o ácido gálico (10, 25 e 50 µg) e a fração AFLp (15, 50 e 75 µg) não afetaram de maneira significativa a quantidade das espécies reativas presentes nas células. A redução significativa das espécies reativas somente ocorreu com o aumento das doses, de 100 µg para o ácido gálico e de 100, 200 e 300 µg para a fração AFLp.

Pacheco-Palencia *et al.* (2008) descreveram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, ao verificar que células da linhagem HT-29 expostas ao extrato de açaí sob baixas concentrações (0,4 a 30 µg eq. AG/mL de amostra) foram capazes de produzir quantidades de espécies reativas tanto ou quanto às células sem tratamento. Somente em concentrações mais elevadas foi possível verificar uma diminuição da presença das espécies reativas. Os

autores sugerem que seja possível que somente em altas concentrações os compostos fenólicos sejam efetivos para inibir a formação das ERNs e EROs intracelular. Porém, a complexidade do mecanismo ainda não permite uma melhor explicação para este modelo.

### 5.6. Avaliação da viabilidade celular

Os modelos utilizando culturas celulares constituem importante ferramenta nos estudos de compostos antioxidantes, pois permitem uma ligação entre testes *in vitro* (que oferecem uma interpretação limitada dos resultados uma vez que não refletem uma condição fisiológica) e os testes de biodisponibilidade utilizando animais (LIU e FINLEY, 2005).

A tabela 10 traz os resultados obtidos para o teste de proliferação e de viabilidade celular de células da linhagem MDCK, expostas a tratamentos com o ácido gálico e com a fração AFL da polpa da romã a 150, 75 e 15ug.

TABELA 10: Viabilidade celular e proliferação das células tratadas com o ácido gálico e com a fração AFLp nas concentrações de 150, 75 e 15ug.

	Cels. totais	% cels viáveis	% prolif. celular
Controle	$8,85 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^3$	$75,99 \pm 5,69$	
Ácido gálico 15ug	$6,70 \times 10^4 \pm 9,6 \times 10^3^*$	$50,77 \pm 8,52$	$5,56 \pm 1,3$
Ácido gálico 75ug	$4,5 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4^*$	$70,05 \pm 16,94$	$35,29 \pm 14,75$
Ácido gálico 150ug	$6,20 \times 10^4 \pm 2,2 \times 10^4^*$	$31,37 \pm 9,4^*$	$6,65 \pm 1,59$
Fração AFLp 15ug	$5,9 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4^*$	$78,56 \pm 11,74$	$196,58 \pm 78,19$
Fração AFLp 75ug	$5,1 \times 10^4 \pm 5,3 \times 10^3^*$	$60,18 \pm 10,94^*$	$53,99 \pm 7,79$
Fração AFLp 150ug	$1,7 \times 10^4 \pm 5,5 \times 10^3^*$	$50,91 \pm 10,61^*$	$21,4 \pm 5,78$

porcentagem de crescimento celular em relação ao grupo controle;

Resultados expressos em média  $\pm$  erro-padrão;

\* grupos tratados diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

AFLp = fração de ácidos fenólicos livres da polpa.

De acordo com os dados expostos na tabela 10, foi notado um decréscimo no número de células que receberam os tratamentos, com exceção do grupo tratado com a fração AFLp de 15µg. No grupo tratado com a fração, notou-se uma diminuição da viabilidade com o aumento da dose, assim como a diminuição da viabilidade.

Na tabela 11, estão apresentados os resultados de porcentagem de inibição de crescimento de células da linhagem Caco-2, submetidas aos tratamento com o extrato hidroalcoólico da polpa da romã e do ácido gálico.

TABELA 11: Conteúdo celular e porcentagem de inibição de crescimento, para células da linhagem Caco-2, tratadas com o extrato hidroalcoólico da polpa da romã e com o ácido gálico.

Amostra	nº cel/mL	% inibição crescimento
Controle	$8,83 \times 10^4$	$17,66 \pm 5,75$
Extrato 100ppm	$3,25 \times 10^4$	$6,5 \pm 0,44$
Extrato 200ppm	$2,08 \times 10^4$	$4,16 \pm 1,53$
Extrato 400ppm	$2,33 \times 10^4$	$4,66 \pm 1,38$
Ác. gálico 100ppm	$2,12 \times 10^4$	$4,24 \pm 3,55$
Ác. gálico 200ppm	$2,54 \times 10^4$	$5,08 \pm 2,42$
Ác. gálico 400ppm	$1,49 \times 10^4$	$2,98 \pm 0,90$

n = 3

Resultados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

(JARDINI *et al.*, 2007).

Os resultados da tabela 11 mostram que houve uma inibição significativa do crescimento nas células tratadas com o extrato hidroalcoólico da romã em relação ao grupo controle, não-tratadas. O mesmo aconteceu com o grupo tratado com o ácido gálico. Não houve diferença significativa entre os grupos que receberam tratamento. A inibição do crescimento foi um evento positivo, considerando-se que a linhagem Caco-2 é originária de um tumor do colón.

A tabela 12 traz os resultados de células das linhagens HeLa e MDCK após tratamento com a fração AFES da polpa e com o ácido gálico, sobre a viabilidade celular.

TABELA 12: Células HeLa e MDCK tratadas com a fração AFES da polpa da romã e do ácido gálico a 10, 20 e 40 ug.

	HeLa			MDCK		
	Nº células	Nº células viáveis	% células viáveis	Nº células	Nº células viáveis	% células viáveis
Controle	$2,4 \times 10^5$	$1,15 \times 10^5$	40,76	$4,9 \times 10^4$	$4,07 \times 10^4$	82,65
AFESp 10	$3,92 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$	8,48	$4,33 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$	90,34
AFESp 20	$5,8 \times 10^5$	$1,32 \times 10^5$	21,78	$5,57 \times 10^4$	$4,87 \times 10^4$	87,02
AFESp 40	$6,42 \times 10^5$	$1,27 \times 10^5$	18,57	$2,8 \times 10^4$	$1,77 \times 10^4$	61,39
Ác. gálico 10	$4,36 \times 10^5$	$1,67 \times 10^5$	38,52	$1,14 \times 10^5$	$9,77 \times 10^4$	86,21
Ác. gálico 20	$5,27 \times 10^5$	$1,22 \times 10^5$	22,86	$6,3 \times 10^4$	$5,27 \times 10^4$	78,82
Ác. gálico 40	$5,05 \times 10^5$	$8,25 \times 10^4$	16,63	$1,49 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	86,67

Número de células inicial: HeLa =  $4,05 \times 10^5$  e MDCK =  $6,14 \times 10^3$ ;

Resultados expresos em média ; n = 3;

AFESp = ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis da polpa.

Avaliando-se os resultados apresentados na tabela 12 pode-se verificar que as duas linhagens celulares utilizadas, às quais a HeLa tem origem tumoral (carcinoma uterino) e a MDCK é original de epitélio renal sadio, responderam de maneira diferente aos tratamentos realizados com o ácido gálico e a fração AFES da polpa. A proliferação e a viabilidade não foram alteradas para as células MDCK, quando estas foram tratadas com a fração AFES da polpa. Em resposta ao tratamento com a mesma amostra, houve um aumento no crescimento acompanhado da diminuição da viabilidade celular para a linhagem HeLa, notado na concentração de 10 µg. O tratamento com o ácido gálico provocou uma diminuição mais acentuada da viabilidade das células HeLa, e estimulou o crescimento na linhagem sadia.

Uma das propriedades desejáveis no estudo de novos compostos para fins de quimioprevenção é a ausência ou minimização de efeitos tóxicos em células saudáveis (GALATI e O'BRIEN, 2004). Porém, em células de origem tumoral, é desejável que o composto apresente os resultados que levem à morte celular. Alguns mecanismos dos compostos fenólicos que teriam ação anti-neoplásica incluem as atividades antioxidante, antiinflamatórias e antiproliferativas, assim como efeitos sobre a sinalização, o ciclo celular e a apoptose (SEERAM *et al.*, 2005).

Em trabalho utilizando linhagens de células tumorais de boca, próstata e cólon, Seeram *et al.* (2005) demonstraram que uma fração de elagiotaninos purificados da casca da romã inibiu de 30 a 100% a proliferação celular, em concentrações de 12,5; 25; 50 e 100µg/mL. Apesar de usar uma fração purificada, os autores também utilizaram o suco da fruta, através do qual obteve os resultados mais significativos.

O ácido gálico é conhecido pela sua capacidade na indução da morte celular. Uma diminuição da proliferação e da viabilidade celular foram observadas em células de linhagens tumorais que foram expostas a uma fração onde o ácido gálico estava presente em grande quantidade (55%) (PELLEGRINA *et al.* 2005). Porém, o grupo tratado com o ácido gálico puro causou acentuação dos efeitos anteriormente observados. Em outro trabalho, Gomes *et al.* (2003) expôs a cultura de células HeLa ao ácido gálico, o que provocou após 72 horas de exposição uma diminuição da ordem de 74% na viabilidade celular.

### **5.7. Ensaio de verificação da apoptose- teste TÚNEL**

A figura 8 mostra os resultados obtidos pelo teste TUNEL, para verificação da apoptose em células da linhagem MDCK tratadas com o

ácido gálico e com a fração AFL da polpa da romã, em leitura realizada em microscópio confocal.

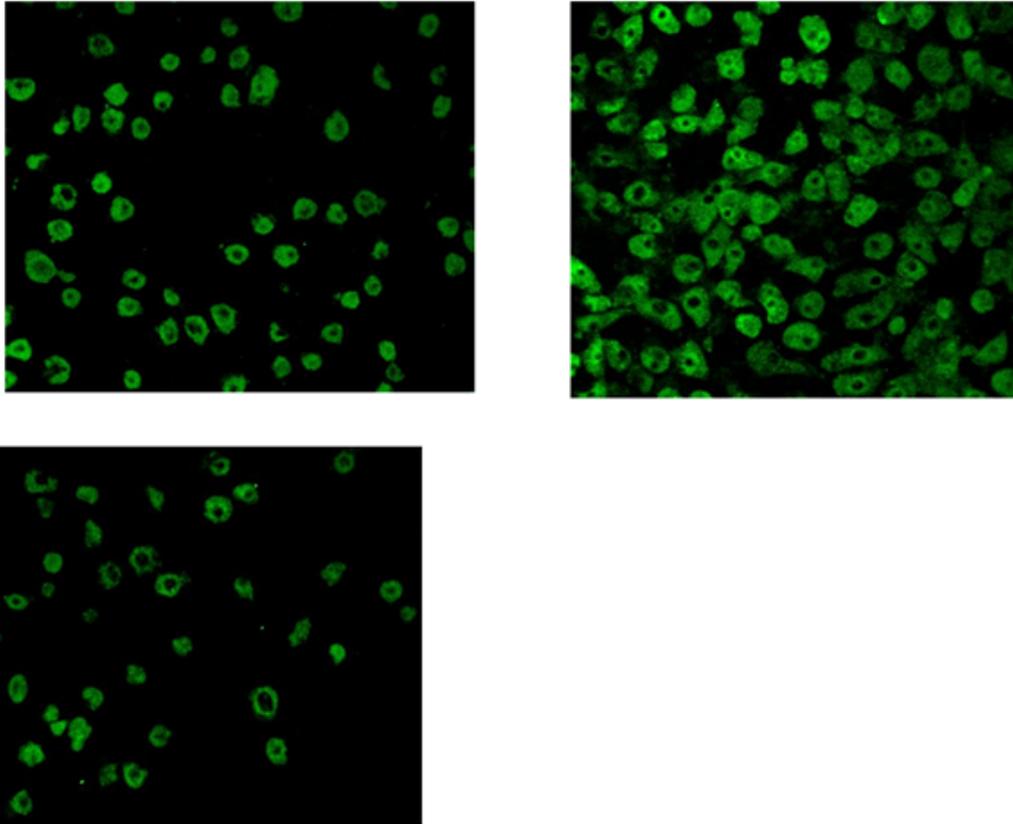


FIGURA 8: Células da linhagem MDCK submetidas a tratamento: (A) Ácido gálico 200ppm; (B) fração AFL da polpa da romã a 10ppm e (C) células sem tratamento.

De acordo com a figura 8, pode-se notar que o grupo tratado com o ácido gálico (A) apresenta menor número de células, que apresentam-se menores. Já as células que foram tratadas com a fração AFL (B) apresentam área bem delimitada e morfologicamente mais semelhantes ao grupo das células que não receberam o tratamento (C). Entretanto, as células tratadas com a fração encontram-se em maior quantidade.

### 5.8. Ensaio biológico

O gráfico 2 mostra a evolução de ganho de peso dos grupos de animais, no período do tratamento.

De acordo com os resultados exibidos no gráfico 2, pode-se observar que os animais de todos os grupos apresentaram ganho de peso no período de 30 dias.

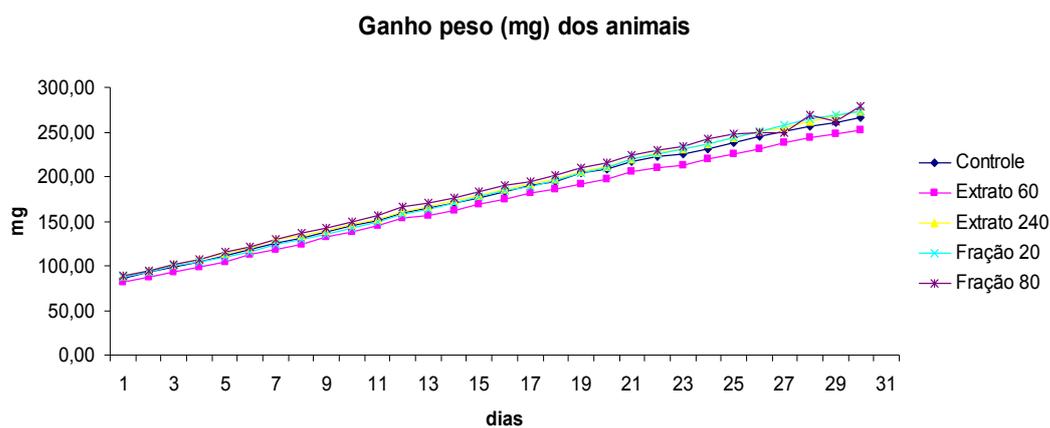


GRÁFICO 2: Evolução do ganho de peso (mg) dos animais, separados pelos grupos de tratamento, no período de 30 dias.

### 5.8.1. Lipidograma

A tabela 13 traz expostos os resultados do conteúdo de triglicérides, colesterol total e da fração HDL obtidos da análise dos animais tratados com o extrato aquoso e com a fração AFL da polpa da romã.

TABELA 13: Conteúdo de triglicérides, colesterol total e colesterol fração HDL (mg/dL) presentes nos animais após tratamento o extrato aquoso e com a fração de AFL da polpa da romã.

GRUPO	Triglicérides	Colesterol mg/dL	HDL
Controle	16,17 ± 6,10	40,28 ± 8,28	28,74 ± 9,13
EAP 60	25,21 ± 9,10 *	48,32 ± 4,57	31,33 ± 7,81
EAP 240	15,55 ± 9,33	39,99 ± 8,49	27,13 ± 8,13
AFLp 20	21,13 ± 8,71	24,12 ± 12,05	34,35 ± 8,75
AFLp80	16,25 ± 7,94	40,61 ± 8,85	25,32 ± 8,69

n = 15;

média ± desvio-padrão;

\*as amostras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle;

EAP = extrato aquoso da polpa (nas concentrações de 60 e 240 mg/Kg de peso corpóreo);

AFLp= fração de ácidos fenólicos livres da polpa (nas concentrações de 20 e 80 mg/Kg de peso corpóreo).

Os resultados da tabela 13 demonstraram que exceto pelo grupo tratado com o extrato aquoso da polpa da romã na dose de 60mg/Kg, os demais grupos não apresentaram alteração significativa em relação aos triglicérides. O mesmo ocorreu para a análise de colesterol, sendo que o grupo tratado com a fração AFL a 20mg/Kg diferiu em relação ao grupo controle. Nenhum grupo mostrou alteração significativa nos níveis de HDL em relação ao grupo controle.

No estudo de Patel *et al.* (2008), ratos Wistar foram tratados com um extrato comercializado da romã (Pomella®) por gavagem nas doses de 60, 240 e 600 mg/Kg durante 90 dias. Todos os animais apresentaram ganho de peso normal e compatível ao do grupo controle. A análise de triglicérides e de colesterol total mostrou que nas doses de 60 e 240mg/Kg houve um aumento não significativo dos resultados em relação ao grupo controle, e que somente o grupo que recebeu a dose de 600 mg/Kg apresentou diminuição no conteúdo de triglicérides em relação ao grupo não tratado.

### 5.8.2. Avaliação da lipoperoxidação pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A tabela 14 apresenta os resultados obtidos na análise da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, onde verifica-se a influência dos extratos e frações da polpa da romã sobre a lipoperoxidação do soro e dos tecidos dos animais após o tratamento.

TABELA 14: Produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), presentes no soro e tecidos cerebral, coronário, hepático e renal dos animais tratados com o extrato e a fração da polpa da romã.

GRUPOS	SORO	CÉREBRO	CORAÇÃO	FÍGADO	RINS
Controle	1,0 ± 0,2	30,2 ± 8,8	2,75 ± 0,63	0,43 ± 0,06	9,35 ± 1,15
EAP 60	0,66 ± 0,11*	30,53 ± 12,89	2,75 ± 0,70	0,35 ± 0,13	17,49 ± 2,11*
EAP 240	1,58 ± 0,49*	16,55 ± 4,36*	4,21 ± 0,49*	0,37 ± 0,09	16,29 ± 3,37*
AFLp 20	1,19 ± 0,28	11,45 ± 4,84*	4,69 ± 0,63*	0,31 ± 0,07*	14,77 ± 2,74*
AFLp 80	1,35 ± 0,48	23,46 ± 11,83	4,37 ± 1,00*	0,95 ± 0,41*	19,33 ± 3,44*

Resultados ( $\mu\text{M}$  de MDA/mg de proteína) expressos por média  $\pm$  desvio-padrão;

\* amostras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) e relação ao grupo controle;

EAP = extrato aquoso da polpa (nas concentrações de 60 e 240 mg/Kg de peso corpóreo);

AFLp= fração de ácidos fenólicos livres da polpa (nas concentrações de 20 e 80 mg/Kg de peso corpóreo).

De acordo com os dados apresentados na tabela 14, pode-se observar uma proteção no nível da peroxidação acentuada no tecido cerebral, na concentração de 240 mg/Kg no extrato aquoso e nas concentrações de 20 e 80 mg/Kg na fração de ácidos fenólicos livres da polpa da romã. No tecido hepático, foi observada uma discreta proteção, para os tratamentos com os extratos em ambas concentrações e na fração AFLp a 20 mg/Kg. Notou-se também uma proteção no soro dos animais que recebeu, tratamento com o extrato na concentração de 60 mg/Kg.

Os resultados obtidos na análise do coração e dos rins mostram que houve um aumento significativo no valor de lipoperoxidação tecidual, para todos os grupos tratados, não se tendo uma justificativa para tal fato.

O trabalho de Faria *et al.* (2007) descreve que camundongos que ingeriram suco da polpa da romã *ad libitum*, contendo 1844 ppm de fenólicos totais (de acordo com o consumo médio descrito, os animais ingeriram aproximadamente 14mg de compostos, para um peso corpóreo médio de 32 g), não apresentaram diferença significativa na lipoperoxidação hepática, em relação ao grupo controle.

### **5.8.3. Determinação das Enzimas Antioxidantes**

#### **5.8.3.1. Superóxido Dismutase (SOD)**

Os dados presentes na tabela 15 mostram os resultados para análise da atividade da enzima SOD nos tecidos cerebral hepático e renal, após o tratamento com o extrato e fração AFL da polpa da romã.

TABELA 15: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), expressos em para os tecidos cerebral, hepático e renal, após o tratamento com o extratos aquoso e fração fenólica da polpa da romã.

	Controle	EAP 60	EAP 240	AFLp 20	AFLp 80
Cérebro	201,24 ± 12,42	292,04 ± 15,40*	221,38 ± 12,05*	313,62 ± 14,52*	148,24 ± 2,06*
Fígado	13,66 ± 0,6	12,65 ± 0,66*	13,41 ± 0,76	12,79 ± 0,73*	17,22 ± 0,91*
Rins	304,81 ± 18,12	271,86 ± 5,7*	303,06 ± 13,22	307,12 ± 10,7	316,34 ± 11,34

Resultados (U/minuto/mg de proteína) expressos por média ± desvio-padrão;

\* amostras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si.

EAP = extrato aquoso da polpa (nas concentrações de 60 e 240 mg/Kg de peso corpóreo);

AFLp= fração de ácidos fenólicos livres da polpa (nas concentrações de 20 e 80 mg/Kg de peso corpóreo).

A enzima SOD é capaz de remover com o oxigênio singlete e o radical peróxido, inibindo a formação de  $\text{OH}^-$ , além de também agir na dismutação de um elétron dos ânions superóxidos gerados, transformando-os em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e  $\text{O}_2$  (WANG *et al.*, 2005). A tabela 15 mostra que no tecido cerebral, houve um aumento significativo na atividade da SOD, exceto no grupo tratado com a fração AFLp na concentração de 80 mg/Kg, onde houve decréscimo da atividade enzimática. O aumento da atividade também foi verificado no tecido hepático do grupo de animais tratados com a fração AFLp na concentração de 80 mg/Kg. A alteração observada no tecido renal foi a diminuição da atividade enzimática, para o grupo que recebeu o extrato aquoso da polpa da fruta na dose de 60mg/Kg, em relação ao grupo controle. Estes resultados estão de acordo com os obtidos na avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico apresentados na tabela 14.

### 5.8.3.2. Catalase (CAT)

Os resultados referentes à atividade da enzima CAT, nos tecidos hepático e renal dos animais após o tratamento com o extrato e a fração AFLp estão mostrados na tabela 16, a seguir.

TABELA 16: Atividade da enzima catalase (CAT), nos tecidos hepático e renal, após o tratamento com o extratos aquoso e fração fenólica da polpa da romã.

	Controle	EAP 60	EAP 240	AFLp 20	AFLp 80
Fígado	20,65 ± 5,66	22,57 ± 5,27	35,77 ± 4,81*	14,95 ± 2,96	14,94 ± 3,53
Rins	385,01 ± 65,99	307,26 ± 86,63	323,57 ± 108,34	685,31 ± 57,08*	596,89 ± 54,41*

Resultados (U/minuto/mg de proteína) expressos por média ± desvio-padrão;

\* amostras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si.

EAP = extrato aquoso da polpa (nas concentrações de 60 e 240 mg/Kg de peso corpóreo);

AFLp= fração de ácidos fenólicos livres da polpa (nas concentrações de 20 e 80 mg/Kg de peso corpóreo).

A enzima catalase (CAT) possui a capacidade de degradar o  $H_2O_2$  quando presente em grandes quantidades. De acordo com os dados apresentados na tabela 16, é possível verificar que a atividade da CAT encontra-se aumentada no grupo que foi tratado com o extrato aquoso da polpa da romã na concentração de 240 mg/Kg, no tecido hepático. Para o tecido renal, a atividade da CAT encontrou-se significativamente aumentada nos animais de ambos os grupos tratados com a fração AFLp.

### 5.8.3.3. Glutathiona Peroxidase (GPx)

A tabela 17, apresentada a seguir, exhibe os resultados referentes à atividade da enzima GPx sobre os tecidos cerebral, hepático e renal dos animais após o tratamento com o extrato e a fração AFLp da romã.

TABELA 17: Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx), para os tecidos cerebral, hepático e renal, após o tratamento com o extratos aquoso e fração fenólica da polpa da romã.

	Controle	EAP 60	EAP 240	AFLp 20	AFLp 80
Cérebro	10,18 ± 1,85	14,05 ± 2,68*	11,2 ± 1,81	11,26 ± 0,64	9,81 ± 0,84
Fígado	2,47 ± 0,46	3,09 ± 0,3*	3,26 ± 0,68	2,51 ± 0,9	2,7 ± 0,45
Rins	175,88 ± 28,86	171,07 ± 12,59	169,14 ± 13,65	161,18 ± 6,27	186,54 ± 15,47

Resultados (U/minuto/mg de proteína) expressos por média ± desvio-padrão;

\* amostras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si.

EAP = extrato aquoso da polpa (nas concentrações de 60 e 240 mg/Kg de peso corpóreo);

AFLp= fração de ácidos fenólicos livres da polpa (nas concentrações de 20 e 80 mg/Kg de peso corpóreo).

A GPx tem o papel principal na proteção da membrana celular frente à peroxidação lipídica, pois catalisa a reação de hidroperóxidos e do peróxido de hidrogênio com a glutathiona (GSH), formando a GSSG. A glutathiona redutase (GSH-R) promove a redução da GSSG para GSH, que posteriormente é utilizada pelas células na redução do  $H_2O_2$  e de outros substratos oxidantes.

Os resultados obtidos para a atividade da enzima GPx, presentes na tabela 17, mostram que houve aumento da atividade enzimática nos grupos que receberam o tratamento com o extrato aquoso da polpa da romã na dose de 60 mg/Kg, nos tecidos cerebral e hepático. No tecido renal, a atividade da GPx não sofreu alteração significativa, em relação ao grupo controle.

A atividade das enzimas SOD, CAT e GPx foi avaliada por LIMA (2008), que utilizou como fonte de compostos antioxidantes o pequi. Em seu estudo, os animais receberam o extrato aquoso (100 e 300mg/Kg) e a fração AFL (40 e 100mg/Kg), sob as mesmas condições do trabalho aqui apresentado. Foi verificado aumento na atividade das três enzimas, nos tecidos cerebral e hepático dos grupos que receberam o extrato e a fração nas maiores doses.

Em outro trabalho, Faria *et al.* (2007) verificou que animais sob condições normais e tratados com o suco da polpa da romã, apresentaram redução nos níveis da glutathiona no fígado e também da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx. Para os autores, a redução da atividade pode ter acontecido devido à diminuição das quantidades de hidroperóxidos e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, possivelmente pela ação dos compostos fenólicos sobre estas espécies reativas.

A condição de stress parece alterar a atividade enzimática, como foi observado por Giovannini *et al.* (2007). As células Caco-2 foram submetidas à exposição à LDL oxidada, causando uma situação de stress devido ao aumento de espécies reativas intracelular. A atividade enzimática foi avaliada nos períodos de 6, 12, 18, 24 e 48 horas. Os autores verificaram que a atividade da SOD sofreu aumento constante (após o período de 12 até 48h) da atividade sob a condição de stress, embora sua expressão permaneceu inalterada em relação ao grupo não tratado. A enzima CAT apresentou elevada atividade logo no período inicial (6h) de exposição, e sofreu decréscimo de 50% após um período de 12h. O aumento da atividade da GPx só foi verificado após 12h a condição de injúria, e sua expressão foi consideravelmente aumentada em relação ao grupo normal. Entretanto, dois grupos foram previamente (2 horas) tratados com os compostos antioxidantes tyrosol (0,5mM) e ácido protocatequínico (0,25mM), e como resultado a expressão da enzima GPx foi significativamente reduzida em relação ao grupo que sofreu a injúria com a LDL oxidada.

Um aumento na atividade enzimática foi verificado no cérebro de animais submetidos a barulho extremo e assim provocando o stress neste órgão (SAMSON, SHEELADEVI e RAVINDRAN, 2007), observando-se a elevação da atividade da SOD e como conseqüência o aumento do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e desta forma estimulando o amento da atividade das enzimas CAT e GPx. Porém, o aumento da atividade da enzima CAT foi verificado significativamente somente na situação aguda de stress, e nos níveis menores de exposição apenas a atividade da enzima GPx foi aumentada.

---

O tratamento de animais que foram expostos ao tetracloreto de carbono, com a fração de ácidos fenólicos livres da alga *Halimeda monile* (80 µg/mL) e também com o ácido gálico (100 µg/mL) mostrou que houve uma proteção sobre o fígado. A atividade das enzimas CAT e GPx foram aumentadas em relação ao grupo que recebeu a injúria, enquanto que a enzima SOD permaneceu inalterada (MANCINI- FILHO *et al.*; 2009).

Os resultados obtidos neste trabalho com a romã e com outros frutos descritos na literatura, demonstrando elevada atividade antioxidante dos compostos fenólicos, permitem inferir a importância da realização de outros trabalhos que possam fornecer mais informações relativas ao estress oxidativo.

## 6. CONCLUSÕES

A romã mostrou-se uma fonte de compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante avaliada pelo sistema  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico, pelo seqüestro do radical DPPH• e pelo ORAC.

Os ácidos fenólicos encontrados na fração de ácidos fenólicos livres (AFL) da polpa da romã apresentaram capacidade de serem absorvidos pela membrana das células MDCK, em diferentes níveis de absorção para cada composto.

A fração AFL da polpa mostrou que pode diminuir a concentração de espécies reativas intracelulares e também aumentar os níveis de viabilidade das células Caco-2, HeLa e MDCK.

O tratamento com o extrato aquoso e a fração AFL da polpa não alterou os índices de triglicérides, colesterol e HDL dos animais. O tecido cerebral foi protegido dos efeitos da lipoperoxidação e a fração AFLp na concentração de 20 mg/Kg foi capaz de aumentar significativamente a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), demonstrando a participação desta fração na inibição do stress oxidativo.

## 7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ADAMS, J.M.. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. **Genes Dev.**, v.17, n.20, p. 2481- 2495, 2003.

AJAIKUMAR, K.B.; ASHEEF, M.; BABU, B.H.; PADIKKALA, J.. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum*, L. (pomegranate) methanolic extract. **J. Ethnopharmacol.**, V. 96, p. 171-176, 2005

ANDRADE-WARTHA, E.R.. Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale*, L.): efeito sobre a lipoperoxidação e enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal. São Paulo, 2007. 134p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K.. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, V.127, p.183-198, 2002.

ARTIK, K.; MURAKAMI, H.; MORI, T.. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. **Fruit Process.**, V. 12, p. 492-499, 1999.

AVIRAM, M.; DORNFELD, L.; ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; COLEMAN, R.; HAYEK, T.; PRESSER, D.; FUHRMAN, B..Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. **Am. J. Clin. Nutr.**, V. 71, p. 1062- 1076, 2000.

AVIRAM, M.; DORNFELD, L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. **Atherosclerosis**, V. 158, p. 195-198, 2001.

AZZI, A.. Oxidativestress: a dead end or a laboratory hypothesis? **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, V. 362, p. 230-232, 2007.

BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; STOHS, S.J.; DAS, D.K.; RAY, S.D.; KUSZYNSKI, C.A.; JOSHI, S.S.; PRUESS, H.G.. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. **Toxicol.**, V. 148, p. 187-197, 2000.

BAGGIO, J.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R.. Identification of phenolic acids in coffee (*Coffea arabica*,L.) dust and its antioxidant activity. **Italian J. Food Sci.**, V.19, n.2, p. 191-201, 2007.

BEUTLER, E. Red cell metabolism. In: \_\_\_\_\_. **Manual of biochemical methods**. 2.ed. New York: Grune & Stratton, 1975. p.89-90.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, V.181, n.26, p.1199-1200, 1958.

BOATRRIGHT, K.M.; RENATUS, M.; SCOTT, F.L.; SPERANDIO, S.; SHIN, H.; PEDERSEN, I.M.; RICCI, J.E.; EDRIS, W.A.; SUTHERLIN, D.P.; GREEN, D.R.; SELVESEN, G.S.. A unified model for apical caspase activation. **Mol. Cell**, V.11, n.2, p. 529-541, 2003.

BOATRRIGHT, K.M.; SALVESEN, G.S.. Mechanism of caspase activation. **Curr. Opin. in Cell Biology**, V. 15, n.16, p. 725-731, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C.. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Leb.-Wiss. Technol.**, V.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, V.56, n.11, p. 317-333, 1998.

CARNERO, A.. Targeting the cell cycle for cancer therapy. **Bri. J. Cancer**, V. 87, p. 129-133, 2002.

CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CULTER, R.. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radic. Biol. Med.**, V. 14, p. 303-311, 1993.

CÉSPEDES, C.L.; MOHAMMED, E.-H.; PAVON, N.; LARCON, J.. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolics extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), maqui. **Food Chem.**, V.107, p. 820-829, 2008.

CHAUDIÉRE, J.; FERRARI-ILIOU, R.. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food Chem. Toxicol.**, V.37, p.946-962, 1999.

DIMITRIOS, B.. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends Food Sci. Technol.**, V. 17, p. 505-512, 2006.

DONNELLI, J.K.; ROBINSON, D.S.. Free Radical in foods. **Free Radic. Res.**, V.22, n.2, p. 147-176, 1995.

FANG, Y.Z.; YANG, S.W.; WU, G.. Free radical antioxidants and nutrition. **Nutrition**, V. 8, p. 872-879, 2002.

FARIA, A.; MONTEIRO, R.; MATEUS, N.; AZEVEDO, I.; CALHAU, C.. Effect of pomegranate (*Punica granatum*, L.) juice intake on hepatic oxidative stress. **Eur. J. Nutr.**, V. 46, p. 271-278, 2007.

GALATTI, G.; O'BRIEN, P.J.. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radic. Biol. Med.**, V. 37, n.3, p. 287-303, 2004.

GARCIA-TORRES, D.E.; SOLIS, V.S.; MANCINI, D.A.P.; TORRES, R.P.; MANCINI-FILHO, J.. Actividad antioxidante de los extractos del chope (*Gustavia augusta*, L.). **Rev. Soc. Quim. Perú**, V. 75, n.3, p. 374-381, 2009.

GERMANO, M.P.; D'ANGELO, V.D.; BIASINI, T.; SANOGO, R.. Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. **J. Ethnopharmacol.**, V.23, p. 121-127, 2006.

GIADA, M.L.R.; MANCINI-FILHO, J.. Antioxidant capacity of the striped sunflower (*Helianthus annuus*, L.) seed extracts evaluated by three *in vitro* methods. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, V.1, p. 1-7, 2008.

GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D.M.; KADER, A.A.. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **J. Agric. Food Chem.**, V. 48, p. 4581-4589, 2000.

GIOVANNINI, C.; SCAZZOCCHIO, B.; VARI, R.; SANTANGELO, C.; D'ARCHIVIO, M.; MASELLA, R.. Apoptosis in cancer and atherosclerosis. **Ann. Ist. Super. Sanita**, V. 43, n. 4, p. 406-416, 2007.

GIOVANNINI, C.; SCAZZOCCHIO, B.; MATARRESE, P.; VARI, R.; D'ARCHIVIO, M.; BENEDETTO, R.D.; CASCIANI, S.; DESSÌ, M.R.; STRAFACE, E.; MALORNI, W.; MASELLA, R.. Apoptosis induced by oxidized lipids is associated with up-regulation of p66<sup>Sch</sup> in intestinal Caco-2 cells: protective effects of phenolic compounds. **J. Nutr. Biochem.**, V.19, n.2, p.118-128, 2008.

GOMES, C.A.; CRUZ, T.G.; ANDRADE, J.L.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; MARQUES, M.P.M.. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. **J. Med. Chem.**, V. 46, p. 5393-5401, 2003.

GREEN, D.R.; MARTIN, S.J.. The killer and the executioner: how apoptosis control malignancy. **Curr. Opin. Immunol.**, V.7; n.5; p. 694-703, 1995.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICOS, S.; ARUOMA, O.I.. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, V. 35, p. 7-20, 1995.

HALLIWELL, B.. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? **Cardiovasc. Res.**, v. 73, p. 341-347, 2007.

HASENHUETTI, G.L.; WAN, P.J.. Temperature effects on the determination of oxidative stability with the Metrohm Rancimat. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.69, n.6, p. 525-527, 1992

HASSIMOTTO, N.M.A., GENOVESE, I.S.; LAJOLO, F.M.. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. **J. Agric. Food Chem.**, V.53, p.2928-2935, 2005.

HETZ, C.A.; TORRES, V.; QUEST, A.F.G.. Beyond apoptosis: nonapoptotic cell death in physiology and disease. **Biochem. Cell Biol.**, V.83, p. 579-588, 2005.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G.. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Curr. Opinion Biotech.**, V. 19, p. 73-82, 2008.

IRVINE, J.D.; TAKAHASHI, L.; LOCKHART, K.; CHEONG, J.; TOLAN, J.W.; SELICK, H.E.; GROVE, R.. MDCK (Madin- Darby Canine Kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. **J. Pharm. Sci.**, V. 88, n.1., p. 28-33, 1999.

ISCHROPOULOS, H.; GOW, A.; THOM, S.R.; KOOY, N.W.; ROYALL, J.A.; CROW, J.P. Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. **Methods Enzymol.**, V. 301, p. 367-373, 1999.

JARDINI, F.A.. Avaliação da atividade antioxidante da romã (*Punica granatum*, L.) – Participação das frações de ácidos fenólicos no processo de inibição da

oxidação. São Paulo, 2005. 111p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

JARDINI, F.A.; MANCINI-FILHO, J.. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, V.43, n.1, jan/mar, p. 137-147, 2007.

JARDINI, F.A.; PINTO, R.J.; MENDONÇA, R.M.Z.; MANCINI, D.A.P.; MANCINI-FILHO, J.. Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da romã (*Púnica granatum*, L.) sobre células da linhagem Caco-2. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, V. 27 (supl.), p. 80-83, 2007.

JURENKA, J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum*, L.): a review. **Altern. Med. Rev.**, V. 13, n.2., p. 128-144, 2008.

KARAKAYA, S.. Bioavailability of phenolic compounds. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, V. 44, p. 453-464, 2004.

KIM, K.W.; KIM, K.-S.; PARK, S.-D.; KIM, J.-K.; CHUNG, K.-H.; KIM, D.-S.; LEE, Y.-C.; KIM, C.-H.. Effect of Cervus Korean TEMMINCK var. mantchurius Swinoe on protease activities, antioxidant and free radical damages in rheumatis arthritis rats. **Toxicology in vitro**, V.22, p. 80-86, 2008.

KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S.. Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid and their colonic metabolites in intestinal Caco-2 monolayers. **J. Agric. Food Chem.**, V.52, p. 2518- 2526, 2004.

KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S.; SHIMIZU, M.. Transepithelial transport of p-coumaric acid and gallic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco-2 cell monolayers. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, V. 67, p. 2317-2324, 2003.

KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L.. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. 1- extraction and purification procedure. **J. Agric. Food Chem.**, V. 30, p. 330- 334, 1982.

LANSKI, E.P.; NEWMAN, R.A..*Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **J. Ethnopharmacol.**, V. 109, p. 177-206, 2007.

LARROSA, M.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ESPÍN, J.C.. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. **J. Nutr. Biochem.**, V. 17, p. 611-625, 2006.

LIMA, A.. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (Caryocar brasiliense, Camb.). São Paulo, 2008. 182p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo

LIU, R.H.; FINLEY, J.. Potential cell culture models for antioxidant Research. **J. Agric. Food Chem.**, V. 53, p. 4311-4314, 2005.

LIU, R.H.. Whole grain phytochemicals and health. **J. Cer. Sci.**, V. 46, p. 207-219, 2007.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v.193, p.265-275, 1951.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L.. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**,V. 79, p.727-747, 2004.

MANACH, C.; DONOVAN, J.. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. **Free Radic. Res.**, V.38, n.8, p.771-785, 2004

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A.. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Curr. Opin. Lipidol.**, V.16, p.77-84, 2005.

MANCINI-FILHO, J.; NOVOA, A.V.; GONZÁLEZ, A.E.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.A.; SILVA, A.M.O.; PINTO, J.R.; MANCINI, D.A.P.. Free phenolic acids from the seaweed *Halimeda monile* with antioxidant effect protecting against liver injury. **Z. Naturforsch.**, V. 64c, p. 657-663, 2009.

MC CORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v.244, p.6049-6055, 1969.

McDOUGALL, G.J.; ROSS, H.A.; IKEJI, M.; STEWART, D.. Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown *in vitro*. **J. Agric. Food Chem.**, V. 56, p. 3016- 3023, 2008.

MARCO, G.J.. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, V. 45, p. 594-598, 1968.

MAZZA, G.; KAY, C.D.; COTTRELL, T.; HOLUB, B.J.. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. **J. Agric. Food Chem.**, V.50, p. 7731-7737, 2002.

MERTENS-TALCOT, S.U.; JILMA- STOHLAWETZ, P.; RIOS, J.; HINGORANI, L.; DERENDORF, H.. Absorption, metabolism and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum*, L.)polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. **J. Agric. Food Chem.**, V. 54, p. 8956- 8961, 2006.

MILLER, H.E.. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, V. 48, p. 91, 1971.

MIN, K.; ELEBER, S.E.. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food Chem. Toxicol.**, V.46, p. 96-104, 2008

MOON, Y.J.; WANG, X.; MORRIS, M.E.. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology In Vitro**, V. 20, p. 187-210, 2006.

MOREIRA A.V.B.; MANCINI-FILHO, J.. Efeitos dos compostos fenólicos de especiarias sobre lípidos poliinsaturados (TALN04). **Rev. Bras. C. Farmac.**, V. 39, p. 130-133, 2003.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.. Extraction and analysis of phenolics in food. **J. Chromatogr. A.**, V. 1054, p. 95-111, 2004.

NARDINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C.; GISHELLI, A.. Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. **J. Nutr. Biochem.**, V.17, p. 14-22, 2006.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.C., BOELEN, P.G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P.A.M.. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.**, V. 74, p. 418-425, 2001.

OHKAWA, H.; OHISI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbitric acid reaction. **Anal. Biochem.** v.95, p.351-358. 1979.

QIN, Z.; RESZKA, K.J.; FUKAI, T.; WEINTRAUB, N.L.. Extracelular superoxido dismutase (ecSOD) in vascular biology: update to exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. **Trans. Res.**, V. 51, n.2, p. 68-78, 2008.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; TALCOTT, S.T.; SAFE, S.; MERTENS-TALCOTT, S.. Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from açai (*Euterpe oleracea*, M.) pulp and oil *in vitro*. **J. Agric. Food Chem.**, V. 56, p. 3593-3600, 2008.

PATEL, C.; DADHANIYA, P.; HINGORANI, L.; SONI, M.G.. Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. **Food Chem. Toxicol.**, V.46, p.2728-2735, 2008.

PEDRIELLI, P. SKIBSTED, L.H.. Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-) epicatechin of  $\alpha$ -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidizing methyl linoleate. **J. Agric. Food Chem.**, V.50, p. 7138-7144, 2002

PELLEGRINA, C.D.; PADOVANI, G.; MAINENTE, F.; ZOCATELLI, G.; BISSOLI, G.; MOCONI, S.; VENERI, G.; PERUFFO, A.; ANDRIGHETTO, G.; RIZZI, C.; CHIGNOLA, R.. Anti-tumor potential of a gallic acid- containing phenolic fraction from *Oenothera biennis*. **Cancer Lett.**, V. 226, p. 17-25, 2005.

PENG, B.; CHANG, Q.; WANG, L.;HU, Q.;WANG, Y.;TANG, J.; LIU, X.. Suppression of human ovarian SKOV-3 cancer cell growth by *Duchesnea* phenolic fraction is associated with cell cycle arrest and apoptosis. **Gynecol. Oncol.**, V. 108, p. 173-181, 2008.

POYRAZOGLU, E.; GÖKMEN, V.; ARTIK, N.. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum*, L.) grown in Turkey. **J. Comp. Anal.**, V.15, p. 567-575, 2002.

PRIOR, R.L.; CAO, G.. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radic. Biol. Med.**, V.27, n.11/12, p. 1173-1181, 1999

RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KIRKHAM, P.A.. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochem. Pharmacol.**, V. 72, p. 1439-1452, 2006.

RODRIGUEZ, H.; LANDETE, J.M.; RIVAS, B.; MUÑOZ, R.. Metabolismo f food phenolic acids by lactobacillus plantarun CECT 748. **Food Chem.**, V.107, p. 1393-1398, 2008.

ROSS, R.G.; SELVASUBRAMANIAN, S.; JAYASUNDAR, S.. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits – a preliminary study. **J. Ethnopharmacol.**, V. 78, p. 85-87, 2001.

ROVER JUNIOR, L.; HOER, F.; VELASCO, A.P.. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, V.24, n.1, p. 112-119, 2001

SALUCCI, M.; STIVALA, L.A.; MAIANI, G.; BURGIANESI, R.; VANNINI, V.. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco-2)., **Br. J. Cancer**, V. 86,p. 1645-1651, 2002.

SAMSON, J.; SHEELADEVI, R.; RAVINDRAN, J.. Oxidative stress in brain and antioxidant activity of *Ocimum sanctum* in noise exposure. **Neurotoxicology**, V. 28, p. 679-685, 2007.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F.. A procedure to measure the antiradical efficient polyphenols. **J. Sci. Food Agric.**, V.76, p. 270-276, 1998.

SAWAI

SAWAY, Y.; MOON, J.-H.; SAKATA, K.; WATANABE, N.. Effects of structure on radical-scavenging abilities and antioxidative activities of tea polyphenols: NMR analytical approach using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **J. Agric. Food Chem.**, V.53, p.276-282, 2002.

SCALFI, C.; FOGLIANO, V.; PENTAGELO, A.; GRAZIANI, C.; GIORDANO, I.; RITIENI, A.. Antioxidant activity and general fruit characteristics in different ecotypes of corbarini small tomatoes. **J. Agric. Food Chem.**,V.48, p. 1363-1366, 2000.

SCHUBERT, S.Y.; LANSKI, E.P.; NEEMAN, I. Antioxidant and eicosanoid anzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. **J. Ethnopharmacol.**,V.66, n.1, p.11-17, 1999.

SEERAM, N.P.; ADAMS, L.S.; HENNING, S.M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M.G.; HEBER, D.. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **J. Nutr. Biochem.**, V. 16, p. 360-367, 2005.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D.. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, V.36, p.67-103, 1992.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Lett.**, v.103, p.287-290, 1979.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANI, A.. Nutritional, dietary ad postprandial oxidative stress. **J. Nutr.**, V.135, n.5, p. 969-972, 2005.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.**, V. 299, p. 152-178, 1999.

SOOBRAJEE, M.A.; NEERAGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.I.; BAHORUN, T.. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutagenesis Research**, V. 579, p. 200-213, 2005.

SPIERINGS, D.; McSTAY, G.; SALEH, M.; BENDER, C.; CHIPUK, J.; MAURER, U.; GREEN, D.R.. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. **Science**,V. 310, n.5745, p.66-67, 2005.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W.. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food Chem. Toxicol.**, V. 41, p. 753-758, 2003.

STAHL, W.; BERG, H.; ARTHUR, J.; BAST, A.; DAINTY, J.; FAULKS, R.M.; GÄRTNER, C.; HAENEN, G.; HOLLMAN, P.; HLST, B.; KELLY, F.J.; POLIDORI, M.C.; RICE-EVANS, C.; SOUTHON, S.; VLIET, T.; VIÑA-RIBES, J.; WILLIAMSON, G.; ASTLE, S.B.. Bioavailability and metabolism. **Molecular Aspects of Medicine**, V. 23, p. 39-100, 2002.

SUN, G.-P.; WAN, X.; XU, S.-P.; WANG, H.; LIU, S.-H.; WANG, Z.-G.. Antiproliferation and apoptosis induction of paeonol in human esophageal cancer cell lines. **Dis. Esoph.**, V. 21, p. 723-729, 2008.

TIWARI, A.K.. Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. **Curr. Sci.**, V.86, n.8, p. 1092-1102, 2004.

TRIPATHI, R.; MOHAN, H.; KAMAT, J.P.. Modulation of oxidative damage by natural products. **Food Chem.**, V. 100, p. 81-90, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIC, M.T.D.; MILAN, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, V.32, n.3, p. 3-41, 2006.

VIDAL, A.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; PAVAN, R.; LIMA, A.; FALLARERO, A.; BATISTA, A.E.; MANCINI-FILHO, J.. Actividad antioxidante y polifenoles de lãs algas marinas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile*. **Ars. Pharm.**, V. 50, n.1, p. 24-31, 2009.

WANG, S.Y.; FENG, R.T.; LU, Y.J.; BOWMAN, L.; DING, M.. Inhibitory effect on activator protein-1, nuclear factor-kappaB and cell transformation by extracts of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **J. Agric. Food Chem.**, V.53, n.10, p.4187-4193, 2005.

WOLFE, K.L.; KANG, X.; HE, X.; DONG, M.; ZHANG, Q.; LIU, R.H.. Cellular antioxidant activity of common fruits. **J. Agric. Food Chem.**, V. 56, p. 8418-8426, 2008.

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell\\_Cycle\\_2.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell_Cycle_2.png) (acessado em 03 de janeiro de 2010).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)