

MÁRIO JORGE ABRANTES DONAS-BÔTO BORDALO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE
DE EXTRACTOS NATURAIS DE MAÇÃ E
AZEITONA USANDO MODELOS CELULARES EM
MONOCAMADA (2D) E AGREGADOS (3D)**

Orientadora: Doutora Ana Teresa de Carvalho Negrão Serra

Co-Orientadora: Doutora Maria Margarida de Carvalho Negrão Serra

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Engenharia

Lisboa

2014

MÁRIO JORGE ABRANTES DONAS-BÔTO BORDALO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE
DE EXTRACTOS NATURAIS DE MAÇÃ E
AZEITONA USANDO MODELOS CELULARES EM
MONOCAMADA (2D) E AGREGADOS (3D)**

Tese/Dissertação apresentada para a obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Biotecnológica no
Curso de Mestrado em Engenharia Biotecnológica,
conferido pela Universidade Lusófona de
Humanidades e Tecnologias

Orientadora: Doutora Ana Teresa de Carvalho
Negrão Serra

Co-Orientadora: Doutora Maria Margarida de
Carvalho Negrão Serra

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Engenharia

Lisboa

2014

Mário Jorge Abrantes Donas-Bôto Bordalo
Avaliação da Capacidade Antioxidante de Extractos Naturais de Maçã e Azeitona Usando Modelos Celulares em
Monocamada (2D) e Agregados (3D)

Dedico esta dissertação ao meus pais,

Às minhas avós,

Maria Olivia e Maria da Conceição

E à minha tia-avó Maria Isabel

Agradecimentos

*Quando a loucura é grande,
os sonhos são enormes.*

*Com alma pequena,
os medos aumentam
e a incerteza aguça.*

*Com companhia certa,
os medos não existem
e a incerteza nem vê-la.*

*Diversão,
é a conquista do desafio.*

Gostaria de expressar a minha gratidão a todas as pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar quero agradecer à **Doutora Ana Teresa Serra** minha orientadora e à **Doutora Maria Margarida Serra** minha co-orientadora, por terem acreditado em mim e me terem concedido, a oportunidade de poder realizar este trabalho. O meu obrigado pelo apoio, disponibilidade, preocupação, e por tudo que me ensinaram.

À **Doutora Catarina Duarte** por me ter dado a oportunidade de desenvolver o trabalho no seu laboratório.

A toda a equipa do **laboratório de Nutracêuticos e Libertação Controlada** e à equipa do **laboratório de Análise Biofarmacêutica e Biofarmacocinética** pelos momentos divertidos e de cumplicidade. À **Unidade de Tecnologias de Células Animais** por terem cedido os agregados de células usados neste trabalho, especialmente à **Ana Paula Terrasso e Doutora Catarina Brito**, cuja ajuda foi indispensável para a realização deste trabalho.

Ao **Instituto Superior de Agronomia** pelas aventuras e desventuras durante estes últimos dois anos e por todas as pessoas que me deu a conhecer.

A todos os professores e colegas, especialmente ao **André Tavares, Emanuel Santos, João Canceira, Inês Silva** que possibilitaram o sucesso desta jornada, por terem contribuído para a minha aprendizagem e para o meu crescimento, tanto intelectual como pessoal.

Um especial agradecimento aos meus grandes amigos **Carlos Cabral, Diogo Guerra e Diogo Machado** que estiveram ao meu lado desde sempre, pelas grandes aventuras que proporcionaram.

Especialmente aos meus **pais**, que sempre me apoiaram e a quem nunca conseguirei recompensar tudo o que fizeram por mim. MUITO OBRIGADO!

A todos MUITO OBRIGADO!

Resumo

Actualmente, os compostos bioactivos de alimentos têm vindo a ser comercializados na forma de produtos farmacêuticos, cosméticos e aditivos alimentares, reclamando efeito benéfico na saúde. Para o desenvolvimento e comercialização destes produtos é necessário a avaliação das propriedades biológicas.

Este trabalho teve como objectivo a avaliação da capacidade antioxidante e neuroprotectora de extractos naturais de maçã e azeitona utilizando ensaios pré-clínicos, nomeadamente métodos químicos e modelos celulares em 2D e 3D.

Foram analisados 11 extractos de maçã (variedade Bravo de Esmolfe) obtidos por diferentes tecnologias. A extracção com fluídos pressurizados (EFP) demonstrou ser mais eficiente do que a extracção convencional em termos de rendimento e de compostos extraídos. As condições de EFP 60:40:0 e 90:5:5 (v/v CO₂:EtOH:H₂O) permitiram obter fracções com maior concentração em compostos antioxidantes e maior capacidade de resgate de radicais livres (EROs) no modelo celular Caco-2, respectivamente. Os principais compostos responsáveis pela actividade antioxidante foram: epicatequina, glucósidos de quercetina e procianidina B2.

Para o extracto de bagaço de azeitona, rico em hidroxitirosol, foi demonstrada a capacidade de resgate de EROs e de prevenção da morte celular em agregados de células NT2 diferenciadas em neurónios, sendo que este efeito neuroprotector foi superior ao obtido para o composto puro.

Palavras-chave: Fitoquímicos; Maçã; Azeitona; Actividade antioxidante; Linhas celulares humanas.

Abstract

Nowadays, bioactive compounds from foods have been commercialized as pharmaceuticals, cosmetics and food additives products, claiming health promoting effects. For the development of these products the evaluation of their biological properties is required.

The main aim of this work was the evaluation of antioxidant and neuroprotective effect of apple and olive natural extracts using preclinical assays, namely chemical methods and cellular models in 2D and 3D.

Eleven extracts obtained by different technologies from ‘Bravo de Esmolfe’ apple variety were analyzed. High pressure extraction (HPE) proved to be more efficient in yield and extracted compounds than conventional method. The solvent ratio of 60:40:0 and 90:5:5 (v/v CO₂:EtOH:H₂O) allowed to obtain fractions with the highest concentration of antioxidants and increased ability in scavenging free radicals (ROS) in Caco-2 cell model, respectively. Epicatechin, quercetin glycosides and procyanidin B2 were identified as the main compounds responsible for the antioxidant of samples.

The olive mill residues extract rich in hydroxytyrosol, demonstrated ability to scavenge ROS and prevent death of neurons derived from NT2 cells cultured as aggregates. This neuroprotective effect was superior to that obtained for the pure compound.

Keywords: Phytochemicals; Hydroxytyrosol; Apple; Antioxidant activity; Human cell lines

Zusammenfassung

Bioaktive Lebensmittel-Verbindungen werden derzeit als Pharmazeutika, Kosmetika oder Lebensmittelzusatzstoffe mit behaupteten gesundheitsfördernden Wirkungen auf den Markt gebracht. Für die Entwicklung und Vermarktung dieser Produkte ist eine Bewertung ihrer biologischen Eigenschaften unerlässlich.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Bewertung der antioxidativen und neuroprotektiven Fähigkeiten natürlicher Extrakte von Apfel und Olive durch vorklinische Tests unter Einbeziehung chemischer Methoden und Zellmodelle in 2D und 3D.

Elf Extrakte, die mittels unterschiedlicher Techniken aus einer Apfelsorte ('Bravo de Esmolfe') gewonnen worden waren, wurden analysiert. Dabei erwiesen sich unter Druck stehende Extrakte (EPF) als effizienter als herkömmliche Extrakte, sowohl in Hinsicht auf ihren Ertrag wie auch hinsichtlich der extrahierten Verbindungen. Unter den Bedingungen von EPF 60:40:0 sowie 90:5:5 (v/v CO₂:EtOH:H₂O) erhielt man Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen an Antioxidantien bzw. mit einer gesteigerten Fähigkeit der Freisetzung von freien Radikalen (ROS) in Caco-2-Zellmodellen. Für die antioxidative Aktivität waren hauptsächlich die Verbindungen Epicatechin, Quercetin-Glykoside und Procyanidin B2 verantwortlich.

Bezüglich des Olivenextraktes, der reich an Hydroxytyrosol war, konnte die Fähigkeit zur Freisetzung von ROS nachgewiesen werden sowie die Vorbeugung gegen Zelltod in NT2 Zell-Aggregaten, unterteilt nach Neuronen; die neuroprotektive Wirkung war derjenigen der reinen Verbindung überlegen.

Keywords: Phytochemikalien; Hydroxytyrosol; Apfel; antioxidative Aktivität; humane Zelllinien.

Lista de Abreviaturas

Abreviaturas	Forma total
AAPH	2,2'Azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorido
AR	Ácido retinóico
ATCC	American type culture collection
AVC	Acidente vascular cerebral
TAH	Transferência de átomo de hidrogénio
BHA	Butil-hidroxianisolo
BHT	Butil-hidroxitolueno
°C	Graus Celsius
CAA	Actividade antioxidante celular
Caco-2	Linha celular humana de carcinoma do cólon
CAEAC	Capacidade antioxidante de equivalentes de ácido cafeico
CL₅₀	50% da concentração letal
Co(II)	Cobalto II
CoF₂	Fluoreto de cobalto II
CUPRAC	Ensaio de redução de cobre
DCF	2',7'-Diclorofluoresceína
DCFH	2',7'-Diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato
DMPD	Ensaio de <i>N,N</i> -dimethyl- <i>p</i> -phenylenediamine
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Método de avaliação da capacidade antioxidante: Capacidade de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ECAT	Equivalentes de capacidade antioxidante trolox
EFP	Extracção com fluidos pressurizados
EQ	Equivalentes de quercetina
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ET	Equivalentes de trolox
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations

Avaliação da Capacidade Antioxidante de Extractos Naturais de Maçã e Azeitona Usando Modelos Celulares em Monocamada (2D) e Agregados (3D)

FBS	Soro bovino fetal
FD	Fluoresceína disódio
FeCl₃	Cloreto de ferro III
FRAP	Método de avaliação da capacidade antioxidante: Poder antioxidante de redução do ferro
HORAC	Método de avaliação da capacidade antioxidante: Capacidade de inibição do radical hidróxilo
HOSC	Método de avaliação da capacidade antioxidante: Capacidade de resgate do radical hidróxilo
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
IBET	Instituto de Biologia Experimental Tecnológica
ITQB-UNL	Instituto de Tecnologia Química e Biológica-Universidade nova de Lisboa
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAP	Proteínas associadas a microtúbulos
mg	Miligrama
mM	Milimolar
MPa	Mega Pascal
NMDA, não-NMDA	Receptor de glutamato, N-metil D-Aspartato
NT2	Sub-clone NTERA-2/D1 da linha celular NTERA-2
NT2N	Neurónios diferenciados a partir da linha celular NTERA-2/D1
OH	Radical hidróxilo
ON	Óxido de azoto
ORAC	Método de avaliação da capacidade antioxidante: Capacidade de absorção do radical Oxigénio
O₂^{•-}	Radical superóxido
PBS	Solução de tampão fosfato
RTE	Reacções de transferência de um electrão
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
SNC	Sistema nervoso central
SPB	Solução tampão fosfato de sódio
Tc	Temperatura crítica

Avaliação da Capacidade Antioxidante de Extractos Naturais de Maçã e Azeitona Usando Modelos Celulares em Monocamada (2D) e Agregados (3D)

TEAC	Actividade antioxidante equivalente trolox
Trolox	(+/-)-6-hidroxi-2,5,7,8.tetrametilchroman-2-ácido carboxílico
t-BHP	Hidroperóxido de tert-butilo
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura
UTCA	Unidade de Tecnologia de Células Animais
WHO	World Health Organization
v/v	Volume por volume
η	Letra grega Eta - Rendimento
Λ	Letra grega Lambda - Comprimento de onda
μL	Microlitro
μm	Micrómetro

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Zusammenfassung	vi
Lista de Abreviaturas	vii
Índice de Tabelas	xiii
Índice de Figuras	xiv
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Stress</i> oxidativo.....	1
1.2. Antioxidantes	4
1.2.1. Compostos fenólicos.....	5
1.3. Fontes naturais de compostos com propriedades antioxidantes	7
1.3.1. Maçã.....	7
1.3.2. Azeitona	9
1.4. Extracção de compostos com propriedades antioxidantes a partir de fontes naturais	13
1.5. Métodos de avaliação da capacidade antioxidante	14
1.5.1. Modelos celulares.....	20
1.6. Objectivo	27
2. Materiais e Métodos	28
2.1. Extractos Naturais	28
2.1.1. Extractos de maçã ‘Bravo de Esmolfe’	28
2.1.2. Extracto de Azeitona	30
2.2. Compostos fenólicos	30
2.3. Caracterização em polifenóis	30
2.3.1. Quantificação de polifenóis totais – Método Folin-Ciocalteu	30
2.3.2. Identificação e quantificação de compostos por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)	30

2.4.	Actividade antioxidante.....	31
2.4.1.	Método de ORAC.....	31
2.4.2.	Método de HORAC.....	31
2.4.3.	Método de HOSC	32
2.5.	Ensaio utilizando modelos celulares	33
2.5.1.	Modelos celulares e condições de cultura celular	33
2.5.2.	Avaliação da toxicidade.....	33
2.5.3.	Actividade antioxidante celular (CAA)	35
2.5.4.	Ensaio de viabilidade	36
2.6.	Análise estatística	37
3.	Resultados e Discussão.....	38
3.1.	Parte 1 – Caracterização antioxidante de extractos naturais de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ ..	38
3.1.1.	Análise e comparação de extractos obtidos por extracção com solventes pressurizados e extracção convencional	38
3.1.2.	Identificação dos principais compostos responsáveis pela actividade antioxidante	48
3.2.	Parte 2 - Avaliação do efeito neuroprotector em agregados de células NT2 diferenciados por ácido retinóico, em células do sistema nervoso central	50
3.2.1.	Avaliação da toxicidade.....	52
3.2.2.	Capacidade de resgate das EROs intracelulares.....	54
3.2.3.	Capacidade de prevenção da morte celular	57
4.	Conclusões e perspectivas futuras	60
5.	Referências.....	62
6.	Apêndices	73
6.1.	Apêndice A – Rectas de calibração	73
6.1.1.	Recta de calibração para a determinação dos polifenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu	73
6.1.2.	Recta de calibração de Quercetina utilizada na quantificação do teor de flavonóides totais nos extractos de maçã (dados obtidos no detector de díodos ao c.d.o. de 360nm.....)	73
6.2.	Apêndice B - Preparação de soluções.....	74

6.2.1.	Tampão fosfato salino (PBS) 75mM a pH 7,4	74
6.2.2.	Tampão fosfato de sódio (SPB) 75mM a pH de 7,4.....	74

Índice de Tabelas

TABELA 1.I – COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE POR CRITÉRIO CHAVE.	17
TABELA 1.II – VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MÉTODOS ORAC E TEAC.	19
TABELA 1.III – DIFERENÇAS ENTRE OS MÉTODOS BASEADOS NA METODOLOGIA DO MÉTODO ORAC E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO ORAC.	20
TABELA 1.IV – LINHAS CELULARES QUE TÊM VINDO A SER USADAS PARA A AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE ALIMENTOS.	21
TABELA 1.V – EXEMPLOS DE ENSAIOS USADOS COM RECURSO A CULTURA DE CÉLULAS PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS.	22
TABELA 2.I – CONDIÇÕES APLICADAS NA EXTRACÇÃO COM LÍQUIDOS PRESSURIZADOS PARA CADA EXTRACTO DE MAÇÃ A $50 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ E $25 \pm 0,4 \text{ MPa}$	29
TABELA 2.II – CONDIÇÕES APLICADAS NA EXTRACÇÃO CONVENCIONAL (SÓLIDO-LÍQUIDO) PARA OS EXTRACTOS DE MAÇÃ A 50°C DURANTE 2H.	29
TABELA 3.I – CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRACTOS DE MAÇÃ ‘BRAVO DE ESMOLFE’, OBTIDOS PELOS DOIS MÉTODOS DE EXTRACÇÃO, COM SOLVENTES PRESSURIZADOS A $50 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ E $25 \pm 0,4 \text{ MPa}$ E EXTRACÇÃO CONVENCIONAL 50°C DURANTE 2H.	39
TABELA 3.II – CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRACTOS DE MAÇÃ ‘BRAVO DE ESMOLFE’ DA SEGUNDA EXTRACÇÃO COM SOLVENTES PRESSURIZADOS A $50 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ E $25 \pm 0,4 \text{ MPa}$	47
TABELA 3.III – CORRELAÇÕES ENTRE A ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E A COMPOSIÇÃO FENÓLICA DOS EXTRACTOS DE MAÇÃ ‘BRAVO DE ESMOLFE’.	49

Índice de Figuras

FIGURA 1.1 – ORIGENS DA FORMAÇÃO E OS DIFERENTES RADICAIS LIVRES QUE PODEM LEVAR AO <i>STRESS</i> OXIDATIVO.	3
FIGURA 1.2 – FONTES DAS EROS, CAUSADORAS DE <i>STRESS</i> OXIDATIVO E OS SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE.	4
FIGURA 1.3 – ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES.	6
FIGURA 1.4 – DIVISÃO DOS POLIFENÓIS EM DIFERENTES GRUPOS.	6
FIGURA 1.5 – ESTRUTURA MOLECULAR DA QUERCETINA.	8
FIGURA 1.6 – HIDRÓLISE DA OLEUROPEINA E DO LIGSTRÓSIDO EM HIDROXITIROSO E TIROSO.	11
FIGURA 1.7 – ESTRUTURA MOLECULAR DO HIDROXITIROSO.	12
FIGURA 1.8 – COMPARAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA (CONTROLO) DE UM ANTIOXIDANTE. CONDIÇÃO OBSERVADA NOS MÉTODOS ORAC, HORAC E HOSC.	18
FIGURA 1.9 – PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE CELULAR (CAA).	23
FIGURA 1.10 – MECANISMOS DA ESTERIFICAÇÃO DA 2',7'-DICLORODIHIROFLUORESCÉINA DIACETATO (DCFH-DA) EM 2',7'-DICLORODIHIROFLUORESCÉINA (DCFH) SEM O DIACETATO E POSTERIOR OXIDAÇÃO DESTA ÚLTIMA EM 2',7'-DICLOROFLUORESCÉINA (DCF) PELAS EROS A NÍVEL DA ESTRUTURA MOLECULAR.	23
FIGURA 1.11 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA DO TRABALHO DESENVOLVIDO PARA A ELABORAÇÃO DA TESE.	28
FIGURA 3.1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS PROCESSOS DE EXTRACÇÃO DA MAÇÃ 'BRAVO DE ESMOLFE'.	40
FIGURA 3.2 – EFEITO DA PERCENTAGEM DE ETANOL PRESENTE NA MISTURA DE SOLVENTE NO RENDIMENTO DO PROCESSO DE EXTRACÇÃO COM SOLVENTES PRESSURIZADOS.	40
FIGURA 3.3 – EFEITO DA PERCENTAGEM DE ETANOL PRESENTE NA MISTURA DE SOLVENTE NA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE NA EXTRACÇÃO COM RECURSO A SOLVENTES PRESSURIZADOS.	42
FIGURA 3.4 – EFEITO DO TIPO DE SOLVENTE NO RENDIMENTO NO PROCESSO DE EXTRACÇÃO CONVENCIONAL (SÓLIDO-LÍQUIDO).	43
FIGURA 3.5 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCESSO DE EXTRACÇÃO COM LÍQUIDOS PRESSURIZADOS DE MAÇÃ 'BRAVO DE ESMOLFE' REALIZADO NA SEGUNDA FASE DO TRABALHO.	45
FIGURA 3.6 – VALORES DE ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE CELULAR DOS VÁRIOS EXTRACTOS DE MAÇÃ 'BRAVO DE ESMOLFE' NO MODELO CELULAR CACO-2.	46
FIGURA 3.7 – ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES.	48
FIGURA 3.8 – AGREGADOS DE CÉLULAS NT2 DIFERENCIADAS UTILIZADOS PARA OS ENSAIOS DE NEUROPROTECÇÃO.	51
FIGURA 3.9 – TOXICIDADE DOS EXTRACTOS E COMPOSTOS SOBRE OS AGREGADOS DE CÉLULAS NT2 DIFERENCIADAS.	53
FIGURA 3.10 – VALORES DE AAC PARA OS RESULTADOS DE FLUORESCÊNCIA OBTIDOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DCFH-DA E T-BHP.	54
FIGURA 3.11 – EFEITO DOS EXTRACTOS DE AZEITONA E MAÇÃ E DOS COMPOSTOS HIDROXITIROSO E QUERCETINA SOBRE AS EROS. (....	55

FIGURA 3.12 – ENSAIO DE NEUROPROTECÇÃO COM O COMPOSTO HIDROXITIRO SOL	57
FIGURA 3.13 – ENSAIO DE NEUROPROTECÇÃO COM O EXTRACTO DE AZEITONA	58
FIGURA 6.1 – RECTA DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DOS POLIFENÓIS TOTAIS	73
FIGURA 6.2 – RECTA DE CALIBRAÇÃO DE QUERCETINA UTILIZADA NA QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS	73

1. Introdução

1.1. *Stress oxidativo*

A vida dos organismos eucariotas é dependente de um fornecimento contínuo de oxigénio, com o objectivo da sua utilização na respiração celular, processo pelo qual as células obtêm energia na forma de ATP a partir de uma reacção controlada de hidrogénio com o oxigénio, dando origem a água [Chong, Z. Z., et al. 2005; Koşar, M., et al. 2011]. A respiração celular é caracterizada por uma cadeia transportadora de electrões, por via de reacções oxidação e redução [Migliore, L., et al. 2009]. Por vezes estes electrões saem da cadeia transportadora de electrões, podendo dar origem a espécies reactivas de oxigénio (EROs) ou radicais livres [Koşar, M., et al. 2011]. Os electrões desemparelhados que são centrados em átomos de oxigénio ou azoto são chamados de EROs ou espécies reactivas de azoto (ERAs), respectivamente [Dutra, R. C., et al. 2008], são normalmente classificados em diferentes espécies, como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidróxilo (OH), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e monóxido de azoto (NO) (Figura 1.1) [Behl C., et al. 2002].

Os radicais livres são produzidos continuamente no organismo como um sub-produto da respiração celular [Konczak, I., et al. 2004; Cardoso, S. M., et al. 2004], são ainda definidos como uma qualquer molécula ou átomo com um ou mais electrões desemparelhados, o que faz com que normalmente sejam instáveis e altamente reactivos [Lo, K. M., et al. 2005; Cheli, F., et al. 2011]. Para além de serem formados a partir do normal funcionamento celular, eles podem ser produzidos por alguma disfunção biológica com origem endógena ou exógena [Dutra, R. C., et al. 2008], fazendo com que surjam deficiências a nível dos mecanismos naturais de defesa antioxidante [Wolfe, K. L., et al. 2007]. Estas deficiências podem ter diversas origens, como a exposição a elevados níveis de EROs, há presença de toxinas que são metabolizadas em espécies reactivas, aumentando os níveis destas espécies, ou ainda pela activação excessiva dos sistemas que as produzem, como aqueles mediados por inflamações e infecções crónicas (Figura 1.1) [Wolfe, K. L., et al. 2007].

Os diferentes radicais possuem diversas funções que vão desde a protecção do hospedeiro (por exemplo: presença do superóxido oxidativo) até à transdução do sinal neuronal (por exemplo: O ON como mensageiro neuronal) [Behl C., et al. 2002] e o seu

excesso possui um efeito nocivo para o organismo, como a peroxidação dos lipídios da membrana, dano a nível das proteínas dos tecidos e membranas, danificando tanto ao nível do DNA como a nível das enzimas. Estas espécies podem estar relacionadas [Dutra, R. C., et al. 2008], ou até implicadas [Konczak, I., et al. 2004] em algumas patologias, como a artrite, choque hemorrágico, desordens vasculares (aterosclerose, diabetes, hipertensão), cancro, SIDA (síndrome de imunodeficiência adquirida), desordens degenerativas do cérebro relacionadas com a idade, como a doença de Alzheimer, bem como no processo de envelhecimento [Behl, C., et al. 2002; Konczak, I., et al. 2004; Chong, Z. Z., et al. 2005; Ono, K., et al. 2006; Dutra, R. C., et al. 2008; Eftekharzadeh, B., et al. 2010 a, 2010 b; Dumont, M., et al. 2011;].

Tem sido observado em sistemas neuronais uma sensibilidade às oxidações [Behl, C., et al. 2002; Butterfield, D. A., et al. 2002]. Esta sensibilidade, é em grande parte devido ao elevado consumo de oxigénio por estes sistemas, presença de níveis de defesas antioxidantes relativamente baixas, há presença de um alto conteúdo em ácidos gordos poli-insaturados e há presença de iões de metais de transição [Butterfield, D. A., et al. 2002; Cardoso S. M., et al. 2004]. Algumas condições gerais podem ser estabelecidas para os sistemas neuronais apesar de a fonte específica das EROs e estruturas afectadas sejam diferentes entre as patologias [Behl, C., et al. 2002]:

1. Aumento dos níveis de metabolitos alterados devido à oxidação destes, encontrado em tecido *post-mortem* em diversas doenças neurodegenerativas.
2. Pode ser observado nas células nervosas afectadas a existência de reacções compensatórias de defesa e de resposta ao *stress* oxidativo.
3. Perturbação do metabolismo mitocondrial, o que pode contribuir para um aumento da libertação das EROs provenientes da cadeia respiratória.

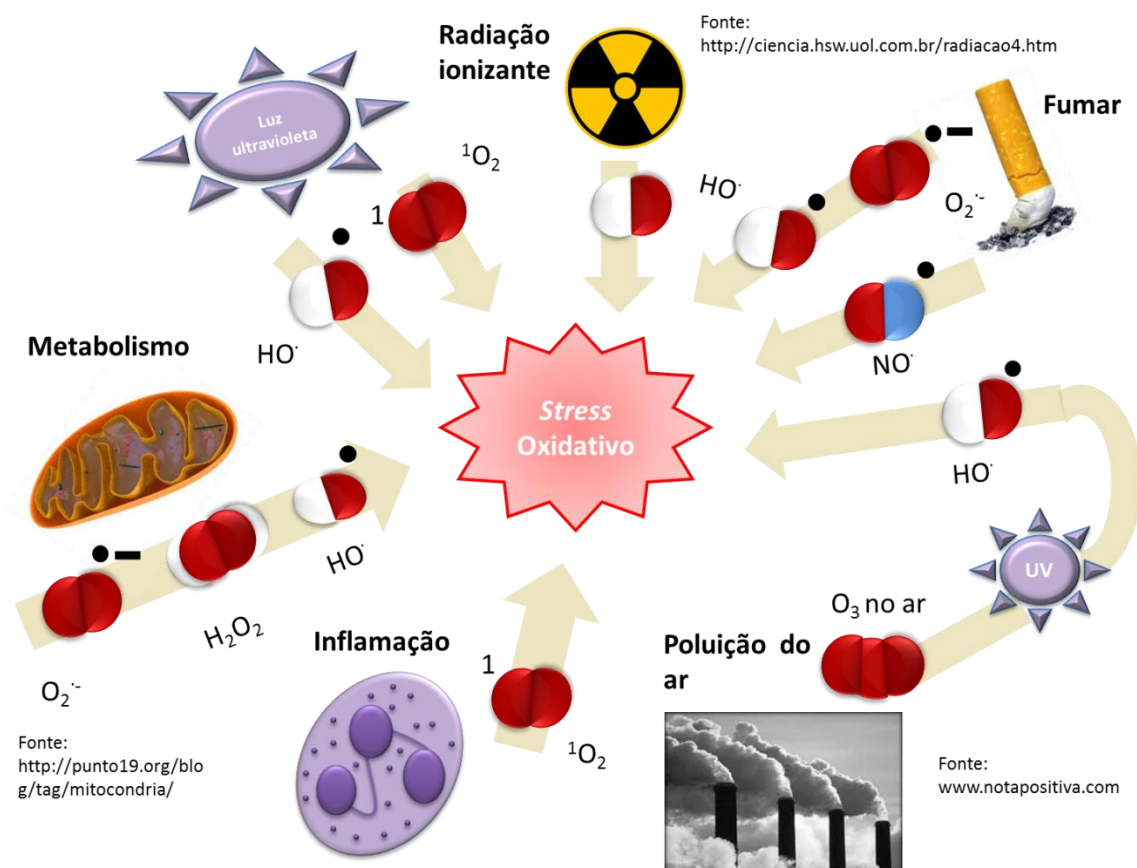


Figura 1.1 – Origens da formação e os diferentes radicais livres que podem levar ao *stress* oxidativo. [Behl C., et al. 2002; Dutra, R. C., et al. 2008]

De modo a contrariar os efeitos do *stress* oxidativo originado pelas EROs, o organismo possui diversos sistemas de defesa que vão permitir um equilíbrio entre a produção e a eliminação das EROs [Behl C., et al. 2002]. Esta eliminação pode induzida por diversas enzimas específicas, como o superóxido dismutase, glutathione peroxidase ou a catalase (Figura 1.2) [Cardoso, S. M., et al. 2004]. Para além dos antioxidantes e das enzimas produzidos endogenamente que actuam no metabolismo das EROs, estas espécies podem ser eliminadas por compostos adquiridos exogenamente, por exemplo: os derivados de antioxidantes, como os fenóis, carotenóides e vitaminas, encontrados em frutas e vegetais, que como demonstrado em vários estudos são uma excelente fonte de compostos fenólicos [Wolfe, K. L., et al. 2007].

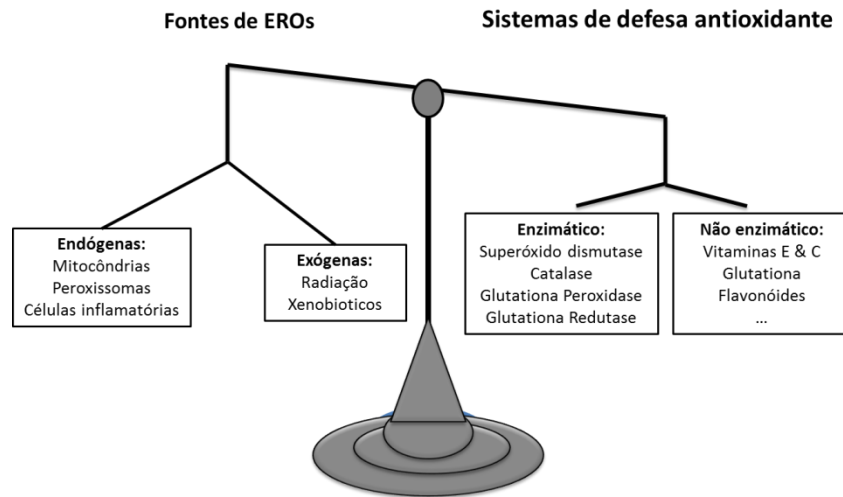


Figura 1.2 – Fontes das EROs, causadoras de *stress* oxidativo e os sistemas de defesa antioxidante. [Cheli, F., et al. 2011]

O estudo sobre o *stress* oxidativo, devido ao já mencionado anteriormente, tem vindo a ter uma grande relevância nas áreas alimentar e médica [Behl C., et al. 2002; Cheli, F., et al. 2011], existindo actualmente um grande interesse no estudo dos compostos antioxidantes [Dutra, R. C., et al. 2008]. Este interesse é derivado da procura, para a utilização de antioxidantes naturais como substitutos para os de síntese química, em parte, muito devido à existência de dados contraditórios sobre a segurança que os compostos sintéticos possuem, o que faz com que exista um aumento da preferência dos consumidores pelos aditivos alimentares naturais [González, J. et al. 2004; Soobrattee, M. A., et al. 2005; Kosar M. et al. 2011]. Contudo, a utilização dos compostos naturais não garante uma total ausência de efeitos toxicológicos e alergénicos, como tal, a sua avaliação experimental é necessária [González, J. et al. 2004; Kosar M. et al. 2011].

1.2. Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que são capazes de evitar ou retardar a oxidação dos lípidos, proteínas, DNA e proteger os compostos ou os tecidos de danos provocados por radicais livres, reduzindo assim o risco de surgirem diversas doenças causadas pelos efeitos negativos dos radicais livres [Adil, Í. H., et al. 2007]. Os antioxidantes podem ser divididos em dois grupos, antioxidantes preventivos ou antioxidantes de quebra de cadeia [Číž, M., et al. 2010]. O primeiro grupo compreende os quelantes de metais, como as proteínas metalotioneína, neuromelanina, transferina e outras envolvidas no transporte de metais de

transição, armazenamento e enzimas antioxidantes, como a catalase, superóxido dismutase, glutathione reductase, etc. [Číž, M., et al. 2010]. Os resgatadores de radicais livres pertencem ao segundo grupo [Číž, M., et al. 2010]. Estes resgatam os radicais livres, parando a propagação das reacções em cadeia de formação dos radicais livres [Číž, M., et al. 2010].

Estudos epidemiológicos têm consistentemente mostrado uma associação inversa entre o consumo de frutas e legumes e o risco de doenças cardiovasculares e algumas formas de cancro [Soobrattee, M. A., et al. 2005; Lorenzo, J. M., et al. 2013]. Embora os efeitos protectores sejam atribuídos principalmente a antioxidantes bem conhecidos, tais como a vitamina C, E e β -caroteno, compostos fenólicos provenientes de diferentes plantas também podem desempenhar um papel significativo na protecção [Soobrattee, M. A., et al. 2005; Lorenzo, J. M., et al. 2013]. Além disso, a restrição sobre a utilização de antioxidantes sintéticos, como o BHA (Butil-hidroxianisolo) e o BHT (Butil-hidroxitolueno) que podem apresentar riscos para a saúde dos consumidores, tendo sido identificados como possíveis cancerinogénicos, em alimentos, reforça ainda mais este interesse na utilização de compostos naturais [Soobrattee, M. A., et al. 2005; Lorenzo, J. M., et al. 2013].

1.2.1. Compostos fenólicos

Vários estudos mostram que os compostos fenólicos possuem actividade antioxidante como resultado da sua capacidade de resgate dos radicais livres [Lucas-Abellán, C., et al. 2011]. Também melhoram os sistemas antioxidantes endógenos, pela sua acção quelante de iões metálicos, evitando assim a formação dos radicais [Lucas-Abellán, C., et al. 2011]. Estes compostos também são conhecidos, não só pela capacidade de ceder hidrogénio ou electrões às espécies reactivas, reduzindo deste modo a reactividade das EROs, pelo emparelhamento dos seus electrões, mas também por serem radicais intermediários estáveis das reacções [Lucas-Abellán, C., et al. 2011].

Os polifenóis são um dos grandes grupos de antioxidantes identificados na dieta [Arts, I. C. W., et al. 2005; Saura-Calixto, F., et al. 2007] e são constituintes [Adil, Í. H., et al. 2007] das frutas, vegetais, cereais, legumes frescos, chocolates, chá, café e vinho [Arts, I. C. W., et al. 2005], produzidos muitas vezes como metabolitos secundários [Adil, Í. H., et al. 2007], são provenientes de plantas e derivam dum intermediário comum a fenilalanina [Arts, I. C. W., et al. 2005]. Podem apresentar várias actividades biológicas específicas, afectando a expressão genética, sinalização celular, adesão celular [Saura-Calixto, F., et al. 2007],

resultando em actividade anti-bacteriana, anti-inflamatória, anti-alérgica, anti-trombótica, capacidade de hepatoprotecção, anticancerígena, antiviral e vasodilatadora [Soobrattee, M. A., et al. 2005]. Os polifenóis podem ser divididos em vários grupos [Soobrattee, M. A., et al. 2005], nomeadamente em flavonóides, ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, estilbenos e lignanos (Figura 1.4) [Li, J., et al. 2007]. Os flavonóides são geralmente classificados em seis classes de acordo com as suas estruturas químicas, a nível dos diferentes anéis e os grupos funcionais em C-3 e C4 (Figuras 1.3 & Figura 1.4) [Li, J., et al. 2007].

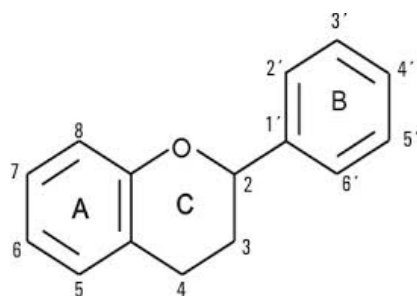


Figura 1.3 – Estrutura básica dos flavonóides. [Adaptado de D'Archivio, M., et al. 2007]

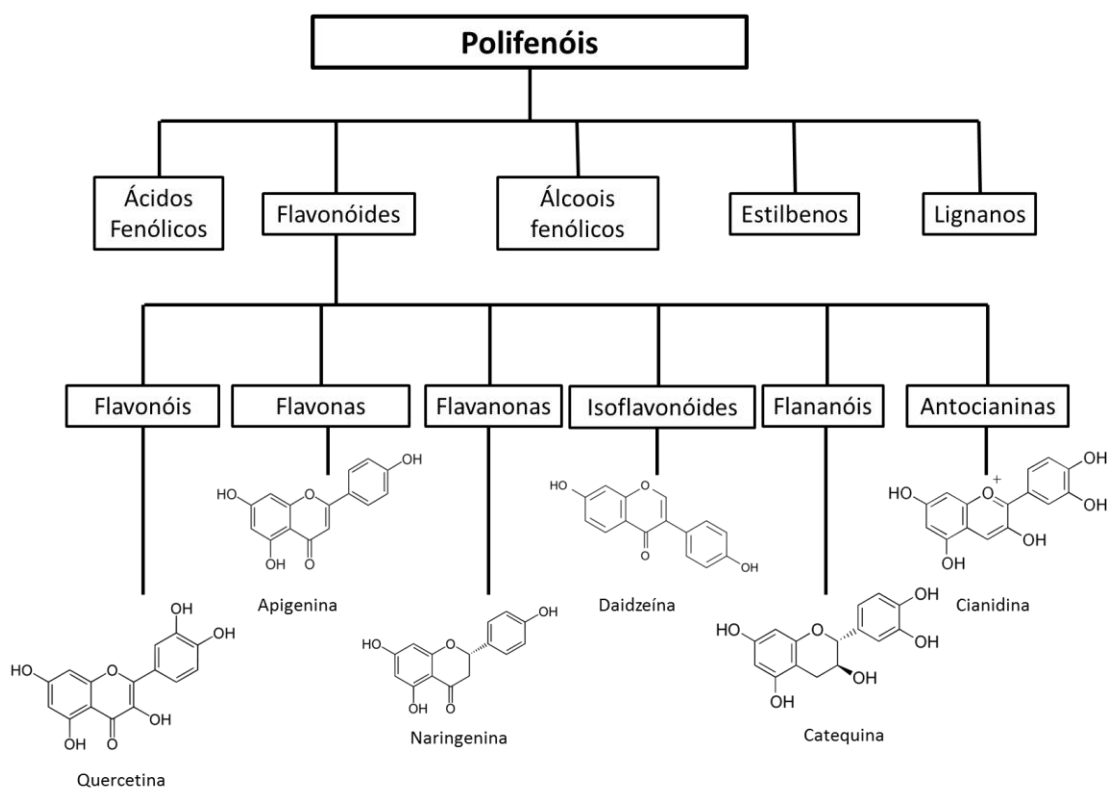


Figura 1.4 – Divisão dos polifenóis em diferentes grupos [Li, J., et al. 2007], estruturas químicas de exemplos de cada grupo [adaptadas de D'Archivio, M., et al. 2007]

1.3. Fontes naturais de compostos com propriedades antioxidantes

Actualmente é aceite que uma dieta rica em frutas e vegetais pode ajudar a prevenir doenças cardiovasculares e certos tipos de cancro, entre outras doenças. Com base neste conhecimento, a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e a World Health Organization (WHO) recomenda uma ingestão mínima diária de 400g de frutas e legumes [Bonany, J., et al. 2013].

1.3.1. Maçã

Um velho ditado anglo-saxónico diz que uma maçã por dia mantém o médico à distância [Jornal de Notícias [JN], 2011].

Em Portugal durante o ano de 2012 foram produzidas 220 mil toneladas de maçã, a par com a laranja e a pêra, a fruta com maior produção [Instituto Nacional de Estatística [INE], 2013]. Pela elevada produção é uma das frutas mais consumidas [Feliciano, R. P., et al. 2010; World Apple and Pear Association [WAPA], 2013], atingindo uma produção mundial em 2009 de 69 milhões de toneladas [WAPA, 2013] e tem sido referido que as maçãs possuem efeitos positivos para a saúde [Plaza, M., et al. 2013; WAPA, 2013], em parte por ser uma fonte rica em carboidratos, pectina, fibras e minerais e como tal, uma boa fonte de nutrientes [Plaza, M., et al. 2013]. Além disso, as maçãs foram identificadas como uma das principais fontes dietéticas de antioxidantes, principalmente de compostos fenólicos, tais como os flavonóides e ácidos fenólicos, possuindo assim uma elevada capacidade antioxidante [Plaza, M., et al. 2013].

Dentro das variedades de maçã produzidas em Portugal, existem algumas tipicamente portuguesas que são apenas cultivadas em determinadas regiões do país. A maçã da espécie ‘Bravo de Esmolfe’ é uma destas variedades [Gabinete de Planeamento e Políticas [GPP], 2007], é originária da freguesia de Esmolfe, Portugal e a sua produção está concentrada nas zonas da Cova da Beira, Viseu e Douro sul [[GPP], 2007]. Devido às suas características sensoriais foi muito cultivada pelos agricultores, sendo a variedade de maçã produzida em maior quantidade nesta região no meio do século XX [Rocha, A. M. C. N., et al. 2004]. A importância desta variedade de maçã foi reconhecida pela classificação Denominação de origem protegida (DOP) em 1994 [Rocha, A. M. C. N., et al. 2004; GPP, 2007]. Em 2005, foram comercializadas sob as regras da DOP 85 toneladas de maçã ‘Bravo

de Esmolfe' [GPP, 2007], existindo um aumento da procura no mercado interno por esta variedade [GPP, 2007].

Diversos compostos fenólicos foram identificados como sendo os principais compostos presentes na maçã, nomeadamente as catequinas, epicatequinas, quercetina-3-glucósido, quercetina-4-glucósido e procianidina B1, tendo sido identificados também na maçã da variedade 'Bravo de Esmolfe' [Serra, A. T., et al. 2010a; Feliciano, R. P., et al. 2010]. A epicatequina, ácido clorogénico e a catequina, foram os compostos identificados em maior concentração para esta variedade. [Feliciano, R. P., et al. 2010].

No estudo realizado por Serra, A. T., et al. 2010a foi verificado que os principais compostos que contribuem para a actividade antioxidante das maçãs são a epicatequina, catequina e procianidina B1.

A quercetina [3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona, CAS no. 117-39-5] (Figura 1.5) é um dos flavonóides dietéticos de ocorrência natural presentes na maçã em níveis elevado, como 350mg/L [Harwood, M., et al. 2007], ao qual está associado uma série de benefícios para a saúde, nomeadamente, propriedades anticancerígenas, anti-inflamatória, cardioprotecção [van der Woude, H., et al. 2006; Harwood, M., et al. 2007], efeito neuroprotector [Dok-Go, H., et al. 2003]. Estes efeitos devem-se essencialmente à capacidade antioxidante deste composto, tendo vários estudos indicado que os diversos efeitos benéficos são devidos em grande parte à função da estrutura química que o composto apresenta, particularmente devido à presença e localização dos grupos hidróxilo (HO) e do anel B do tipo catecol (Figura 1.5). Outras fontes naturais de quercetina para além das maçãs [Harwood, M., et al. 2007; Serra, A. T., et al. 2010a] foram identificadas e incluem, arandos, mirtilos, cebolas, chá preto, legumes, nozes, sementes, bem como o vinho tinto e vários sumos de fruta [Harwood, M., et al. 2007], estando presente principalmente como um glucósido [van der Woude, H., et al. 2006].

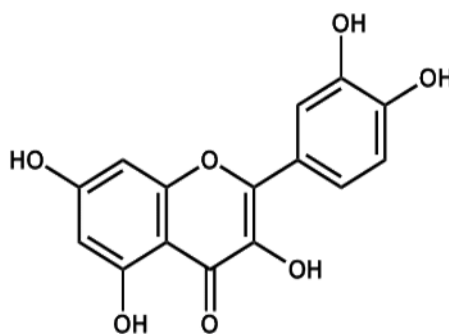


Figura 1.5 – Estrutura molecular da quercetina. [Lee, H.-J., et al. 2008]

Devido às diferentes propriedades que a quercetina apresenta, já anteriormente referidas, esta tem sido um composto com bastante interesse, embora algumas evidências científicas, alegam que a sua actividade na saúde é limitada [van der Woude, H., et al. 2006]. Estas alegações baseiam-se essencialmente na sua actividade antioxidante em modelos *in vitro*, possuindo um efeito inibitório na proliferação de algumas células cancerígenas *in vitro* e/ou na capacidade de activação de enzimas envolvidas na divisão celular e biotransformação [van der Woude, H., et al. 2006], apresenta assim possíveis efeitos adversos para a saúde [van der Woude, H., et al. 2006; Harwood, M., et al. 2007], como a capacidade de estimulação *in vitro* da proliferação de células positivas para o receptor de estrogénio em concentrações testadas *in vitro* que são relevantes *in vivo* [van der Woude, H., et al. 2006]. Além disso, a quercetina apresenta genotoxicidade em vários modelos *in vitro* [van der Woude, H., et al. 2006].

In vivo, a quercetina é extensivamente metabolizada em metilados, sulfatados e conjugados de fase II glucuronidos, sendo que no plasma humano 35% da quercetina que circula, consiste em conjugados de sulfato, 46% de conjugados de glucuronido e 19% de conjugados de glucurono-metilados [van der Woude, H., et al. 2006].

Tem sido também estudado para a quercetina o efeito neuroprotector e de biodisponibilidade, tendo sido comprovado o efeito neuroprotector por Suematsu, N., et al. 2011 em que ao induzir *stress* oxidativo numa linha neuronal humana SH-SY5Y observou uma inibição eficaz da activação da cascata das caspases, a activação desta cascata conduz à fragmentação do DNA. Já Huebbe, P., et al. 2010 analisou o efeito de uma dieta rica em quercetina, obtendo um aumento da quercetina a nível do plasma (0,12µmol/L vs. 2,31µmol/L) e do córtex cerebral (0,23nmol/L vs. 0,28nmol/L), mostrando assim que o composto consegue passar a barreira hematoencefálica.

1.3.2. Azeitona

A azeitona é indirectamente através do azeite, um componente chave da dieta mediterrânica e tem sido atribuído a esta dieta benefícios para a saúde, como a actividade anticancerígena, anti-inflamatória, prevenção de doenças cardiovasculares, protecção de doenças degenerativas e capacidade antioxidante [Charoenprasert, S., et al. 2012], tendo sido reconhecida como Património Cultural Imaterial da Humanidade pela Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (UNESCO) a 4 de Dezembro de 2013

[Jornal SOL [SOL], 2013]. As capacidades apresentadas pela dieta mediterrânica têm sido atribuídas a uma alta proporção de ácidos gordos monoinsaturados a saturados consumidos em grandes quantidades [Charoenprasert, S., et al. 2012], presentes essencialmente no azeite e no peixe, alimentos característicos desta dieta. No entanto, vários estudos indicam que é difícil isolar um componente alimentar, como sendo o principal responsável para o benefício apresentado por esta dieta [Charoenprasert, S., et al. 2012].

Foram produzidas em Portugal 415 mil toneladas de azeitonas durante o ano de 2012, sendo que a produção é principalmente dirigida para a produção de azeite [INE, 2013]. A azeitona é um fruto de uma pequena árvore da família Oleaceae (*Olea europaea*) é classificada como uma drupa, fruto pequeno com apenas uma semente, com a característica de possuir um menor teor de açúcar e maior concentração de fracção lipídica diferenciando-se de outras drupas, como a cereja [Charoenprasert, S., et al. 2012].

A fracção lipídica presente na azeitona varia com a variedade e o grau de maturação, indo de 3% a 38% de peso fresco [Charoenprasert, S., et al. 2012]. É um fruto amargo, devido essencialmente à presença de um elevado teor de compostos fenólicos, em particular, há presença de oleuropeína *O*-difenol e seus derivados, que incluem o hidroxitirosol e o tirosol [Charoenprasert, S., et al. 2012]. Estes compostos fenólicos existem tanto na azeitona como nas folhas e constituem um sistema de defesa contra agentes patogénico e herbívoros [Charoenprasert, S., et al. 2012]. Em geral, os compostos fenólicos da azeitona estão localizados na película e em torno da estrutura da semente [Charoenprasert, S., et al. 2012]. Durante a maturação dos frutos, ou quando o tecido da azeitona é ferido por dano mecânico, ou por algum patogénico a enzima β -glicosidase hidroliza a oleuropeína de modo a produzir a aglicona, esta vai ser um precursor para a produção de hidroxitirosol e de tirosol (Figura 1.6) [Charoenprasert, S., et al. 2012]. Os compostos fenólicos de azeitona compreendem 1 a 3% do peso da polpa fresca e variam desde monofenólicos até fenólicos mais complexos com múltiplos anéis aromáticos, os fenólicos mais complexos são muitas vezes modificados com açúcares [Charoenprasert, S., et al. 2012]. Os grupos de polifenóis presentes incluem os ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, flavonóides e os secoiridoides [Charoenprasert, S., et al. 2012]. Até à data existem pelo menos 36 estruturas distintas de compostos fenólicos identificados na azeitona. [Charoenprasert, S., et al. 2012].

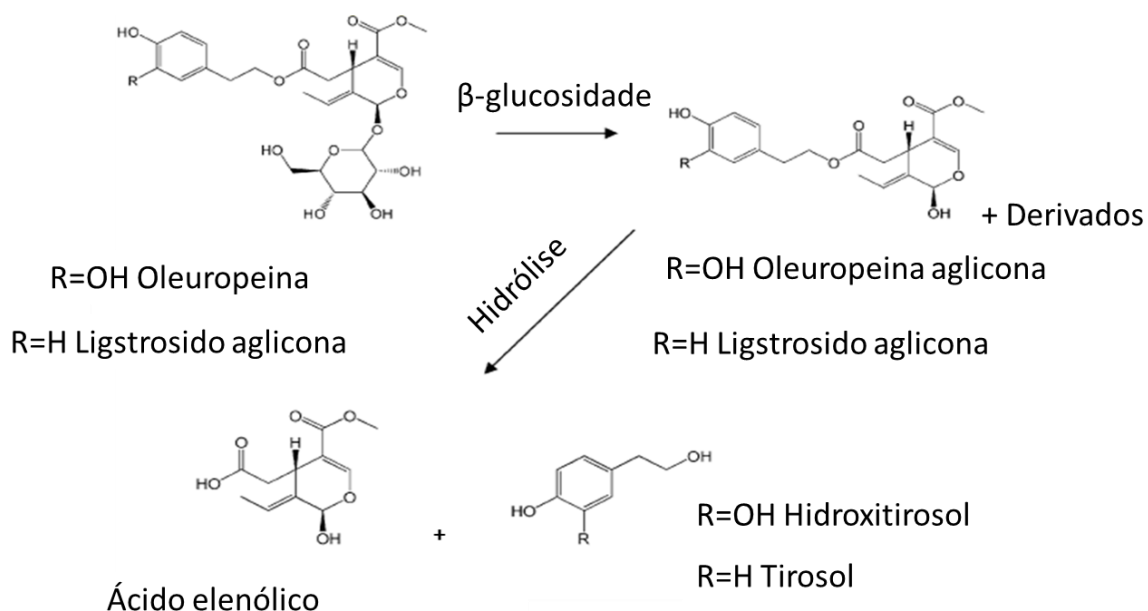


Figure 1.6 – Hidrólise da oleuropeína e do ligstrósido em hidroxitirosol e tirosol. [Adaptado de: Charoenprasert, S., et al. 2012; Fernández-Mar, M. I., et al. 2012]

A diversidade dos compostos fenólicos encontrados na azeitona é essencialmente impulsionada por factores genéticos, existindo grandes diferenças entre as diferentes variedades de azeitona [Charoenprasert, S., et al. 2012]. No entanto, em todas as variedades a oleuropeína e o hidroxitirosol são os principais compostos fenólicos presentes, variando consideravelmente a sua concentração entre as variedades, com graus de maturação semelhantes [Charoenprasert, S., et al. 2012]. Os valores de oleuropeína variam de 0,388 a 21,681g/kg de peso seco enquanto para o hidroxitirosol varia de 1,477 a 15,763 g/kg de peso seco [Charoenprasert, S., et al. 2012].

A oleuropeína é muito abundante na fase inicial da maturação do fruto [Charoenprasert, S., et al. 2012]. Nesta fase a oleuropeína pode atingir 14% de massa seca [Charoenprasert, S., et al. 2012]. Em geral, os níveis de oleuropeína diminuem na polpa da azeitona ao longo da maturação do fruto [Charoenprasert, S., et al. 2012]. Ao contrário, os flavonóides glucósidos, nomeadamente a luteolina-7-glucósido, cianidina-3-glucósido, cianidia-3-rutinosida e quercetina-3-rutinosida, existem em maior concentração na polpa do fruto maduro [Charoenprasert, S., et al. 2012]. Também com a maturação, os níveis de demetiloleuropeína, hidroxitirosol-4- β -D-glucósido, demetilglostrosido, e oleosido-11-metiléster aumentam [Charoenprasert, S., et al. 2012]. O hidroxitirosol como um produto da

degradação da oleuropeína, tem sido indicado para o tratamento de doenças neurodegenerativas [Fernández-Mar, M. I., et al. 2012].

Vários estudos em humanos e animais têm demonstrado que os fenóis provenientes do azeite, como o hidroxitirosol e seus derivados são biodisponíveis, sendo que este efeito é dependente da dose consumida [Fernández-Mar, M. I., et al. 2012]. O hidroxitirosol é um álcool fenil-etilo, 2-(3,4-di-hidroxifenol)-etanol (3,4-DHPEA) (Figura 1.7) [Fernández-Mar, M. I., et al. 2012]. Num estudo de ileostomia humana demonstrou-se que até 66% dos fenóis ingeridos do azeite foram absorvidos no intestino delgado, sendo que a absorção do hidroxitirosol é rápida, chegando a uma concentração máxima no plasma após 5 a 10 minutos da sua ingestão, ocorrendo em seguida um rápido declínio [Fernández-Mar, M. I., et al. 2012]. Já num estudo sobre a distribuição nos tecidos após a administração intravenosa de hidroxitirosol radioactivo em ratos demonstrou-se uma rápida e extensa absorção desta molécula por vários órgãos e tecidos investigados, tais como o músculo-esquelético, fígado, pulmão ou de coração, sendo preferencialmente absorvido pelos rins [*in* Fernández-Mar, M. I., et al. 2012]. Num outro estudo identificou-se a presença de hidroxitirosol livre no sangue e cérebro de ratos após a sua ingestão, mostrando que o hidroxitirosol consegue atravessar a barreira hematoencefálica, reforçando a sua utilização para o tratamento de doenças neurodegenerativas [Wu, Y. T., et al 2009; *in* Fernández-Mar, M. I., et al. 2012].

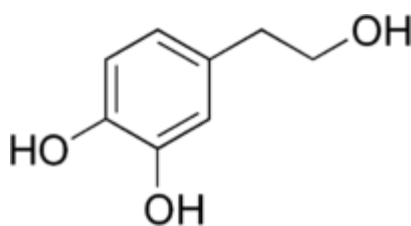


Figura 1.7 – Estrutura molecular do hidroxitirosol. [fonte: Pubchem]

A actividade antioxidante do composto fenólico hidroxitirosol foi estudado exaustivamente, recorrendo a diferentes técnicas em sistemas de modelos abióticos onde as EROs e outros radicais são gerados por uma variedade de agentes [Fernández-Mar, M. I., et al. 2012]. Quando comparado com outros fenólicos, incluindo o tirosol, composto também

obtido a partir da degradação da oleuropeína, o hidroxitirosol apresentou uma actividade antioxidante superior [Fernández-Mar, M. I., et al. 2012]. Foi ainda demonstrado que o hidroxitirosol possui actividade *in vitro* de resgate de radicais peróxido, radicais hidróxido, espécies de azoto reactivo, aniões superóxidos, reacções em cadeia de quebra de peroxidação e prevenção da catálise de iões metálicos produzidos a partir das EROs [*in* Fernández-Mar, M. I., et al. 2012]. Algumas evidências têm vindo a mostrar que o hidroxitirosol pode oferecer uma protecção indirecta, essencialmente por conseguir aumentar os sistemas de defesa endógenos, em parte por conseguir induzir a produção de enzimas antioxidantes, estas vão posteriormente actuar como reguladores importantes na protecção das células contra o *stress* oxidativo e danos químicos [Fernández-Mar, M. I., et al. 2012].

1.4. Extracção de compostos com propriedades antioxidantes a partir de fontes naturais

O isolamento de compostos naturais é uma das mais importantes áreas de pesquisa em tecnologia ligada aos alimentos e uma vez que estes compostos activos em plantas encontram-se em baixas concentrações e são normalmente muito complexos, os investigadores estão focados no desenvolvimento de métodos de extracção mais eficazes e selectivos para a sua recuperação, a partir das matérias-primas [Junior, M. R. M., et al. 2010]. Desta forma, os métodos de extracção e purificação são essenciais, quando são utilizados na preparação de suplementos alimentares, nutracêuticos, ingredientes alimentares funcionais, aditivos alimentares, produtos farmacêuticos e cosméticos [Junior, M. R. M., et al. 2010].

As extracções convencionais com solventes são o procedimento mais utilizado para preparar extractos naturais de plantas, muito devido à facilidade com que podem ser realizadas, a sua eficiência e ampla aplicabilidade [Poejo, J., 2011, p.13]. Vários factores influenciam o rendimento e a actividade antioxidante destas extracções, como o tipo de solvente, tempo de extracção, temperatura e o rácio entre amostra/solvente [Adil, Í. H., et al. 2007; Poejo, J., 2011, p.13]. Solventes orgânicos, como o etanol, metanol, acetato de etilo e as suas misturas com água têm vindo a ser amplamente utilizados, sendo que o etanol e a água são os solventes por excelência, muito devido à sua baixa toxicidade e elevados rendimentos que se consegue obter [Franco, D., et al. 2008]. Estes últimos apresentam ainda a vantagem de a sua polaridade poder ser modificada consoante o rácio etanol/água utilizado [Franco, D., et al. 2008]. A principal desvantagem das extracções convencionais com solventes é o seu baixo

rendimento em antioxidantes com baixa polaridade ou lipossolúveis, como por exemplo, os carotenóides [Franco, D., et al. 2008]. A solubilidade dos polifenóis vai depender principalmente dos seus grupos hidróxilo, do tamanho molecular e do comprimento do hidrocarboneto [Franco, D., et al. 2008]. Vários métodos de extracção foram desenvolvidos com o objectivo de aumentar o rendimento de extracção dos compostos com baixa polaridade e lipossolúveis, como a tecnologia de absorção, extracção por microondas, extracções assistidas por ultra-sons e técnicas baseadas no uso de fluidos pressurizados, como as extracções com fluidos supercríticos e extracção com líquidos pressurizados [Poejo, J., 2011, p.13].

Tem existido um grande interesse na extracção de compostos antioxidantes naturais com a técnica de fluidos supercríticos ou de líquidos pressurizados [Berna, A., et al. 2001; Adil, Í. H., et al. 2007; Mustafa, A., et al. 2011]. Estas têm sido uma alternativa com uma grande potencialidade para a indústria alimentar em detrimento de outras extracções, como as extracções convencionais com solventes [Berna, A., et al. 2001; Adil, Í. H., et al. 2007; Mustafa, A., et al. 2011]. Nesta técnica, o dióxido de carbono pode ser usado em combinação com água ou um álcool [Berna, A., et al. 2001; Adil, Í. H., et al. 2007; Mustafa, A., et al. 2011] e a combinação de altas pressões com a temperatura confere a esta técnica, rapidez de extracção e eficiência, recorrendo-se a pequenas quantidades de solventes [Berna, A., et al. 2001; Adil, Í. H., et al. 2007; Mustafa, A., et al. 2011]. O CO₂ ainda apresenta a vantagem de possuir uma baixa temperatura crítica ($T_c = 31.1\text{ }^{\circ}\text{C}$), é seguro e não tóxico [Berna, A., et al. 2001; Adil, Í. H., et al. 2007; Mustafa, A., et al. 2011]. A técnica de líquidos pressurizados já foi aplicada com sucesso a diferentes matrizes naturais, como por exemplo, em maçãs [Alonso-Salces, R. M., et al. 2001; Adil, Í. H., et al. 2007; Plaza, M., et al. 2013], pêras [Adil, Í. H., et al. 2007], cerejas [Serra, A. T., et al. 2011b], *Opuntia ficus-indica* [Serra, A. T., et al. 2013], Sabugueiro [Vatai, T., et al. 2009], própolis [Erdogan, S., et al. 2011].

1.5. Métodos de avaliação da capacidade antioxidante

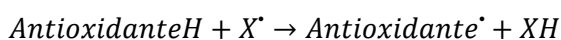
A avaliação da capacidade antioxidante de um determinado alimento é uma estratégia promissora no que respeita à avaliação do seu potencial efeito benéfico para a saúde [de Carvalho et al. 2009]. A acção dos compostos antioxidantes sobre a diminuição do *stress* oxidativo, pode ser realizada através, de um conjunto de diferentes mecanismos, que se fundamentam no resgate das EROs, na capacidade quelante de iões metálicos e na modulação

da resposta celular [de Carvalho et al. 2009]. É ainda de salientar, que a capacidade antioxidante de um alimento, depende não só do somatório das actividades dos compostos antioxidantes presentes, mas também das possíveis sinergias existentes entre eles [de Carvalho et al. 2009]. Assim, na mesma matriz podem existir diferentes mecanismos de actuação sobre os radicais livres, pelo que é fundamental a combinação de mais do que um método de avaliação da capacidade antioxidante total de um produto [de Carvalho et al. 2009]. Por exemplo, os carotenóides não são particularmente bons supressores dos radicais peróxilo, relativamente aos compostos fenólicos, mas são bons resgatadores dos radicais simples de oxigénio [Karadag, A., et al. 2009].

Os principais métodos de avaliação da capacidade antioxidante são normalmente divididos em dois grupos: (1) Reacções de transferência do átomo de hidrogénio (TAH) e (2) métodos de reacções baseadas em transferência de um electrão (RTE) [Karadag, A., et al. 2009; Zulueta, A., et al. 2009; Lucas-Abellán, C., et al. 2011]. A energia de dissociação e o potencial de ionização são as duas características chave para a eficiência apresentada pelos antioxidantes. A TAH e a RTE quase sempre ocorrem em simultâneo tornando difícil a sua diferenciação [Karadag, A., et al. 2009; Zulueta, A., et al. 2009; Lucas-Abellán, C., et al. 2011].

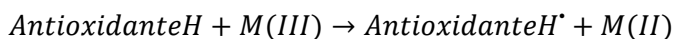
Os métodos baseados em TAH medem a habilidade de um composto antioxidante em resgatar radicais livres pela doação de um átomo de hidrogénio, com o objectivo de formar compostos estáveis (Reacção 1), sendo mais relevantes para avaliar a capacidade antioxidante pela quebra da reacção de formação do radical [Karadag, A., et al. 2009]. Os métodos baseados em TAH são normalmente constituídos por um indutor de radicais livres, por exemplo, o indutor 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorido (AAPH), e um marcador molecular oxidável, como por exemplo a diclorofluoresceína (DCFH) ou a fluoresceína (FD) [Karadag, A., et al. 2009]. Os métodos baseados em TAH usam marcadores fluorescentes, com o objectivo de serem um mecanismo de similaridade com a peroxidação lipídica, mas com determinadas condições de ensaio, a concentração do marcador (substrato) é muito menor que a concentração do composto antioxidante, estando em conflito com as situações reais [Karadag, A., et al. 2009]. Nos sistemas alimentares, a concentração de antioxidante é muito menor que a concentração do substrato [Karadag, A., et al. 2009]. Tem sido questionável, se a capacidade antioxidante avaliada usando os métodos baseados em

TAH com um marcador podem ou não representar um sistema alimentar real [Karadag, A., et al. 2009].



Reacção 1

Os métodos baseados em RTE detectam a capacidade de um potencial antioxidante em transferir um electrão de modo a reduzir um composto, incluindo metais, carbonilos e radicais (Reacção 2) [Karadag, A., et al. 2009]. Os métodos baseados em RTE são baseados na desprotonação e no potencial ionizante da reactividade do grupo funcional, devido a esta característica as RTE são dependentes de pH [Karadag, A., et al. 2009]. Resumidamente, os valores para o potencial ionizante diminuem com o aumento do pH, que aumenta a capacidade de doação de electrões com a desprotonação [Karadag, A., et al. 2009]. Os valores de pH têm um efeito importante na redução da capacidade dos antioxidantes de doarem electrões [Karadag, A., et al. 2009]. Em condições ácidas, a capacidade de redução pode ser restringida devido à protonação de compostos antioxidantes, enquanto em condições básicas a dissociação do protão dos compostos fenólicos aumenta a capacidade de redução da amostra [Karadag, A., et al. 2009]. As RTEs podem ser lentas e necessitar de um longo tempo de reacção [Karadag, A., et al. 2009]. Em comparação às reacções TAH, o mecanismo das RTE é dependente do solvente, devido à estabilização das espécies carregadas pelo solvente [Karadag, A., et al. 2009]. Envolvem ainda dois componentes na mistura de reacção, antioxidantes e oxidante (marcador) [Karadag, A., et al. 2009]. O próprio marcador é um oxidante que retira um electrão do composto antioxidante, resultando numa mudança de cor do marcador [Karadag, A., et al. 2009].



Reacção 2

Foi realizado um estudo, com o objectivo de identificar qual o mecanismo mais fisiologicamente relevante, por reacções de TAH ou por RTE, este demonstrou que na maioria dos casos o mecanismo TAH prevalece sobre o mecanismo RTE [Karadag, A., et al. 2009]. Está demonstrado que o mecanismo TAH coincide com o mecanismo RTE e apresenta uma maior prevalência nas reacções de oxidação e redução biológicas [Karadag, A., et al. 2009]. Na tabela 1.I estão sumarizados vários métodos de avaliação da actividade antioxidante por critério chave.

Tabela 1.I – Comparação de diferentes métodos de avaliação da actividade antioxidante por critério chave. [MacDonald-Wicks, L., et al. 2006]

	Princípio	
	Transferência do átomo de hidrogénio (TAH)	Reacções de transferência de um electrão (RTE)
Exemplos		Fenóis totais
	ORAC	TEAC
	TRAP	FRAP*
	Crocin	DMPD**
	Oxidação da LDL	Redução de Cu(II)
		DPPH
Biologicamente relevante?	Sim	Não
Fácil avaliação?	Não (Excepto ORAC)	Sim
Instrumentos facilmente acessíveis?	Sim (Excepto TRAP e ORAC)	Sim
Reproduzível?	Indeterminado	Indeterminado
Viável para antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos?	Não (Excepto ORAC)	Não (excepto TEAC)

*FRAP - Poder antioxidante de redução do ferro; ** DMPD – Ensaio de *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine

O método que se destaca na avaliação da capacidade antioxidante (Tabela 1.I) quando o princípio é a TAH é o método da capacidade de absorção do radical oxigénio (ORAC), enquanto quando o princípio da reacção é o das RTE é o método da actividade antioxidante equivalente trolox (TEAC) [MacDonald-Wicks, L., et al. 2006]. Uma grande vantagem apresentada para a utilização destes dois métodos em detrimento dos restantes é a capacidade de poderem ter como amostra antioxidantes tanto hidrofílicos como lipofílicos (Tabela 1.I) [MacDonald-Wicks, L., et al. 2006].

O ensaio da capacidade de absorção do radical oxigénio (ORAC) avalia a capacidade de inibição pelo antioxidante do radical induzido peróxilo, reflecte a abordagem clássica do antioxidante com capacidade de quebra da cadeia da formação dos radicais livres, pela transferência do átomo de hidrogénio [Karadag, A., et al. 2009]. O ensaio ORAC consiste, na produção de radicais peróxilo pela decomposição térmica do AAPH em tampão aquoso [Karadag, A., et al. 2009]. Os radicais hidróxilo vão reagir com um marcador fluorescente, um substrato proteico oxidável que origina um produto não fluorescente, observando-se um decaimento da fluorescência ao longo do tempo (Figura 1.8) que pode ser facilmente

quantificada por fluorescência num espectro com excitação de 485 nm e emissão de 525 nm [Karadag, A., et al. 2009].

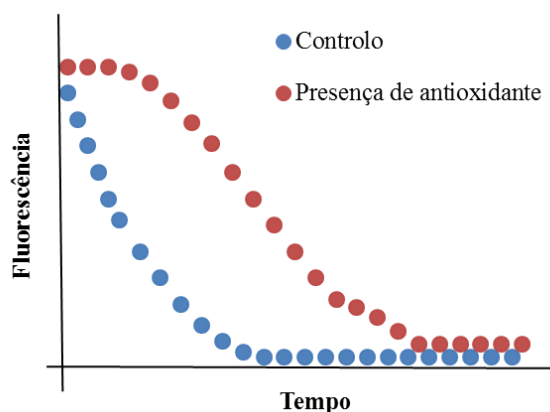


Figura 1.8 – Comparação da intensidade de fluorescência na presença e na ausência (controlo) de um antioxidante. Condição observada nos métodos ORAC, HORAC e HOSC.

O ensaio de actividade antioxidante trolox equivalente (TEAC) é baseado na utilização do composto *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)* (ABTS), este é um substrato da peroxidase que quando oxidado por radicais peróxido ou outros oxidantes na presença de H_2O_2 origina um radical catião metaestável, o $ABTS^{++}$ [Karadag, A., et al. 2009]. Este catião apresenta cor e a sua formação pode ser monitorizada espectrofotometricamente recorrendo a um comprimento de onda entre 600 e 750nm [Karadag, A., et al. 2009]. A capacidade antioxidante é avaliada, como a capacidade dos antioxidantes em diminuir a cor ao reagirem directamente com o catião $ABTS^{++}$ [Karadag, A., et al. 2009]. Na tabela 1.II estão sumarizadas as principais vantagens e desvantagens dos métodos ORAC e ABTS (TEAC).

Com recurso à metodologia utilizada no método ORAC foram desenvolvidos e validados dois outros métodos, com o objectivo de avaliar outras propriedades igualmente importantes dos compostos antioxidantes, através da indução de diferentes radicais livres produzidos por condições diferentes [Karadag, A., et al. 2009].

Tabela 1.II – Vantagens e desvantagens dos métodos ORAC e TEAC. [Zulueta, A., et al. 2009]

Método	Vantagens	Desvantagens
ORAC	• Usa radicais biologicamente relevantes; • Padronizado: Permite a comparação de resultados entre laboratórios; • Compreende tanto o grau como o tempo da reacção do antioxidante.	• Normalmente requer equipamentos dispendiosos; • Sensível ao pH; • Requer um longo tempo de ensaio; • Variabilidade de resultados dependente dos equipamentos.
ABTS (TEAC)	• Pouco dispendioso e fácil de utilizar; • Estável ao pH, pode ser utilizado para estudar o efeito no pH na actividade; • Reacção num curto espaço de tempo.	• Necessária uma etapa de modo a produzir os radicais livres a partir do sal ABTS; • Não padronizado, dificuldade em comparar resultados entre laboratórios.

O método de determinação da capacidade antioxidante através da inibição de radicais hidróxilo (HORAC) é um dos métodos desenvolvidos a partir da metodologia do método ORAC [Karadag, A., et al. 2009]. Ao contrário do ORAC, o HORAC permite a avaliação da capacidade antioxidante em inibir a formação de radicais HO[•] que são induzidos por uma reacção de Fenton mediada por um complexo de Cobalto II (Co(II)), ou seja, capacidade inibitória de radicais quelantes de metais [Karadag, A., et al. 2009]. Outro método desenvolvido a partir do método ORAC é o método de determinação da capacidade antioxidante pelo resgate de radicais hidróxilo (HOSC) [Karadag, A., et al. 2009]. O método HOSC a par do método HORAC utiliza também o radical hidróxilo, como espécie reactiva [Karadag, A., et al. 2009]. Os radicais hidróxilo do método HOSC são induzidos a pH fisiológico por uma reacção de Fenton [Karadag, A., et al. 2009]. A actividade antioxidante tanto do HORAC como do HOSC, é avaliada por um decaimento da fluorescência ao longo do tempo, como já acontecia para o método ORAC (Figura 1.8) [Karadag, A., et al. 2009]. Na tabela 1.III são sumarizados os três métodos com as diferenças de cada um.

Tabela 1.III – Diferenças entre os métodos baseados na metodologia do método ORAC e comparação com o método ORAC. [Karadag, A., et al. 2009]

Características	Métodos		
	ORAC	HORAC	HOSC
Radical	Peróxido (ROO [•])	Hidróxido (HO)	Hidróxido (HO)
Objectivo	Absorção dos radicais	Inibição dos radicais	Resgate dos radicais
Indução dos radicais	Decomposição térmica do AAPH em tampão aquoso	Reacção de Fenton mediada por um complexo de Co(II)	A pH fisiológico por uma reacção de Fenton

1.5.1. Modelos celulares

A biodisponibilidade e o metabolismo são duas importantes características para a avaliação da actividade antioxidante dos alimentos e suplementos dietéticos [Cheli, F., et al. 2011]. A biodisponibilidade e a absorção dos antioxidantes são influenciadas por vários factores, como a diversidade estrutural dos compostos com capacidade antioxidante, a origem dos antioxidantes e a coexistência de diferentes nutrientes e grupos de antioxidantes presentes na dieta e as suas proporções [Cheli, F., et al. 2011]. Os antioxidantes são absorvidos a partir do tracto gastrointestinal, aumentando os níveis em circulação e a sua disponibilidade para as células [Cheli, F., et al. 2011]. Além disso, a fermentação intestinal e a absorção podem ser acompanhadas pela degradação dos antioxidantes, dando origem a novas moléculas com actividade antioxidante [Cheli, F., et al. 2011]. Este processo pode explicar como no caso de certos compostos antioxidantes que são encontrados no sangue e nos tecidos-alvo, sejam diferentes daqueles encontrados nas matrizes naturais [Cheli, F., et al. 2011].

Um bom modelo *in vitro* para a análise dos alimentos que permita ensaios com um elevada eficácia e resultados reprodutíveis, tem de satisfazer dois requisitos básicos: disponibilidade e simplicidade em manusear [Cheli, F., et al. 2011]. Vários aspectos importantes devem ser avaliados, como a precisão para um uso mais amplo dos modelos e para a avaliação da actividade antioxidante: escolha do modelo celular, avaliação de biomarcadores específicos como um parâmetro a medir e o ambiente celular [Cheli, F., et al. 2011]. Todos estes aspectos são fundamentais para garantir a padronização dos modelos,

uniformidade e sensibilidade dos ensaios para a avaliação da actividade antioxidante em sistemas biológicos [Cheli, F., et al. 2011]. O desenvolvimento de bioensaios com células para a avaliação da capacidade antioxidante de alimentos pode incluir ensaios de rastreio de elevada eficácia e outros bioensaios personalizados, sendo assim específicos para a avaliação das diferentes propriedades dos alimentos [Cheli, F., et al. 2011]. Os métodos *in vitro* com recurso a cultura de células podem ser utilizados através de duas abordagens, uma abordagem em que são avaliados os efeitos do composto de interesse sobre a viabilidade e a proliferação celular e a segunda abordagem, mais complexa, é a avaliação e a identificação do metabolismo do composto de interesse [Cheli, F., et al. 2011]. Na tabela 1.IV são apresentadas algumas linhas celulares que têm vindo a ser usadas para a avaliação da capacidade antioxidante de alimentos e na tabela 1.V são apresentados alguns exemplos de ensaios usados com recurso a cultura de células para análise de alimentos. De um modo geral, um bioensaio tem de ser robusto através de um equilíbrio entre: elevada eficácia, facilidade de interpretação dos resultados, simplicidade de realização, tempo adequado e custos associados [Cheli, F., et al. 2011].

Tabela 1.IV – Linhas celulares que têm vindo a ser usadas para a avaliação da capacidade antioxidante de alimentos. [Cheli, F., et al. 2011]

Linhas celulares	Origem	Tipo/Morfologia	Espécie
HepG-2	Carcinoma do fígado	Tipo epitelial	Humano
AGS	Adenocarcinoma gástrico	Epitelial	Humano
Caco-2	Adenocarcinoma do cólon	Epitelial	Humano
L-929	Tecido conectivo subcutâneo	Tipo fibroblasto	Murino
Int 407	Embrionário, intestino	Epitelial	Humano
RAW264.7	Ascite	Monocitos/macrófagos	Murino
MKN-45	Adenocarcinoma gástrico	Epitelial	Humano
MCF-7	Cancro da mama	-	Humano
HT29	Adenocarcinoma de cólon-rectal	Epitelial	Humano
RBC e células PMN	Sangue	-	Humano

Tabela 1.V – Exemplos de ensaios usados com recurso a cultura de células para análise de alimentos. [Cheli, F., et al. 2011]

Abordagem	Efeito	Ensaio
Viabilidade celular	Viabilidade mitocondrial	Redução do reagente MTT
	Libertação de enzimas citoplasmáticas	Libertação de LDH
Funcionalidade das células	Estado oxidação-redução	Produção de EROs
		Níveis de glutatona
		Sistema de enzimas antioxidantes (SOD, CAD, GPx, GR)
	Oxidação intracelular	Incorporação e oxidação de marcadores fluorescentes ou fluorogénicos
	Dano oxidativo	Malondialdeído

No entanto, ainda persistem desafios no desenvolvimento destes modelos *in vitro* com recurso a cultura de células [Meli, L., et al. 2012]. Um passo para o desenvolvimento de modelos de cultura mais realistas é o de restringir as células a um ambiente *in vitro* mais semelhante aos sistemas *in vivo*, ou seja, tridimensional (3D) [Meli, L., et al. 2012]. Estes modelos tridimensionais facilitam o contacto célula-célula e pode ser útil na avaliação de como as células interagem, interpretam e respondem aos sinais do seu ambiente a uma microescala [Meli, L., et al. 2012]. Os novos ensaios baseados em modelos computacionais e ensaios *in vitro* com células, têm o potencial de eliminar a necessidade do recurso a modelos animais [Radio, N. M., et al. 2008].

A utilização de marcadores fluorescentes ou fluorogénicos (Tabela 1.V) têm sido relatados em vários ensaios com recurso a células, com o objectivo de avaliar e monitorizar espécies oxidantes, como as EROs [Cheli, F., et al. 2011]. Foi desenvolvido um ensaio, que utiliza a 2',7'-Diclorohidrofluoresceína (DCFH) como um marcador fluorescente [Gomes, A., et al. 2005; Wolfe K. L., et al. 2008; Cheli, F., et al. 2011]. A 2',7'-Diclorohidrofluoresceína DCFH é um composto que, uma vez no meio celular é facilmente oxidada por radicais peróxido, a um composto fluorescente, resultando em 2',7'-diclorofluoresceína (Figura 1.9 e 1.10) [Gomes, A., et al. 2005; Wolfe K. L., et al. 2008]. Na figura 1.9 está esquematizada o princípio do método com recurso à DCFH.

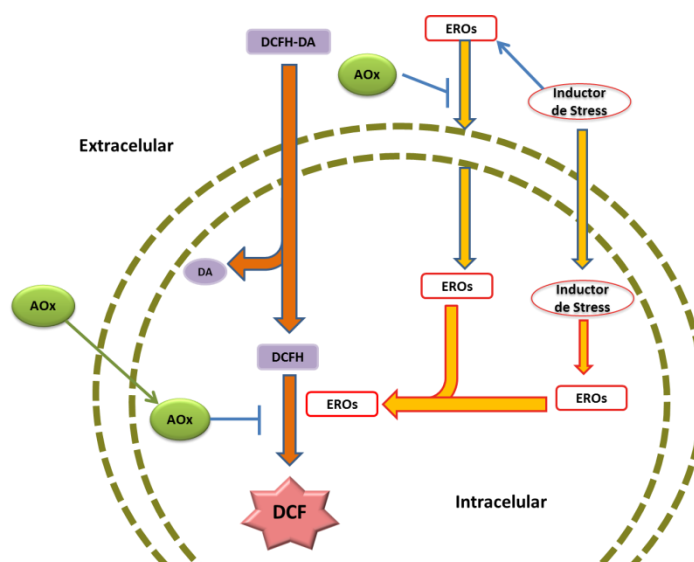


Figura 1.9 – Princípio do método de actividade antioxidante celular (CAA). A 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) entra na célula e é alvo das enzimas esterases, sendo clivado o diacetato presente na molécula. A molécula pela acção das EROs é oxidada, formando assim a 2',7'- Diclorodifluoresceína que possui fluorescência. A oxidação pode ser inibida pela acção dos compostos antioxidantes que vão reduzir o potencial oxidante das EROs. As EROs, têm como fonte, o indutor de *stress*, e o processo natural de respiração celular. [Adaptado de: Wolfe, K. L., et al. 2007]

Como o objectivo deste método é a avaliação e monitorização de espécies oxidantes intracelulares, como as EROs, foi desenvolvida a 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) que é só oxidada no interior da célula, após perda do grupo diacetato pela hidrolisação enzimática intracelular [Wolfe K. L., et al. 2008].

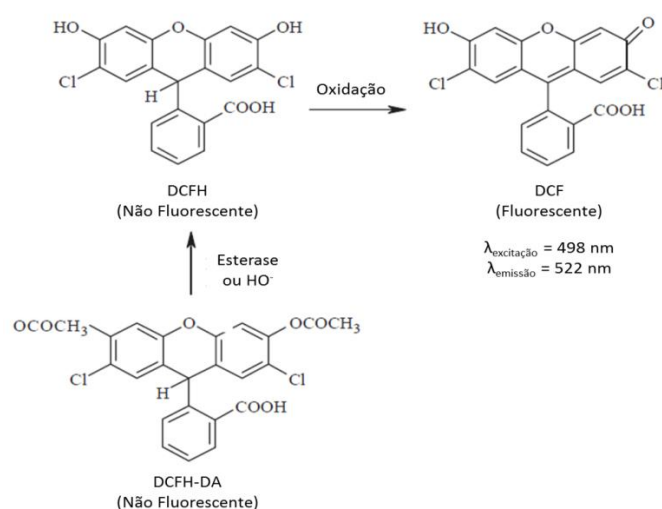


Figura 1.10 – Mecanismos da esterificação da 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) em 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína (DCFH) sem o diacetato e posterior oxidação desta última em 2',7'-diclorodifluoresceína (DCF) pelas EROs a nível da estrutura molecular, expressando nesta última forma fluorescência [Adaptado de: Gomes, A. et al. 2005].

1.5.1.1. Células Caco-2

A linha celular Caco-2 é uma linha contínua de células epiteliais de adenocarcinoma heterogéneo do cólon rectal humano, desenvolvida pelo instituto Sloan-Kettering para a pesquisa em cancro, através da investigação conduzida por Jorgen Fogh [Smetanová, L., et al. 2011]. Apesar da origem cancerígena, estas células são únicas na sua capacidade de iniciar a diferenciação espontaneamente quando atingem a confluência, em condições de cultura normais (na presença de glucose e soro) [Sambuy, Y., et al. 2005; Smetanová, L., et al. 2011]. Por conseguinte, ao longo de um período de 20 a 30 dias de cultura após a confluência, gradualmente, estas células começam a apresentar polaridade morfológica e níveis de hidrolases comparáveis com os níveis expressos por células maduras intestinais [Sambuy, Y., et al. 2005; Smetanová, L., et al. 2011]. O modelo celular Caco-2 tem sido utilizado com o objectivo de avaliar a biodisponibilidade e a conversão metabólica de compostos antioxidantes, tais como carotenóides e os flavonóides [Cheli, F., et al. 2011]. Este modelo tem sido ainda utilizado com o objectivo de avaliar capacidade antioxidante de diferentes compostos antioxidantes, recorrendo-se ao marcador fluorescente DCFH [Gomes, A., et al. 2005; Wolfe K. L., et al. 2008; Cheli, F., et al. 2011; Serra, A. T., et al. 2012].

1.5.1.2. Células NTERA-2

Hoje em dia, existe uma grande procura por sistemas de cultura de células neuronais, essencialmente na área da biomedicina [Paquet-Durand, F., et al. 2003; Terrasso, A. P., 2012, p.11]. Células estaminais pluripotentes imortais e células embrionárias de carcinoma, como a linha celular NTERA-2/Clone D1(NT2) podem fornecer um número ilimitado de células, obtidas em menos tempo e com recurso a protocolos de diferenciação mais simples [Terrasso, A. P., 2012, p.11], com diferentes finalidades, como o rastreio de compostos neuroactivos em grande escala, poderia ainda fornecer material experimental (células neuronais) para a investigação a nível celular das doenças do SNC e ainda eventualmente servir como uma possível fonte para transplante de células neuronais para o tratamento de dano cerebral, como em casos de acidentes vasculares cerebrais (AVC) [Paquet-Durand, F., et al. 2003; Kondziolka, D., et al. 2008; Serra, M., et al. 2009; Terrasso, A. P., 2012, p.13]. Assim, a linha celular NT2 representa uma alternativa promissora como uma linha celular pluripotente que se assemelha às células estaminais embrionárias humanas derivadas de células de blastocisto.

A linha celular TERA-2 é originária de uma metástase localizada no pulmão de um tetracarcinoma testicular [Fennell, M., et al. 1998; Fischer, H. S., et al. 2000] com capacidade de diferenciação [Fennell, M., et al. 1998; Terrasso, A. P., 2012, p.11]. Esta linha celular é fácil de expandir e de se manter no estado indiferenciado, mas pode ser induzida a diferenciar eficientemente, pela manipulação das condições de cultivo [Hill, E. J., et al. 2012]. É uma das linhas celulares estaminais mais bem documentada como apresentando a capacidade de se diferenciarem em células neuronais (NT2N) por tratamento com ácido retinóico (AR) [Hill, E. J., et al. 2012; Terrasso, A. P., 2012, p.11].

O AR é um derivado da vitamina A de formação natural, conhecido por ser sintetizado no cérebro e afectar a diferenciação do SNC [Fischer, H. S., et al. 2000; Paquet-Durand, F., et al. 2003; Terrasso, A. P., 2012, p.11]. Quando exposto ao AR a taxa de divisão das células diminui e num prazo de 7 a 14 dias aparecem marcadores antigénicos por um número de diferentes tipos de células, entre as quais os neurónios [Fennell, M., et al. 1998; Terrasso, A. P., 2012, p.11], sendo que os neurónios representam apenas uma porção de todos os fenótipos existentes após a diferenciação e tem sido descrito um procedimento para a purificação destes, envolvendo a aderência diferencial, o uso de inibidores de mitose e um substrato de crescimento adequado, para a sobrevivência a longo prazo dos neurónios [Fennell, M., et al. 1998; Terrasso, A. P., 2012, p.11]. Após a diferenciação com o AR, esta linha celular apresenta as características morfológicas e bioquímicas dos neurónios do SNC [Fischer, H. S., et al. 2000; de Arriba S. G., et al. 2006; Terrasso, A. P., 2012, p.12], muito devido à expressão dos marcadores neuronais e de citoesqueleto, tais como, os neurofilamentos, proteína tau, proteínas associadas a microtúbulos (MAP) do tipo 1 e tipo 2 e sinaptofisina [Fischer, H. S., et al. 2000; de Arriba S. G., et al. 2006]. Os neurónios derivados desta linha celular expressam também genes para os receptores de glutamato, NMDA e não-NMDA, como também para a proteína precursora da amiloide- β e para os receptores GABA_A [Fischer, H. S., et al. 2000; de Arriba S. G., et al. 2006; Terrasso, A. P., 2012, p.12]. Devido aos diferentes genes expressos por esta linha celular após a diferenciação tem sido considerada como um possível modelo para a investigação da excitotoxicidade e de doenças neurodegenerativas [Fischer, H. S., et al. 2000], sendo considerada como um modelo experimental para o estudo da regulação do precursor da proteína amiloide- β (PPA β) e da patogenicidade da doença de Alzheimer [Tamagno, E., et al. 2002; Eftekharzadeh, B., et al. 2010b]. Foi ainda desenvolvido um protocolo por Serra, M., et al. 2009 e optimizado por

Terrasso, A. P., 2012, p.13 que permite a expansão e diferenciação de células NTERA-2 em agregados 3D diferenciados em *spinners*, num menor tempo de cultura celular, tendo atingido uma redução de cerca de 30% do tempo de diferenciação, obtendo-se no final um processo de expansão e de diferenciação robusto para futuros ensaios, sendo promissor para a avaliação de compostos com capacidade neuroprotectora.

Os neurónios diferenciados a partir da linha celular NT2 foram utilizados com sucesso em estudos de transplantação em vários modelos de ratos e pacientes que sofreram dano cerebral por AVCs, fornecendo também material promissor para investigações em terapia celular no SNC [Kondziolka, D., et al. 2008; in Serra, M., et al. 2009; in Terrasso, A. P., 2012, p.13].

O dano celular induzido pelo *stress* oxidativo tem sido implicado no processo normal de envelhecimento, também como patologia de certas doenças neurodegenerativas, principalmente na doença de Alzheimer [Eftekharzadeh, B., et al. 2010a]. Recentemente, com o aumento do número de casos de doentes com Alzheimer, muito devido ao modo de vida e longevidade das populações, tem existido um interesse na pesquisa e no desenvolvimento de compostos com potencial neuroprotector, que possuam capacidade de resgate de radicais livres e protegerem assim as células de danos causados pelo *stress* oxidativo [Eftekharzadeh, B., et al. 2010a]. Das várias estratégias terapêuticas utilizadas para combater o *stress* oxidativo, uma das maneiras plausíveis é aumentar ou fortalecer a defesa endógena contra este *stress* através da ingestão dietética ou farmacológica de compostos antioxidantes [Eftekharzadeh, B., et al. 2010a]. Como tal, é necessário o desenvolvimento de um modelo celular neuronal que permita a avaliação da capacidade antioxidante dos compostos a testar, de modo a que os resultados obtidos sejam biologicamente relevante em condições *in vivo* [Eftekharzadeh, B., et al. 2010a]. Esta linha celular apresenta as características que permitem o desenvolvimento desse modelo pretendido, como a semelhança às células do SNC após o processo de diferenciação e, tem assim vindo a ser usada como um modelo para a avaliação da capacidade antioxidante de compostos [Eftekharzadeh, B., et al. 2010a]. Por exemplo, no estudo realizado por Eftekharzadeh, B., et al. 2010a concluíram que um pré-tratamento com o oligossacárido antioxidante alginato, este protege as células dos efeitos do *stress* oxidativo induzido a nível da viabilidade celular.

1.6. Objectivo

Este trabalho teve como principal objectivo, a avaliação da capacidade antioxidante de vários extractos naturais, nomeadamente onze extractos naturais de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ e um de bagaço de azeitona, utilizando modelos celulares robustos, com vista ao desenvolvimento de novos ingredientes funcionais. Outro objectivo associado a esta tese consistiu na identificação dos principais compostos responsáveis pela actividade biológica, através da correlação dos resultados obtidos nos ensaios da actividade antioxidante com a composição dos extractos.

Este trabalho foi realizado em duas partes como esquematizado na figura 1.11.

A primeira parte deste trabalho teve como objectivo a caracterização antioxidante de extractos naturais de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ obtidos por extracção convencional utilizando misturas hidroalcoólicas e por extracção com solventes pressurizados (etanol, CO₂ e água). Os extractos obtidos pelas diferentes tecnologias foram analisados e comparados em termos de rendimento, composição fenólica e actividade antioxidante utilizando diferentes ensaios químicos (HORAC, HOSC e ORAC) e um ensaio celular (células do epitélio intestinal – Caco-2) em monocamada para avaliação da capacidade de resgate das EROs intracelulares.

Na segunda parte deste trabalho, foi avaliada a capacidade de um extracto de maçã com uma elevada concentração em quercetina, seleccionado na Parte 1 e um extracto de bagaço de azeitona rico em hidroxitirosol utilizando um modelo celular do SNC, nomeadamente agregados de células NTERA-2 diferenciadas em neurónios. A capacidade de neuroprotecção foi avaliada através da análise das EROs e da prevenção da morte celular em células submetidas a *stress* oxidativo. A actividade dos extractos foi ainda comparada com compostos puros, com o objectivo de identificar os compostos responsáveis pelo efeito benéfico assim como potenciais sinergias existentes entre as várias biomoléculas.

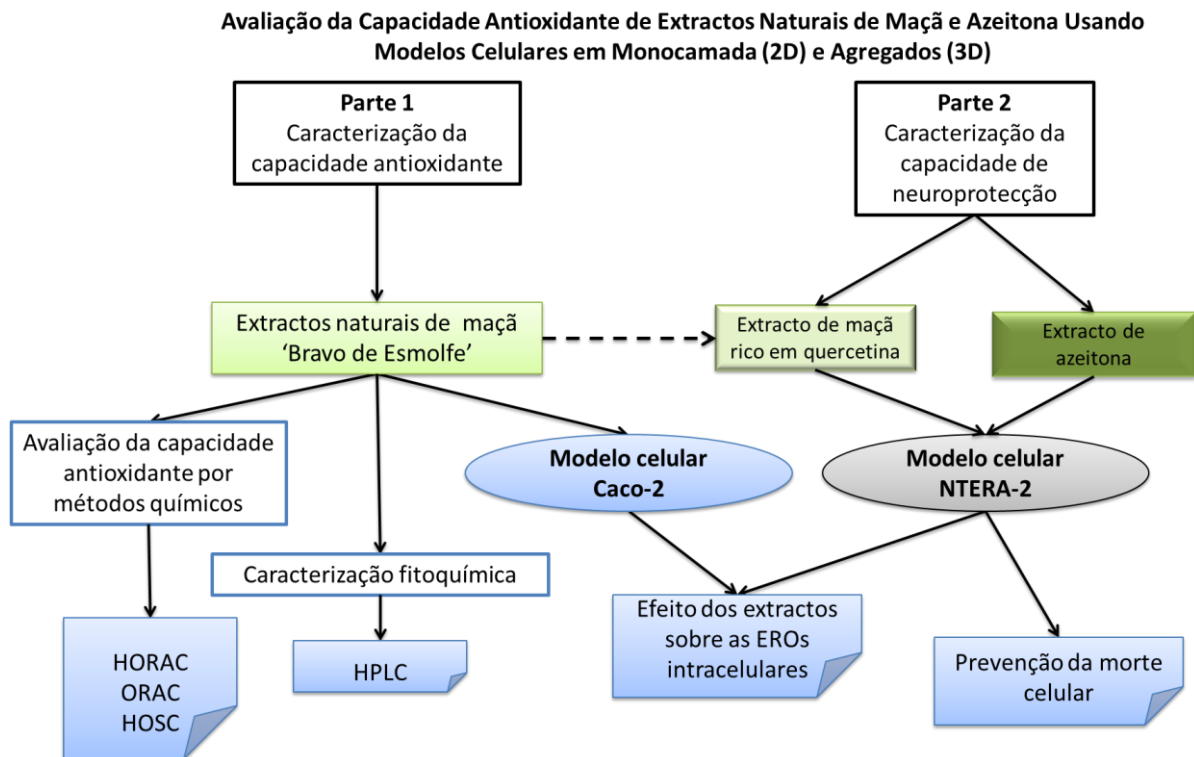


Figura 1.11 – Esquema representativo da estrutura do trabalho desenvolvido para a elaboração da tese.

2. Materiais e Métodos

2.1. Extractos Naturais

2.1.1. Extractos de maçã 'Bravo de Esmolfe'

Os extractos utilizados neste trabalho foram obtidos com solventes pressurizados, a partir de refugo, de uma variedade portuguesa de maçã, nomeadamente 'Bravo de Esmolfe'. Os extractos foram realizados, pelo grupo Nutracêuticos e Libertação Controlada – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET)/Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB-UNL), utilizando o procedimento experimental e o equipamento descritos por Serra, A. T., et al. 2011b. Na tabela 2.I, são apresentadas as condições de extracção (Pressão, Temperatura, tempo, tipo de solvente, razão matriz/solvente) utilizadas para a produção de cada extracto.

Tabela 2.I – Condições aplicadas na extracção com líquidos pressurizados para cada extracto de maçã a $50 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e $25 \pm 0,4 \text{ MPa}$.

Mistura de solvente ($\text{CO}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$)
1º Passo: Extracção com líquidos pressurizados (Tempo de extracção, 60min; Matriz sólida/rácio de solvente, $1:47 \pm 2$)
100:0:0
2º Passo: Optimização da extracção com o solvente com líquidos pressurizados (Tempo de extracção, 90min; Matriz sólida/rácio de solvente, $1:67 \pm 2,6$)
80:20:0
60:40:0
40:60:0
20:80:0
0:100:0
90:10:0
90:5:5

Adicionalmente foram realizadas extracções convencionais, sólido-líquido. Para esta extracção foram utilizadas três percentagens do solvente etanol, nomeadamente 0%, 50% e 100% em água.

Resumidamente, a 1 grama de matéria-prima foi adicionado 10mL de solvente, a mistura foi agitada durante 2h, num banho à temperatura de 50°C . Na tabela 2.II são apresentadas as condições para a extracção convencional sólido-líquido.

Tabela 2.II – Condições aplicadas na extracção convencional (sólido-líquido) para os extractos de maçã a 50°C durante 2h.

Mistura de solvente ($\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (v/v))
Extracção convencional (sólido-líquido) (Tempo de extracção, 2h; Matriz sólida/rácio de solvente, $1\text{g}/10\text{mL}$) a $50 \pm 0,1^\circ\text{C}$
100:0
50:50
0:100

2.1.2. Extracto de Azeitona

O extracto de azeitona foi realizado pelo grupo Nutracêuticos e Libertação Controlada – IBET/ITQB-UN, de acordo com o procedimento descrito na patente, com a identificação: WO2007013032.

2.2. Compostos fenólicos

Os compostos utilizados neste trabalho foram o hidroxitirosol (Extrasynthese[®]), e a quercetina (Sigma-Aldrich[®]).

2.3. Caracterização em polifenóis

2.3.1. Quantificação de polifenóis totais – Método Folin-Ciocalteu

A concentração de polifenóis totais foi determinada pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu, segundo o procedimento descrito por Singleton, V. L., et al. 1965. Nesta análise 20µL das diluições apropriadas das amostras foram adicionadas a 1580µL de água destilada e foram oxidadas com 100µL do reagente Folin-Ciocalteu (Panreac[®]). A reacção foi neutralizada, com a adição de 300µL de uma solução de carbonato de sódio (NaCO₃) (Sigma-Aldrich[®]). Neste ensaio foi realizada uma recta de calibração com ácido gálico (0 - 800mg/L) (Sigma-Aldrich[®]). Posteriormente as amostras foram incubadas durante 30 minutos a 40°C e as absorvâncias das amostras foram lidas num espectrofotometro Genesys10uv (Thermo Spectronic[®]) a 765nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg EAG). Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão (DP) de três replicados.

2.3.2. Identificação e quantificação de compostos por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)

As amostras de extractos de ‘Bravo de Esmolfe’ foram analisadas por HPLC, pelo Grupo Química Analítica do IBET de acordo com o método descrito por Serra, A. T., et al. 2011b. A análise foi realizada utilizando o equipamento de HPLC *Surveyor* equipado com um detector de díodo (Thermo Finnigan-Surveyor).

A análise dos resultados foi realizada utilizando o programa Chromquest versão 4.0 (Thermo Finnigan-Surveyor). Os extractos de ‘Bravo de Esmolfe’ foram diluídos em etanol (25 – 50mg/ml) e filtrados (0,22µm) antes da injeção no HPLC. A identificação for

realizada, por comparação do tempo de retenção e espectros, a 280 e 360nm dos picos das amostras, com padrões puros. Os compostos padrões utilizados, foram: catequina, ácido clorogénico, procianidina B2, epicatequina, quercetina-3'-glucósido, e quercetina-4'-glucósido. Os resultados foram expressos em mg/g de extracto. Os flavonóides totais foram determinados utilizando a área total dos espectros obtidos a 360nm utilizando uma recta de quercetina. Os resultados finais foram expressos como mg EQ/g de extracto.

2.4. Actividade antioxidante

2.4.1. Método de ORAC

Este método tem como objectivo a avaliação do resgate do radical peróxilo pelas amostras. Neste ensaio, avalia-se a capacidade dos extractos, de inibirem a oxidação da fluoresceína disódio (FD) (TCI Europe[®]), promovida pelos radicais peróxilo, induzidos através de degradação térmica do 2,2'-Azobis (2-metilpropionamida) dihidroclorido (AAPH) (Sigma-Aldrich[®]) [Serra, A. T., et al. 2013].

Foi seguido o protocolo descrito por Serra, A. T., et al. 2011a. Resumidamente, numa placa preta de 96 poços (NUNC[™]), foi adicionada uma mistura reaccional a cada poço constituída por 5,18M de AAPH, $1,5 \times 10^{-10}$ M de Fluoresceína disódio (FD), (ambos preparados em Tampão fosfato salino (PBS) 75mM a pH 7,4) e a amostra para um volume final de 0,2mL. Foi realizada uma recta de calibração com o composto (+/-)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox) (Fluka[®]), num intervalo de concentrações de 0µM a 40µM. A fluorescência das amostras, foi lida num leitor de microplacas, FLx800 da Biotek[®] ($\lambda_{\text{emissão}}$: 528 ± 20 nm, $\lambda_{\text{excitação}}$: 485 ± 20 nm), incubou-se a placa durante 10 minutos a 37°C, medindo-se posteriormente a fluorescência a cada minuto, durante 40 minutos a 37°C. O *software* de controlo do fluorímetro utilizado, foi o Gen5. Os resultados foram expressos em micromoles de equivalentes de Trolox (µmol ET). Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) de seis replicados.

2.4.2. Método de HORAC

Este método tem como objectivo, a avaliação da capacidade dos extractos, em conseguirem inibir a formação do radical hidróxilo. Neste ensaio, avalia-se a capacidade dos extractos na inibição da oxidação da FD, promovida por radicais hidróxilo, por via de um

mecanismo de transferência de átomos de hidrogénio. Os radicais livres são gerados pelo peróxido de hidrogénio (H_2O_2) [Serra, A. T., et al. 2013].

Foi seguido o procedimento descrito por Serra, A. T., et al. 2010a. Resumidamente, numa placa preta de 96 poços, foi adicionada uma mistura reaccional a cada poço constituída por $5,26 \times 10^{-8} \text{M}$ de FD em Tampão fosfato de sódio (SPB) 75mM a pH 7,4, 0,23mM de CoF_2 (Sigma-Aldrich®), 0,027M de H_2O_2 (Sigma-Aldrich®) e a amostra de modo a obter-se um volume final de 0,3mL. Foi realizada uma recta de calibração com o composto ácido cafeico (0 - 250 μM). A fluorescência das amostras foi lida num leitor de microplacas FLx800, da Biotek® ($\lambda_{\text{emissão}}$: $528 \pm 20 \text{nm}$, $\lambda_{\text{excitação}}$: $485 \pm 20 \text{nm}$), mediu-se a fluorescência a cada minuto, durante 60 minutos a 37°C. O *software* de controlo do fluorímetro utilizado, foi o Gen5. Os resultados foram expressos em micromoles de equivalentes de ácido cafeico (μmol EAC). Foi usado neste ensaio como solvente de mistura, uma mistura de Acetona/água milliQ (50/50). Realizou-se controlos aos solventes, em que as amostras se encontram. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) de seis replicados.

2.4.3. Método de HOSC

Este método tem como objectivo, avaliar a capacidade de resgate dos radicais hidróxilo pela amostra, utilizando para isso o marcador fluorescente, FD e uma reacção clássica de Fenton com Fe (III) e H_2O_2 como fonte dos radicais hidróxilo [Serra, A. T., et al. 2013].

Foi seguido o protocolo descrito por Moore, J., et al. 2006. Resumidamente, numa placa preta de 96 poços, foi adicionada uma mistura reaccional a cada poço constituída por $5,26 \times 10^{-8} \text{M}$ de FD em tampão SPB 75mM a pH de 7,4, 0,686mM de FeCl_3 , 0,0265 de H_2O_2 e a amostra para um volume final de 0,3mL. Foi realizada uma recta de calibração com o composto trolox (0 - 30 μM). A fluorescência das amostras foi lida num leitor de microplacas, FLx800 da Biotek® ($\lambda_{\text{emissão}}$: $528 \pm 20 \text{nm}$, $\lambda_{\text{excitação}}$: $485 \pm 20 \text{nm}$) medindo-se a fluorescência a cada minuto, durante 60 minutos a 37°C, O *software* de controlo do fluorímetro utilizado foi o Gen5. Os resultados foram expressos como micromoles equivalentes de capacidade antioxidante Trolox (μmol ECAT). Foi usado neste ensaio como solvente de diluição uma mistura de Acetona/água milliQ (50/50). Realizou-se controlos aos solventes, em que as amostras se encontram. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) de seis replicados.

2.5. Ensaios utilizando modelos celulares

2.5.1. Modelos celulares e condições de cultura celular

A linha celular de carcinoma de cólon humano, Caco-2 foi adquirida à *Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) (Barunshweig, Alemanha). A linha celular foi mantida e expandida em meio RPMI 1640 (Invitrogen, Gibco®), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) (Gibco®). As células de *stock* foram mantidas em monocamada (2D), em T-flask, incubadas a 37°C com 5% CO₂ numa atmosfera húmida.

A linha celular NTERA-2 cl.D1 [NT2/D1] (ATCC® CRL-1973™) foi adquirida à *American Type Culture Collection* (ATCC). Os agregados de células NT2 foram diferenciados com ácido retinóico, para diferenciação neuronal num sistema de cultura agitado em meio DMEM-HG (L-Glutamina 4mM, Piruvato de sódio 1mM) suplementado com 5% FBS e 1% PenStrep (Meio e suplementos adquiridos da Invitrogen®), foram produzidos pela Unidade de Tecnologias de Células Animais (UTCA) – IBET, de acordo com o procedimento descrito em Terrasso, A. P., 2012, p.23-26.

2.5.2. Avaliação da toxicidade

2.5.2.1. Avaliação da toxicidade das amostras no modelo celular Caco-2

As células foram inoculadas numa placa de 96 poços transparente, com uma densidade de 2×10^4 células por poço, num volume final de 100µL de meio de cultura. As células foram incubadas com as amostras, numa gama de concentrações (5 – 50mg/mL), diluídas em PBS (10mM, pH 7,4) (Sigma-Aldrich®). Foram realizados diferentes controlos, ao PBS e ao solvente das amostras. As células foram incubadas durante 1h. As diluições e controlos foram removidos e adicionou-se a cada poço 100µL de 0,5mg/mL do reagente colorimétrico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium de brometo (MTT) (Sigma-Aldrich®), diluído em meio de cultura suplementado com 0,5% de FBS, para determinação da viabilidade celular. Após 4h de incubação o meio foi removido e a cada poço foi adicionado 150µL de Dimetil sulfoxido (DMSO) (Carlos Erba Reagents®). A formação dos cristais de formazan originados pela metabolização do reagente MTT foi quantificada pela

medição da absorvância a 570nm num leitor de microplacas SPECTRAmax™ (Molecular Devices Corporation®).

Os resultados foram calculados pela normalização ao controlo com PBS e foram expressos em percentagem (%). Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) de dois replicados.

2.5.2.2. Avaliação da toxicidade das amostras no modelo celular NTERA-2

Os agregados de células NTERA-2, diferenciados com ácido retinóico, tinham um diâmetro médio de 150 μ m, foram inoculados em placas transparentes de 96 poços com a densidade de ± 10 agregados por poço, para um volume final de 100 μ L. 24h após, foi realizado um teste de avaliação da viabilidade celular utilizando o reagente PrestoBlue (Invitrogen®). Removeu-se o meio e adicionou-se a cada poço 100 μ L de PrestoBlue, diluído 1/10 em meio de cultura, deixou-se a placa a incubar durante 1hora. Posteriormente o meio de cada poço foi removido e transferido para uma placa preta de 96poços para medição da fluorescência (λ emissão: 590/20 nm, λ excitação: 560/20 nm). Às células foram adicionados, o extracto de maçã (31,25 – 500 μ g/mL), o extracto de azeitona (2,5 – 40mg/L), o composto quercetina (2,5 – 40mg/L) e o composto hidroxitirosol (1,25 – 20mg/L) ou meio (controlo). Após 24h, retirou-se o meio de cada poço e após lavagem com PBS (10mM, pH 7,4) pré-aquecido a 37°C, adicionou-se 100 μ L PrestoBlue, diluído 1/10 em meio de cultura, para avaliação da viabilidade celular. As células foram incubadas durante 1h a 37°C e ao final desse tempo, o meio foi transferido para uma placa preta de 96 poços para medição da fluorescência (λ emissão: 590/20 nm, λ excitação: 560/20 nm). As diferentes placas pretas de 96 poços com PrestoBlue foram lidas num leitor de microplacas de fluorescência da Biotec® (λ emissão: 590/20 nm, λ excitação: 560/20 nm). Os resultados foram calculados pela normalização ao controlo e foram expressos em percentagem (%) de acordo com a equação (3). Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) de dois replicados.

$$\frac{(IF_A(t_f) - IF_B(t_f)) - (IF_A(t_0) - IF_B(t_0))}{IF_A(t_0) - IF_B(t_0)} \times 100\% \quad (3)$$

Onde: IF_A é a intensidade de fluorescência da amostra. IF_B é a intensidade de fluorescência do branco. t_f é o tempo final do ensaio. t_0 é o tempo 0 do ensaio.

2.5.3. Actividade antioxidante celular (CAA)

2.5.3.1. Modelo celular Caco-2

Para este ensaio foi seguido o procedimento descrito por Wolfe, K. L., & Liu, R. H., 2007.

Neste ensaio as células Caco-2 foram inoculadas em placas de 96 poços transparentes (Falcon®), com a densidade de 2×10^4 de células por poço num volume final de 100µL de meio. O meio foi substituído de 2 em 2 dias até à confluência das células. No dia do ensaio e após a lavagem das células com PBS (2x100µL) (Sigma-Aldrich®) (10mM, pH 7,4), pré-aquecido a 37°C, foram incubadas com os extractos de maçã (5 – 50mg/mL) (diluídos em PBS) com 25µM de diacetato 2',7'-Diclorohidrofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich®), preparada em etanol e diluída em PBS, durante 1h a 37°C. Após a incubação o meio de cada poço foi removido e adicionou-se uma solução com 600µM de AAPH. Realizou-se uma recta de calibração com quercetina (0 - 20µM) (Sigma-Aldrich®). A fluorescência das amostras foi medida num leitor de placas, FLx 800 Fluorescence Microplate reader da Biotek®, medindo a cada minuto durante 1h a 37°C (λ emissão: 515/20, λ excitação: 493/20nm). A actividade antioxidante celular foi obtida pelo cálculo da área abaixo da curva, de acordo com a fórmula descrita por Wolfe, K. L., & Liu, R. H., 2007. Os resultados foram expressos como micromoles de equivalentes de quercetina por grama de extracto (µmol EQ/g de extracto). Sendo os dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) de quatro replicados.

2.5.3.2. Modelo celular NTERA-2

Para este ensaio foi seguido o procedimento descrito por Wolfe, K. L., & Liu, R. H., 2007.

Numa primeira parte procedeu-se à optimização do método para os agregados de células NTERA-2, diferenciados com ácido retinóico. Para tal, variou-se as concentrações do marcador fluorescente DCFH-DA e do indutor de *stress* hidróperóxido de tert-butil (t-BHP) (Sigma-Aldrich®).

Os agregados foram inoculados em placas de 96 poços, com a densidade de ± 10 agregados por poço, para um volume final de 100uL de meio. Após 24h retirou-se o meio, e após lavagem com 100µL PBS (10mM, pH 7,4), pré-aquecido a 37°C, adicionou-se as várias

concentrações do marcador fluorescente DCFH-DA (0 - 40 μ M), diluídas em meio DMEM-HG sem vermelho de fenol (Invitrogen[®]), suplementado com 5% FBS, 1% PenStrep, 1mM de Piruvato de sódio e 4mM de L-Glutamina. A placa ficou a incubar a 37°C, durante 1h. Após a incubação, o meio foi removido e foi adicionado a cada poço as várias concentrações do indutor de *stress* (0 - 246 μ M) (diluído em meio). A Fluorescência foi medida num leitor de placas de FLx 800 Fluorescence Microplate reader da Biotek[®], medindo a cada minuto por 1h, a 37°C (λ emissão: 515, λ excitação: 493nm).

Na segunda parte do ensaio, os agregados foram inoculados em placas de 96 poços com a densidade de ± 10 agregados por poço, para um volume final de 100 μ L de meio. Após 24h, retirou-se o meio, e após lavagem com 100 μ L PBS (10mM, pH 7,4), pré-aquecido a 37°C, adicionou-se o extracto de maçã previamente escolhido ou o extracto de azeitona, com a concentração do marcador de fluorescência (40 μ M), diluídos em meio DMEM-HG sem vermelho de fenol (Invitrogen[®]) suplementado com 5% FBS, 1% PenStrep, 1mM de Piruvato de sódio e 4mM de L-Glutamina. A placa ficou a incubar a 37°C durante 1h. Após a incubação o meio foi retirado e foi adicionado a cada poço a concentração de indutor de *stress* seleccionado na primeira parte do ensaio (diluído em meio sem vermelho de fenol). A Fluorescência foi medida num leitor de placas de fluorescência FLx 800 Fluorescence Microplate reader da Biotek[®], medindo a cada minuto por 1h a 37°C (λ emissão: 515, λ excitação: 493nm).

Em ambas as partes do ensaio, a actividade antioxidante celular foi determinada, calculando a área abaixo da curva, de acordo com a fórmula descrita por Wolfe, K. L., & Liu, R. H., 2007. Os resultados foram expressos como percentagem em relação ao controlo com *stress*. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) de cinco replicados.

2.5.4. Ensaio de viabilidade

Os ensaios de neuroprotecção foram realizados no modelo celular NT2.

Neste ensaio os agregados de células NT2 diferenciados, foram inoculados em placas de 96 poços, com densidade de ± 10 agregados por poço, para um volume final de 100 μ L de meio de cultivo. Após 24h, retirou-se o meio e adicionou-se a cada poço 100 μ L de PrestoBlue, diluído 1/10 em meio de cultura, com o objectivo de determinar a viabilidade celular de cada poço, ficando a incubar durante 1h a 37°C. Após este tempo, o meio de cada poço foi removido e transferido para uma placa preta de 96 poços para medição da

fluorescência (λ emissão: 590/20 nm, λ excitação: 560/20 nm). Aos agregados de células NT2 diferenciados com ácido retinóico foi adicionado, meio nos controlos, o extracto de azeitona (1,25 e 5mg/L) e o composto hidroxitirosol (2,5 e 10mg/L). Após 24h removeu-se o meio e adicionou-se o indutor de *stress* t-BHP (246 μ M). No caso de có-incubação adicionou-se o indutor com o extracto ou o composto nas mesmas concentrações, deixou-se a incubar durante 48h. Passadas as 48h, retirou-se o meio e adicionou-se 100uL do reagente PrestoBlue a cada poço, e deixou-se a incubar durante 1h a 37°C. Após este tempo, o meio de cada poço foi removido e transferido para uma placa preta de 96 poços para medição da fluorescência (λ emissão: 590/20 nm, λ excitação: 560/20 nm). As placas pretas de 96 poços com PrestoBlue foram lidas num leitor de microplacas de fluorescência da Biotec[®] (λ emissão: 590/20 nm, λ excitação: 560/20 nm). Os resultados foram calculados pela normalização ao controlo e foram expressos em percentagem (%) de acordo com a equação (1). Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) de três replicados.

2.6. Análise estatística

Os resultados obtidos para os ensaios de neuroprotecção, foram comparados por meio de análise *one-way* de variância (ANOVA) e por teste de Turkey, de modo a testar as diferenças significativas entre as médias. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 6.03[®] (GraphPad Software, Inc.). Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) de três replicados.

3. Resultados e Discussão

Neste trabalho foi analisada a capacidade antioxidante de extractos naturais de maçã e de azeitona com o objectivo de avaliar o potencial destes ingredientes no desenvolvimento de novos produtos funcionais. O trabalho desenvolvido foi dividido em duas partes. A primeira parte teve como objectivo a caracterização de extractos naturais de maçã, obtidos por extracção com solventes pressurizados e por extracção convencional, utilizando o modelo celular Caco-2, células humanas do cancro do cólon. Na segunda parte foi explorado o potencial neuroprotector de um extracto de maçã rico em quercetina e de um extracto de azeitona rico em hidroxitirosol, num modelo celular 3D do SNC, nomeadamente agregados de células NTERA-2 diferenciadas em neurónios.

3.1. Parte 1 – Caracterização antioxidante de extractos naturais de maçã ‘Bravo de Esmolfe’

3.1.1. Análise e comparação de extractos obtidos por extracção com solventes pressurizados e extracção convencional

As extracções foram realizadas a partir de refugo de maçã ‘Bravo de Esmolfe’, uma variedade de maçã rica em compostos fenólicos com elevada capacidade antioxidante [Serra, A. T., et al. 2010a], previamente liofilizado, utilizando as técnicas de extracção com solventes pressurizados e a técnica de extracção convencional. A extracção com solventes pressurizados foi realizada segundo o procedimento experimental e o equipamento descritos por Serra, A. T., et al. 2010b para o fraccionamento de compostos antioxidantes de cereja. O processo consistiu num fraccionamento com dois passos, envolvendo um pré-tratamento com CO₂ supercrítico para remoção de compostos lipofílicos (1º Passo), seguido de um passo de extracção com solventes pressurizados onde foram testadas diferentes misturas de CO₂ e etanol (2º Passo). O esquema das várias extracções é apresentado na figura 3.1.

Os extractos obtidos foram analisados e comparados em termos de rendimento mássico, composição fenólica e actividade antioxidante utilizando três métodos químicos complementares, nomeadamente os métodos HORAC, HOSC, ORAC e utilizando o modelo celular Caco-2 – células humanas do cancro do colón (Tabela 3.I).

Tabela 3.I – Caracterização dos extractos de maçã ‘Bravo de Esmolfe’, obtidos pelos dois métodos de extracção, com solventes pressurizados a 50±0,1°C e 25±0,4 MPa e extracção convencional 50°C durante 2h.

			Caracterização fitoquímica (mg/g de extracto)							Actividade antioxidante			
Mistura de solvente (CO ₂ :EtOH:H ₂ O)	η (%)	PT (mg EAG/g extracto)	Fld ^a	Cat ^b	ACI ^b	PB2 ^b	Epc ^b	Q3g ^b	Q4g ^b	HOSC (μmol CAET/g de extracto)	HORAC (μmol CAEAC/g de extracto)	ORAC (μmol CAET/g de extracto)	CAA (μmol de EQ/mg de extracto)
1º Passo: Extracção com solventes pressurizados (Tempo de extracção, 60min; Razão massa matriz/volume solvente, 1:47±2)													
100:0:0	0,9	4,9 ± 0,7	0,980	0,105	0,160	0,155	0,205	0,153	0,142	64,9 ± 6,8	< 2,5	65,0 ± 7,8	<0,08
2º Passo: Extracção com solventes pressurizados (Tempo de extracção, 90min; Razão massa matriz/volume solvente, 1:67±2,6)													
80:20:0	12,7	6,1 ± 0,3	1,544	0,089	0,142	0,220	0,397	0,107	0,140	145,2 ± 22,7	102,3 ± 3,3	197,2 ± 18,6	1,425 ± 0,378
60:40:0	36,1	7,0 ± 0,4	3,806	0,143	0,285	0,176	0,647	0,368	0,229	133,6 ± 9,5	63,4 ± 8,7	284,9 ± 16,3	1,497 ± 0,240
40:60:0	56,3	5,3 ± 0,4	1,738	0,128	0,235	0,177	0,440	0,217	0,152	201,9 ± 26,5	60,1 ± 5,2	243,9 ± 10,4	1,069 ± 0,038
20:80:0	66,6	6,1 ± 0,9	1,213	0,107	0,197	0,144	0,334	0,161	0,118	120,2 ± 18,4	32,9 ± 2,4	146,9 ± 22,1	1,233 ± 0,032
0:100:0	80,8	6,3 ± 0,1	1,577	0,136	0,290	0,238	0,420	0,198	0,135	118,4 ± 14,5	93,6 ± 2,4	122,8 ± 13,7	1,189 ± 0,234
Extracção convencional (sólido-líquido) (Tempo de extracção, 2h; Razão massa matriz/volume solvente, 1g:10mL) a 50 ± 0,1°C													
0:100:0	23,9	3,8 ± 0,1	1,169	0,024	0,056	0,131	0,144	0,113	0,103	26,9 ± 2,9	18,4 ± 2,5	116,9 ± 6,0	0,581 ± 0,035
0:50:50	22,1	6,3 ± 0,5	1,147	0,074	0,212	0,102	0,250	0,185	0,106	96,7 ± 13,3	44,2 ± 3,9	81,8 ± 10,8	0,879 ± 0,034
0:0:100	16,4	2,4 ± 0,0	0,472	0,054	0,124	0,075	0,101	0,087	0,071	39,4 ± 5,1	18,8 ± 2,1	32,0 ± 4,1	0,528 ± 0,123

η: Rendimento global da extracção; Fld - Flavonóides; Cat - Catequina; ACl - Ácido clorogénico; PB2 – Procianidina B2; Epc – Epicatequina; Q3g – Quercetina-3'-glucósido; Q4g – Quercetina-4'-glucósido; a – dados obtidos no detector de díodos a 360nm; b - dados obtidos no detector de díodos a 280nm; CAET – Capacidade antioxidante de equivalentes de trolox; CAEAC – Equivalentes de ácido cafeico; EQ – Equivalentes de quercetina

Numa primeira fase foi avaliado o efeito da variação da percentagem de etanol na mistura de solvente utilizado no processo de extracção com solventes pressurizados, em termos de rendimento mássico e quantidade de compostos extraídos. Os resultados obtidos são apresentados na figura 3.2.

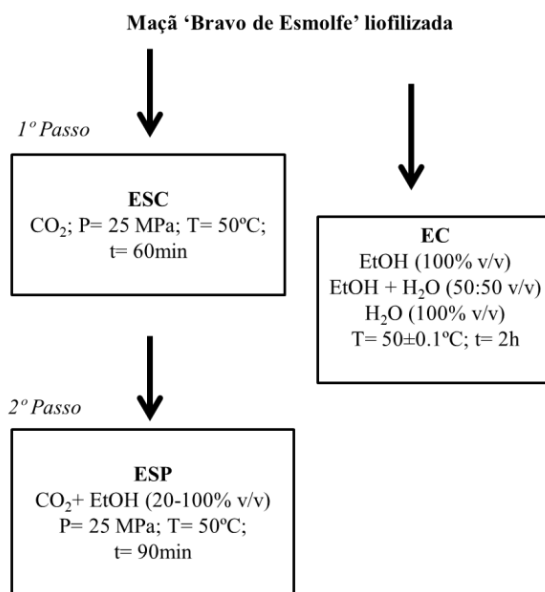


Figura 3.1 – Esquema representativo dos processos de extracção da maçã ‘Bravo de Esmolfe’. EtOH – Etanol; ESC – Extracção supercrítica; ESP – Extracção com solventes pressurizados; EC – Extracção convencional.

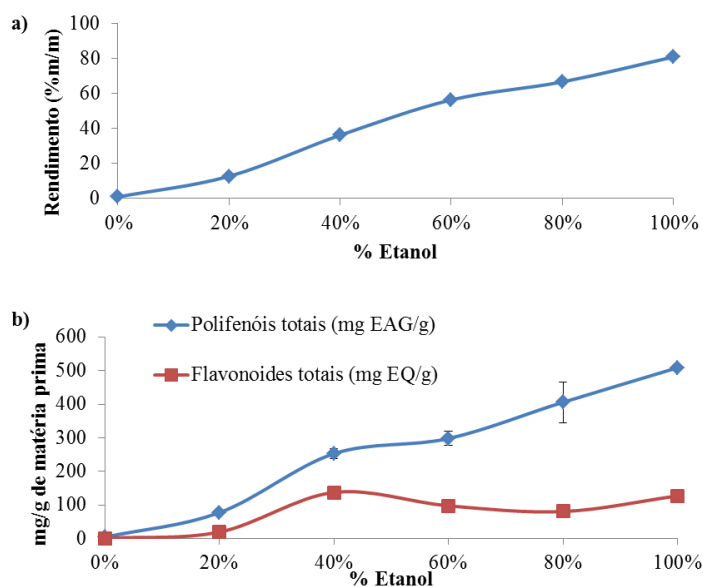


Figura 3.2 – Efeito da percentagem de etanol presente na mistura de solvente no rendimento do processo de extracção com solventes pressurizados. a) Rendimento mássico (% m/m); b) Rendimento dos flavonóides totais (mg EQ/g matéria-prima) e polifenóis totais extraídos (mg EAG/g matéria-prima).

Da análise dos resultados verifica-se que na extracção com solventes pressurizados foram obtidos valores baixos de rendimento para baixas percentagens de etanol presente na mistura. Em particular, no primeiro passo, onde foi aplicada uma extracção só com CO₂ supercrítico, o rendimento mássico obtido assim como a quantidade de polifenóis extraída foram relativamente baixos, 0,92% (m/m) e 4,5mg/g matéria-prima, respectivamente. Este resultado, pode ser devido ao facto, de neste primeiro passo serem preferencialmente extraídas substâncias não-polares e lipofílicas, como demonstrado anteriormente por outros autores. Por exemplo, num estudo realizado com cerejas, Serra, A. T. e co-autores verificaram que ao aplicar o mesmo tipo de processo, o rendimento de extracção assim como a quantidade de polifenóis extraídos só com CO₂ supercrítico era inferior [Serra, A. T., et al., 2010b]. Também Adil, Í. H., et al. 2007 demonstrou que o rendimento mássico e a quantidade de polifenóis extraídos aumentavam com a quantidade de co-solvente utilizado (etanol) no processo de extracção de resíduos de maçã e de pêssago, provenientes da produção de sumo. Como foi observado por este estudo, o recurso a concentrações elevadas de etanol no solvente de extracção favoreceu a extracção dos polifenóis de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ devido ao aumento da polaridade do solvente. No caso dos flavonóides, observa-se que o etanol favorece a extracção dos compostos da maçã ‘Bravo de Esmolfe’ até à percentagem de 40% (Figura 3.2b). A partir desta percentagem a quantidade de flavonóides extraída da matéria-prima mantêm-se constante. Um resultado contrário ao obtido por He, G.-q., et al. 2005, que obteve um rendimento crescente com o aumento da percentagem de etanol até 80% na mistura de extracção com solventes supercríticos, para flavonóides extraídos de *Humulus lupulus* L. Esta diferença pode ser devido à matéria-prima usada ser diferente e aos tipos de flavonóides que foram extraídos.

No que diz respeito à selectividade do método de extracção, verificou-se que o solvente 60:40 (CO₂:EtOH v/v) permitiu obter um extracto com maior concentração em polifenóis (7,0 ± 0,4mg CAEAG/g de extracto) (Tabela 3.I). Este resultado sugere que para concentrações elevadas de etanol (> 40%) outros compostos não fenólicos são também extraídos, conduzindo a uma diminuição da concentração de polifenóis no extracto final. Relativamente à capacidade antioxidante, de uma forma geral, três extractos apresentaram valores mais elevados para os métodos químicos realizados (Figura 3.3 & Tabela 3.I). Em particular, o extracto 60:40 (CO₂:EtOH v/v) apresentou maior valor de ORAC (284,9 ± 16,3 µmol CAET/g de extracto), o extracto 40:60 (CO₂:EtOH v/v) maior valor de HOSC (201,9 ±

26,5 $\mu\text{mol CAET/g}$ de extracto) e o extracto 80:20 ($\text{CO}_2\text{:EtOH v/v}$) maior valor de HORAC ($102,3 \pm 3,3 \mu\text{mol CAEAC/g}$ de extracto). Estas diferenças são provavelmente devidas à diferente composição fitoquímica dos extractos (Tabela 3.I). Neste sentido, foram identificados e quantificados por HPLC alguns compostos fenólicos presentes nos extractos, nomeadamente, catequina, ácido clorogénico, procianidina B2, epicatequina, quercetina-3-glucósido e quercetina-4-glucósido (Tabela 3.I). Estes fitoquímicos já tinham sido identificados por outros autores como fazendo parte da constituição da maçã [Reis, S. F., et al. 2012] e em particular da maçã ‘Bravo de Esmolfe’ [Serra, A. T., et al. 2010a]. Dentro dos diferentes compostos identificados, a epicatequina foi o composto existente em maior quantidade em todos os extractos.

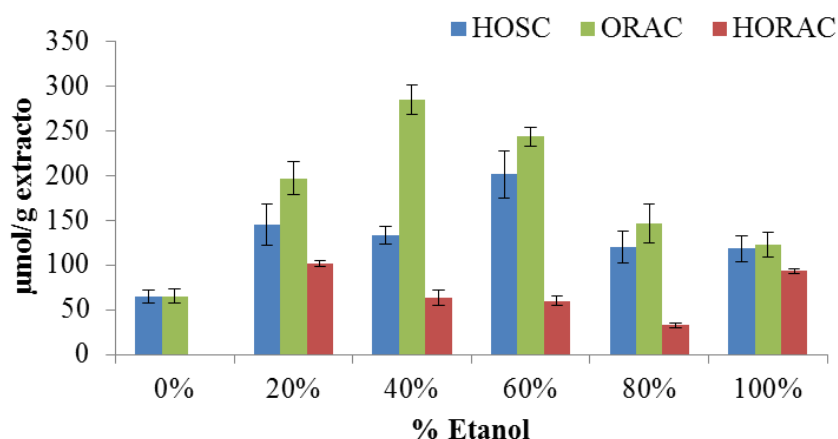


Figura 3.3 – Efeito da percentagem de etanol presente na mistura de solvente na actividade antioxidante na extracção com recurso a solventes pressurizados. HOSC - $\mu\text{mol CAET/g}$ de extracto; ORAC - $\mu\text{mol CAET/g}$ de extracto; HORAC - $\mu\text{mol CAEAC/g}$ de extracto.

Com o objectivo de avaliar a eficiência do processo de extracção com solventes pressurizados, os resultados obtidos foram comparados com extractos convencionais, realizados com três tipos de solvente: H_2O -100%, $\text{EtOH/H}_2\text{O}$ -50:50 e EtOH -100%. Verificou-se que o processo com recurso a solventes pressurizados, quando se utiliza uma percentagem de 40% ou superior de etanol na mistura, permite obter extractos com rendimento superior aos do processo convencional. Em particular, o uso de etanol pressurizado (condição 0:100 ($\text{CO}_2\text{:EtOH v/v}$)) permite obter rendimentos mássicos e rendimentos em compostos

bioactivos extraídos 3,37 e 2,48 vezes superiores do que na extracção convencional com o mesmo tipo de solvente, respectivamente.

Dos vários extractos obtidos por processo convencional observou-se que a mistura hidroalcoólica é a mais eficiente na extracção de compostos fenólicos (Figura 3.4), permitindo também obter um extracto com maior concentração nestes compostos (Tabela 3.I). A presença de água na mistura contribui para esta maior selectividade, foi demonstrado por Reis, S. F., et al. 2012 que analisou a influência de água no solvente na extracção de compostos fenólicos de resíduos de maçã, tendo obtido como resultado extractos contendo altas quantidades destes compostos. Assim comprovou que a água é um bom solvente de extracção de compostos fenólicos, nomeadamente, ácidos hidroxicianâmicos, flavonóis, flavanonas, di-hidrocalconas e flavonas. O extracto obtido com a mistura hidroalcoólica apresentou ainda maior valor de HOSC ($96,7 \pm 13,3 \mu\text{mol CAET/g}$ de extracto) e de HORAC ($44,2 \pm 3,9 \mu\text{mol CAEAC/g}$ de extracto). Para o método ORAC, o extracto obtido com 100% etanol apresentou uma actividade antioxidante superior provavelmente devido à maior concentração de flavonóides (Tabela 3.I) os quais são referidos na literatura como tendo elevada capacidade antioxidante [Arts, I. C. W., et al. 2005; Soobrattee, M. A., et al. 2005 Saura-Calixto, F., et al. 2007; Li, J., et al. 2007; D'Archivio, M., et al. 2007; Lucas-Abellán, C., et al. 2011;].

De uma forma geral, os extractos analisados apresentaram uma actividade antioxidante superior à do fruto fresco desta variedade de maçã apresentada pelo estudo realizado por Serra, A. T., et al. 2010a, sendo que, para os métodos ORAC e HORAC os melhores extractos apresentaram uma actividade 19 e 13 vezes superior à do fruto fresco, respectivamente.

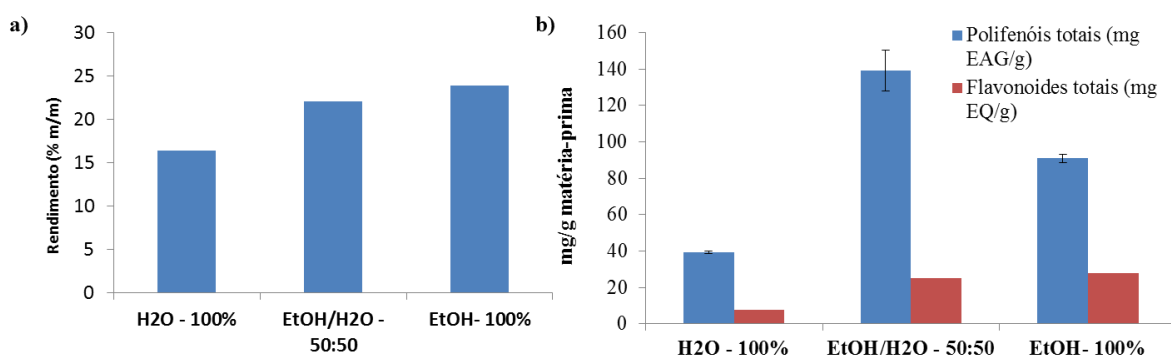


Figura 3.4 – Efeito do tipo de solvente no rendimento no processo de extracção convencional (sólido-líquido). a) Rendimento mássico (% m/m); b) Rendimento dos flavonóides totais (mg/g matéria-prima) e polifenóis totais extraídos (mg EAG/g matéria-prima).

Com o objectivo de avaliar a bioactividade dos extractos a nível celular foi realizado o ensaio de avaliação da actividade antioxidante celular (CAA) no modelo Caco-2 – células humanas do cancro do cólon. Este modelo celular tem sido muito utilizado na avaliação da biodisponibilidade, toxicidade e conversão metabólica de compostos antioxidantes, tais como os carotenóides e os flavonóides, revisto por Cheli, F., et al. 2011. Neste trabalho a avaliação da capacidade antioxidante foi realizada recorrendo-se ao marcador fluorescente DCFH que permite identificar as espécies reactivas intracelulares [Wolfe, K. L., et al. 2007].

Previamente ao ensaio de CAA foi avaliada a toxicidade dos extractos nas células Caco-2. Os resultados obtidos indicaram que para as concentrações testadas no ensaio CAA, não foi verificada toxicidade nesta linha celular. Os valores de CAA para os vários extractos estão apresentados na tabela 3.I.

Os resultados obtidos indicam que o método de solventes pressurizados é mais eficiente do que o método convencional na extracção de compostos com actividade a nível celular. De facto, todas as fracções obtidas após o segundo passo de extracção com solventes pressurizados apresentaram valores de CAA superiores do que os extractos obtidos com H₂O-100%, EtOH/H₂O-50:50 e EtOH-100%. O extracto obtido com a condição 60:40 (CO₂:EtOH v/v) foi o que apresentou maior actividade antioxidante (1,497 µmol EQ/mg de extracto) provavelmente devido à sua concentração em catequina, um composto antioxidante com elevada capacidade de absorção e permeabilidade neste modelo celular, Caco-2 [Deprez, S., et al. 2001]. No caso dos extractos convencionais, a fracção obtida com a mistura EtOH/H₂O-50:50 foi a que apresentou maior actividade antioxidante intracelular, seguida do extracto com EtOH-100%.

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que, a extracção com solventes pressurizados permite obter extractos com maior actividade antioxidante celular, sendo que percentagens baixas de etanol no solvente de extracção favorecem a extracção dos compostos responsáveis por esta actividade. Assim, e de forma a estudar a influência deste parâmetro foi realizada uma extracção pressurizada adicional. O processo consistiu num fraccionamento com dois passos, envolvendo um pré-tratamento com CO₂ supercrítico para remoção de compostos lipofílicos (1º Passo), seguido de um passo de extracção com solventes pressurizados (2º Passo) à matéria-prima utilizando como solvente a mistura 90:10 (CO₂:EtOH v/v). Para além disso, foi aplicada também a seguinte condição 90:5:5 (CO₂:EtOH:H₂O v/v/v) com o objectivo de avaliar se a introdução de água na mistura de

solvente contribui para a obtenção de extractos ricos em compostos antioxidantes, tal como observado para os extractos convencionais. O esquema de extracção é apresentado na figura 3.5 e a caracterização dos extractos obtidos é apresentada na tabela 3.II.

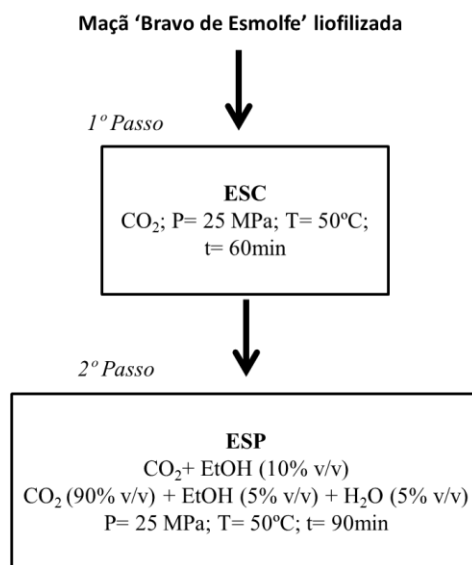


Figura 3.5 – Esquema representativo do processo de extracção com líquidos pressurizados de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ realizado na segunda fase do trabalho. EtOH – Etanol; ESC – Extracção supercrítica; ESP – Extracção com solventes pressurizados.

Relativamente à actividade antioxidante intracelular verificou-se uma diminuição do valor de CAA com a diminuição da percentagem de etanol (Figura 3.6). No entanto, quando se adicionou água ao solvente de mistura, o valor de CAA aumentou cerca de cinco vezes ($5,129 \pm 0,004 \mu\text{mol EQ/mg}$ de extracto) indicando que a presença de água favorece a extracção de compostos não fenólicos que podem exercer actividade ao nível das EROs. Estudos futuros devem ser realizados, com o objectivo de identificar estes compostos, uma vez que não corresponde a nenhum dos compostos analisados.

Os resultados obtidos indicam que a presença de água na mistura de solvente permitiu obter rendimento mássico superior (cerca de 13 vezes) ao extracto 90:10 (CO₂:EtOH v/v) (4,8%). É ainda de referir que este último extracto foi o que apresentou maior concentração em compostos fenólicos indicando que o solvente 90:10 (CO₂:EtOH v/v) contribui para uma maior selectividade para estes compostos. No entanto, nenhum dos dois

extractos apresentou valores de ORAC, HORAC e HOSC superiores aos extractos obtidos anteriormente.

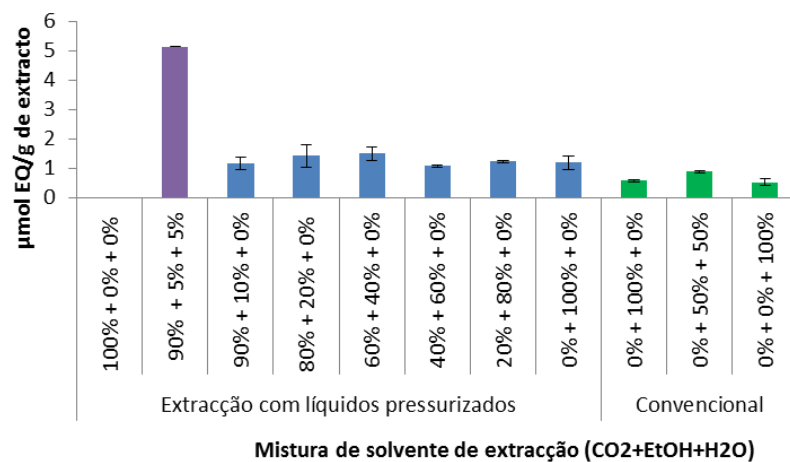


Figura 3.6 – Valores de actividade antioxidante celular dos vários extractos de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ no modelo celular Caco-2.

Tabela 3.II – Caracterização dos extractos de maçã ‘Bravo de Esmolfe’ da segunda extracção com solventes pressurizados a 50±0,1°C e 25±0,4 MPa

Caracterização fitoquímica (mg/g de extracto)										Actividade antioxidante			
Mistura de solvente (CO ₂ :EtOH:H ₂ O)	η (%)	PT (mg EAG/g extracto)	Fld ^a	Cat ^b	ACl ^b	PB2 ^b	Epc ^b	Q3g ^b	Q4g ^b	HOSC (μmol CAET/g de extracto)	HORAC (μmol EAC/g de extracto)	ORAC (μmol CAET/g de extracto)	CAA (μmol de EQ/mg de extracto)
2º Passo: Extracção com solventes pressurizados (Tempo de extracção, 90min; Razão massa matriz/volume solvente, 1:67±2,6)													
90:10:0	4,8	8,82 ± 1,08	2,171	0,278	0,206	0,163	0,293	0,174	0,147	86,3 ± 7,8	13,6 ± 0,7	200,0 ± 25,6	1,158 ± 0,219
90:5:5	64,1	6,36 ± 0,18	1,584	0,099	0,190	0,061	0,352	0,161	0,174	143,5 ± 9,8	14,7 ± 1,5	154,9 ± 18,9	5,129 ± 0,004

η: Rendimento global da extracção; Fld - Flavonóides; Cat - Catequina; ACl - Ácido clorogénico; PB2 – Procianidina B2; Epc – Epicatequina; Q3g – Quercetina-3’-glucósido; Q4g – Quercetina-4’-glucósido; a – dados obtidos no detector de díodos a 360nm; b - dados obtidos no detector de díodos a 280nm; CAET – Capacidade antioxidante de equivalentes de trolox; EAC – Equivalentes de ácido cafeico; EQ – Equivalentes de quercetina

3.1.2. Identificação dos principais compostos responsáveis pela actividade antioxidante

Tem sido descrito na literatura que as propriedades antioxidantes dependem de várias características estruturais na estrutura base da molécula do polifenol, sendo atribuídas à elevada reactividade dos grupos hidróxilo [Číž, M., et al. 2010]. A configuração dos grupos do anel A e B são os mais importantes no resgate das EROs (Figura 3.7) [Číž, M., et al. 2010; Henning, S. M., et al. 2003], sendo que os flavonóides com múltiplos grupos hidróxilo são referidos como apresentando maior actividade antioxidante contra os radicais peróxido do que os ácidos [Zheng, W., et al. 2001]. Já nos flavonóides glucósidos são obtidos valores inferiores [Zheng, W., et al. 2001].

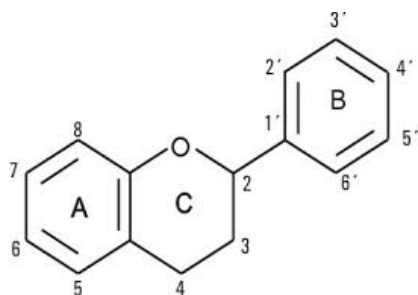
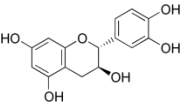
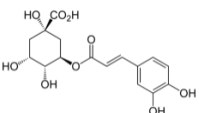
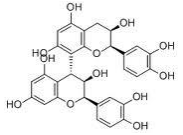
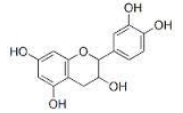
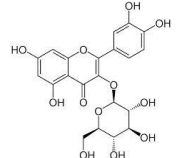
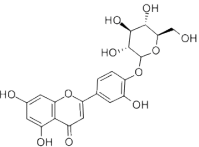


Figura 3.7 – Estrutura básica dos flavonóides. [Adaptado de D'Archivio, M., et al. 2007]

Com o objectivo de identificar os principais compostos responsáveis pela actividade antioxidante, os resultados obtidos utilizando os vários métodos de análise da capacidade antioxidante (ORAC, HORAC, HOSC e CAA) foram correlacionados com a composição dos diferentes extractos. Nesta análise foram considerados todos os extractos obtidos por extracção com solventes pressurizados e por extracção convencional. Os coeficientes de correlação obtidos são apresentados na tabela 3.III.

Tabela 3.III – Correlações entre a actividade antioxidante e a composição fenólica dos extractos de maçã ‘Bravo de Esmolfe’.

Estrutura molecular [Adaptado de: The Pubchem Project]	HOSC	HORAC	ORAC	CAA	Valores de ORAC ($\mu\text{mol ET/g}$)
PT	0,451	0,159	0,596	0,279	-
Flavonóides	-0,440	-0,241	-0,318	-0,294	-
 Catequina	0,282	-0,011	0,493	0,056	27217 [Tabart, J., et al. 2009]
 Ácido clorogénico	0,629	0,434	0,499	0,140	14959 [Tabart, J., et al. 2009]
 Procianidina B2	0,362	0,820	0,453	-0,361	n.e.
 Epicatequina	0,772	0,588	0,864	0,244	17570 [Tabart, J., et al. 2009]
 Quercetina-3-glucósido	0,464	0,256	0,703	0,074	13898* [Tabart, J., et al. 2009]
 Quercetina-4-glucósido	0,576	0,269	0,809	0,471	13898* [Tabart, J., et al. 2009]

*Valor referente à aglicona quercetina; n.e. – valor não encontrado na literatura.

De entre os vários compostos analisados, a epicatequina, a procianidina B2 e os glucósidos de quercetina foram identificados como os principais responsáveis pela actividade antioxidante dos extractos de maçã ($R > 0,7$).

Em particular, a epicatequina foi o composto que apresentou coeficiente de correlação mais elevado para dois métodos de avaliação antioxidante, nomeadamente o

ORAC ($R=0,864$) e o HOSC ($R=0,772$). É de referir que a epicatequina já tinha sido identificada como sendo um dos principais compostos responsáveis pelo valor de ORAC de diferentes variedades de maçã [Serra, A. T., et al. 2010a]. Este resultado pode ser devido ao facto de a epicatequina ser um flavonóide com estrutura simples com grupos hidróxilo em todos os anéis e de ser o composto fenólico presente em maior quantidade nos vários extractos. Para o método ORAC, os glucósidos de quercetina também apresentaram coeficientes de correlação elevados, nomeadamente 0,703 e 0,809 para a quercetina-3-glucósido e quercetina-4-glucósido, respectivamente. Para o método de HORAC, a procianidina B2 foi o que apresentou o maior valor de coeficiente.

A catequina, à semelhança da epicatequina, apresenta os mesmos grupos hidróxilo e uma estrutura simples estando referida na literatura, como tendo um valor de ORAC superior ao da epicatequina [Tabart, J., et al. 2009] (Tabela 3.III) e uma elevada capacidade de absorção e permeabilidade no modelo celular Caco-2 [Deprez, S., et al. 2001]. Assim, era esperado que a catequina apresentasse uma boa correlação com a actividade antioxidante, nomeadamente com o método de ORAC e CAA, como observado pelo estudo realizado por Serra, A. T., et al. 2010a. No entanto, os coeficientes de correlação deste composto foram relativamente baixos, provavelmente devido à menor quantidade existente deste composto nos extractos analisados.

3.2. Parte 2 - Avaliação do efeito neuroprotector em agregados de células NT2 diferenciados por ácido retinóico, em células do sistema nervoso central

A segunda parte deste trabalho teve como objectivo a avaliação da capacidade de neuroprotecção de um extracto natural de maçã contendo quercetina e um extracto natural de bagaço de azeitona rico em hidroxitirosol, num modelo celular 3D do SNC, utilizando agregados de células NTERA-2 (NT2) diferenciadas em neurónios.

Esta linha celular tem sido utilizada em diversos estudos de avaliação da capacidade antioxidante de compostos, nomeadamente o alginato, um oligossacárido antioxidante [Eftekharzadeh, B., et al. 2010a]. As células NTERA-2 são fáceis de cultivar no seu estado indiferenciado e diferenciam-se eficientemente em células neuronais através da adição de ácido retinóico [Hill, E. J., et al. 2012], têm sido usadas como um modelo experimental em estudos de regulação do precursor da proteína amilóide- β (PPA β) e da patogenicidade da doença de Alzheimer [Tamagno, E., et al. 2002]. A maioria dos estudos em que se utiliza esta

linha celular são realizados em modelos em monocamada (2D), como por exemplo os estudos realizados por Eftekharzadeh, B., et al. 2010a; 2010b. A utilização de modelos tridimensionais (3D), relativamente aos modelos em monocamada (2D) permite o estudo da interacção célula-célula e pode ser útil na avaliação de como as células interagem, interpretam e respondem aos sinais do seu ambiente a uma microescala [Meli, L., et al. 2012].

Neste trabalho para o desenvolvimento dos agregados de células NT2 diferenciadas em neurónios foi realizado com ácido retinóico segundo o protocolo já estabelecido pela UTCA do IBET/ITQB-UNL, utilizando um sistema de cultura agitado em suspensão.

Os agregados de células NT2 diferenciadas desenvolvidos por este protocolo e utilizados nesta tese apresentaram uma diferenciação em neurónios de cerca de 40% [Serra, M., et al. 2009] e um diâmetro médio de 150 μ m (Figura 3.8).

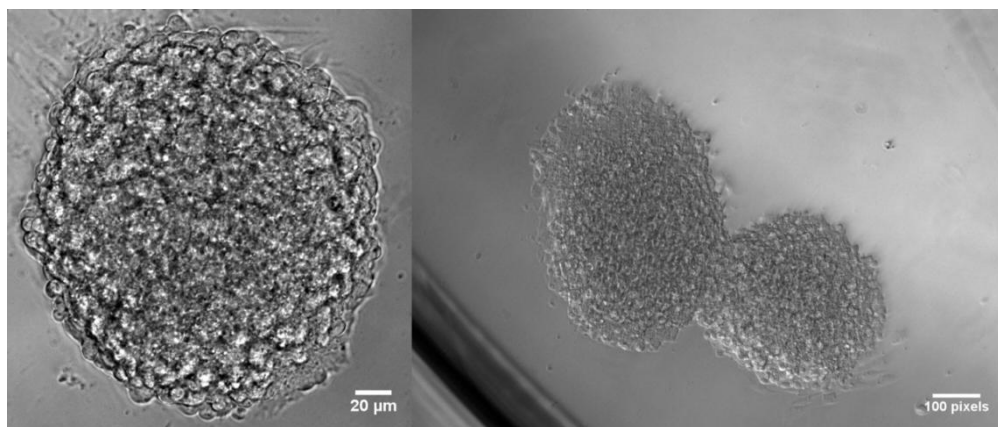


Figura 3.8 – Agregados de células NT2 diferenciadas utilizados para os ensaios de neuroprotecção. (Fotografias obtidas no dia anterior aos ensaios por microscópio invertido (Leica DM IRB). Fotografia trabalhada por FiJi ImageJ® 1.48i.)

Os extractos naturais utilizados neste trabalho apresentaram na sua composição compostos com potencial efeito neuroprotector, nomeadamente a quercetina e o hidroxitirosol. Em particular, a quercetina tem sido descrita como tendo efeito protector ao nível de doenças neurodegenerativas. Estudos com linhas celulares neuronais indicam que a quercetina em testes *in vitro* possui efeito de regulação a nível dos genes e possui capacidade de passar a barreira hematoencefálica [in Huebbe, P., et al. 2010]. No caso do hidroxitirosol, foi demonstrado por Wu, Y. T., 2009 que o hidroxitirosol, à semelhança da catequina, possui capacidade de passar a barreira hematoencefálica. Scarmeas, N. 2006 realizou um estudo com 2258 pacientes mostrando que uma maior adesão à dieta mediterrânica está associada a uma redução da doença de Alzheimer. O hidroxitirosol devido a ser o principal composto presente

no azeite, principal componente da dieta mediterrânica é assim sugerido como tendo as propriedades apresentadas por esta dieta [Charoenprasert, S., et al. 2012]. O efeito neuroprotector do hidroxitirosol foi ainda testado por González–Correa, J. A., et al. 2008 num modelo de hipoxia-reoxigenação em cortes de cérebro de rato, *in vivo* e *in vitro*, mostrando que o hidroxitirosol consegue inibir significativamente o efluxo de LDL numa forma dependente da dose.

Neste trabalho, o extracto de maçã utilizado foi obtido com a condição 60:40 (CO₂:EtHO) (Tabela 3.I) a qual conduziu à obtenção de uma fracção com maior concentração em quercetina (quercetina-3-glucósido de 0,368 mg/g de extracto e de quercetina-4-glucósido de 0,229 mg/g de extracto). O segundo extracto utilizado foi um extracto de bagaço de azeitona rico em hidroxitirosol. Este último extracto foi obtido a partir de um processo patenteado que utiliza métodos de extracção convencionais e processos de separação com membranas. Este extracto apresenta 8×10^3 mg EAG/L em polifenóis totais e 7×10^3 mg/L em hidroxitirosol [Matias, A. A. F., 2008]. Outros compostos identificados no extracto incluem o tirosol e o ácido protocatechuico [Matias, A. A. F., 2008].

Numa primeira fase foi avaliada a toxicidade dos extractos naturais e dos compostos puros no modelo celular em estudo. As concentrações não tóxicas foram utilizadas para avaliação do seu potencial efeito neuroprotector, nomeadamente, pela capacidade de resgate de radicais livres e de prevenção da morte celular induzida por um agente oxidante.

3.2.1. Avaliação da toxicidade

Na figura 3.9 são apresentadas as curvas de toxicidade para todas as amostras testadas no modelo NT2.

Foram testadas concentrações até 40mg/L (132µM) do composto quercetina, tendo como base a revisão realizada por Harwood, M., et al. 2007. Em particular, um estudo realizado por Lee, J. C., et al. 2003 [*in* Harwood, M., et al. 2007] foram incubados timócitos de rato com 50µM de quercetina não se observando toxicidade, mas apresentou actividade antioxidante, deste modo protegendo as células contra apoptose mediada por *stress* oxidativo. Por outro lado, em linhas celulares humanas incubadas com concentrações superiores a 300µM de quercetina observou-se citotoxicidade moderada em fibroblastos embrionários de pulmão (CL₅₀=303µM), mas em células endoteliais da veia umbilical apresentou níveis significativos de citotoxicidade (CL₅₀=61µM) [*in* Harwood, M., et al. 2007], já Suematsu, N.,

et al. 2011 utilizou no seu estudo de avaliação do efeito protector da quercetina numa linha celular neuronal SH-SY5Y uma concentração de 100 μ M de quercetina. Num outro estudo, realizado por Huebbe, P., et al. 2010 foi analisado o efeito de uma dieta rica em quercetina a nível neuronal, obtendo-se um aumento deste composto a nível do plasma (0,12 μ M vs. 2,31 μ M) como do córtex cerebral (0,23nmol/L vs. 0,28nmol/L). Para o composto hidroxitirosol foram testadas as mesmas concentrações que as do com composto quercetina, enquanto para os extractos as concentrações testadas foram determinadas pela concentração presentes dos compostos quercetina, para o extracto de maçã e hidroxitirosol, para o extracto de bagaço de azeitona.

De entre os compostos puros analisados, o hidroxitirosol foi o composto que apresentou maior toxicidade celular, tendo-se obtido viabilidade de 80 e 40% relativamente ao controlo para as concentrações de 20 e 40mg/L, respectivamente. No caso da quercetina verificou-se uma toxicidade de cerca de 30% (viabilidade de 70%) para a maior concentração testada de 40mg/L. O extracto natural de maçã não apresentou toxicidade nas concentrações testadas até 500mg de extracto/L, enquanto o extracto de azeitona apresentou toxicidade na concentração mais elevada testada a qual corresponde a 20mg de hidroxitirosol/L, que poderá estar relacionada com a toxicidade associada ao composto hidroxitirosol.

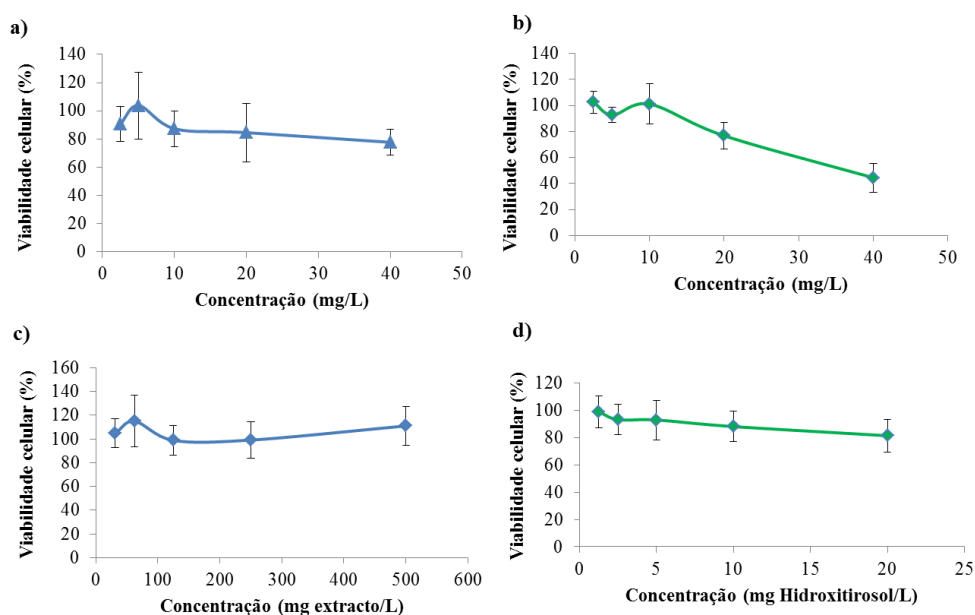


Figura 3.9 – Toxicidade dos extractos e compostos sobre os agregados de células NT2 diferenciadas. Dados apresentados como $\pm$ DP. a) Composto quercetina; b) Composto hidroxitirosol; c) Extracto de maçã; d) Extracto de azeitona. (Tempo de incubação dos extractos de 24h. Viabilidade determinada através do método PrestoBlue®).

3.2.2. Capacidade de resgate das EROs intracelulares

Para o estudo da capacidade de resgate das EROs intracelular foi necessário otimizar as condições de ensaio para o modelo celular NT2, nomeadamente a concentração do marcador fluorescente DCFH-DA e do indutor de *stress*, o hidroperóxido de tert-butilo (t-BHP). Este indutor de *stress* oxidativo foi seleccionado tendo como base estudos anteriores realizados pelo grupo da UTAC do ITQB-UN/IBET que indicaram que o t-BHP induz *stress* oxidativo nas células originando a morte celular (em particular, a concentração de 246 μ M reduz 50% da viabilidade dos agregados de células NT2 diferenciadas ao final de 48h). Nestes ensaios de optimização foram testadas 3 concentrações de DCFH-DA (10, 20, 40 μ M) e duas concentrações de t-BHP (123 e 246 μ M). Na figura 3.10 são apresentados os valores da área abaixo da curva (AAC) dos resultados de fluorescência obtidos para cada condição testada.

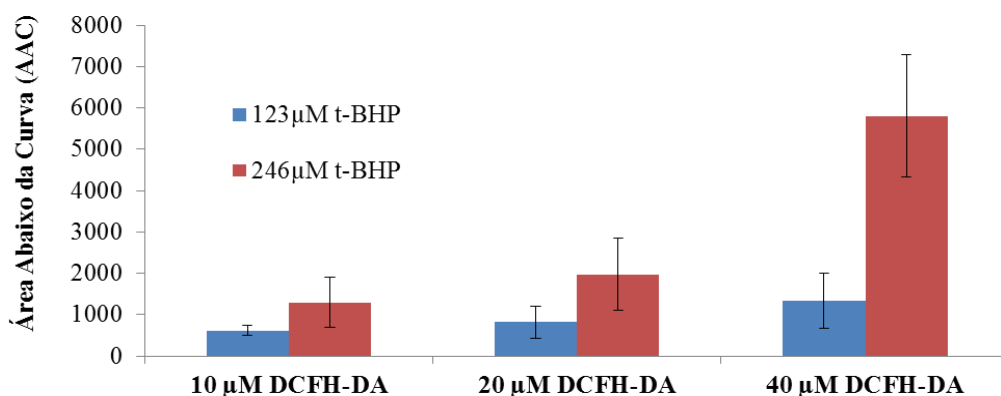


Figura 3.10 – Valores de AAC para os resultados de fluorescência obtidos com diferentes concentrações de DCFH-DA e t-BHP. (Tempo de incubação de 48h. Valores determinado através do método CAA).

Da análise dos resultados, verificou-se um aumento dos valores de AAC para concentrações elevadas de t-BHP. Este resultado era esperado uma vez que ao se utilizar uma maior concentração de indutor, este vai induzir uma maior produção das EROs e consequentemente maiores valores de fluorescência. No entanto, para as concentrações de 10 e 20 μ M de DCFH-DA, não se observou aumento do valor da AAC com a concentração de t-BHP, sugerindo que neste caso a DCFH-DA poderá ser o composto limitante da reacção. Para

a concentração de 40 μ M foi verificada uma diferença de 4 vezes superior entre as duas concentrações de t-BHP.

Tendo em conta os resultados obtidos foram seleccionadas as concentrações de 246 μ M e 40 μ M para o t-BHP e DCFH-DA, respectivamente, para serem utilizadas nos ensaios posteriores com os extractos naturais e os compostos.

Com o objectivo de avaliar a capacidade dos extractos em resgatar as EROs foram testadas duas concentrações não tóxicas dos extractos e compostos. Para os compostos hidroxitirosol e quercetina as concentrações foram 2,5 e 10mg/L e 2,5 e 5mg/L, respectivamente, enquanto para os extractos de azeitona e de maçã as concentrações foram 1,25 e 5mg Hidroxitirosol/L e 31,25 e 62,5 mg de extracto/L, respectivamente. Assim, os agregados foram incubados com os extractos naturais e a formação de EROs intracelulares induzidas pelo t-BHP foi monitorizada com o marcador fluorescente DCFH-DA. Os resultados da inibição das EROs são apresentados na figura 3.11.

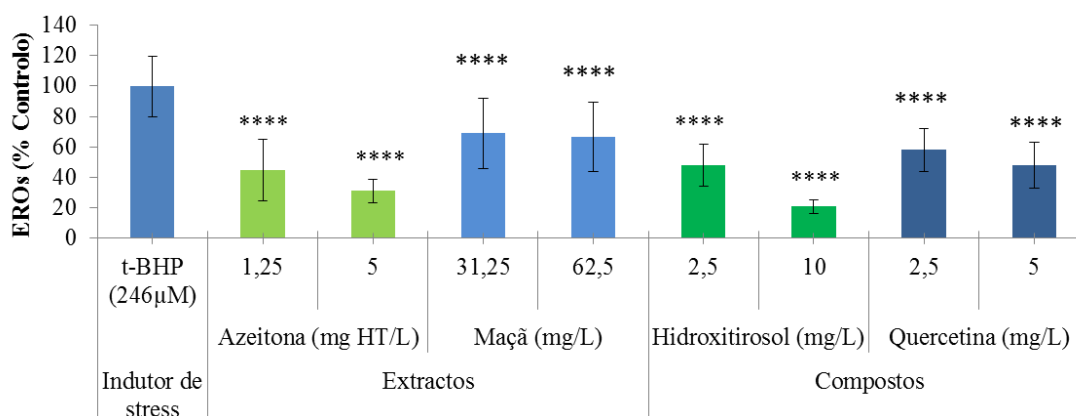


Figura 3.11 – Efeito dos extractos de azeitona e maçã e dos compostos hidroxitirosol e quercetina sobre as EROs. (Dados apresentados como percentagem em relação ao controlo (só com indutor de stress, t-BHP) e $\pm$ DP. As diferenças significativas são expressas em asteriscos (* $P < 0,5$ e **** $P < 0,0001$) análise por two-way ANOVA. **** - Significância em relação ao controlo só com indutor de stress, t-BHP. HT- Hidroxitirosol.)

Os resultados obtidos indicam que todas as amostras diminuíram significativamente a formação das EROs relativamente ao controlo.

Para o extracto de azeitona observa-se para a maior concentração, uma inibição de 69%, enquanto para a menor concentração foi de 55%. Este resultado indica que o efeito que o extracto apresenta é dependente da dose. Observa-se a mesma dependência para o composto hidroxitirosol, em que para a maior concentração foi obtida uma inibição de 80% e para a

menor concentração uma inibição de 51%. O extracto de azeitona sendo um extracto natural possui na sua constituição uma mistura de diferentes compostos, que possuem diferentes actividades e capacidades, podendo existir uma sinergia entre estes diferentes compostos, que aumenta o efeito que o extracto apresenta, explicando assim este resultado. Observa-se ainda que a concentração de 1,25 mg de hidroxitirosol/L do extracto consegue obter a mesma inibição que a apresentada pelo composto na concentração de 2,5mg/L, mostrando assim que o extracto de azeitona apresenta uma capacidade de inibição da formação das EROs de cerca do dobro em comparação com o composto hidroxitirosol. O resultado observado para o extracto é possivelmente e principalmente devido à elevada quantidade em hidroxitirosol. O resultado apresentado pelo composto hidroxitirosol vai de encontro com os resultados existentes na literatura, como por exemplo no estudo realizado por González–Correa, J. A., et al. 2008 que ao analisar o efeito do hidroxitirosol num modelo de hipoxia-reoxigenação em cortes de cérebro de rato, *in vivo* e *in vitro*, mostrou assim que o hidroxitirosol consegue inibir significativamente o efluxo de LDL, também observou à semelhança desta dissertação uma acção do hidroxitirosol dependente da dose. Este resultado também pode ser devido à actividade que o composto hidroxitirosol apresenta *in vitro* de resgate de radicais peróxido, radicais hidróxido, espécies de azoto reactivo, aniões superóxidos, reacções em cadeia de quebra de peroxidação e prevenção da catálise de iões metálicos produzidos a partir das EROs, como revisto por Fernández-Mar, M. I., et al. 2012.

Para o extracto de maçã, observa-se uma inibição da formação das espécies reactivas de 30% para ambas as concentrações testadas. Verifica-se assim que ao contrário do extracto de azeitona, a capacidade de inibição que este extracto apresenta, não é dependente da dose. Para o composto puro quercetina observou-se uma inibição das EROs de 50% para ambas as concentrações, à semelhança do extracto de maçã, a quercetina também não apresenta inibição dependente da dose, estando de acordo com a literatura, nomeadamente a revisão realizada por Harwood, M., et al. 2007, que ao se incubar uma cultura de fibroblastos embrionários de pulmão com quercetina, esta aumenta os níveis de EROs presentes de uma forma não dependente da dose, pode assim explicar o valor elevado de EROs para o extracto de maçã.

Entre os dois compostos, ao comparar-se a mesma concentração, de 2,5 mg/L, observa-se que o composto hidroxitirosol apresenta um maior poder de inibição das EROs, cerca de 10% de diferença, do que o composto quercetina.

3.2.3. Capacidade de prevenção da morte celular

Tendo em conta os resultados obtidos no ensaio de avaliação das EROs intracelulares, o extracto de azeitona e o composto hidroxitirosol foram seleccionados para avaliação da capacidade de prevenção da morte celular. Estes foram os que apresentaram maior capacidade de inibição das EROs intracelulares.

Os resultados do efeito sobre a prevenção da morte celular são apresentados na figura 3.12 para o composto hidroxitirosol e na figura 3.13 para o extracto de azeitona.

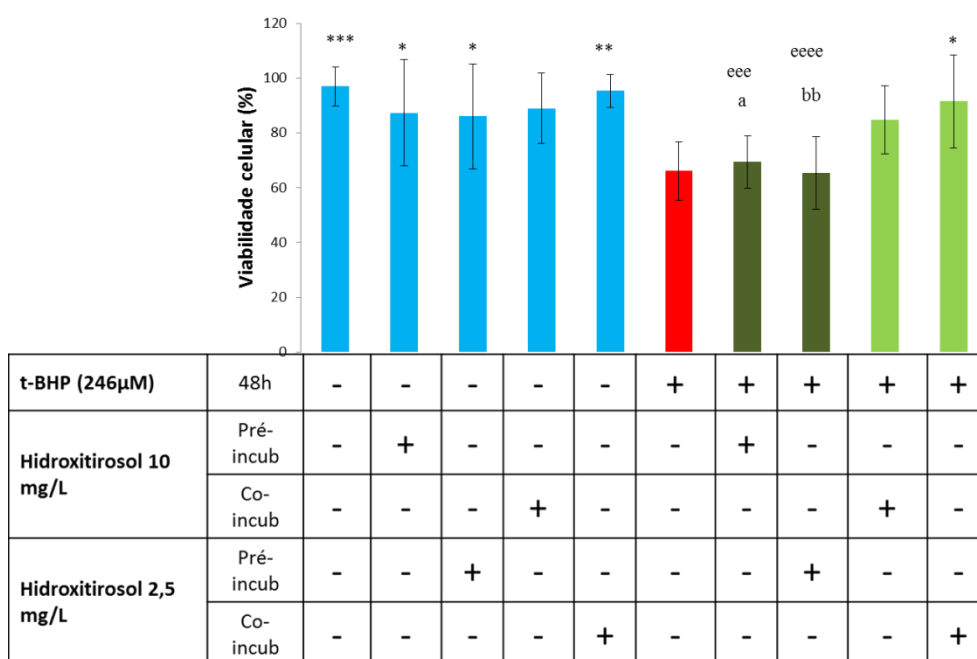


Figura 3.12 – Ensaio de neuroprotecção com o composto hidroxitirosol. (Resultados analisados com o método PrestoBlue®. Dados apresentados como $\pm$ DP. As diferenças significativas são expressas em asteriscos e letras (* $P < 0,5$ e **** $P < 0,0001$) análise por two-way ANOVA. * - Significância em relação ao controlo só com indutor de stress, t-BHP; a – Significância em relação ao controlo de pré-incubação do composto com a concentração 10mg/L, 24h de incubação; b – Significância em relação ao controlo de pré-incubação do composto com a concentração 2,5mg/L, 24h de incubação; c – Significância em relação ao controlo do composto com a concentração 10mg/L com 48h de incubação; d – Significância em relação ao controlo do composto com a concentração 2,5mg/L com 48h de incubação; e – Significância em relação ao controlo de células (sem composto nem indutor de stress, t-BHP)).

Avaliação da Capacidade Antioxidante de Extractos Naturais de Maça e Azeitona Usando Modelos Celulares em Monocamada (2D) e Agregados (3D)

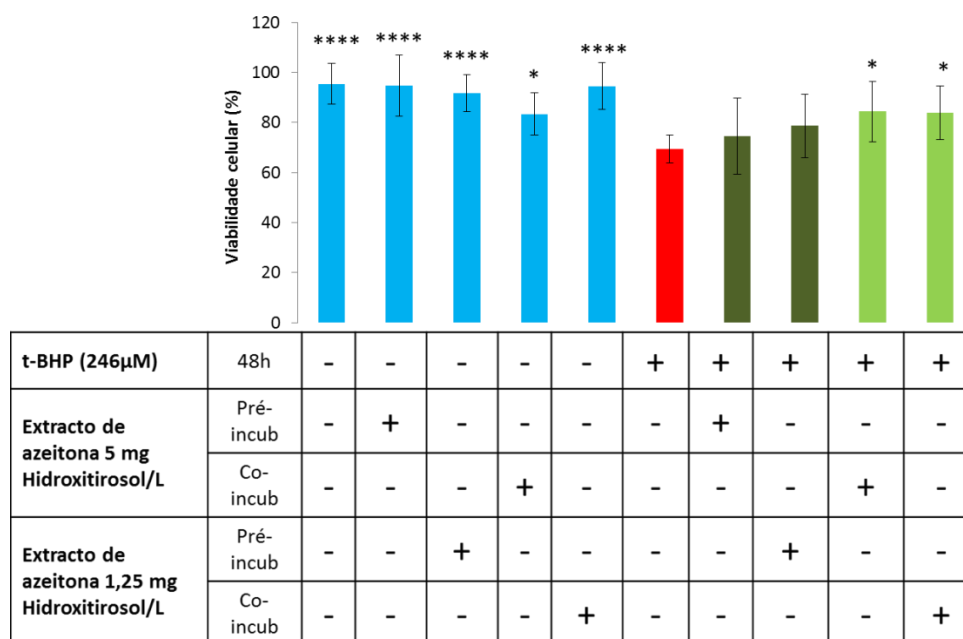


Figura 3.13 – Ensaio de neuroprotecção com o extracto de azeitona. (Resultados analisados com o método PrestoBlue®. Dados apresentados como $\pm$ DP ($P < 0,0001$). * - Significância em relação ao controlo só com indutor de stress, t-BHP; a – Significância em relação ao controlo do composto com a concentração 10mg/L com 24h de incubação; b – Significância em relação ao controlo do composto com a concentração 2,5mg/L com 24h de incubação; c – Significância em relação ao controlo do composto com a concentração 10mg/L com 48h de incubação; d – Significância em relação ao controlo do composto com a concentração 2,5mg/L com 48h de incubação; e – Significância em relação ao controlo de células (sem composto nem indutor de stress, t-BHP)).

Pela análise dos resultados observa-se que o composto hidroxitirosol não apresenta prevenção da morte celular quando é pré-incubado, sendo as viabilidades obtidas muito semelhantes (não significativas) ao controlo (incubação dos agregados só com indutor de *stress*). Já na situação em que o composto hidroxitirosol é co-incubado observa-se prevenção da morte celular. Para o extracto observa-se o mesmo comportamento, isto é, a capacidade neuroprotectora foi verificada apenas quando o extracto é co-incubado com o indutor de *stress* oxidativo. Estes resultados podem ser devido ao facto de na condição em que o extracto ou o composto são pré-incubados, a actividade antioxidante é referente aos compostos que conseguem passar a membrana celular ou os que ficam sobre a membrana celular. No caso em que existe co-incubação o indutor de *stress* e o extracto ou composto são adicionados ao mesmo tempo, assim os compostos presentes no meio extracelular podem estar a prevenir o *stress* oxidativo induzido pelo t-BHP. Num estudo realizado por Eftekharzadeh, B., et al. 2010a, observou-se neuroprotecção na mesma linha celular NT2 em monocamada quando um oligossacárido era pré-incubado e com um tempo de incubação menor. Pode significar assim

que a estrutura tridimensional dos agregados dificulte a difusão dos compostos para o interior das células, fazendo com que não se observe neuroprotecção a quando da pré-incubação.

4. Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho, extractos naturais obtidos por métodos de extracção limpos a partir de refugo de maçã e bagaço de azeitona foram investigados pelo seu potencial antioxidante e neuroprotector, com o objectivo de valorizar estes resíduos e sub-produtos da agro-indústria e explorar a sua aplicação no desenvolvimento de novos fitofármacos ou ingredientes bioactivos.

A maçã da variedade ‘Bravo de Esmolfe’ é uma espécie autóctone de uma zona específica do território português, nomeadamente Cova da Beira, Viseu e Douro sul. Em comparação com outras variedades apresenta uma elevada capacidade antioxidante e o seu refugo tem ainda uma elevada expressão em Portugal. A utilização da tecnologia de extracção por fluidos pressurizados apresentou neste caso, um elevado potencial para a extracção de composto bioactivos, obtendo-se extractos com actividade antioxidante superior a extractos convencionais obtidos do fruto fresco, é uma técnica já utilizada pela indústria agro-alimentar (por exemplo na descafeinação dos grãos de café), considerada verde e segura para a saúde humana. No caso do bagaço de azeitona é interessante referir que o extracto analisado neste trabalho apresentou um potencial superior ao composto puro na inibição de EROs a nível neuronal, permitindo a utilização deste resíduo para tratamento de doenças neuronais com patologia induzida pelo *stress* oxidativo.

Com este trabalho conseguiu-se valorizar dois resíduos resultantes da indústria agro-alimentar, nomeadamente o refugo de maçã, resultante da apanha e o bagaço de azeitona, formado aquando da produção do azeite. Actualmente estes resíduos não possuem valor económico, representando um custo acrescido para a produção dos produtos maçã e azeite, podendo incrementar o valor dos produtos finais.

Este trabalho apresentou ainda uma nova abordagem para a estratégia de avaliação de compostos naturais adquiridos através da dieta, a nível neuronal. Esta nova abordagem permite a identificação em larga escala de compostos bioactivos presentes na dieta, tanto a nível da capacidade de se difundirem mais facilmente pela estrutura tridimensional como a nível da capacidade de neuroprotecção, recorrendo-se a um modelo 3D robusto de células com uma elevada capacidade de se diferenciarem em células neuronais. Este modelo 3D permite a diferenciação num único passo das células NT2 nas diferentes células existentes *in vivo* no SNC, formando assim uma interligação tridimensional entre as células, simulando

tanto o comportamento observado nos sistemas *in vivo* como a natural difusão dos compostos nestes organismos. Diminui-se assim o recurso a testes em animais, estes mais dispendiosos e cada vez mais sujeitos a regras restritivas.

Este trabalho contribui ainda para o debate, em torno da importância da dieta na prevenção de várias doenças, como o cancro, doenças neuronais e outras em que a sua patologia é induzida pelo *stress* oxidativo, através dos efeitos nefastos das EROs.

Estudos futuros devem incidir sobre o efeito dos extractos no metabolismo celular dos agregados, difusão dos compostos pelo agregado, com o objectivo de se elucidar o comportamento dos compostos sobre as vias metabólicas. Seria também interessante identificar as estruturas moleculares que possuem maior capacidade de proteger e de se difundirem pelas células que compõem o agregado e por fim, a identificação de biomarcadores de *stress* oxidativo neuronal.

5. Referências

- Adil, Í. H., Çetin, H. Í., Yener, M. E., & Bayindirli, A. (2007). Subcritical (carbon dioxide+ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. *Journal of Supercritical Fluids* 43, pp. 55-63.
- Alonso-Salces, R. M., Korta, E., Barranco, A., Berruta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2001). Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *Journal of Chromatography A* 933, 37-43.
- Arts, I. C. W., & Hollman, P. C. H. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 317S-325S.
- Bazoti, F. N., Bergquist, J., Markides, K., & Tsarbopoulos, A. (2006). Noncovalent interaction between amyloid- β -peptide (1-40) and oleuropein studied by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 17(4), 568-575.
- Behl, C., & Moosmann, B. (2002). Antioxidant Neuroprotection in Alzheimer's disease as Preventive and Therapeutic Approach. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 33(2), 182-191.
- Berna, A., Cháfer, A., Montón, J. B. (2001). High-pressure solubility data of the system resveratrol (3) + ethanol (2) + CO₂ (1). *Journal of Supercritical Fluids* 19, 133-139.
- Bonany, J., Buehler, A., Carbó, J., Codarin, S., Donati, F., Echeverria, G., et al. (2013). Consumer eating quality acceptance of new apple varieties in different European countries. *Food Quality and Preference* 30, 250-259.
- Boncler, M., Rózsalski, M., Krajewska, U., Podsędek, A., & Watala, C. (2014). Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 69, 9-16.

- Butterfield, D. A., Castegna, A., Pocernich, C. B., Drake, J., Scapagnini, G., & Calabrese, V. (2002). Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 444-461.
- Cardoso, S. M., Rego A. C., Penacho N., & Oliveira C. R. (2004). Apoptotic cell death induced by hydrogen peroxide in NT2 parental and mitochondrial DNA depleted cells. *Neurochemistry International* 45, 693-698.
- Ceymann, M., Arrigoni, E., Schärer, H., Nising, A. B., & Hurrell, R. F. (2012). Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *Journal of Food Composition and Analysis* 26, 128-135.
- Charoenprasert, S., & Mitchell A. (2012). Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 7081-7095.
- Cheli, F., & Baldi, A. (2011). Nutrition-Based Health: Cell-Based Bioassays for food antioxidant activity evaluation. *Journal of Food Science* 76(9).
- Chong, Z. Z., Li, F. & Maiese K. (2005). Stress in the brain: novel cellular mechanisms of injury linked to Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews* 49, 1-21.
- de Arriba, S. G., Wegner, F., Grüner, K., Verdaguer, E., Palas M., Camins, A., et al. (2006). Different capacities of various NMDA receptor antagonists to prevent ischemia-induced neurodegeneration in human cultured NT2 neurons. *Neurochemistry International* 49, 466-474.
- de Carvalho, A., Serra, A. T., Lopes, A., Sepodes, B., Duarte, C., Fernandes, F., et al. (2009). *Maçãs tradicionais de eleição*. Lisboa: Agro-Manual Publicações.
- Deprez, S., Mila, I., Huneau, J.-F., Tome, D., & Scalbert, A. (2001). Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial caco-2 cells. *Antioxidants & Redox Signaling* 3(6), 957-967.
- Dok-Go, H., Lee, K. H., Kim, H. J., Lee, E. H., Lee J., Song, Y. S., et al. (2003). Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin

and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. saboten. *Brain Research* 965, 130-136.

Dumont, M., & Beal, M. F. (2011). Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radical Biology & Medicine* 51, 1014-1026.

Dutra, R. C., Leite, M. N., & Barbosa N. R. (2008). Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds. *International Journal of Molecular Sciences* 9, 606-614.

D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovanni, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 43, 4: 348-361.

Eftekharzadeh, B., Khodagholi, F., Abdi, A., & Maghsoudi N. (2010a). Alginate protects NT2 neurons against H₂O₂-induced neurotoxicity. *Carbohydrate Polymers* 79, 1063-1072.

Eftekharzadeh, B., Maghsoudi, N., & Khodagholi, F. (2010b). Stabilization of transcription factor Nrf2 by tBHQ prevents oxidative stress-induced amyloid β formation in NT2N neurons. *Biochimie* 92, 245-253.

Erdogan, S., Ates, B., Durmaz G., Yilmaz I., & Seckin T. (2011). Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food and Chemical Toxicology* 49, 1592-1597.

Feliciano, R. P., Antunes, C., Ramos, A., Serra, A. T., Figueira, M. E., Duarte, C. M. M., Carvalho A., Bronze, M. R. (2010). Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical and sensory evaluation. *Journal of Functional Foods* 2, 35-45.

Fennell, M., Khawaja, X. Z., Cockett M. I., & Wood, A. (1998). Enhanced neuronal differentiation of NTera-2 cells expressing neuronally restricted β 2 adrenergic receptor. *Brain Research* 799, 243-249.

- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry* 130, 797-813.
- Fischer, H. S., Berti I., Schatz, D. S., Humpel, C., & Saria, A. (2000). Retinoic acid treatment enhances the acetylcholine contents in the human teratocarcinoma cell line NTera-2. *Regulatory Peptides* 96, 59-63.
- Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sanchés, M., Jerez, M., Pinelo, M., et al. (2008). Polyphenols from plant materials: Extraction and antioxidante power. *Electronic Jornal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 7, 3210-3216.
- Gabinete de Planeamento e Políticas [GPP]. (2007). <http://www.gpp.pt/pbl/Diagnosticos/SubFileiras/Maca.pdf>. Acedido a 18 de Dezembro, 2013 de GPP em <http://www.gpp.pt>.
- Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65, 45-80.
- González, J., Cruz, J. M., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2004). Production of antioxidants from *Eucalyptus globulus* wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates. *Food Chemistry* 84, 243-251.
- González-Correa, J. A., Navas, M. D., Lopez-Villodres, J. A., Trujillo, M., Espartero, J. L., & de La Cruz, J. P. (2008). Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neuroscience Letters* 446(2-3), 143-146.
- Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G.M., & Lines, T. C. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology* 45, 2179-2205.

- He, G.-q., Xiong, H.-p., Chen, Q.-h., Ruan, H., Wang, Z.-y., & Traoré, L. (2005). Optimization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Zhejiang University SCIENCE* 6B(10), 999-1004.
- Henning, S. M., Fajardo-Lira, C., Lee, H. W., Youssefian, A. A., Go, V. L. W., & Heber, D. (2003). Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. *Nutrition and Cancer* 45(2), 226-235.
- Hill, E. J., Jiménez-González, C., Tarczyluk, M., Nagel, D. A., Coleman, M. D., H. & Parri, R. (2012). NT2 Derived Neuronal and Astrocytic Network Signalling. *PLoS ONE* 7(5).
- Huebbe, P., Wagner, A. E., Boesch-Saadatmandi, C., Sellmer, F., Wolfram, S., Rimbach, G. (2010). Effect of dietary quercetin on brain quercetin levels and the expression of antioxidant and Alzheimer's disease relevant genes in mice. *Pharmacological Research* 61, 242-246.
- Instituto Nacional de Estatística [INE]. (2013). *Estatísticas Agrícolas 2012*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística.
- Jornal de Notícias [JN]. (2011). http://www.jn.pt/PaginaInicial/Sociedade/Interior.aspx?content_id=1831290&page=1. Acedido a 19 de Dezembro, 2013 de JN em www.jn.pt.
- Jornal SOL [SOL]. (2013). http://sol.sapo.pt/inicio/Vida/Interior.aspx?content_id=94016. Acedido a 10 de Dezembro, 2013 de SOL em www.sol.sapo.pt.
- Junior, M. R. M., Leite, A. V., Romanelli, N., & Dragano, V. (2010). Supercritical fluid extraction and stabilization of phenolic compounds from natural sources – Review (Supercritical Extraction and Stabilization of Phenolic Compounds), *The Open Chemical Engineering Journal* 4, 51-60.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods* 2, 41-60.

- Konczak, I., Okuno, S., Yoshimoto, M., & Yamakawa, O. (2004). Caffeoylquinic acids generated *in vitro* in a high-anthocyanin-accumulating sweet potato cell line. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 5, 287-292.
- Kondziolka, D., Whechsler, L. (2008). Stroke repair with cell transplantation: neuronal cells, neuroprogenitor cells and stem cells. *Neurosurgical Focus* 24, 3-4.
- Koşar, M., Göger, F., & Can Başer K. H. (2011). *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia halophila* Hedge from Turkey. *Food Chemistry* 129, 374-379.
- Lee, H.-J., Lee, H.-J., Lee, E.-O., Ko, S.-G., Bae, H.-S., Kim, C.-H. et al. (2008). Mitochondria-cytochrome C-caspase-9 cascade mediates isorhamnetin-induced apoptosis. *Cancer Letters* 270, 342-353.
- Li, J., & Jiang, Y. (2007). Review: litchi flavonoids: isolation, identification and biological activity. *Molecules* 12, 745-758.
- Lo, K. M., & Cheung, P. C. K., (2005). Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. alba. *Food Chemistry* 89, 533-533.
- Lorenzo, J. M., González-Rodríguez, R. M., Sánchez, M., Amado, I. R., & Franco, D. (2013). Effects of natural (grape seed and Chestnut extracts) and synthetic antioxidants (butylatedhydroxytoluene, BHT) on the physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of dry cured sausage “chorizo”. *Food Research International* 54, 611-620.
- Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M. T., Zafrilla. M. P., Gabaldón, J. A., & Núñez-Delicado, E. (2011). Comparative study of diferente methods to measure antioxidante activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. *Food and Chemical Toxicology* 49, 1255-1260.
- Macdonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., & Garg, M. L. (2006). Methodology for determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of th Science of Food and Agriculture* 86, 2046-2056.

- Meli, L., Jordan, E. T., Clark, D. S., Linhardt, R. J., & Dordick, J. S. (2012). Influence of a three-dimensional, microarray environment on human Cell culture in drug screening systems. *Biomaterials* 33, 9087-9096.
- Migliore, L., & Coppedè, F. (2009). Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research* 674, 73-84.
- Moore, J., Yin, J.-J., & Yu, L. (2006). Novel fluorometric assay for hydroxyl radical scavenging capacity (HOSC) estimation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 617-626.
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta* 703, 8-18.
- Ono, K., Hamaguchi, T., Naiki, H., & Yamada, M. (2006). Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762, 575-586.
- Paquet-Durand, F., Tan S., & Bicker, G. (2003). Turning teratocarcinoma cells into neurons: rapid differentiation of NT-2 cells in floating spheres. *Developmental Brain Research* 132, 161-167.
- Plaza, M., Abrahamsson, V., & Turner, C. (2013). Extraction and neoformation of antioxidant compounds by pressurized hot water extraction from apple byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 61, 5500–5510.
- Poejo, J., (2011). Evaluation of *Opuntia spp.* Bioactive products as promising natural chemotherapeutical agents- an *in vitro* approach. Dissertation presented at Faculdade de Ciência e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa to obtain master degree in Biotecnologia, supervisor by Doutora Ana Teresa Serra, Lisbon.
- Radio, N. M., & Mundy, W. R. (2008). Development neurotoxicity testing *in vitro*: Models for assessing chemical effects on neurite outgrowth. *NeuroToxicology* 29, 361-376.
- Reis, S. F., Rai, D. K., & Abu-Ghannam, N. (2012). Water at room temperature as a solvent for extraction of apple pomace phenolic compounds. *Food Chemistry* 135, 191-1998.

- Reis, S. F. A. R., Rocha, S. M., Barros, A. S., Delgadillo, I., & Coimbra, M. A. (2009). Establishment of the volatile profile of 'Bravo de Esmolfe' apple variety and identification of varietal markers. *Food Chemistry* 113, 513-521.
- Rocha, A. M. C. N., Barreiro, M.G., & Morais, A.M.M.B. (2004). Modified atmosphere package for apple 'Bravo de Esmolfe'. *Food Control* 15, 61–64.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Raanldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A., & Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology Toxicology* 21, 1-26.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a Whole Diet. *Food Chemistry* 101, 492-501.
- Serra, A. T., Duarte, R. O., Bronze, M. R., Duarte, C. M. M. (2011a). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry* 125, 318-325.
- Serra, A. T., Matias, A. A., Almeida, A. P. C., Bronze, M. R., Alves, P. M., de Sousa, H. C., et al. (2011b). Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 2. Evaluation of SCF extracts as promising natural chemotherapeutical agents. *The Journal of Supercritical Fluids* 55, 1007-1013.
- Serra, A. T., Matias, A. A., Frade, R. F. M., Duarte, R. O., Feliciano, R. P., Bronze, M. R., et al. (2010a) Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2 – Antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Functional Foods* 2, 46-53.
- Serra, A. T., Poejo, J., Matias, A. A., Bronze, M. R., & Duarte, C. M. M. (2013). Evaluation of *Opuntia* spp. Derived products as antiproliferative agentes in human colon cancer cell line (HT29). *Food Research International* 54, 892-901.
- Serra, A. T., Seabra, I. J., Bronze, M. R., de Sousa, H. C., & Duarte, C. M. M. (2010b). Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1:

- Recovery of extracts fractions rich in bioactive compounds. *Journal of Supercritical Fluids* 55, 184-191.
- Serra, M., Brito, C., Costa, E. M., Sousa, M. F. Q., & Alves, P. M.. (2009). Integrating human stem cell expansion and neuronal differentiation in bioreactors. *BMC Biotechnology* 9:82.
- Scarmeas, N., Stern, Y., Tang, M. X., Mayeux, R., & Luchsinger, J. A. (2006). Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 59(6), 912–921.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-158.
- Smetanová, L., Štětinová, V., Svoboda, Z., & Květina, J. (2011). Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and biowaiver. *Acta Medica (Hradec Králové)* 54, 3-8.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T.. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* 579, 200-213.
- Suematsu, N., Hosoda, M., & Fujimori, K. (2011). Protective effects of quercetin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters* 504, 223-227.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., & Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* 113, 1226-1233.
- Tamagno, E., Bardini, P., Obbili, A., Vitali, A., Borghi, R., Zaccheo, D. et al. (2002). Oxidative stress Increases Expression and Activity of BACE in NT₂ Neurons. *Neurobiology of Disease* 10, 279-288.
- Terrasso, A. P. (2012). Development of novel human cellular models for neurotoxicity studies. Dissertação apresentada na Faculdade de Ciência e Tecnologia –

Universidade Nova de Lisboa para obter o grau de mestre em Genética Molecular e Biomedicina, orientada por Doutora Ana Catarina Brito, Lisboa.

Matias, A. A. F. (2008). Desenvolvimento de óleos alimentares funcionais - Da ciência à aplicação. Dissertação apresentada no Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier - Universidade Nova de Lisboa para obter o grau de doutor em Química, orientada por Doutora Catarina Duarte, Lisboa.

Wolfe, K. L., & Liu, R. H. (2007). Cellular Antioxidant Activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8896-8907.

Wolfe, K. L., Kang, X., He, X., Dong, M., Zhang, Q. & Liu, R. H. (2008). Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 8418-8426.

World Apple and Pear Association [WAPA]. (2013). http://www.wapa-association.org/asp/page_1.asp?doc_id=452. Acedido a 17 de Dezembro, 2013 de WAPA em www.wapa-association.org/.

Wu, Y. T., Lin, L. C., & Tsai, T. H. (2009). Measurement of free hydroxytyrosol in microdialysates from blood and brain of anesthetized rats by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1216(16), 3501–3507.

van der Woude, H., Boersma, M. G., Alink, G. M., Vervoort, J., Rietjens, I. M. C. M. (2006). Consequences of quercetin methylation for its covalent glutathione and DNA adduct formation. *Chemico-Biological Interactions* 160, 193-203.

Vatai, T., Škerget, M., & Knez, Ž. (2009). Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering* 90, 246-254.

Zheng, W., & Wang, S. K. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5165-5170.

- Zulueta, A., Esteve M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidante capacity of food products. *Food Chemistry* 114, 310-316.
- Číž, M., Čížová H., Denev P., Kratchanova M., Slavov A., & Lojek A. (2010). Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control* 21, 518-523.

6. Apêndices

6.1. Apêndice A – Rectas de calibração

6.1.1. Recta de calibração para a determinação dos polifenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

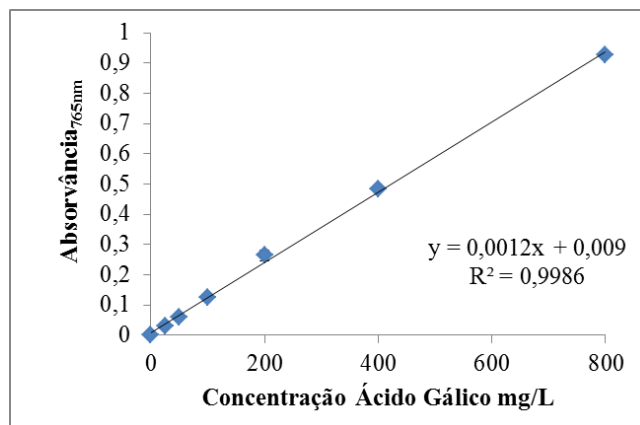


Figura 6.1 – Recta de calibração para a determinação dos polifenóis totais

6.1.2. Recta de calibração de Quercetina utilizada na quantificação do teor de flavonóides totais nos extractos de maçã (dados obtidos no detector de díodos ao c.d.o. de 360nm)

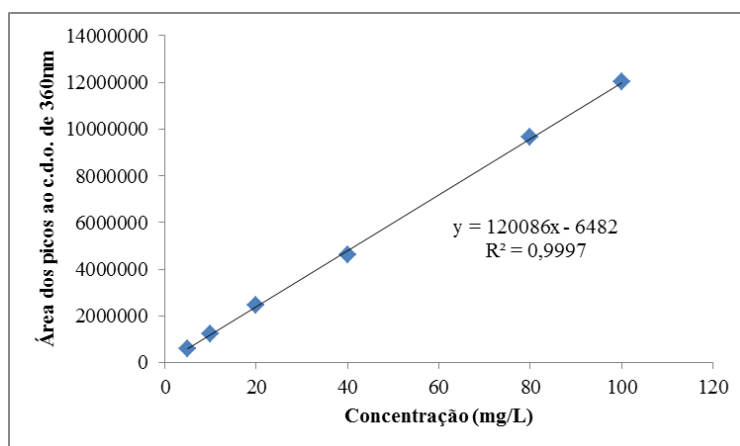


Figura 6.2 – Recta de calibração de Quercetina utilizada na quantificação do teor de flavonóides totais

6.2. Apêndice B - Preparação de soluções

6.2.1. Tampão fosfato salino (PBS) 75mM a pH 7,4

Para 1 L de tampão, pesou-se:

- NaCl: 8g;
- KH_2PO_4 : 1,53g;
- $\text{HNa}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 10,8118g;
- KCl: 0,202g

Perfez-se o volume com 1L de H_2O destilada e colocou-se em agitação durante alguns minutos, até dissolver os sais. Acertou-se o pH a 7,4 e armazenou-se a 4°C até ao seu uso.

6.2.2. Tampão fosfato de sódio (SPB) 75mM a pH de 7,4

Para um volume de 500mL, pesou-se:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 1,17g;
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 5,17g

Perfez-se o volume com 500mL de H_2O MilliQ e colocou-se em agitação durante alguns, até dissolver os sais. Acertou-se o pH a 7,4 com $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (para diminuir o valor de pH) ou $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (para aumentar) e armazenou-se a 4°C até ao seu uso.