

Mariana Raposo Guerra Mendes Ribeiro

**Influência do processo digestivo na atividade
antioxidante de alimentos funcionais**

Orientadora: Prof.^a Doutora Tânia Santos de Almeida

Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2016

Mariana Raposo Guerra Mendes Ribeiro

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 07/12/ 2016, perante o júri com a seguinte composição:

Presidente: Prof.^a Doutora Maria Dulce Várzea

Arguente: Prof.^a Doutora Marisa Nicolai

Orientador: Prof.^a Doutora Tânia Santos de Almeida

Influência do processo digestivo na atividade antioxidante de alimentos funcionais

Dissertação apresentada para obtenção do Grau Mestre em Ciências Farmacêuticas no curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Orientadora: Prof.^a Doutora Tânia Santos de Almeida

Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa
2016

Resumo

O aumento da consciência do consumidor para a relação entre os bons hábitos alimentares e a diminuição da incidência de certas patologias, aliado à evolução científica conduziu a uma nova categoria de alimentos denominados alimentos funcionais.

Neste trabalho, foram abordados os alimentos funcionais com atividade antioxidante, com destaque para o seu conteúdo em compostos fenólicos. Para avaliar as propriedades antioxidantes destes compostos foram considerados diversos fatores como a influência das suas características estruturais e a relevância da matriz alimentar em que estão inseridos. Adicionalmente, as metodologias mais utilizadas para a avaliação da atividade antioxidante foram também abordadas, bem como a relevância em considerar o processo digestivo e a sua influência nessas propriedades.

Pode-se concluir que apesar de existirem alguns estudos que incluam a influência do processo digestivo na determinação da atividade antioxidante de certos componentes alimentares, ainda há muito por fazer, uma vez que os modelos *in vitro* disponíveis ainda estão longe de mimetizar o que ocorre *in vivo*. No entanto, a literatura existente, evidencia que as propriedades antioxidantes são efetivamente afetadas pelo processo digestivo e que consoante a matriz alimentar analisada os resultados obtidos são também diferentes, pelo que estes fatores devem ser sempre considerados numa avaliação deste âmbito.

Palavras-chave: Alimentos funcionais, compostos fenólicos, atividade antioxidante, processo digestivo

Abstract

The increase in consumers awareness about the link between good eating habits and the reduction in the incidence of certain diseases, along with the scientific evolution has led to a new category of foods called functional foods. Herein, functional foods with antioxidant activity were studied with emphasis on its content in phenolic compounds.

To evaluate the antioxidant properties of these compounds several factors were considered such as the influence of their structural characteristics and the relevance of the food matrix in which they are inserted. In addition, the methodologies used for the evaluation of the antioxidant activity were also discussed, as well as the relevance in considering the digestive process and its influence on these properties.

It was concluded that, although there are some studies that include the influence of the digestive process in the determination of the antioxidant activity of certain food components, there is still much work to be done, since the *in vitro* models available are still far from mimic what occurs *in vivo*.

However, the existing literature, shows that the antioxidant properties are affected by the digestive process and that depending on the food matrix analysed the results obtained are different, so these factors should always be considered when studying this topic.

Keywords: Functional foods, phenolic compounds, antioxidant activity, digestive process

Lista de abreviaturas e símbolos

- ABTS** Ensaio do radical azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
- ADN** Ácido desoxirribonucleico
- ARN** Ácido ribonucleico
- ATP** Adenosina trifosfato
- BHA** Butilhidroxianisol (*Butylated hydroxyanisole*)
- BHT** Butilhidroxitolueno (*Butylated hydroxytoluene*)
- CAT** Catalase
- CUPRAC** Capacidade antioxidante de redução cúprica (*Cupric ions Cu^{2+} reducing power assay*)
- DPPH** 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
- DPPH $\cdot$** Radical DPPH
- EFSA** Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
- ERN** Espécies reativas de nitrogénio
- ERO** Espécies reativas de oxigénio
- FDA** Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*)
- FOSHU** Alimentos específicos para uso na saúde
- FRAP** Poder antioxidante de redução férrica (*Ferric reducing antioxidant power*)
- GPx** Glutaciona peroxidase
- GR** Glutaciona redutase
- Grupo hidroxilo** -OH
- Grupo metilo** -CH₃
- Grupo metoxilo** -OCH₃
- H** Átomo de Hidrogénio
- HAT** Transferência de um átomo de hidrogénio (*Hydrogen atom transfer*)
- ILSI** Instituto Internacional de Ciências da Vida (*International Life Sciences Institute*)
- LDL** Lipoproteínas de baixa densidade (*Low density lipoprotein*)
- ORAC** Capacidade de absorção de radicais oxigénio (*Oxygen radical absorbance capacity*)
- RIVM** Instituto Nacional de Saúde e Meio Ambiente (*Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu*)
- SET** Transferência de um eletrão (*Single electron transfer*)
- SOD** Superóxido dismutase
- TBHQ** Terc-butil-hidroquinona (*Tertiary butylhydroquinone*)
- TIM** Modelo gastrointestinal do TNO (*TNO gastrointestinal model*)

TNO Organização holandesa para a investigação científica aplicada (*TNO Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek*)

TRAP Potencial antioxidante total (*Total radical-trapping potential*)

Índice

Introdução

1. Os Alimentos Funcionais	12
1.1. A definição de alimento funcional	13
1.2. O contexto histórico	15
1.3. Os principais componentes bioativos dos alimentos funcionais	16
1.3.1. Os compostos fenólicos	16
2. Os Antioxidantes e Atividade Antioxidante	18
2.1. O papel dos antioxidantes no Stress Oxidativo	19
2.2. A defesa antioxidante – O sistema endógeno e os antioxidantes exógenos	20
2.3. Os antioxidantes provenientes da alimentação	21
2.3.1. A estrutura e as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos	22
2.3.2. Os flavonóides	24
2.3.3. Os ácidos Fenólicos	26
2.4. Os métodos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de determinação da atividade antioxidante	28
3. O Processo Digestivo	31
3.1. A atividade antioxidante dos componentes alimentares e sua biodisponibilidade	32
3.2. Os modelos de simulação <i>in vitro</i> da digestão gastrointestinal	33
3.3. O processo digestivo e os compostos fenólicos	36
3.3.1 As características da matriz alimentar ingerida	37
3.3.2 A eficiência da extração dos compostos fenólicos da matriz alimentar	37
3.3.3 As características dos compostos fenólicos e sua influência na biodisponibilidade	37
3.3.4 A resistência ao processo digestivo	38
3.3.5 A natureza de outros componentes da refeição	40
3.4. As propriedades antioxidantes de diferentes matrizes alimentares considerando a influência do processo digestivo	40
Conclusão	44
Bibliografia	47

Índice de figuras

Figura 1: Principais classes de fitoquímicos naturais

Figura 2: Estrutura geral dos flavonóides

Figura 3: Estrutura geral das subclasses dos flavonóides e respectivos derivados

Figura 4: Estrutura geral dos ácidos fenólicos (ácido hidroxicinâmico e ácido hidroxibenzóico)

Figura 5: Representação das secções do ácido hidroxicinâmico com maior influência na capacidade antioxidante

Figura 6A e 6B: Representação do conjunto de compartimentos do modelo TIM que se divide em TIM-1 e em TIM-2, respetivamente.

Índice de tabelas

Tabela 1: Definições de alimentos funcionais de acordo com diversos organismos mundiais

Tabela 2: Características de alimentos funcionais e respetivos exemplos

Tabela 3: Principais fontes alimentares de algumas substâncias funcionais

Tabela 4: Espécies reativas de oxigénio (ERO) e espécies não radicalares

Tabela 5: Sistema de defesa antioxidante humana

Tabela 6: Classificação e grupo funcional de alguns flavonóides

Tabela 7: Classificação e grupo funcional de alguns ácidos fenólicos

Introdução

A sociedade atual tem-se caracterizado por um estilo de vida acelerado, o que muitas vezes afasta a população de hábitos alimentares saudáveis. Como consequência, a morbidade de certas patologias como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares, tem aumentado (Lidon & Silvestre, 2010).

De forma a contrariar esta tendência, a população, principalmente de países mais desenvolvidos e apesar de pressionada pelo seu quotidiano, começa a procurar ter uma alimentação saudável e a compreender melhor a relação entre um estilo de vida saudável e os hábitos alimentares adequados (Lidon & Silvestre, 2010).

Qualquer alimento fornece energia e nutrientes essenciais à vida. Porém, alguns alimentos acrescentam efeitos benéficos à saúde – os denominados alimentos funcionais. (Crowe & Francis, 2013).

Surge, assim, uma nova tipologia de alimentos, com crescimento assinalável ao longo da última década, como consequência de uma mudança de atitude por parte dos consumidores. Atualmente, os alimentos funcionais ocupam uma das áreas de maior potencial na indústria alimentar, com destaque para aqueles que têm propriedades antioxidantes (Prates & Mateus, 2002).

Os antioxidantes, e os seus efeitos protetores no combate do processo oxidativo, reúnem cada vez mais atenção em diversas áreas (biológicas, médicas, nutricionais e agroquímicas). (Gülçin, 2012; Liu, 2010) Já à mais de quinze anos, que se acredita que os antioxidantes desempenham um papel fundamental na manutenção da saúde, através da modulação dos processos oxidativos do organismo (Mosca, et al., 2002).

Vários estudos realizados demonstraram uma proporcionalidade entre a ingestão diária de alimentos ricos em antioxidantes e a diminuição na incidência de certas patologias. Este facto, adiciona valor aos alimentos funcionais com propriedades antioxidantes e reforça a importância do seu consumo para a implementação de uma vida saudável (Landete, 2012; Gülçin, 2012).

Assim, os antioxidantes alimentares conquistaram nas últimas décadas grande visibilidade pela sua potencial função na redução do risco de algumas doenças, e adicionalmente, podem representar uma alternativa viável a alguns antioxidantes sintéticos, como o butilhidroxitolueno (*butylated hydroxytoluene*, BHT), butilhidroxianisol (*butylated hydroxyanisole*, BHA) e terc-butil-hidroquinona (*tertiary butylhydroquinone*, TBHQ), que têm sido implicados em lesões do fígado e carcinogénese, levantado algumas preocupações sobre a segurança da sua utilização na área alimentar (Krishnaiah, Sarbatly, & Nithyanandam, 2011).

Em simultâneo, a aposta no desenvolvimento dos alimentos funcionais com propriedades antioxidantes tem permitido à ciência da nutrição uma evolução nas estratégias desenvolvidas para a prevenção de certas doenças. Dentro desta categoria, destacam-se os alimentos funcionais ricos em compostos fenólicos (Carvalho, Machado, Moretti, & Fonseca, 2006).

Certos compostos fenólicos presentes nos alimentos podem ajudar a limitar alguns danos oxidativos atuando diretamente sobre espécies reativas de oxigénio ou estimulando os sistemas de defesa endógenos. Assim, estão atualmente a receber muita atenção pela suas propriedades antioxidantes que os levam a contribuir para a promoção da saúde e prevenção de doenças colocando-os na classe de componentes funcionais (Landete, 2012).

Os compostos fenólicos são ingeridos numa matriz alimentar e para concederem efeitos benéficos têm de ser biodisponíveis, isto é, serem absorvidos no trato gastrointestinal, entrarem na corrente sanguínea e serem distribuídos. No entanto, no decorrer da digestão a sua estrutura pode ser afetada e os seus efeitos benéficos nas células e nos tecidos alvo podem ser alterados. Para possuírem atividade sistémica após a absorção, os compostos fenólicos têm de se manter ativos após a digestão. O mesmo também é válido para a percentagem de compostos fenólicos que não é absorvida, de forma a terem capacidade de exercer atividade no lúmen intestinal (Gülçin, 2012).

Por tudo isto, e como consequência do crescente interesse nesta temática, muitos ensaios *in vitro* têm sido desenvolvidos de forma a testar a capacidade antioxidante total de matrizes alimentícias (Gülçin, 2012).

No entanto, apesar de a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos contidos em diversos produtos alimentares estar bem documentada, ainda é pouca a informação que considera o processo digestivo (Bouayed, Hoffmann, & Bohn, 2011). É neste âmbito que se desenvolve o presente estudo, procurando compreender não só o conceito e a ação benéfica dos alimentos funcionais e do seu conteúdo em antioxidantes mas também abordando como o processo digestivo pode influenciar essa ação.

1. ALIMENTOS FUNCIONAIS

1.1. A definição de alimento funcional

O aparecimento do termo alimento funcional exige uma definição, porém, ainda, não foi determinado um significado universal (Carvalho, Machado, Moretti, & Fonseca, 2006).

O conceito de alimento funcional tem de obedecer a características obrigatórias como o de possuírem efeitos positivos além do valor básico nutritivo, que promovam benefícios à saúde, ou reduzam o risco de ocorrência de doenças, aumentando assim a qualidade de vida.

Na tabela 1 são apresentadas algumas definições estabelecidas por diversos organismos em diferentes Países.

Tabela 1: Definições de alimentos funcionais conferidas por diversas organizações mundiais. (Crowe & Francis, 2013).

Organização	Definição
<i>Academy of Nutrition and Dietetics</i>	"Alimentos definidos como alimentos inalterados, juntamente com os alimentos fortificados, enriquecidos, ou aprimorados, que têm um efeito potencialmente benéfico sobre a saúde quando consumidos como parte de uma dieta variada em níveis eficazes."
<i>International Food Information Council</i>	"Alimentos ou componentes da dieta que possam proporcionar um benefício de saúde para além da nutrição básica e possam desempenhar um papel na redução ou minimização dos riscos de certas doenças e outras condições de saúde."
<i>Institute of Food Technologists</i>	"Os alimentos e componentes de alimentos que fornecem um benefício de saúde além da nutrição básica (na população proposta)."
<i>International Life Sciences Institute</i>	"Alimentos que, em virtude da presença de componentes alimentares fisiologicamente ativos fornecem benefícios de saúde além da nutrição básica."
Comissão Europeia	"Um alimento que afecta benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, para além dos efeitos nutricionais adequados, de uma forma que seja relevante para qualquer melhora no estado de saúde, no bem-estar e/ou redução do risco de doença. Faz parte de um padrão alimentar normal. Não é um comprimido, uma cápsula ou qualquer outra forma de suplemento dietético."
<i>Health Canada</i>	"Um alimento funcional é de aparência semelhante, ou pode ser, a um alimento convencional, é consumido como parte de uma dieta normal, e que seja demonstrado ter benefícios fisiológicos e/ou reduzir o risco de doença crónica além das funções fisiológicas essenciais."
Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-estar Japonês	"FOSHU (alimentos específicos para uso na saúde) refere-se a alimentos que contenham ingredientes com funções para a saúde e que sejam oficialmente aprovados para reivindicar os seus efeitos fisiológicos no corpo humano. Destina-se a ser consumido para a manutenção/promoção da saúde ou para ser usado por pessoas que desejam controlar as condições de saúde, incluindo pressão arterial ou colesterol no sangue."
<i>Institute of Medicine of the National Academy of Sciences</i>	"Alimentos cuja concentração de um ou mais ingredientes foi manipulada ou modificada de modo a incrementar a sua contribuição para uma dieta saudável."

Apesar de, atualmente, o Japão ser o único país com regulamentação específica para aprovar alimentos funcionais, muitas organizações propuseram definições para esta nova e emergente área das ciências da nutrição e da alimentação, sendo a definição elaborada pelo Instituto Internacional de Ciências da Vida (*International Life Sciences Institute, ILSI*) a amplamente mais aceite (Mendes, 2014).

Assim sendo, a definição de alimento funcional diverge entre Países, sendo que nos Estados Unidos da América incluem os suplementos alimentares nesta categoria, ao contrário do que acontece no Japão e União Europeia, onde essas definições diferem na legislação (Moraes & Colla, 2006).

Porém, no âmbito deste trabalho será considerada a definição de alimento funcional utilizada na Europa, onde os suplementos alimentares são inseridos noutro conceito: o de nutracêuticos (Moraes & Colla, 2006).

Adicionalmente, é obrigatório que as alegações de propriedades funcionais tenham base científica comprovada, e, na Europa, sejam autorizados pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) após rigorosa avaliação científica (Mendes, 2014).

Desta forma, um alimento funcional, em termos práticos, pode ser qualquer alimento inalterado que possua naturalmente capacidade funcional, isto é, alimentos convencionais consumidos usualmente na dieta ou, também, qualquer alimento onde a natureza de um ou mais componentes tenha sido modificada sinteticamente. Neste segundo caso, está incluído: 1) a adição ou remoção de um componente por meios tecnológicos ou biotecnológicos que aporte benefícios; 2) a substituição de um componente por outro com propriedades favoráveis; 3) o aumento de determinado componente; e 4) a modificação da bioatividade ou biodisponibilidade de um componente ou ainda a combinação de mais do que um destes fatores (Tabela 2) (Mendes, 2014; Crowe & Francis, 2013).

Como consequência do conceito de alimento funcional estar amplamente ligado à referência - benéfico para a saúde - a promoção destes efeitos saudáveis passou a ser regulamentada nos países da União Europeia desde 2006, quando foi estabelecida uma regulamentação específica referente às propriedades benéficas e nutricionais dos alimentos (Mendes, 2014).

Para clarificar a referência 'benéfico para a saúde', a Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration, FDA*), relata que esta indicação não se refere a tratamento, cura ou diagnóstico, não podendo de forma alguma os alimentos funcionais serem confundidos com fármacos (Moraes & Colla, 2006).

Assim, a regulamentação destes produtos é de extrema importância pois confere confiança ao consumidor sobre a informação presente nos rótulos e previne declarações de promoção de saúde falsas ou exageradas sobre as suas propriedades. Adicionalmente, a

comprovação da eficácia destes alimentos é crucial no sentido de evitar declarações falsas ou exacerbadas relativamente às suas propriedades benéficas (Mendes, 2014).

Tabela 2: Alterações das características de alguns alimentos de forma a torná-los funcionais e respectivos exemplos (Mendes, 2014).

Característica modificada no alimento	Exemplos de respetivos alimentos funcionais
Aumento da quantidade de um componente	Tomates com maior teor de licopeno, sumo de fruta com teor aumentado de antioxidantes, enriquecimento do leite em cálcio ou vitamina D, ou do teor de fibra em cereais de pequeno-almoço
Adição de um componente	Creme de barrar com adição de fitosteróis, óleos alimentares enriquecidos com vitamina E, iogurte com adição de prebiótico ou probiótico, arroz enriquecido com vitamina A
Remoção de um componente	Iogurte com redução do teor de gordura
Substituição de um componente por outro	Refrigerantes nos quais se substituiu o açúcar por edulcorantes
Modificação da biodisponibilidade de um componente	Arroz geneticamente modificado de modo a aumentar a biodisponibilidade do ferro

1.2. O contexto histórico

O conceito de alimentação começou por ser visto apenas como uma necessidade e uma forma de obter energia, sendo que o ser humano sempre soube procurar intuitivamente uma forma de se alimentar (Hasler, 2002).

No entanto, alimentos como proporcionadores de promoção de saúde não é uma ideia nova. Esta visão, de que a alimentação pode prevenir certas patologias foi introduzida há 2500 anos atrás pelo pai da medicina, Hipócrates. Porém, tal filosofia caiu no século 19, com a introdução da teoria medicamentosa moderna (Hasler, 2002).

Em 1900, o papel da dieta na prevenção de doenças e na promoção da saúde ganhou novamente importância (Hasler, 2002; Moraes & Colla, 2006; Wilkinson, Pidgeon, Lee, Pattison, & Lambert, 2015).

Na primeira metade do século XX, o foco científico na área alimentar caía sobre a identificação de elementos causadores de doenças de deficiência dietética, dando especial atenção às vitaminas (Hasler, 2002).

Porém, o foco na desnutrição, deslocou-se para a sobrenutrição. Durante a década de 1970, as doenças ligadas ao excesso de consumo de alimentos ricos em gordura,

tornaram-se um problema central na saúde pública na Europa e também noutros países. Tal conduziu à elaboração de uma grande variedade de normas de saúde pública na área alimentar, em que o elemento comum se refere à importância do consumo de uma dieta baixa em gordura saturada e rica em vegetais, frutas, leguminosas e grãos integrais (Hasler, 2002; Wilkinson, Pidgeon, Lee, Pattison, & Lambert, 2015).

Este aumento da consciência do consumidor para a relação entre os bons hábitos alimentares e a diminuição da incidência de certas patologias, em combinação com a evolução científica, deu origem a uma nova geração de produtos os já referidos alimentos funcionais (Wilkinson, Pidgeon, Lee, Pattison, & Lambert, 2015).

Estes alimentos surgem pela primeira vez, na década de 80, no Japão, através de um programa do governo (Hasler, 2002; Moraes & Colla, 2006).

Na evolução do conceito de alimento funcional, destacou-se o facto de alguns povos apresentarem baixa incidência em patologias representativas de problemas de saúde pública. Tal foi relacionando com o hábito de uma alimentação rica em compostos fenólicos, reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes que podem contribuir para a promoção da saúde e prevenção da doença e como tal serem considerados componentes funcionais (Moraes & Colla, 2006).

1.3. Os principais componentes bioativos dos alimentos funcionais

São diversos os componentes contidos em alimentos que pelas suas propriedades são considerados funcionais. Estes elementos podem ser classificados em grupos, sendo os mais reconhecidos: 1) os **probióticos**; e os 2) **prebióticos** (bem como os que incluem estes dois primeiros) – 3) os denominados **simbióticos**; 4) as **fibras dietéticas**; 5) os **fitosteróis**; 6) os **fitoestrogénios**; 7) os **ácidos gordos insaturados** e os já referidos 8) **compostos fenólicos**, que se encontram entre os mais mencionados (Mendes, 2014).

No âmbito deste trabalho, e uma vez que os compostos fenólicos são os mais reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes, iremos focar-nos apenas nesta classe.

1.3.1. Os compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais abundantes na dieta e o seu potencial antioxidante sobrepõem-se aos restantes antioxidantes conhecidos (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005; Carvalho, Machado, Moretti, & Fonseca, 2006).

Os compostos fenólicos apresentam uma grande diversidade de classes, consoante a sua estrutura química, e, encontram-se presentes em variadíssimos alimentos (Mendes, 2014).

São encontrados em frutas, vegetais, e em algumas bebidas como os chás verde e preto, o café, o vinho tinto, entre outros (Landete, 2012; Dicko, Gruppen, Traoré, Voragen & Berkel, 2006; Gülçin, 2012).

Alguns destes compostos funcionais, bem como as suas respetivas principais fontes alimentares estão ilustrados na tabela 3 (Carvalho, Machado, Moretti & Fonseca, 2006).

Tabela 3: Principais fontes alimentares de alguns componentes funcionais (Carvalho, Machado, Moretti, & Fonseca, 2006)

Fitoquímicos	Componentes Funcionais		Principais Fontes Alimentares
Compostos fenólicos	Ácidos Fenólicos		Beringela, brócolos, cenoura, pimenta, repolho, salsa, tomate
	Taninos		Vinho tinto
	Estilbenos		Pele das uvas
	Flavonóides	Flavonóis	Cebolas, couve-flor, alho-porro, brócolos, mirtilos
		Flavonas	Salsa, aipo
		Flavanóis	Frutos, chá verde, chocolate
		Flavanonas	Tomates, plantas aromáticas, citrinos
		Antocianinas	Vinho tinto, mirtilos, cerejas, morangos, amoras
		Isoflavonas	Leguminosas
Carotenóides	Licopeno		Tomate, melancia
	Beta-caroteno		Hortalças amarelo-alaranjadas e de folhas verdes (abóboras, brócolos, cenouras, espinafres)

Nos alimentos, os compostos fenólicos são também responsáveis pela cor, aroma e sabor (adstringência e amargura) (Landete, 2012). São também usados na indústria alimentar para prolongar o tempo de vida dos alimentos (Dicko, Gruppen, Traoré, Voragen, & Berkel, 2006).

A atividade antioxidante é uma função transversal a todas as classes de compostos fenólicos, que inclui o seu envolvimento em reações de stress oxidativo, e, de eliminação de radicais livres.

2. OS ANTIOXIDANTES E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.1. O papel dos antioxidantes no Stress Oxidativo

O *stress* oxidativo, resulta de um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes originando um excesso de radicais livres. Ou seja, existe um desequilíbrio entre a produção de radicais livres (oxidantes) e a capacidade do organismo os eliminar, o que dificulta a manutenção das funções fisiológicas normais, podendo mesmo levar a danos celulares (Silva, Ribeiro, & Chaves, 2009).

Os radicais livres podem ser agrupados em categorias, entre elas as espécies reativas de oxigénio (ERO) e as espécies reativas de nitrogénio (ERN). As ERO são compostas por um centro de oxigénio (Tabela 4) e são a classe mais importante de radicais livres formados pelo organismo, sendo muito reativos (Gülçin, 2012).

Tabela 4: Espécies reativas de oxigénio (ERO) radicalares e não radicalares (Gülçin, 2012).

Espécies Reativas de Oxigénio	
Espécies radicalares	
Radical anião superóxido	$O_2^{\cdot -}$
Radical hidroxilo	$HO^{\cdot}$
Radical peróxido	$ROO^{\cdot}$
Radical perhidroxilo	$HO_2^{\cdot}$
Radical alcóxido	$RO^{\cdot}$
Hidroperóxido orgânico	ROOH
Espécies não radicalares	
Peróxido de Hidrogénio	H_2O_2
Oxigénio singlete	1O_2

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via catalítica de enzimas. Na maioria dos casos, os radicais livres são originados fisiologicamente, como consequência dos processos de transferência de eletrões, no metabolismo celular de sistemas biológicos. Como é o caso da produção de radicais livres pelas mitocôndrias como consequência da fosforilação oxidativa, sendo este o principal local de formação destas substâncias (Silva, Ribeiro, & Chaves, 2009).

Assim, em concentrações baixas, os radicais livres cumprem funções biológicas relevantes, como possibilitar a formação de ATP, sendo benéficos para as células por estarem integrados em diversos processos fisiológicos de sinalização e regulação

(Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald, & Robards, 2002; Barbosa, Bressan, Costa, Alfenas, Paula, & Minim, 2010).

Porém, quando os sistemas intracelulares estão expostos a alguns compostos exógenos ao organismo, como radiações gama e ultravioleta, medicamentos, fumo, tabaco, ou mesmo alguns compostos provenientes da dieta alimentar, podem originar subprodutos metabólicos nocivos (radicais livres). E estes, quando em excesso, provocam danos oxidativos nas células, nos tecidos e em componentes celulares, o que origina a oxidação de lípidos, proteínas, açúcares, ADN e ARN e consequentemente provoca danos às membranas biológicas. Por esta razão, está bastante descrita a correlação do *stress* oxidativo com o desencadeamento de várias patologias, como cardiopatias, aterosclerose, problemas pulmonares, envelhecimento, artrite, catarata, diabetes, vários tipos de cancro, cirrose, anemia e desordens neurodegenerativas crônicas como a doença de Parkinson e Alzheimer (Silva, Ribeiro, & Chaves, 2009).

Neste âmbito, existem, nas últimas décadas, diversas referências de que as propriedades antioxidantes de determinados alimentos funcionais podem ajudar a proteger as células do *stress* oxidativo, promovendo desta forma o bem-estar e a saúde humana (Carvalho, Machado, Moretti, & Fonseca, 2006). E assim, os antioxidantes têm recebido particular atenção, na prevenção do *stress* oxidativo (Selvakumar, Madhan, Srinivasan, & Baskar, 2011).

2.2. A Defesa Antioxidante – O sistema endógeno e os antioxidantes exógenos

O organismo dispõe de mecanismos biológicos de proteção para a compensação do efeito prejudicial dos radicais livres (Renz, 2003). Neste âmbito, a indução de antioxidantes, é um mecanismo de defesa endógeno (Tabela 5) e estes dividem-se em enzimáticos e não enzimáticos (Renz, 2003; Gülçin, 2012).

O sistema enzimático é o primeiro a agir e as suas principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx), a glutathione reductase (GR) e as peroxirredoxinas (Renz, 2003). Estas enzimas são capazes de bloquear o início da oxidação e ao possuírem metais no centro ativo, com múltiplas valências, nunca se tornam espécies radicalares (Barbosa, Bressan, Costa, Alfenas, Paula, & Minim, 2010).

No sistema não-enzimático, situam-se os antioxidantes endógenos não enzimáticos, como a coenzima Q10, a vitamina A, a glutathione, o ácido úrico, o ácido lipoico, a bilirrubina, a L-carnitina, etc. – bem como, as substâncias antioxidantes (não endógenas, Tabela 5) provenientes da dieta.

Tabela 5: Sistema de defesa antioxidante humana endógeno e não endógeno (Bouayed & Bohn, 2010).

Antioxidantes Endógenos			Antioxidantes Exógenos
Enzimático		Não enzimático	
SOD: a) citoplasmática: Zinco-Cobre b) mitocondrial: Manganês	Enzima desintoxicante de Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Glutathiona, Ácido úrico, Ácido lipoico, NADPH, Albumina, Coenzima Q10, Bilirrubina	Vitaminas: vitamina C, vitamina E
CAT	Enzima desintoxicante de Peróxido de hidrogénio (H_2O_2)		Zinco, selénio
GPx	Enzima desintoxicante de Peróxido lipídico ($COOH^{\cdot}$)		Carotenóides: b-caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina
GRX	Enzima envolvida na regeneração de glutathiona		Compostos fenólicos: Ácidos fenólicos e Flavonóides

A necessidade e a importância do uso de antioxidantes exógenos complementares fornecidos pela dieta, advém de, por vezes, a quantidade de antioxidantes produzida pelo sistema de defesa do organismo, poder não ser suficiente (Yoo, Saliba, & Prenzler, 2010).

2.3. Os antioxidantes provenientes da alimentação

A dieta alimentar pode ser uma fonte de diversos compostos com atividade antioxidante. O consumo destes alimentos, através da dieta, pode auxiliar na manutenção da homeostase, na proteção dos componentes celulares e das suas respetivas funções, e na redução do *stress* oxidativo. Adicionalmente, outra vantagem destes compostos refere-se à segurança dos antioxidantes naturais face aos antioxidantes sintéticos (Gülçin, 2012).

Como já foi referido, os principais compostos bioativos provenientes de fontes naturais são os compostos fenólicos com destaque para os flavonóides e os ácidos fenólicos (Yoo, Saliba, & Prenzler, 2010). Estes compostos, são abundantes nos alimentos e apresentam 8000 variantes estruturais identificadas (Dicko, Gruppen, Traoré, Voragen, &

Berkel, 2006).

Apesar das referidas propriedades benéficas por parte dos compostos fenólicos, também existe a indicação de que a sua ingestão excessiva, através da alimentação, pode atingir níveis tóxicos no organismo (Crowe & Francis, 2013). Um dos efeitos menos desejáveis destes compostos é o facto de, sob certas condições, poderem comportar-se como pro-oxidantes, contribuindo para o stress oxidativo, que acontece pela deslocação do equilíbrio redox (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald, & Robards, 2002; Crowe & Francis, 2013). Adicionalmente, podem também diminuir a capacidade de absorção de diversos minerais, inibir enzimas digestivas, precipitar proteínas e diminuir a digestibilidade das proteínas originando o aumento da excreção fecal de azoto, e assim serem considerados antinutrientes (Landete, 2012). Pelo que o seu consumo, como o da maioria dos alimentos, deve ser feita de forma equilibrada para que os seus efeitos benéficos tão procurados e referenciados superem os efeitos nocivos.

2.3.1. A estrutura e as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são fitoquímicos e a sua estrutura base consiste num anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilo. A classificação dos compostos fenólicos (Figura 1) entra em conta com o número de anéis fenólicos e o tipo de elementos estruturais que se ligam aos anéis (Landete, 2012).

Assim, consoante o seu esqueleto de átomos de carbono, estes agrupam-se em ácidos fenólicos (responsáveis por aproximadamente 30% do *intake* total), taninos, estilbenos, e flavonóides (com aproximadamente 60% do *intake* total) (Gülçin, 2012).

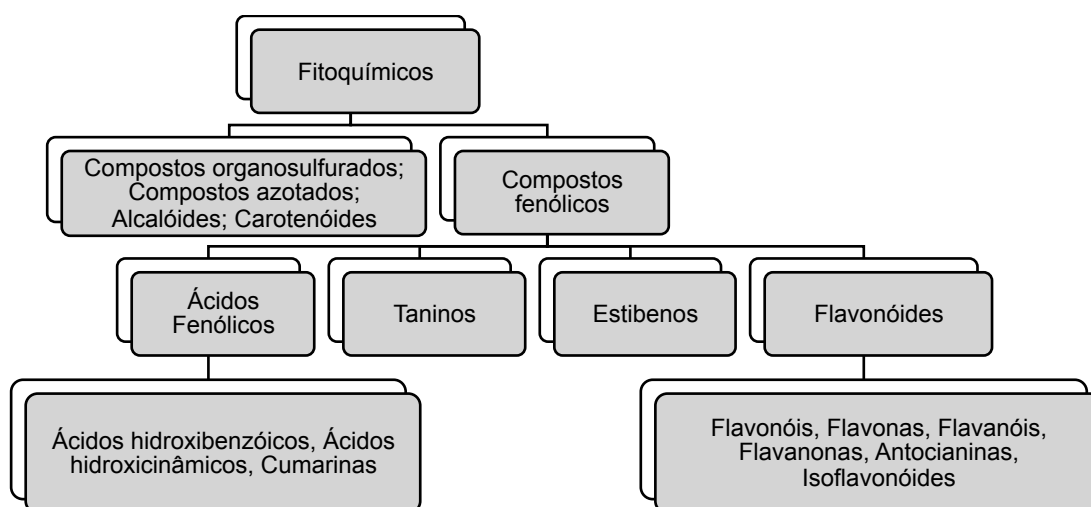


Figura 1: Classificação das principais classes de fitoquímicos naturais (Ramalho & Jorge, 2006).

É também esta variedade estrutural, que lhes confere a sua diversidade de efeitos farmacológicos, nomeadamente as suas propriedades antioxidantes (Landete, 2012; Gülçin, 2012). Está descrito que estas propriedades conferem um amplo espectro de funções: anticarcinogénicas, antiapoptóticas, anti-inflamatórias, antienvelhecimento, cardioprotetoras e vasodilatadoras, bem como a função inibidora da proliferação celular e de estimulação do sistema imune (Carvalho, Machado, Moretti, & Fonseca, 2006; Gülçin, 2012).

Adicionalmente, a capacidade protetora indireta dos compostos fenólicos também está referenciada, quer por ativação de sistemas de defesa endógenos, quer por modelação de processos de sinalização celular. E são estas propriedades que tornam os compostos fenólicos ferramentas valiosas nas áreas da saúde, nomeadamente a sua atividade antioxidante (Carvalho, Machado, Moretti, & Fonseca, 2006; Gülçin, 2012).

A atividade antioxidante assenta em mecanismos de transferência de um átomo de hidrogénio (*hydrogen atom transfer*, HAT) e de transferência de um eletrão (*single electron transfer*, SET), eliminando espécies reativas (como o $O_2^{\cdot-}$) e radicais promotores de peroxidação lipídica (como o $ROO^{\cdot}$). Estes também podem atuar como antioxidantes pela prevenção de produção de espécies reativas por quelação de metais. É a estrutura destes compostos fenólicos que é a chave da sua atividade.

A generalidade da ação antioxidante dos ácidos fenólicos e dos flavonóides pode ser representada através de duas reações:

1. Composto fenólico (OH) + $R^{\cdot}$ $\rightarrow$ Composto fenólico ($O^{\cdot}$) + RH
2. Composto fenólico (OCH_3) + $R^{\cdot}$ $\rightarrow$ Composto fenólico ($O^{\cdot}$) + RCH_3

$R^{\cdot}$ - Radical livre reativo

$O^{\cdot}$ - Composto fenólico após doar eletrões (Machado, Nagem, Peters, Fonseca, & Oliveira, 2008).

A primeira reação representa o grupo hidroxilo (OH) do composto fenólico a reagir com o radical livre, transferindo-lhe um H e obtendo-se desta reação o radical livre neutralizado (Machado, Nagem, Peters, Fonseca, & Oliveira, 2008).

A segunda reação ilustra o grupo metoxilo (OCH_3) do composto fenólico a reagir com o radical livre, transferindo-lhe um metilo (CH_3), alcançando-se um radical estável (Machado, Nagem, Peters, Fonseca, & Oliveira, 2008).

O poder antioxidante dos compostos fenólicos é geralmente superior quando comparado com os restantes antioxidantes provenientes da alimentação, como o α -tocoferol, o ácido ascórbico e os carotenóides. Contudo, existe uma atividade sinérgica entre os diversos compostos antioxidantes presentes (Dicko, Gruppen, Traoré, Voragen, & Berkel,

2006).

Como já foi referido, os compostos fenólicos, especificamente os flavonóides e os ácidos fenólicos, são o grupo de antioxidantes naturais, provenientes da dieta, mais presentes e melhor estudados.

Assim, é essencial compreender o papel destes compostos como antioxidantes.

2.3.2. Os flavonóides

Esta classe de fitoquímicos é bastante comum e ocorre naturalmente em plantas. Encontram-se na natureza como glicosídeos, isto é, ligados a resíduos de açúcares, ou sob a forma de aglicona, que corresponde à sua forma mais simples. A estrutura em que se encontram influencia as suas propriedades antioxidantes (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004).

Encontram-se entre os principais antioxidantes da dieta alimentar estando presentes numa ingestão diária normalmente superior a 100 mg. São antioxidantes muito eficazes, atuando na eliminação de radicais livres, quelação de iões metálicos e inibindo a formação do óxido nítrico. Porém, são pouco absorvidos a partir dos alimentos (Gülçin, 2012).

As diferentes características estruturais dos flavonóides são responsáveis não só pela sua atividade antioxidante, mas também pela atividade antibacteriana, antitrombótica, vasodilatadora, anti-inflamatória, anti-cancerígena. Estes compostos podem ainda participar como protetores de doenças oxidativas como a doença cardiovascular, por diminuição da oxidação das LDL. Também têm a capacidade de inibir a peroxidação lipídica (Gülçin, 2012).

Os flavonóides são compostos com baixa massa molecular, com um núcleo base de 15 carbonos, arranjados numa configuração C6-C3-C6 (Dicko, Gruppen, Traoré, Voragen, & Berkel, 2006). São os três grupos da sua estrutura que lhes conferem a atividade antioxidante: dois anéis aromáticos (A e B), ligados por uma ponte de 3 carbonos (Figura 2). Normalmente esta parte da molécula encontra-se sob a forma de um anel heterocíclico formando o anel C, que contém um átomo de Oxigénio (Lorrain, Ky, Pechamat, & Teissedre, 2013).

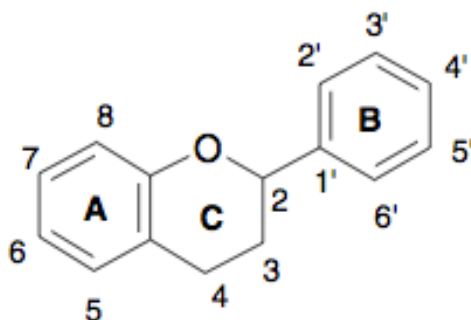


Figura 2: Estrutura geral dos flavonóides (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005)

Todos os flavonóides partilham esta estrutura base, porém, as suas propriedades antioxidantes são influenciadas pelo número e pela posição dos substituintes -OH e -OCH₃ (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005).

Para se considerar que os flavonóides exercem uma proteção eficaz contra o *stress* oxidativo, estes devem conter pelo menos dois substituintes -OH na sua estrutura (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005).

Os flavonóides, apresentam-se sob uma variedade de estruturas, representando mais de metade de todos os compostos fenólicos existentes, podendo ser divididos em subclasses consoante as diferenças nos seus substituintes (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005).

Tais variações originam grandes diferenças na capacidade antioxidante, na biodisponibilidade, na sua distribuição e no seu metabolismo. As subclasses existentes são: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanóis e antocianidinas (Figura 3) (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005).

Antocianidinas	Isoflavonas	Flavanonas	Flavonas	Flavonóis	Flavanóis
Cianidina*, pelargonidina*	Genisteína*, daidzeína*, gliciteína*	Naringenina*, eriodictiol*, hesperetina*	Luteolina*, apigenina*	Quercetina*, campferol*, miricetina*	Proantocianidinas, catequinas

* Forma de aglicona

Figura 3: Estrutura geral das subclasses dos flavonóides e respectivos derivados (Machado, Nagem, Peters, Fonseca, & Oliveira, 2008; Bouayed & Bohn, 2010).

Qualquer uma das subclasses está presente em todos os tipos de tecidos superiores de plantas, no entanto, os flavonóis constituem a subclasse mais encontrada nos alimentos, embora em concentrações relativamente baixas, 15 a 30 mg/kg. É sugerido em

alguns estudos realizados, que a capacidade de captar radicais livres pode ser estruturada pela seguinte ordem decrescente de poder: flavonóis, flavonas, flavanonas (Gülçin, 2012; Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2016).

A tabela seguinte apresenta os grupos funcionais que conferem atividade antioxidante, em alguns exemplos de flavonóides (Santos, 2011).

Tabela 6: Classificação e grupo funcional de alguns flavonóides (Santos, 2011).

Classe/Subclasse					
Flavonóide/Flavona		Flavonóide/Flavonol		Flavonóide/Flavanona	
Apigenina	Luteolina	Quercetina	Campferol	Hesperidina	Eriodictiol
Grupo -OH em 4', 5 e 7; ligação dupla entre 2 e 3 e um carbonilo em 4; Forma: aglicona	Grupo catecol no anel B; -OH em 5 e 7; ligação dupla entre 2 e 3 conjugado com grupo carbonilo em 4; forma: aglicona.	Grupo catecol em anel B, -OH em 3, 5 e 7; ligação dupla entre 2 e 3 e um carbonilo em 4; forma: aglicona.	Grupo -OH em 4', 3, 5 e 7; ligação dupla entre 2 e 3 e um carbonilo em 4; forma: aglicona	Grupo -OH em 3' e 5; um -OCH ₃ em 4'; forma: glicosídeo.	Grupo -OH em 4', 5', 5, 7; forma: aglicona.

2.3.3. Os ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos são compostos com atividade antioxidante, ocupam aproximadamente 30% dos compostos fenólicos presentes em plantas. Aparecem tanto na sua forma livre, como na forma conjugada (Gülçin, 2012).

Dividem-se em dois grupos principais: ácidos hidroxibenzóicos com sete átomos de carbono e configuração C6-C1, e, ácidos hidroxicinâmicos, compostos aromáticos com nove átomos de carbono, organizados sob a forma C6-C3 (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005).

Os ácidos hidroxibenzóicos incluem o ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido gálico e ácido siríngico (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005). Os ácidos hidroxicinâmico incluem ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005).

Os ácidos hidroxibenzóicos encontram-se em teores muito baixos nas plantas, com exceção de alguns frutos vermelhos, chá (ácido gálico), cebola, entre outros e aparecem também no café (ácido clorogénico) e em alguns frutos. Os frutos com maior teor destes ácidos são os mirtilos, kiwis, ameixas, cerejas e maçãs. Porém, na forma livre são

raramente encontrados, aparecendo praticamente apenas em alimentos processados (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004).

A estrutura base dos ácidos fenólicos é composta por um anel aromático fenólico de baixo peso molecular, um grupo funcional carboxílico e um ou mais grupos hidroxilo e metoxilo (Figura 4) (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005).

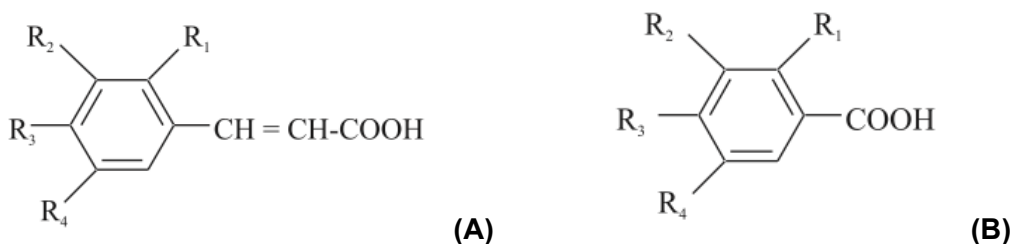


Figura 4: Estrutura geral dos ácidos fenólicos (ácido hidroxicinâmico e ácido hidroxibenzóico) (Ramalho & Jorge, 2006).

Em comparação com os diversos grupos de ácidos fenólicos, os derivados do ácido hidroxicinâmico apresentam atividade antioxidante mais elevada. Tal pode estar associado à cadeia insaturada ligada ao grupo carboxílico, que lhes confere maior capacidade de doar prótons e de estabilizar radicais livres (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005).

Na seguinte imagem (Figura 5) estão assinaladas as zonas da estrutura do ácido hidroxicinâmico que têm influência sobre a atividade antioxidante (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005).

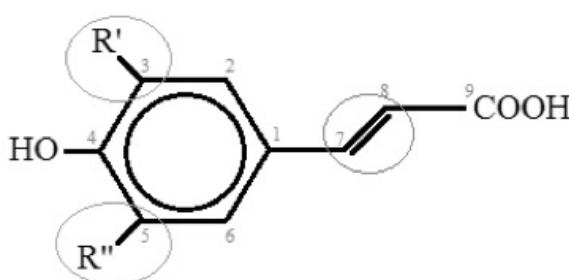


Figura 5: Representação das zonas com maior influência na capacidade antioxidante do ácido hidroxicinâmico (Santos, 2011).

A capacidade de captar radicais livres aumenta com o aumento da hidroxilação. Ou seja, está relacionada com o número e posição dos grupos hidroxilo (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005).

Por outro lado, a atividade antioxidante diminui quando em alternativa ao grupo –OH no carbono 3 e 5 tem lugar um grupo metoxilo –OCH₃ (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005).

Samman, 2005).

Na tabela 7 encontram-se representados alguns ácidos fenólicos e respetiva forma em que se encontram e os grupos funcionais que lhes conferem atividade (Santos, 2011).

Tabela 7: Classificação e posicionamento do grupo funcional –OH de alguns ácidos fenólicos (Santos, 2011).

Classe/Subclasse	
Ácido fenólico: Ácido hidroxicinâmico	
Ácido cafeico	Ácido rosmarínico
Grupo -OH nas posições 3 e 4.	Grupo -OH nas posições 3, 4, 15 e 16.

Assim, claramente se conclui que são estas diferenças estruturais nos compostos fenólicos, nomeadamente a posição e o número de grupos –OH presentes, que conferem as propriedades antioxidantes destes compostos, sendo fundamental o estudo destas propriedades.

Para avaliar as propriedades antioxidantes destes compostos, têm sido utilizados diversos métodos, sendo pertinente aprofundar o conhecimento das diversas metodologias atualmente disponíveis para este fim.

2.4. Os métodos *in vitro* e *in vivo* de determinação da atividade antioxidante

O estudo do potencial da atividade antioxidante dos compostos fenólicos contidos em alimentos exige a utilização de metodologias adequadas. Neste âmbito, são diversos os métodos *in vitro* para avaliação da atividade antioxidante propostos na literatura e estes debruçam-se geralmente sobre dois olhares: no estudo da atividade antioxidante de alimentos ou na bioatividade dos antioxidantes alimentares em humanos (Gülçin, 2012; Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald, & Robards, 2002).

Porém, o estudo da atividade antioxidante de alimentos é um tópico complexo pela falta de disponibilidade de um ensaio *standard* (Selvakumar, Madhan, Srinivasan, & Baskar, 2011) e estes apenas preveem o potencial antioxidante do alimento antes de ser ingerido (Sucupira, Silva, Pereira, & Costa, 2012). Adicionalmente, o desenvolvimento de um método para avaliar a capacidade antioxidante não é linear, por existirem inúmeros antioxidantes com diferentes reatividades para cada espécie radicalar (Gülçin, 2012).

Todos os métodos desenvolvidos têm em comum a presença de um agente oxidante, um substrato adequado e uma estratégia de medida do *end-point* da reação (Sucupira, Silva, Pereira, & Costa, 2012). No entanto, a eficiência de um antioxidante no

organismo também depende do radical livre que está envolvido, como e onde este foi formado, e onde vai provocar a lesão (Selvakumar, Madhan, Srinivasan, & Baskar, 2011).

Os ensaios utilizados para a avaliação da atividade antioxidante baseiam-se na determinação da capacidade antioxidante por reações SET, e, por reações HAT (Nimalaratne, 2015).

Nas reações SET, a capacidade do potencial antioxidante é detetado na transferência de um eletrão para reduzir qualquer composto, com mudança de cor enquanto o oxidante é reduzido. Estas reações são dependentes do pH, porque a reatividade deste método é baseada primeiramente na desprotonação e na ionização. Em geral o potencial de ionização decresce com o aumento do pH. Além disso, são reações lentas, e sensíveis ao ácido ascórbico e ácido úrico. Alguns exemplos de métodos mais utilizados baseados em reações SET são: o ensaio do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila-DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging*), o método de Folin-Ciocalteu para a determinação do conteúdo em fenóis totais, o poder antioxidante de redução férrica (*ferric reducing antioxidant power*, FRAP), a capacidade antioxidante de redução cúprica (*cupric ions Cu^{2+} reducing power assay*, CUPRAC), e o ensaio do radical catião do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (*2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulphonate radical scavenging*, ABTS⁺), entre outros (Gülçin, 2012).

Por outro lado, as reações HAT medem a capacidade clássica de um antioxidante eliminar radicais livres pela doação de hidrogénio pelo antioxidante. Estas reações são reações independentes do pH e do solvente, e são muito rápidas (Gülçin, 2012). Como exemplo de métodos baseados em reações HAT, temos a capacidade de absorção de radicais oxigénio (*oxygen radical absorbance capacity*, ORAC) e o potencial antioxidante total (*total radical-trapping parameter*, TRAP) (Gülçin, 2012).

Dependendo da natureza dos compostos presentes em certo alimento, alguns métodos podem ser mais apropriados que outros (Gülçin, 2012; Nimalaratne, 2015), uma vez que se baseiam em diferentes mecanismos. O mecanismo do método ORAC e TRAP assenta na remoção de um radical peróxido. Os métodos FRAP e CUPRAC medem a capacidade de redução de metais. O método ABTS e DPPH[•] atuam pela capacidade de remoção de radical orgânico. O método Folin-Ciocalteu é um ensaio colorimétrico, onde, através das reações de oxidação-redução é possibilitada a quantificação dos compostos fenólicos redutores presentes na amostra. Desta forma, ao procurar avaliar as propriedades antioxidantes de um determinado alimento funcional, o ideal é utilizar diversos métodos (Gülçin, 2012).

Adicionalmente, cada composto antioxidante proveniente da alimentação terá uma absorção e uma biodisponibilidade dependente das interações com outros conteúdos

alimentares e com a própria matriz alimentar (Barbosa, Bressan, Costa, Alfenas, Paula, & Minim, 2010). Assim, deve ser efetuada uma avaliação da dieta em geral, uma vez que estudo dos nutrientes e/ou dos alimentos isolados são limitadores, pois não considera a interação entre esses elementos, que por ventura podem estabelecer relações sinérgicas contra os danos oxidativos.

Finalmente, o processo digestivo e os seus efeitos as propriedades antioxidantes, claramente deve ser considerado na escolha do melhor método de avaliação destas propriedades. Particularmente em ensaios *in vivo*, parâmetros como as transformações metabólicas, excreção, presença de enzimas antioxidantes e pró-oxidantes podem afectar profundamente a atividade *in vivo* dos antioxidantes em estudo (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald, & Robards, 2002).

Como o processo digestivo interage, intimamente, com os compostos antioxidantes e é o responsável por torna-los disponíveis para exercer a sua função, torna-se relevante relacionar o estudo do processo digestivo com a atividade antioxidante, de forma a obter resultados consistentes onde se observe a atividade antioxidante sob condições de reação que melhor mimetizem as condições *in vivo* (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald, & Robards, 2002).

3. O PROCESSO DIGESTIVO

3.1. A atividade antioxidante dos componentes alimentares e sua biodisponibilidade

Os compostos fenólicos têm sido referidos como um dos principais componentes alimentares responsáveis pelas propriedades antioxidantes de muitos alimentos (Bouayed, Hoffmann, & Bohn, 2011). No entanto, de acordo com o descrito em diversos estudos, os compostos fenólicos podem ser sensíveis a condições de digestão (Chiang, Kadouh, & Zhou, 2013; Nimalaratne, 2015).

Atualmente os estudos desenvolvidos começam a direcionar-se para a avaliação das possíveis alterações na atividade antioxidante de diferentes produtos alimentares após a digestão gastrointestinal (Nimalaratne, 2015).

Ao longo do trato gastrointestinal, há transformação dos alimentos. Como consequência desta transformação a sua atividade antioxidante pode aumentar, diminuir ou não ser afetada. Quando a capacidade não é afetada, significa que não há formação ou alteração dos compostos antioxidantes que origine uma modificação da atividade antioxidante. No caso de haver aumento desta atividade, significa que ocorreu alguma, alteração ou formação de compostos, que permitiu a melhoria das propriedades antioxidantes. Por sua vez, quando a atividade diminui, esse efeito pode estar associado à diminuição da forma antioxidante presente ou à formação de pró-oxidantes (Nimalaratne, 2015).

Assim, é fundamental considerar qual a fração dos componentes com propriedades antioxidantes que não é destruída na digestão, bem como a porção solubilizada a partir da matriz alimentar. Esta questão ainda se torna mais relevante porque nem sempre uma maior ingestão alimentar se relaciona com uma maior concentração dos componentes relevantes nos tecidos alvo. Na origem desta discrepância pode estar uma fraca absorção, uma elevada metabolização e/ou uma rápida eliminação (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010).

Um dos maiores desafios na investigação dos efeitos dos alimentos funcionais é a comprovação de que estes se encontram dentro da matriz alimentar nos níveis necessários para exercerem os efeitos benéficos pretendidos. (Crowe & Francis, 2013).

Assim, é necessário estabelecer qual a biodisponibilidade e a eficácia destes compostos nos níveis em que são tipicamente consumidos, bem como compreender o significado deste conceito (Cilla, Alegria, Barberá, & Lagarda, 2013).

O termo biodisponibilidade designa a quantidade disponível de determinado composto no local de ação, ou seja, envolve a fração absorvida pelas células, sendo, desta forma, habitualmente determinada pela concentração plasmática. Por sua vez, em termos nutricionais este conceito é definido pela proporção de composto bioativo que consegue exercer funções fisiológicas. Para melhor compreender a biodisponibilidade é também necessário compreender a bioacessibilidade e bioatividade (Cilla, Alegría, Barberá, & Lagarda, 2013).

Assim, para haver biodisponibilidade, os compostos têm que se libertar da matriz em que estão inseridos. Tal acontece no processo digestivo, por ação do suco digestivo. A fração libertada da matriz alimentar e que fica disponível para ser absorvida denomina-se como bioacessível (Cilla, Alegría, Barberá, & Lagarda, 2013).

Seguidamente, os compostos bioacessíveis necessitam de ser transportados do intestino para a veia porta, de forma a atingir a corrente sanguínea para serem metabolizados no fígado (Cilla, Alegría, Barberá, & Lagarda, 2013).

A bioacessibilidade é, desta forma, definida como a quantidade de cada composto ingerido, libertado de uma matriz alimentar, que fica disponível para absorção intestinal, isto é, que subsiste às diversas etapas da digestão tornando-se num composto absorvível (Cilla, Alegría, Barberá, & Lagarda, 2013).

Por outro lado, a bioatividade engloba todas as propriedades inerentes a um composto bioativo, nomeadamente a sua interação com biomoléculas, o seu metabolismo e biotransformação, a sua distribuição até ao tecido alvo e se este consegue exercer uma resposta fisiológica (Cilla, Alegría, Barberá, & Lagarda, 2013).

Neste âmbito, os modelos de simulação *in vivo* e *in vitro* surgem como ferramentas valiosas para o estudo da biodisponibilidade (Hur, Lim, Decker, & McClements, 2011; Minekus, et al., 2014).

3.2. Os modelos de simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal

Os métodos *in vivo* são extremamente relevantes fisiologicamente, fornecendo resultados bastante precisos, no entanto, para além da sua complexidade, estes implicam um elevado custo e consumo de tempo, havendo uma grande variabilidade interindividual, bem como restrições éticas. Assim sendo, na tentativa de ultrapassar estas limitações inerentes aos modelos *in vivo*, têm sido desenvolvidos alguns modelos *in vitro*, mais rápidos, mais baratos e mais simples, não apresentando restrições éticas e que permitem a recolha de amostras em qualquer ponto da digestão (Minekus, et al., 2014; Cilla, Alegría, Barberá, & Lagarda, 2013).

Estes modelos *in vitro* são amplamente utilizados para estudar o comportamento gastrointestinal de alimentos e permitem o estudo das mudanças estruturais, da digestibilidade alimentar, da liberação dos componentes alimentares sob condições simuladas e o estudo da biodisponibilidade e bioacessibilidade de um composto. Porém, apesar de serem uma alternativa útil, os resultados obtidos nestes modelos são muitas vezes diferentes dos obtidos nos modelos *in vivo*. Esta diferença deve-se à enorme complexidade físico-química e fisiológica do processo digestivo no trato gastrointestinal humano que engloba desde processos mecânicos, como a mastigação, bem como, condições de pH e temperatura, força iônica, condições enzimáticas e bioquímicas, composição química dos fluídos, fluxo do alimento, períodos de incubação em cada órgão e a microbiota existente no organismo. Sendo ainda de considerar a variabilidade entre indivíduos (idade, estado patológico, estados de jejum, entre outros) como um parâmetro a ter em conta num modelo digestivo ideal (Hur, Lim, Decker, & McClements, 2011).

Assim, estes métodos *in vitro* consistem em modelos de simulação da digestão gastrointestinal, através de uma série de reações que evoluem no sentido de recriar todas estas condições fisiológicas complexas existentes nos diferentes órgãos que constituem o trato gastrointestinal por onde o alimento passa, terminando na absorção (Ferreira 2014; Minekus, et al., 2014).

Atualmente, os métodos de simulação da digestão existentes incluem tipicamente a fase oral, gástrica e do intestino delgado e dividem-se em duas grandes categorias: modelos estáticos e modelos dinâmicos. Sendo que a maioria dos modelos descritos na literatura é do tipo estático (Minekus, et al., 2014).

Os modelos estáticos não mimetizam os processos físicos inerentes à digestão, como o corte, a mistura, a hidratação, entre outros. Também ocultam processos fisiológicos como os movimentos peristálticos, a existência da microbiota intestinal, a alteração de condições de pH e temperatura ao longo do tempo e os alimentos permanecem praticamente imóveis ao longo da digestão. Porém, utilizam enzimas digestivas de forma a mimetizar a digestão química e geralmente são introduzidas culturas de células Caco-2 de forma a avaliar a absorção (Minekus, et al., 2014).

O modelo estático de digestão *in vitro* mais utilizado é conhecido como modelo RIVM (*Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Instituto Nacional de Saúde e Meio Ambiente*), onde são considerados apenas três compartimentos: boca, estômago e intestino delgado. O intestino grosso não é considerado (Ferreira, 2014; Versantvoort, Van de Kamp, & Rempelberg, 2004). Estes modelos apresentam a vantagem de serem mais simples e mais rápidos (Minekus, et al., 2014), sendo úteis para o estudo da digestibilidade, bioacessibilidade, e, também, para o estudo da liberação de micronutrientes da matriz

alimentar, como os compostos fenólicos (González-Arias, Marín, Sanchis, & Ramos, 2013). No entanto, para uma simulação mais precisa das condições *in vivo*, devem ser utilizados os modelos dinâmicos (Minekus, et al., 2014). Estes modelos mimetizam processos físicos e mecânicos, incluindo fluxos dinâmicos do alimento e modificações graduais de pH e enzimas, permitindo assim alcançar condições mais próximas das condições *in vivo* (Cilla, Alegría, Barberá, & Lagarda, 2013). Atualmente, o modelo dinâmico mais desenvolvido é o modelo gastrointestinal do TNO (*TNO gastrointestinal model*, TIM, onde TNO *Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek*, organização holandesa para a investigação científica aplicada), que é um modelo multicompartimental. É controlado por computadores permitindo a simulação de aspetos dinâmicos da digestão adaptados ao longo do tempo de digestão, como concentrações variáveis de enzimas, pH, temperatura corporal, peristaltismo, secreção gástrica/biliar e pancreática, absorção de água e nutrientes e introdução de microbiota intestinal (González-Arias, Marín, Sanchis, & Ramos, 2013; Minekus, et al., 2014; Verhoeckx, et al., 2015). Adicionalmente, este modelo permite a simulação do trato gastrointestinal e considera a variabilidade individual de acordo com dados obtidos em estudos prévios em voluntários. Assim, simula diferentes estágios da vida (infantil, adulto e idoso), o seu período alimentar (alimentado ou em jejum), e as condições fisiológicas ou patológicas (Minekus, et al., 2014; Verhoeckx, et al., 2015).

Este modelo TIM é constituído por um conjunto de compartimentos que se dividem em TIM-1, onde é simulado o processo digestivo no estômago e intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), e em TIM-2, que simula a flora microbiana do intestino grosso (Figura 6A e 6B). Este modelo apresenta diversas vantagens, uma vez que é um modelo preciso, reproduzível, validado com base em dados humanos e animais e torna possível a recolha de amostras a qualquer nível do trato gastrointestinal simulado, e a qualquer momento (Verhoeckx, et al., 2015).



Figura 6A e 6B: Representação do conjunto de compartimentos do modelo TIM que se divide em TIM-1 e em TIM-2, respectivamente (Verhoeckx, et al., 2015).

Assim, a digestão, e também o processamento que os alimentos sofrem, podem afetar a atividade antioxidante dos compostos bioativos presentes nos alimentos. Como tal, as substâncias funcionais apresentam na sua maioria baixa biodisponibilidade, principalmente em comparação com os compostos bioativos manipulados em produtos farmacêuticos. No entanto, a ingestão regular e em quantidades significativas de compostos bioativos fazendo parte da dieta, como os compostos fenólicos, podem induzir efeitos a longo prazo, sendo portanto de extrema relevância a compreensão do mecanismo de ação inerente, incluindo as vias moleculares e bioquímicas e o destino metabólico (Cilla, Alegría, Barberá, & Lagarda, 2013).

3.3. O Processo digestivo e os compostos fenólicos

Um fator que influencia a absorção dos compostos fenólicos é a interação destes com outros componentes alimentares, podendo aumentar ou impedir a sua metabolização. Adicionalmente, a presença de alguns micronutrientes pode afetar indiretamente a absorção, podendo induzir ou inibir as enzimas transportadoras envolvidas na absorção e metabolismo dos compostos fenólicos (García-Alonso, Ros, Vidal-Guevara, & Periago, 2006).

Sabe-se que os compostos fenólicos são capazes de penetrar nos tecidos e que quando entram na corrente sanguínea ligam-se aos lípidos e/ou formam quelatos com o

ferro, e que após duas horas da ingestão atingem o pico plasmático (García-Alonso, Ros, Vidal-Guevara, & Periago, 2006).

A reciclagem enterohepática, isto é, a segregação de compostos fenólicos para o intestino através da biliar e a posterior reabsorção nos segmentos distais do intestino, com o auxílio de enzimas bacterianas, podem aumentar a presença de compostos fenólicos no interior do organismo (García-Alonso, Ros, Vidal-Guevara, & Periago, 2006). Porém, a absorção dos compostos fenólicos no lúmen gastrointestinal e a sua capacidade de se acumular no interior de tecidos-alvo, não se encontra bem esclarecido e necessita de mais investigação (García-Alonso, Ros, Vidal-Guevara, & Periago, 2006). Relativamente à eliminação, os compostos fenólicos e os seus derivados são eliminados principalmente na urina (García-Alonso, Ros, Vidal-Guevara, & Periago, 2006).

Considerar o consumo de alimentos funcionais e mais particularmente os seus componentes constituintes como os compostos fenólicos, é particularmente relevante devido à atividade antioxidante destes compostos e também porque estes ocorrem naturalmente numa grande variedade de alimentos. Porém, devem ser considerados alguns elementos que podem afetar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos no organismo (Balasundram, Sundram, & Samman, 2005).

Tal como já foi estabelecido anteriormente, é fundamental compreender tanto a bioacessibilidade como a biodisponibilidade dos compostos fenólicos e ter em conta que estes processos dependem das características do composto fenólico em causa, da matriz alimentar em que estão inseridos, da dose em que cada composto se apresenta, da eficiência da extração dos compostos fenólicos da matriz alimentar, da sua resistência ao processo digestivo, da natureza dos outros componentes da refeição, e, ainda, de fatores de variabilidade individual.

3.3.1 As características da matriz alimentar ingerida

Qualquer matriz alimentar apresenta uma composição e uma microestrutura que intervêm na biodisponibilidade dos nutrientes pelo qual é composta.

A libertação dos compostos fenólicos a partir da matriz alimentar (especialmente nos alimentos sólidos), é um fator determinante da biodisponibilidade dos mesmos (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010). Adicionalmente, a existência de uma matriz alimentar, que contém diversos nutrientes, pode originar interações sinérgicas, aditivas ou de neutralização. Um exemplo desta situação é o caso da vitamina C que regenera a vitamina E e aumenta o efeito dos carotenóides. Também os flavonóides interagem sinergicamente com a vitamina E, prevenindo a oxidação das LDL. Estes são

apenas alguns exemplos que demonstram a diversidade de interações que podem ocorrer dentro de uma matriz alimentar (Crowe & Francis, 2013).

3.3.2 A eficiência da extração dos compostos fenólicos da matriz alimentar

A digestão poder ser considerada como um processo que permite uma extração de macronutrientes, micronutrientes e fitoquímicos, utilizando ação mecânica, química e enzimática. Apenas os compostos fenólicos que são solubilizados a partir da matriz do alimento são realmente bioacessíveis e, por conseguinte, potencialmente biodisponíveis (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010).

No entanto, num estudo que investigou a libertação de compostos fenólicos numa matriz sólida, concluiu-se que uma porção destes compostos não está presente no final da digestão, sendo referido que uma parte foi degradada e, outra parte, não foi extraída da matriz sólida (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010).

3.3.3 As características dos compostos fenólicos e sua influência na biodisponibilidade

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos origina grandes diferenças na sua biodisponibilidade. Alguns estudos realizados indicam que as diferentes estruturas dos compostos fenólicos conferem um ponto diferencial no que diz respeito ao seu comportamento no processo digestivo. Desta forma, consoante a sua estrutura, as suas perdas podem variar desde o negligenciável até à degradação quase total (Gião, et al., 2012).

Num estudo que abordou o efeito da digestão *in vitro* na capacidade antioxidante de extratos aquosos de quatro plantas, verificou-se que alguns compostos fenólicos com atividade antioxidante não são afetados pelo processo digestivo, enquanto que para outros ocorre a diminuição da sua atividade ao longo deste processo (Gião, et al., 2012). Outros estudos demonstraram, ainda, que certos compostos fenólicos diminuem em quantidade ao longo da digestão, mas a atividade antioxidante das amostras não. Na origem deste acontecimento pode estar o facto de estes se transformarem em diferentes compostos fenólicos que possuam, igualmente, atividade antioxidante (Pavan, Sancho, & Pastore, 2014).

Sabe-se que na generalidade, a biodisponibilidade dos compostos fenólicos é bastante baixa e inversamente proporcional ao peso molecular, sendo o conteúdo alimentar

composto, na sua maioria, por compostos fenólicos complexos e não simples. Os que são melhor absorvidos são as isoflavonas com o menor peso molecular, seguidas dos ácidos fenólicos, catequinas e, por último, as flavonas, com o maior peso molecular (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2016; Landete, 2012).

Desta forma, a absorção é determinada pela estrutura química do composto fenólico e é dependente do peso molecular (já referido), mas também, da solubilidade, do grau de polimerização, da glicosilação e acilação, da estrutura básica e da conjugação com outros compostos fenólicos (Landete, 2012). Adicionalmente, nem sempre são os compostos fenólicos ingeridos em maior quantidade, os que atingem em maior porção o tecido alvo, até porque os metabolitos presentes no sangue – após metabolização hepática e digestão – são diferentes dos compostos fenólicos presentes nos alimentos ingeridos (Landete, 2012).

Para um consumo de 10-100 mg de um único composto fenólico, a concentração máxima no plasma raramente é superior a 1 mM – porção que atravessa a barreira intestinal, chega à corrente sanguínea e exerce os efeitos biológicos. Foi estimada uma ingestão diária de 1 g de compostos polifenólicos por pessoa (Scalbert & Williamson, 2000).

3.3.4 A resistência ao processo digestivo

Os resultados obtidos num estudo que abordou o efeito de digestão *in vitro* na capacidade antioxidante, alegam que 48% dos compostos fenólicos estão bioacessíveis no intestino delgado, enquanto 42% permanecem biodisponíveis no intestino grosso e apenas uma fração mínima (10%) está sempre inacessível (Gião, et al., 2012).

Os compostos fenólicos quando absorvidos podem ser hidroxilados pelos citocromos P450 ou conjugados com grupos glucuronido, sulfato ou metilo. Estes fatores originam uma grande diversidade estrutural que pode conduzir à alteração da atividade biológica (Antunes, 2012; Landete, 2012).

No entanto, existe sempre uma percentagem que não é absorvida ao longo do trato gastrointestinal. Esta porção alcança o cólon, onde sofre metabolização por ação enzimática da própria microflora. Tal leva à formação de muitos metabolitos secundários biodisponíveis e de baixo peso molecular que chegam à corrente sanguínea e que possuem interesse biológico (Landete, 2012).

Assim, quando não há absorção, os compostos fenólicos têm a capacidade de exercer efeitos benéficos no próprio intestino, desativando espécies reativas que se encontrem nesse local. Desta forma, mesmo que os compostos fenólicos não alcancem uma elevada concentração no plasma, podem obter concentrações elevadas no lúmen

gastrointestinal. Nesta situação, os compostos fenólicos não têm que estar biodisponíveis, basta serem estáveis e bioacessíveis. Desta forma, para a determinação dos seus potenciais efeitos apenas este último fator deve ser considerado (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010).

Logo, as transformações que ocorrem no cólon são geralmente essenciais para a absorção e modulam a atividade biológica. Estas transformações no cólon também são fulcrais uma vez que os compostos fenólicos presentes na alimentação encontram-se muitas vezes sob formas nativas não absorvíveis - ésteres, glicosídeos e polímeros. Através das enzimas intestinais ou da microflora do cólon, estas formas são hidrolisadas, ficando sob uma forma que permite serem absorvidas (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004).

Dados epidemiológicos relativos às proantocianidinas, também sustentam este argumento. A absorção intestinal destas é muito baixa, no entanto apresentam efeitos biológicos que podem dever-se a um metabolito formado na sua metabolização por bactérias da flora intestinal (Antunes, 2012; Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004).

A reciclagem enterohepática também interfere na atividade dos compostos fenólicos, podendo aumentar a presença de compostos fenólicos no interior do organismo. Em adição, a digestão gastrointestinal envolve condições de pH extremas e a presença de uma grande variedade de enzimas que podem causar degradação de compostos antioxidantes ou formação de novos compostos (Nimalaratne, 2015). Assim, a estabilidade de um composto nas condições gastrointestinais é outro fator a considerar. Tal verifica-se no exemplo das antocianinas, onde por serem muito instáveis em meio alcalino (intestino delgado), limita a sua biodisponibilidade (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010).

Foi sugerido num estudo que os compostos fenólicos com maior atividade a pH básico protegem mais eficientemente as células intestinais e que os compostos fenólicos com maior atividade a pH ácido, são mais eficientes na proteção do estômago (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010).

3.3.5 A natureza de outros componentes da refeição

A natureza dos outros componentes não fenólicos presentes na refeição também é um fator que influencia a atividade antioxidante dos compostos fenólicos no organismo pois a biodisponibilidade de um composto funcional é regida pela composição da refeição total. É neste facto que reside a principal limitação no uso de modelos *in vitro*. Maioritariamente, tais estudos fornecem informação sobre os efeitos dos alimentos funcionais baseando-se

numa concentração de um composto funcional individual e em doses fora do contexto das doses dietéticas normais *in vivo*. Quando não se considera que os compostos funcionais estão inseridos numa matriz alimentar e numa refeição total, os resultados obtidos são irreais (Crowe & Francis, 2013).

Adicionalmente, a variabilidade fisiológica individual também influencia o processo digestivo dos compostos fenólicos. Cada indivíduo tem uma determinada acidez gástrica, estado fisiológico característico e concentrações e atividades enzimáticas diferentes, pelo que existem diferenças fisiológicas entre os indivíduos em termos de absorção e metabolismo dos alimentos.

Assim, a variedade de fatores que estão implicados no processo digestivo de alimentos funcionais revela a importância de efetuar um estudo aprofundado, relacionando os diversos compostos antioxidantes presentes no organismo por resultado da dieta e o seu respetivo comportamento no aparelho digestivo, entrando em conta com a diversidade de interações que podem ocorrer dentro de uma matriz alimentar, de forma a conhecer o maior potencial dos compostos fenólicos na saúde humana (Crowe & Francis, 2013).

3.4. As propriedades antioxidantes de diferentes matrizes alimentares considerando a influência do processo digestivo

Atualmente existem vários dados na literatura sobre a capacidade antioxidante de diversos produtos alimentares, especialmente de frutos, e sua respetiva composição em antioxidantes (principalmente compostos fenólicos). No entanto, há falta de dados sobre o estudo dos mesmos parâmetros após o processo digestivo, ou seja, que considere o padrão de libertação dos compostos fenólicos, as alterações que estes sofrem e consequentemente como a digestão influencia a atividade antioxidante. Porém, ainda que escassa, a literatura existente permite uma análise (Pavan, Sancho, & Pastore, 2014).

Um estudo realizado no sentido de melhorar o conhecimento relativo aos processos de absorção de compostos antioxidantes, avaliou extratos de papaia, jaca e anona. Neste âmbito, verificou-se que a atividade antioxidante medida através do método ORAC e TEAC da anona e da jaca aumenta após a digestão e que a da papaia diminui ligeiramente. No caso da jaca é também observado um aumento dos compostos fenólicos o que explica o consequente aumento da atividade antioxidante nesta amostra. Porém, ao contrário do esperado, na anona verifica-se uma diminuição do conteúdo em compostos fenólicos. A explicação para este acontecimento pode residir no facto de a anona ter outros compostos antioxidantes não fenólicos ou na ocorrência de uma mudança na estrutura dos compostos fenólicos avaliados, tornando-os indetetáveis. No caso da papaia e ainda relativamente ao

conteúdo em compostos fenólicos totais após a digestão, observou-se uma diminuição no seu conteúdo, tendo-se observado no entanto um aumento no conteúdo em flavonóides. Este facto leva-nos a concluir que os flavonóides são estáveis perante as condições de digestão experimentadas, podendo dever-se à formação de uma ligação que não é hidrolisada pelas enzimas gastrointestinais (Pavan, Sancho, & Pastore, 2014).

Bouayed et al, também realizaram um estudo considerando a influência do processo digestivo nos compostos antioxidantes (compostos fenólicos totais, flavonóides e antocianinas) e na respetiva atividade antioxidante medida pelos métodos FRAP e ABTS, neste caso contidos em quatro variedades de maçãs (Bouayed, Hoffmann, & Bohn, 2011). Os resultados obtidos nesta matriz indicam que em comparação com a atividade antioxidante nativa das maçãs, determinada por avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos extraídos quimicamente desta matriz, a atividade antioxidante após a digestão é mais baixa, tal como o conteúdo em compostos fenólicos (Bouayed, Hoffmann, & Bohn, 2011).

Porém, os compostos fenólicos submetidos ao processo digestivo estão presentes a partir do estômago, indicando que a digestão gástrica liberta os compostos funcionais da matriz alimentar, isto é, torna-os bioacessíveis. Apesar de ser principalmente no estômago que a extração dos compostos fenólicos ocorre, o intestino também tem a capacidade de os libertar pelas enzimas nele presentes (lipases e pancreatina), fazendo com que a extração dos compostos funcionais continue ao longo do trato gastrointestinal. Assim, neste estudo pode-se concluir que os compostos fenólicos das maçãs estudadas são maioritariamente estáveis ao longo da digestão (Bouayed, Hoffmann, & Bohn, 2011). No entanto, é fundamental considerar que os compostos fenólicos detetados no intestino encontram-se sob duas formas: numa forma livre solúvel e, também, ligados a componentes como proteínas e polissacarídeos, onde apenas a percentagem livre está disponível para ser absorvida (biodisponível) (Bouayed, Hoffmann, & Bohn, 2011).

Um outro estudo investigou a bioacessibilidade de compostos fenólicos da uva. O estudo iniciou-se com a extração química dos compostos fenólicos desta matriz sem os submeter à simulação do processo digestivo. Os resultados obtidos nesta fase, foram considerados como os compostos fenólicos totais, naturalmente presentes na uva. Posto isto, foi, também, realizada uma quantificação em compostos fenólicos totais presentes nas uvas considerando o processo digestivo, para ser possível a comparação do conteúdo em compostos fenólicos antes e após a simulação da digestão. Assim, a comparação dos resultados obtidos, antes e após a simulação do processo digestivo, revelou que a quantidade bioacessível de compostos fenólicos totais, bem como os conteúdos individuais, dos flavonóides e antocianinas, aumenta durante a digestão gástrica, aumentando

correspondentemente a atividade antioxidante desta matriz medida através do método FRAP e ABTS. Assim, todos os compostos fenólicos testados foram muito estáveis no meio gástrico, tendo-se concluído que os compostos fitoquímicos antioxidantes são progressivamente libertados da matriz alimentar e disponibilizados para absorção ou para exercer os seus efeitos biológicos diretamente no trato gastrointestinal (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010).

Porém, relativamente às antocianinas, estas não são detetáveis na digestão intestinal. Pensa-se que sejam degradadas na passagem do meio ácido do estômago para o meio alcalino do intestino. Tal é concordante com os resultados obtidos em diversos estudos que relatam a sensibilidade das antocianinas em pH neutro ou ligeiramente alcalino. Mas relativamente aos restantes compostos fenólicos, estes demonstraram ser estáveis a esta alteração de pH (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010). Uma conclusão observada neste ensaio é que o máximo de extração dos compostos fenólicos ocorre a uma temperatura entre 30-35 °C - valores de temperatura perto dos observados no trato gastrointestinal (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010).

Um outro estudo investigou os potenciais efeitos da digestão nas propriedades antioxidantes de groselhas utilizando o método DPPH[•] e ORAC (Chiang, Kadouh, & Zhou, 2013). Os resultados obtidos indicaram que a digestão aumenta a disponibilidade dos antioxidantes presentes neste fruto. Ou seja, é observado que o processo digestivo não destrói nem diminui a quantidade de antioxidantes, pelo contrário, em comparação com a quantidade de antioxidantes presentes no fruto sem ser digerido, após a sua digestão, os valores são mais elevados, ou mantêm-se (Chiang, Kadouh, & Zhou, 2013). O aumento no conteúdo em compostos antioxidantes justifica o aumento na capacidade antioxidante observada.

Assim, é observado que os estudos realizados, que englobam a simulação da digestão, apresentam resultados de atividade antioxidante diferentes consoante a matriz alimentar analisada (Chiang, Kadouh, & Zhou, 2013). Porém, apesar das diferenças observadas antes e após a simulação da digestão gastrointestinal, de uma maneira geral, a maioria dos compostos responsáveis pelo potencial antioxidante não perde a sua atividade após o processo digestivo.

Conclusão

É reconhecido o efeito que a alimentação pode ter sobre a saúde, estimando-se que um grande número de doenças crônicas possa ser prevenido, fazendo uma dieta rica em vegetais, leguminosas e fruta. De entre os diferentes tipos de compostos naturais, os que possuem propriedades antioxidantes, e que se encontram presentes em alimentos, representam um tema de grande interesse pela relação destas propriedades com os possíveis efeitos benéficos na saúde. Neste âmbito, os compostos fenólicos situam-se entre os mais estudados contendo atividade antioxidante comprovada em diversos sistemas. Encontram-se entre as substâncias bioativas terapeuticamente mais úteis e potentes e que constituem uma porção significativa da dieta humana.

No entanto para que estes compostos possam exercer as suas propriedades no organismo humano têm de passar pelo processo digestivo e ficar bioacessíveis e/ou potencialmente biodisponíveis, sendo pertinente compreender o efeito do processo digestivo nas propriedades antioxidantes de alimentos funcionais. Foi este o objetivo do presente estudo.

A digestão pode transformar os compostos fenólicos em diferentes formas estruturais, sendo que estas diferenças podem originar resultados de atividade antioxidante distintos.

Não existe um método universal para a determinação da atividade antioxidante, por esta poder ser exercida através de diferentes mecanismos, recorrendo-se, assim, por norma a diversos ensaios, de forma a abranger diversos mecanismos de ação antioxidante. Quando é efetuada a avaliação da atividade antioxidante de alimentos, não são todos os estudos que consideram a influência da digestão nesta propriedade, o que pode representar uma lacuna nesses estudos. Quando o processo digestivo é considerado, recorre-se a modelos de simulação da digestão *in vitro* e/ou ensaios *in vivo*.

A simulação da digestão *in vitro* é avaliada por diferentes modelos, o que origina resultados pouco correlacionáveis entre os diversos estudos realizados. Adicionalmente, nenhum deles é ainda amplamente aceite, surgindo assim a necessidade do desenvolvimento de modelos de digestão padronizados, contemplando fatores como o conteúdo enzimático, tensões mecânicas aplicadas e tempos de digestão para cada etapa, entre diversos outros factores, bem definidos. Adicionalmente existem outros fatores a considerar como, a complexidade e grande variabilidade individual do processo digestivo, o facto de que cada amostra exhibe diferentes características, contendo diversos compostos fenólicos presentes em diferentes quantidades, bem como se esses alimentos estão a ser ingeridos sozinhos, ou como parte de uma refeição. Todos estes fatores vão influenciar a

atividade antioxidante da amostra.

As próprias condições de digestão *in vivo* são muito variáveis. Como exemplo desta variação temos o tempo de digestão que depende das características individuais (idade, sexo, estado patológico, estados de jejum etc.), bem como a variabilidade dos próprios alimentos (características da matriz alimentar ingerida, como estar no estado sólido ou líquido, quantidade total, tamanho das partículas, etc.). Desta forma, a digestão *in vitro* nunca poderá reproduzir exatamente aquilo que acontece *in vivo*, podendo, no entanto, fornecer uma ideia aproximada e útil.

Assim, várias investigações têm utilizado métodos de simulação da digestão *in vitro* para analisar mudanças estruturais, biodisponibilidade e digestibilidade dos alimentos, indicando que estes modelos são ferramentas comuns e úteis para análise de alimentos. Continuando, no entanto, a serem observadas algumas diferenças entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*.

Na verdade a correlação *in vitro-in vivo* é um fator muito importante e há claramente necessidade urgente de mais pesquisas sobre este tema de forma a desenvolver sistemas bem definidos e mais realistas de modelos de simulação da digestão *in vitro* para avaliar a biodisponibilidade dos compostos fenólicos nos alimentos. Além disso, é necessária mais investigação para adaptar os modelos *in vitro* de digestão para amostras de diferentes alimentos.

No entanto, a investigação já realizada permite obter algumas conclusões. No domínio da biodisponibilidade dos compostos fenólicos foram efetuados ensaios em diversos frutos (papaia, jaca, anona, maçãs, groselhas, uvas, entre outros), comparando resultados da atividade antioxidante destes, antes e após a digestão.

A maioria destes estudos considera a atividade antioxidante nativa das matrizes alimentares pela extração química dos compostos fenólicos e determinação da respetiva atividade antioxidante. Porém o teor extraído neste processo pode diferir quantitativa e qualitativamente dos que são realmente extraídos no processo digestivo, observando-se, em alguns dos ensaios já realizados uma diminuição dos compostos fenólicos quando é considerado o processo digestivo. Tal pode sugerir que a extração química pode sobrestimar a disponibilidade dos componentes ativos dos alimentos. Este facto pode, também, indicar que durante o processo digestivo, uma parte dos compostos fenólicos poder ser degradada e/ou que estes compostos podem não ser extraídos da matriz na sua totalidade. Em adição, os compostos antioxidantes podem encontrar-se tanto na sua forma livre solúvel como ligados a outros componentes, podendo ainda formar complexos com minerais dificilmente solubilizados pela digestão gastrointestinal. Adicionalmente, os resultados obtidos nestes estudos mostram que nem sempre é linear a relação entre a

quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante correspondente da amostra. Este facto evidencia que a atividade antioxidante observada depende do tipo de estrutura fenólica presente, ou seja, depende mais do tipo de compostos presentes do que da quantidade total. Assim, compreende-se que a extração química pode não ser o melhor método para avaliar a atividade antioxidante dos alimentos, e que o processo digestivo deve ser considerado para se alcançar resultados mais realistas.

É também observado em muitos ensaios realizados situações em que os compostos fenólicos são pouco biodisponíveis mas encontram-se bioacessíveis, podendo desempenhar um papel importante na defesa antioxidante, atuando localmente na desativação de radicais livres que se possam formar no aparelho digestivo.

Uma outra conclusão que se pode retirar através dos resultados obtidos na maioria dos ensaios é que o conteúdo em compostos fenólicos totais, flavonóides e a atividade antioxidante dos compostos digeridos aumenta significativamente durante a passagem do meio ácido do estômago para o meio alcalino intestinal, sugerindo que esta transição facilita a libertação dos compostos fenólicos da matriz alimentar em que estão inseridos, o que pode ser explicado pela mudança de pH, pelo efeito das enzimas digestivas intestinais, e/ou pelo tempo adicional de extração.

Com este trabalho pode-se também concluir que apesar de já existirem alguns estudos que incluam a influencia do processo digestivo na determinação da atividade antioxidante, ainda há muito por fazer, uma vez que os modelos *in vitro* disponíveis ainda estão longe de mimetizar o que ocorre *in vivo*. No entanto, a literatura existente, evidencia que as propriedades antioxidantes são realmente afetadas pelo processo digestivo e que, consoante a matriz alimentar em que estão incluídos, estas aumentam ou diminuem. Estas conclusões demonstram adicionalmente a relevância de se desenvolverem formas de manter as propriedades bioativas benéficas dos compostos fenólicos na situação *in vivo*.

Bibliografia

Aberoumand, A., & Deokule, S. (2008). Comparison of Phenolic Compounds of Some Edible Plants of Iran and India. *Pakistan Journal of Nutrition*, 582-585.

Antunes, R. B. (2012). Avaliação do efeito da digestão in vitro na capacidade antioxidante de infusões medicinais: Flor de Camomila e Flor de Laranjeira. *Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa*, 67.

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). *Methods for testing antioxidant activity*. Wagga Wagga, Australia: The Royal Society of Chemistry.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2005). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 191–203 .

Barbosa, k., Bressan, j., Costa, n., Alfenas, r., Paula, s., & Minim, v. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, 629-643.

Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 228-237.

Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 14–21 .

Carvalho, P. G., Machado, C. M., Moretti, C. L., & Fonseca, M. E. (2006). Hortaliças como alimentos funcionais. *Horticultura Brasileira*, 397-404.

Cilla, A., Alegría, A., Barberá, R., & Lagarda, M. J. (2013). Foods or Bioactive Constituents of Foods as Chemopreventives in Cell Lines After Simulated Gastrointestinal Digestion: A Review. In J. A. Morales-González, *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants* (pp. 131-151). México: InTech.

Chiang, C.-J., Kadouh, H., & Zhou, K. (2013). Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by in vitro digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 417-422.

Crowe, K. M., & Francis, C. (2013). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Functional Foods. *Journal of the academy of nutrition and dietetics*, 1096-1103.

Dicko, M. H., Gruppen, H., Traoré, A. S., Voragen, A. G., & Berkel, W. J. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use . *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 21-38.

Ferreira, M. (2014). Simulação in vitro do processo digestivo de patulina em sumos de fruta. *Universidade de Lisboa*, 124.

Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 345–391.

García-Alonso, J., Ros, G., Vidal-Guevara, M. L., & Periago, M. J. (2006). Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. *Nutrition Research*, 330-339.

Gião, M. S., Gomes, S., Madureira, A. R., Faria, A., Pestana, D., Calhau, C., et al. (2012). Effect of in vitro digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of Agrimonia eupatoria, Rubus idaeus, Salvia sp. and Satureja montana. *Food Chemistry*, 761–767 .

González-Arias, C., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. (2013). Mycotoxin bioaccessibility/absorption assessment using in vitro digestion models: a review. *World Mycotoxin Journal*, 167-184.

Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 1-12.

Hasler, C. M. (2002). Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges. *the journal of nutrition*, 3772-3781.

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *food and bioproducts processing*, 217–233.

Landete, J. M. (2012). Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 936-948.

Lidon, F., & Silvestre, M. M. (2010). *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana*. Lisboa: Escolar Editora.

Lorrain, B., Ky, s., Pechamat, L., & Teissedre, P.-L. (2013). Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines, and Extracts. *Molecules*, 1076-1100 .

Nimalaratne, L. A. (2015). *Antioxidants in Chicken Egg Yolk: Effects of Cooking, Storage and Gastrointestinal Digestion*. Edmonton: University of Alberta.

Machado, H., Nagem, T. J., Peters, V. M., Fonseca, C. S., & Oliveira, T. T. (2008). Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, 33-39.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *the american journal of clinical nutrition* , 727–747.

Mendes, A. P. (2014). Alimentos funcionais. pp. 133-134.

- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., et al. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *The Royal Society of Chemistry*, 1113–1124.
- Mosca, L., Marcellini, S., Perluigi, M., Mastroiacovo, P., Moretti, S., Famularo, G., et al. (2002). Modulation of apoptosis and improved redox metabolism with the use of a new antioxidant formula. *Biochemical Pharmacology*, 1305-1314.
- Moraes, F. P., & Colla, L. M. (2006). Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, pp. 109-122.
- Pavan, V., Sancho, R. A., & Pastore, G. M. (2014). The effect of in vitro digestion on the antioxidant activity of fruit extracts (Carica papaya, Artocarpus heterophyllus and Annona marcgravii). *LWT - Food Science and Technology*, 1247e1251.
- Prates, J. A., & Mateus, C. M. (2002). Componentes com actividade fisiológica dos alimentos de origem animal. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*, 3-12.
- Sucupira, N. R., Silva, A. B., Pereira, G., & Costa, J. N. (2012). Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 263-269.
- Santos, I. S. (2011). *Avaliação do potencial antioxidante dos compostos fenólicos de extractos de plantas da flora portuguesa*. Porto: Universidade Fernando Pessoa.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The journal of nutrition*, 2073—2085.
- Selvakumar, K., Madhan, R., Srinivasan, G., & Baskar, V. (2011). Antioxidant Assays in Pharmacological Research. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology and Innovation*, 99-103.
- Silva, F. C., Ribeiro, R. d., & Chaves, A. C. (2009). *Radicais livres e antioxidantes: concepções e expectativas dos professores do ensino médio*. Florianópolis.
- Ramalho, V. C., & Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química nova*, 755-760 .
- Renz, S. V. (2003). *Oxidação e antioxidantes*. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 599–606.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Mackie, T. L., Swiatecka, T. R., et al. (2015). *The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health - In Vitro and Ex Vivo Models*. França: Springer open.

Versantvoort, C. H., Van de Kamp, E., & Rempelberg, C. J. (2004). *RIVM report: Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food*. Bilthoven.

Wilkinson, S. B., Pidgeon, N., Lee, J., Pattison, C., & Lambert, N. (2015). Exploring Consumer Attitudes Towards Functional Foods. *Journal of Nutraceuticals Functional & Medical Foods* , 5-28.

Yoo, Y. J., Saliba, A. J., & Prenzler, P. D. (2010). Should Red Wine Be Considered a Functional Food? *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 530-551.