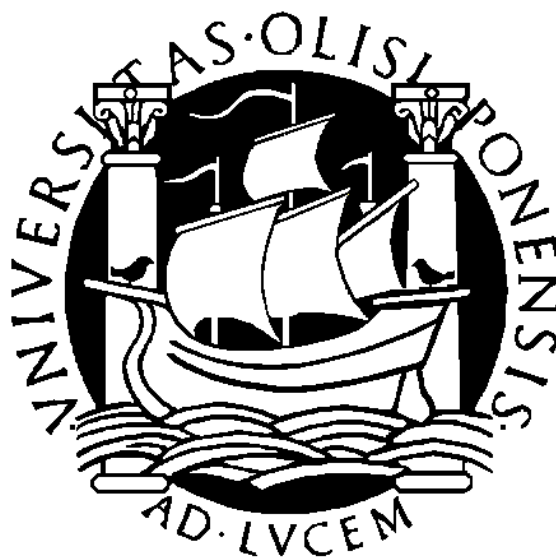


UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Farmácia



**Avaliação da atividade anti-inflamatória de um
extrato de framboesa na Artrite Reumatóide**

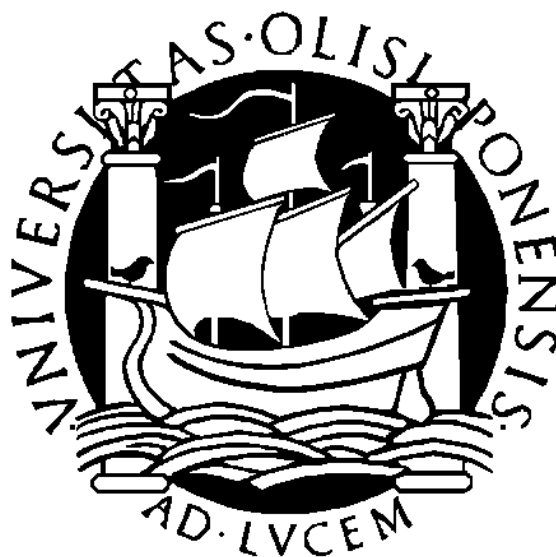
Cassius Francisco de Andrade Freitas

**Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos
Alimentos**

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Farmácia



**Avaliação da atividade anti-inflamatória de um
extrato de framboesa na Artrite Reumatóide**

Cassius Francisco de Andrade Freitas

**Dissertação orientada por Prof. Doutor Bruno Sepodes e
co-orientada por Prof. Doutora Maria Eduardo Figueira**

2011

Índice

Prólogo

Lista de Abreviaturas.....6

Resumo.....9

Palavras-chave

Abstract.....10

Keywords

1. Introdução.....11

1.1 Cultura da Framboesa.....13

1.2 Composição química das framboesas.....14

1.3 Capacidade antioxidante.....18

1.4 Biodisponibilidade/Metabolismo dos flavonóides, ácido elágico e derivados.....21

1.5 Inflamação.....24

1.6 Inflamação aguda.....25

1.7 Inflamação crónica.....29

1.8 Fisiologia da Artrite Reumatóide.....31

2. Objetivos do trabalho.....34

3. Materiais e Métodos.....35

3.1 Materiais

3.1.1 Ensaio de caracterização química

3.1.2 Ensaio *in vivo*.....36

3.2 Métodos.....37

3.2.1 Preparação do extrato rico em compostos fenólicos

3.2.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....38

3.2.2.1 Análise pelo método Folin-Ciocalteu - Preparação de solução padrão de ácido gálico.....39

3.2.2.2 Análise de soluções padrões de Catequina para construção da reta de calibração

3.2.2.3 Análise do teor de compostos fenólicos totais da amostra

3.2.3 Determinação do teor de flavonóides totais

3.2.3.1 Procedimento para determinar o teor de flavonóides totais numa amostra - Preparação das soluções auxiliares

3.2.3.2 Preparação de soluções padrão de Catequina.....40

3.2.3.3	Análise das soluções padrões de Catequina para construção da reta de calibração	
3.2.3.4	Análise do teor de flavonóides totais da amostra	
3.2.4	Determinação do teor de antocianinas totais.....	41
3.2.4.1	Procedimento para determinar o teor de antocianinas totais numa amostra – Preparação das soluções auxiliares	
3.2.4.2	Preparação das soluções padrão de Cianidina-3-Glucósido e análise dessas soluções para construção da reta de calibração	
3.2.4.3	Análise do teor de antocianinas da amostra	
3.2.5	Determinação do teor de Taninos hidrolisáveis.....	42
3.2.5.1	Procedimento para determinar o teor de taninos hidrolisáveis numa amostra – Preparação das soluções auxiliares	
3.2.5.2	Preparação de soluções padrão de ácido tânico	
3.2.5.3	Análise das soluções padrão de ácido tânico para construção da reta de calibração	
3.2.5.4	Análise do teor de taninos hidrolisáveis da amostra	
3.2.6	Determinação do teor de taninos condensados.....	44
3.2.6.1	Procedimento para determinar o teor de taninos condensados numa amostra – Preparação das soluções auxiliares	
3.2.6.2	Preparação de soluções padrão de Catequina	
3.2.6.3	Análise das soluções padrão de Catequina para construção da reta de calibração	
3.2.6.4	Análise do teor de taninos condensados da amostra	
3.2.7	Análise cromatográfica (HPLC-DAD-ED).....	47
3.2.8	Análise cromatográfica (HPLC-MS/MS).....	48
3.2.9	Determinação da atividade antioxidante – ORAC, HORAC e CAA.....	49
3.2.9.1	Método ORAC	
3.2.9.2	Método HORAC	
3.2.9.3	Método CAA	
3.3	Avaliação da ação anti-inflamatória do extrato de framboesas – Ensaio <i>in vivo</i>	51
3.3.1	Modelo de edema da pata induzido pela carragenina	
3.3.1.1	Desenho e procedimento experimental	
3.3.1.2	Expressão dos resultados e análise estatística	
3.3.2	Modelo da Artrite Reumatóide.....	53

3.3.2.1	Desenho e procedimento experimental	
3.3.2.2	Expressão dos resultados e análise estatística	
4.	Resultados e discussões.....	55
4.1	Caracterização em compostos fenólicos	
4.1.1	Determinação do teor de compostos fenólicos totais	
4.1.2	Determinação do teor de flavonóides totais	
4.1.3	Determinação do teor de antocianinas totais.....	56
4.1.4	Determinação do teor de taninos hidrolisáveis.....	57
4.1.5	Determinação do teor de taninos condensados	
4.2	Caracterização dos compostos fenólicos por HPLC-DAD-ED.....	58
4.3	Análise cromatográfica (HPLC-MS/MS).....	66
4.4	Determinação da atividade antioxidante – ORAC, HORAC e CAA.....	70
4.5	Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato.....	71
4.5.1	Modelo do edema da pata induzido pela carragenina	
4.5.2	Modelo da Artrite Reumatóide.....	72
5.	Conclusão.....	75
6.	Referências Bibliográficas.....	77
7.	Anexos.....	86

Prólogo

“Em relação a todos os atos de iniciativa e de criação, existe uma verdade fundamental cujo desconhecimento mata inúmeras idéias e planos esplêndidos: a de que no momento em que nos comprometemos definitivamente, a providência move-se também. Toda uma corrente de acontecimentos brota da decisão, fazendo surgir a nosso favor toda sorte de incidentes e encontros e assistência material que nenhum homem sonharia que viesse em sua direção. O que quer que você possa fazer ou sonhe que possa, faça. Coragem contém genialidade, poder e magia. Comece agora.”

Von Goethe

Este trabalho foi concretizado com a colaboração e apoio de diversas pessoas as quais gostaria de manifestar o meu agradecimento.

Ao Senhor Professor Doutor Bruno Sepodes pela orientação e apoio durante o trabalho.

À Senhora professora Doutora Maria Eduardo Figueira, um agradecimento muito especial pela paciência que teve comigo e por ter me dado a oportunidade de ter trabalhado consigo e ter partilhado de tão agradável relacionamento ao longo desta orientação.

À Professora Doutora Rosário Bronze pelo apoio e compreensão ao longo deste trabalho e pela sempre disponibilidade em me receber.

Ao Senhor Professor Doutor Rui Pinto e ao colega João Rocha do laboratório de Farmacologia pelo apoio nos ensaios finais deste trabalho.

Ao Senhor Professor Doutor Luis Vilas Boas pelo apoio dado durante as práticas realizadas no laboratório do ITQB.

Ao ITQB por disponibilizar o seu laboratório para a realização do trabalho de caracterização química e à colega Joana por tornar a nossa integração no laboratório mais fácil.

Ao laboratório de Nutracêuticos do IBET/ITQB, muito obrigado pela colaboração na realização dos ensaios de avaliação da capacidade antioxidante, especificamente à Doutora Catarina Duarte, à Doutora Teresa Serra, à Doutora Ana Matias e toda equipe.

À Senhora Professora Cristina Marques pela colaboração na realização das radiografias dos animais e interpretação dos resultados.

Ao Laboratório de Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massa da Universidade de Lisboa, ao colega João Ferreira e à Ana Teresa Mata.

É um agradecimento muito especial à colega Elsa Mecha pelas palavras amigas nos momentos mais difíceis, pelo city tour pelas redondezas de Lisboa, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório e por ser tão boa influência. Muito obrigado pela sua amizade.

Aos professores da primeira parte do curso.

À Senhora Professora Doutora Matilde Castro coordenadora deste mestrado pela assistência nas questões burocráticas.

A todos colegas da minha turma de mestrado, pela amizade e pelo apoio mútuo.

Especialmente à minha família por permitir que tudo isto fosse possível. Meu agradecimento e meu amor.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte diretamente ou indiretamente da realização deste trabalho.

Lista de Abreviaturas

AIC- artrite induzida por colagénio
ANOVA- análise de variância
Aprox.- aproximadamente
AR- artrite reumatóide
BLys- estimulador de linfócito-B
CAA- atividade antioxidante celular
Caco-2- células de carcinoma de cólon humanas
CAT- catalase
Cox- ciclooxigenase
CII- colagénio tipo II
DAD- detector de fotodíodos
DHA- ácido docosaexaenóico
DNA- ácido desoxirribonucleico
DO- densidade ótica
DP- desvio padrão
DPR- desvio padrão relativo
EA- ácido elágico
ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) - ensaio imunoenzimático de detecção de anticorpos específicos no plasma
EPA- ácido eicosapentaenóico
Eq. – equivalente
ETS- elagitaninos
FCPM- fator de correção de peso molecular
FD- fator de diluição
G-CSF- fator estimulador de colónias granulócitos
GM-CSF - fator estimulador de colónias granulócito-monócito
GPx- glutathiona peroxidase
HHDP- ácido hexahidroxidifénico
HIV- vírus da imunodeficiência humana
HORAC- capacidade antioxidante do radical hidroxil
HPLC- cromatografia líquida de alta eficiência
IFN- δ - interferão gama
IL-1 β - interleucina 1 β
iNOS- óxido nítrico-sintase induzida
I.p.- administração intra-peritoneal

LDLs- lipoproteínas de baixo peso molecular
LQ- limite de quantificação
LTB4- leucotrieno 4
M-CSF- fator estimulador de colónias monócitos
MHC- antígeno do complexo principal de histocompatibilidade
MMPs- metaloproteínas da matriz
MPO- mieloperoxidase
MRM- monitorização de reação múltipla
MS- espectro de massa
NFkB- fator de indução nuclear -κB
NO- monóxido de azoto
ORAC- capacidade de absorção do radical oxigénio
PF- peso fresco
PGs- prostaglandinas
PGD₂—prostaglandina D₂
PGJ₂ – prostaglandina J₂
PMN- polimorfonucleares
p.o (per os) – administração oral
Ref- referência
RNS – espécies reativas do azoto
ROS- espécies reativas de oxigénio
SOD- superóxido dismutase
TGFβ1- Fator de transformação do crescimento β1
TNF-α- fator de necrose tumoral
Tr- tempo de retenção
UV- ultra-violeta
vs- versus
15-LO – lipoxigenase
5-HT - 5-hidroxitriptamina (serotonina)

Unidades:

°C- graus celsius
CAE- equivalentes de ácido cafeico
cm- centímetros
Da- dalton

EAG- equivalentes de ácido gálico
EAT- equivalente de ácido tânico
ECT- equivalente de catequina
ECG- equivalente de cianidina-3-glucósido
eV- elétron-volt
g- grama
Hz- hertz
Kg- quilograma
kV- quilovolt
L- litro
M-molar
mg- miligrama
min- minutos
mL- mililitros
mm- milímetro
mol- número de moles
N- normal
nm- nanómetro
pg- picograma
Ppm- partes por milhão
QE- equivalente de quercetina
rpm- rotações por minuto
s- segundo
TEAC- capacidade antioxidante em equivalentes de trolox
V- volts
 μ mol- micromoles
 μ L-microlitro
 Ω - ohms

RESUMO

A framboesa, vulgarmente classificada como um fruto vermelho possui um elevado teor de compostos fenólicos aos quais têm sido associados benefícios para a saúde, relacionados com a sua atividade antioxidante e anti-inflamatória.

Com o principal objetivo de avaliar a atividade anti-inflamatória de um extrato de framboesa em modelo animal de artrite reumatóide, preparou-se um extrato de framboesa recorrendo a uma variedade desconhecida da região Sul de Portugal.

O extrato produzido foi caracterizado quimicamente por ensaios espectrofotométricos e cromatográficos (HPLC-DAD-ED e HPLC-DAD-ESI-MS/MS).

A atividade antioxidante do extrato de framboesa foi avaliada em ensaios ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), HORAC (Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity) e CAA (Cellular Antioxidant Activity), tendo-se obtido valores de 1277 ± 38 μmol de equivalentes de Trolox/ 100 g, 529 ± 33 μmol de equivalentes de ácido cafeico/ 100 g e 133 μmol de equivalentes de quercetina equivalentes/ 100 g, respetivamente.

Para o estudo da inflamação aguda, num modelo de edema da pata induzido pela carragenina, administrou-se uma dose única de extrato de framboesa (15 mg de fenóis totais/ kg de rato), usando a via oral e a intraperitoneal. Após análise estatística dos resultados relativos à percentagem de aumento de volume de pata por ANOVA e teste de Bonferroni concluiu-se que a administração de extrato de framboesa via p.o não inibiu o aumento do volume da pata ($P < 0,001$ vs Controlo) enquanto que a administração via i.p causou um efeito de inibição da inflamação ($P < 0,001$ vs Carragenina). No ensaio da inflamação crónica com duração de 35 dias, num modelo de artrite reumatóide (AR) induzida por colagénio tipo II (CII), administrou-se o extrato de framboesa (15 mg de fenóis totais/ kg de rato) por via oral ou intraperitoneal, do 23º ao 35º dias de ensaio). Para além da redução do edema nas patas dos animais tratados, a análise radiográfica das patas destes animais revelou que a osteoesclerose das superfícies articulares e as áreas erosivas subcondrais das articulações das patas posteriores eram menos evidentes nos ratos aos quais foi administrado extrato de framboesa por via oral ou por via intraperitoneal, o que sugere a ação anti-inflamatória do extrato de framboesa quando administrado continuamente.

Palavras chave: Framboesa, Inflamação, Edema, Artrite Reumatóide

Freitas, Cassius F.A. – Anti-inflammatory effect evaluation of raspberry extract on Rheumatoid Arthritis.

ABSTRACT

Raspberries are classified as a berry and have a high content of phenolic compounds. Those compounds have been associated with health benefits due to their antioxidant and anti-inflammatory effects.

The main objective was to evaluate the anti-inflammatory effect of a raspberry extract in the animal model Arthritis Rheumatoid. It was prepared from an extract of an unknown raspberry variety from the south of Portugal.

The extract was chemically analysed by spectrophotometric and chromatographic assays (HPLC-DAD-ED e HPLC-DAD-ESI-MS/MS).

The antioxidant activity of the raspberry extract was evaluated by ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), HORAC (Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity) and CAA (Cellular Antioxidant Activity) assays. It has obtained values of 1277 ± 38 μmol of Trolox equivalents per 100 g of fresh fruit, 529 ± 33 μmol of caffeic acid equivalents/ 100 g and 133 μmol of quercetin equivalents/ 100 g, respectively.

For the acute inflammation study, in the carrageenan induced-paw edema model, a dose of the raspberry extract (15mg of total phenols per Kg of animal weight) was administered, orally and intra-peritoneally. After the statistical analysis (ANOVA and Bonferroni's test) of the paw's volume increase, it was demonstrated that the oral extract administration did not inhibit the paw's volume increase ($P < 0,001$ vs Control) but the intra-peritoneal extract administration did inhibit the inflammatory effect ($P < 0,001$ vs carrageenan). The duration of the chronic inflammation assay was 35 days. It was an animal model of collagen-induced arthritis. The raspberry extract was administered (15mg of total phenols per Kg of animal weight), orally or intra-peritoneally from day 23 to the last day. Not only there was a statistically significant reduction in paw edema, but also the radiographic analysis of the animals' paws showed that osteosclerosis of the articular surfaces and subchondral erosive areas of the joints of the hind paws were less evident in rats. In these, oral and intra-peritoneal extract were administered. This suggests that there is an anti-inflammatory effect of the raspberry extract when it is continually administered.

Keywords: Raspberry, Inflammation, Edema, Rheumatoid Arthritis.

1. Introdução

É relevante a exposição dos seres humanos aos agentes oxidantes responsáveis muitas vezes por danos a biomoléculas tais como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos e que resulta num grande número de patologias como as doenças inflamatórias em geral, as cardiovasculares e alguns tipos de cancro. De acordo com diversos estudos epidemiológicos, há uma menor incidência de doenças crónicas não-transmissíveis associadas a dietas ricas em frutas e hortaliças (Cerqueira *et al.*, 2007). Os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes derivam de diversos compostos presentes nesses alimentos que neutralizam a ação dos radicais livres e agem também através de outros mecanismos anti-inflamatórios. Justifica-se portanto, a importância da pesquisa de fontes vegetais dietéticas com altos teores em compostos com atividade antioxidante (Pinto, 2008).

A Framboesa (*Rubus idaeus*) encaixa-se perfeitamente nesse contexto por ser um alimento rico em compostos fenólicos, especialmente antocianinas responsáveis pela sua cor e que são antioxidantes naturais. Além de fornecerem proteção antioxidante, esses compostos atuam também na manutenção da integridade do DNA, como agentes anti-inflamatórios e anti-mutagénicos e fornecem cárdio-proteção através da manutenção da permeabilidade vascular (Bagchi *et al.*, 2004).

O metabolismo do oxigénio molecular origina espécies reativas de oxigénio (ROS) que, quando estão em excesso no organismo devido a um desequilíbrio na sua produção pelas fontes endógenas, exógenas e/ou depleção de antioxidantes, causam o stresse oxidativo (Dartsch *et al.*, 2008). Alguns estudos têm demonstrado que a suplementação com frutas ricas em antocianinas foram eficazes na redução desse stresse oxidativo associado ao envelhecimento, sendo benéfico na reversão da idade relacionada a alterações neuronais e comportamentais (Bagchi *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos em geral agem contra a inflamação que é o processo que o organismo dispõe para localizar, neutralizar ou eliminar um agente agressor (bacteriano, viral ou outro). Dito de outra forma, não é mais do que o afluxo de leucócitos e moléculas do plasma ao foco inflamatório, desencadeando-se, então, os mecanismos reacionais que a caracterizam (Arosa; Cardoso; Pacheco, 2007). A inflamação aguda é definida como uma série de respostas tecidulares nas primeiras horas após a lesão e possui um mecanismo eficaz de regeneração do tecido afetado. A falha ou ausência desse mecanismo evolui para uma inflamação crónica (Ward, 2010). Assim, pode dizer-se que o mecanismo de inflamação é benéfico para a própria defesa do organismo desde que seja auto limitado. Contudo, quando a inflamação se torna persistente e exagerada está associada a uma série de doenças crónicas (Rhaman *et al.*, 2009).

Aproximadamente 1% da população mundial adulta sofre de Artrite Reumatóide (AR), que é uma doença inflamatória crónica sistémica de etiologia auto-imune. Caracteriza-se basicamente por inflamação das membranas sinoviais, preferencialmente de articulações periféricas. A grande preocupação do aumento da taxa de mortalidade de pessoas afetadas pela AR, deve-se às complicações cardiovasculares subsequentes à inicial aterosclerose (Martinez-Calatrava *et al.*, 2010).

O evento inicial da doença é o processo inflamatório iniciado na membrana sinovial com infiltrado de linfócitos e macrófagos. Esse infiltrado juntamente com a hiperplasia das células sinoviais e a neoangiogénese levam a formação do tecido sinovial proliferado (pannus) que atinge o osso subcondral e , em seguida, a cartilagem articular, com destruição progressiva da mesma (Miossec, 2004).

Como já foi referido anteriormente alguns frutos e legumes contêm compostos que têm mostrado actividades antioxidantes e anti-inflamatórias, nomeadamente os chamados frutos vermelhos.

Devido a composição rica em antocianinas, um estudo recente efetuado com extratos de algumas variedades de framboesas demonstrou uma boa capacidade antioxidante e moderada ação anti-inflamatória evidenciada pela ação inibitória da enzima cicloxigenase (Bowen-Forbes *et al.*, 2010). Há diferentes alvos envolvidos na atividade anti-inflamatória desses compostos fenólicos presentes nas framboesas e que podem ser subdivididos em alvos relacionados à via dependente do ácido araquidónico, à inibição da cicloxigenase , à inibição da lipoxigenase e também da fosfolipase A2. Outros alvos não menos importantes são o fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B), os linfócitos T e a produção de citocinas do tipo 1 e 2 (Biesalski; Hans, 2007).

Devido às propriedades já evidenciadas pelas framboesas estes frutos parecem ser promissores na prevenção dos fenómenos oxidativos e inflamatórios. No entanto, serão necessários ser feitos muitos estudos que comprovem essa hipótese e que elucidem os mecanismos envolvidos nesses efeitos.

O objectivo do presente estudo é avaliar se a framboesa tem propriedades anti-inflamatórias e se a administração crónica de um extrato de framboesa poderá auxiliar na prevenção ou redução da inflamação na AR, podendo assim contribuir para uma melhoria da qualidade de vida das pessoas afetadas por essa patologia.

1.1 Cultura da Framboesa

Desde tempos primórdios que o Homem se sentiu atraído por pequenos frutos e inseriu-os na sua alimentação devido a variedade de formas, texturas, cores, sabores e aromas.

Neste grupo estão incluídas as plantas perenes de climas temperados, lenhosas ou semilenhosas que produzam frutos simples derivados apenas do tecido do ovário em que o pericarpo apresenta polpa e textura branda. Dentre elas destacam os géneros: *Rubus*, *Ribes*, *Fragaria* e *Vaccinium* (INRB, 2007).

As plantas da framboesa pertencem à família das *Rosacea*, género *Rubus*, subgénero *Idaeobatus* e ocorrem nos cinco continentes, mas tem a sua distribuição centrada fundamentalmente no hemisfério Norte, com especial incidência na Ásia, Europa e América do Norte.

A framboesa vermelha floresce no verão após um ano de crescimento vegetativo e de passar por um período de dormência durante o inverno (INRB, 2007).

A cultura da framboesa em solo português ainda é reduzida devido ao baixo consumo destes frutos pela população nacional se comparado com países do Norte da Europa como Noruega, Suécia e Holanda. No entanto parece haver um aumento significativo na sua produção nos últimos anos, já que os frutos produzidos em Portugal começaram a ter uma maior procura para exportação.

As áreas de maior produção são localizadas no Algarve, Alentejo e Ribatejo. 95% da produção nos 14 hectares de estufas (Figura 1) no Algarve são destinadas aos mercados nórdicos (Hubel, 2011).

Dentre as cultivares mais utilizadas na Europa destacam-se a 'Polka', 'Himbo-Top' e a 'Joan-Squire' (INRB, 2007).



Figura 1. Cultura de framboesas em estufas (INRB, 2007).

1.2 Composição Química da Framboesa

A framboesa faz parte de um grupo pequeno de frutos denominados de frutos vermelhos juntamente com mirtilos, amoras, morangos, entre outros. 20% do seu peso total é composto por fibras e é uma fonte de Vitamina C e outras vitaminas, nomeadamente o ácido fólico, a vitamina B₁, B₂ e também alguns minerais (magnésio, cobre e ferro) (World's healthiest foods).

Este grupo de frutos é bastante reconhecido pela sua qualidade nutricional e os benefícios para a saúde. Muitos estudos têm demonstrado que eles possuem altos teores de açúcares e ácidos orgânicos (ácido málico, ácido cítrico, ácido succínico) que determinam sua doçura e acidez. O tipo e a quantidade individual de cada composto vai refletir na qualidade da fruta (Milivojevic *et al.*, 2011).

Estes frutos são excepcionalmente ricos em compostos fenólicos que correspondem ao maior grupo de fitoquímicos e são classificados como se pode ver na Figura 2. Incluem flavonóides (antocianinas, flavonóis e flavanóis), estilbenos, taninos e ácidos fenólicos (Seeram *et al.*, 2006).

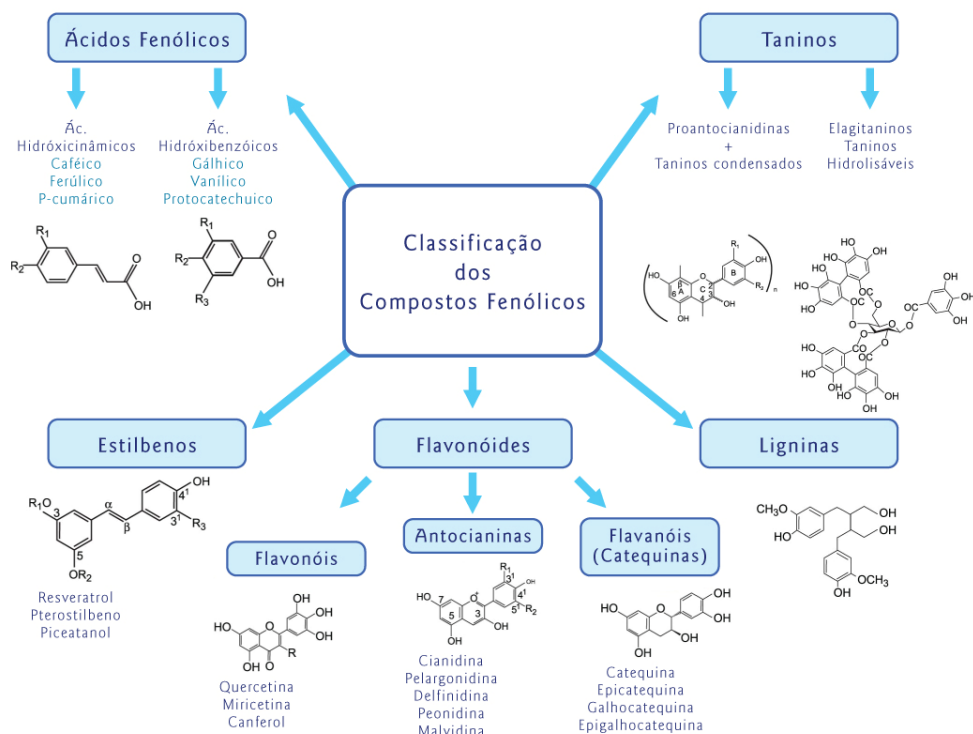


Figura 2. Esquema de classificação dos compostos fenólicos (Paredes-López *et al.*, 2010).

A Tabela 1 a seguir mostra valores médios reportados de compostos fenólicos totais, flavonóides e antocianinas de alguns frutos vermelhos.

Fruto/Gênero e espécie	Compostos fenólicos mg/100g peso fresco	Flavonóides mg/100g peso fresco	Antocianinas mg/100g peso fresco
Arando (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	525	44	300
Amora (<i>Rubus fruticosus</i>)	486	276	82-326
Mirtilo (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	261-585	50	25-495
Oxicoco (<i>Vaccinium macrocarpon</i>)	315	157	67-140
Framboesa (<i>Rubus idaeus</i>)	121	6	99
Groselha (<i>Ribes rugrum</i>)	1400	9	22
Morango (<i>Fragaria x. ananassa</i>)	313	desconhece	54

Tabela 1. Quantidades médias de compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas de alguns frutos vermelhos (Paredes-Lopéz *et al.*, 2010).

Os flavonóides são conhecidos como responsáveis pela pigmentação das plantas, inicialmente foram confundidos com vitaminas chegando a receber o nome de “Vitamina P”. Na verdade esses polifenóis estão envolvidos no crescimento e reprodução das plantas, pois oferecem resistência aos microrganismos patogênicos e predadores e também protegem culturas vegetais de doenças e germinação de sementes pré-colheita. Estudos *in vitro* demonstram o poder antioxidante, de captura dos radicais livres, promovido por esses compostos fenólicos (particularmente flavonóides) (Ross; Kasum, 2002).

Estes compostos também atuam no tecido adiposo como agente anti-inflamatório inibindo a síntese dos eicosanóides e no sangue na agregação plaquetária (Dillard; German, 2000).

Este grupo de compostos é caracterizado estruturalmente pela presença de dois anéis aromáticos (A, B) ligados a um anel heterocíclico (C) ilustrados na Figura 3. São classificados de acordo com o grau de oxidação do anel heterocíclico e podem ser

antocianinas, flavanóis (catequinas) e flavonóis. Essas moléculas podem sofrer substituição dos anéis aromáticos como hidroxilações, metilações, glicosilações, acilações que representam a diversidade dentro de uma classe de compostos (Pourcel *et al.*, 2006).

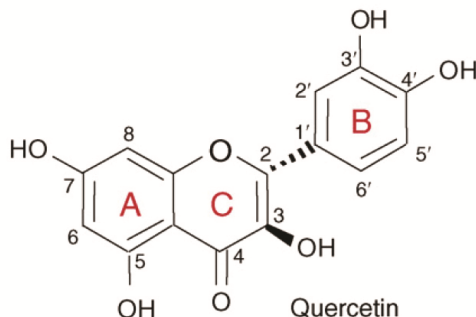


Figura 3. Estrutura da Quercetina (Pourcel *et al.*, 2006).

Os ácidos fenólicos e os flavonóides, embora não sejam essenciais para a sobrevivência dos seres humanos, podem a longo prazo ser os fatores que contribuem para os efeitos protetores de uma dieta rica em frutas e vegetais.

De entre os ácidos fenólicos existentes na framboesa que podem, estar envolvidos nos efeitos benéficos temos o ácido gálico e os ácidos cumárico, cafeico e clorogénico. Os principais flavonóides são as antocianinas, flavan-3-óis, flavanonas, flavonóis e flavonas (Borges *et al.*, 2010).

A cor atrativa da framboesa deve-se às antocianinas e seus derivados que existem na natureza ligados a açúcares, nomeadamente glucose. A quantidade de antocianinas é importante para a avaliação da maturidade dos frutos e as principais antocianinas encontradas na framboesa são cianidina-3-soforósido (que se encontra em maior quantidade), cianidina-3-glucósido e pelargonidina-3-glucósido. Além das antocianinas, a framboesa também contém outros flavonóides, como por exemplo os derivados glicosilados de quercetina e canferol (Mullen *et al.*, 2003).

O ácido elágico (EA) é uma dilactona do ácido hexahidroxidifénico (HHDP) de peso molecular 338.2 g/mol (Fig. 4). É termicamente estável devido aos quatro anéis da molécula, que representam a parte lipofílica enquanto que os quatro grupos fenólicos e as duas lactonas representam a zona hidrofílica. Essas propriedades resultam numa elevada insolubilidade em água (Aguilera-Carbo *et al.*, 2008). Pode-se encontrar nas formas livre, glicosilada ou esterificada com açúcares dando origem aos elagitaninos na maioria das vezes com β -D-glucose (Wang *et al.*, 2010).

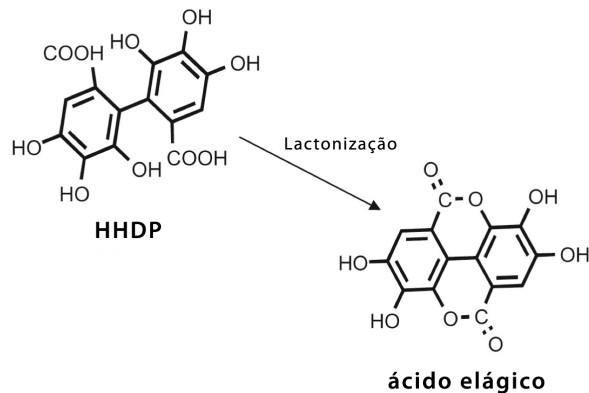


Figura 4. Lactonização do ácido hexahidroxi-difenico (HHDP) para originar o ácido elágico (Aguilera-Carbo *et al.*, 2008).

A framboesa tem também na sua constituição elagitaninos (ETS). Com mais de 500 produtos naturais caracterizados, os elagitaninos formam o maior grupo dos taninos. Eles possuem um importante papel na nutrição humana e são dotados de várias propriedades biológicas, incluindo a antioxidante, anticancerígena, anti-aterosclerótica, anti-inflamatória, anti-hepatotóxica, antibacteriana e anti-replicação do HIV (Landete, 2011). Como componentes de plantas medicinais, eles são tradicionalmente utilizados para tratar diarreia, úlceras gástricas, queimaduras e quando são administrados em animais por vias intra-peritoneal, intra-venosa e oral também parecem exibir uma potente atividade antitumoral (Clifford; Scalbert, 2000).

O ácido elágico tem sido detectado em vários estudos com frutos, nomeadamente em frutos vermelhos e alguns frutos secos (Daniel *et al.*, 1989). Nesses estudos o total de ácido elágico é medido pela quantidade presente nos extratos após hidrólise ácida. Nas framboesas o ácido elágico livre corresponde à menor parte do teor total de ácido elágico sendo os elagitaninos a sua principal fonte (Mullen *et al.*, 2003). Os elagitaninos que estão presentes em maior quantidade nesse fruto são lambertianina C, sanguina H-6 e sanguina H-10 segundo Beattie, Crozier e Duthie (2005) sendo a sanguina H-6 a responsável por mais de 30% da atividade antioxidante desses frutos.

Ao contrário do ácido elágico, os elagitaninos são solúveis em água. Podem precipitar alcalóides e proteínas e possuem alto peso molecular pois seus monômeros podem ser oxidados nas plantas e formar dímeros, trímeros e tetrâmeros com pesos moleculares que podem chegar a 4000 Da (Pinto, 2008).

1.3 Capacidade antioxidante

As espécies reativas de oxigénio (ROS) e radicais livres são produzidos em vários processos fisiológicos. O stresse oxidativo é um balanço entre a produção de ROS e a defesa antioxidante endógena e que pode levar a danos oxidativos quando a quantidade de ROS é superior à que os antioxidantes existentes no organismo conseguem anular. Esta condição biológica pode resultar ou de uma defesa antioxidante insuficiente ou de uma intensa produção de ROS relacionados com o envelhecimento e patologias de inúmeras doenças crónicas, incluindo cancro, doenças cardiovasculares, inflamações, diabetes, doença de Parkinson, Alzheimer e outras. Para confrontar o stresse oxidativo o corpo humano desenvolve mecanismos para manter a homeostase redox. Esses mecanismos incluem as defesas antioxidantes endógenas, como por exemplo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) e outras obtidas através da dieta (Paredes-López *et al.*, 2010), ou seja, para que haja equilíbrio o sistema antioxidante endógeno, por vezes, terá de ser auxiliado por antioxidantes exógenos, normalmente veiculados via alimentar.

Segundo Agar, Streif e Bangerth (1997), a vitamina C (L-ascorbato) é um dos mais importantes sequestradores de radicais livres encontrados em plantas, animais e humanos. É derivada de um açúcar hexose e o grupo ene-diol nos átomos de carbono 2 e 3 é o responsável por suas propriedades ácidas e redutoras, pois podem ionizar-se e doar electrões. Dessa forma, o ascorbato reage com ROS tais como H_2O_2 (peróxido de hidrogénio), O_2 (superóxido) e 1O_2 (oxigénio singlete) (Asard; May; Smirnoff, 2004).

Beekwilder *et al.* (2005) constataram que sendo a framboesa uma fonte de vitamina C, a sua capacidade antioxidante total parece resultar em cerca de 80% dos compostos fenólicos presentes na amostra, e o restante corresponde à vitamina C. Ensaios prévios realizados por Kalt *et al.* (1999) também já o haviam demonstrado.

Dentre os compostos fenólicos, que são antioxidantes exógenos, os ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e taninos são os que mais exibem mecanismos de ação biológica significativa, como limpeza ou desintoxicação de ROS, bloqueio da produção de ROS, impacto no ciclo celular, supressão de tumores, modulação do sinal de transdução, apoptose, desintoxicação de enzimas e metabolismo (Paredes-López *et al.* , 2010).

Os flavonóides possuem propriedades anti-inflamatórias, anti-alérgicas, antivirais e anti-carcinogénicas. Os grupos das flavonas e dos (flavanóis, que incluem as catequinas, parecem ser os mais poderosos na proteção do corpo contra as espécies reativas de oxigénio que causam danos às células e tecidos. Os radicais livres podem

atrair vários mediadores inflamatórios que contribuem para uma resposta inflamatória geral e uma danificação do tecido (Nijveldt *et al.*, 2001).

Além da remoção direta dos radicais livres através da estabilização das ROS pela sua reação com a parte mais reativa dos radicais livres, alguns flavonóides, inclusive a quercetina (flavonol), impedem que o óxido nítrico produzido pelas células reaja com os radicais livres formando peroxinitrito que oxida os LDLs (Lipoproteínas de baixo peso molecular) e causa danos irreversíveis à membrana celular (Lin; Weng, 2006).

Outro importante mecanismo responsável pela formação das espécies reativas de oxigênio é a imobilização e firme adesão dos leucócitos às paredes endoteliais. Normalmente os leucócitos movem-se livremente ao longo das paredes endoteliais. No entanto, quando ocorre uma isquemia ou inflamação vários mediadores derivados do endotélio e outros fatores do complemento podem causar essa adesão dos leucócitos às paredes do endotélio imobilizando-os e estimulando a desgranulação dos neutrófilos levando a produção de mediadores oxidantes e inflamatórios que danificam os tecidos. Os flavonóides agem diminuindo o número de leucócitos imobilizados durante a reperfusão e alguns deles ainda podem inibir a desgranulação dos neutrófilos sem afetar a produção do superóxido (Nijveldt *et al.*, 2001).

Um estudo realizado por Guardia *et al.*, em 2001, utilizou um modelo animal de inflamação para avaliar o potencial de agentes anti-artríticos nas fases aguda e crônica. A inflamação foi provocada nos ratos pelo método da inflamação induzida pela carragenina e foi observado a resposta de três flavonóides: rutina, quercetina (flavonóis) e hesperidina (flavanona) (Figura 5). A capacidade antioxidante dos flavonóides está relacionada ao número e posição de três grupos hidroxila livres que podem agir pela sua capacidade de doar hidrogênio. Como a rutina difere da quercetina só na presença do açúcar rutinose na posição 3, é possível que fatores farmacocinéticos contribuam para o aumento da atividade do glucósido. Constatou-se que o flavonol rutina foi extremamente eficaz na redução do edema da pata (fase aguda), nódulos e ancilose (rigidez da articulação). Quercetina e hesperidina foram menos eficientes que a rutina, mas a quercetina ainda foi mais eficaz que a hesperidina. Uma razão pela qual a quercetina não é utilizada como medicamento é a possibilidade de produzir efeitos genotóxicos (Guardia *et al.*, 2001).

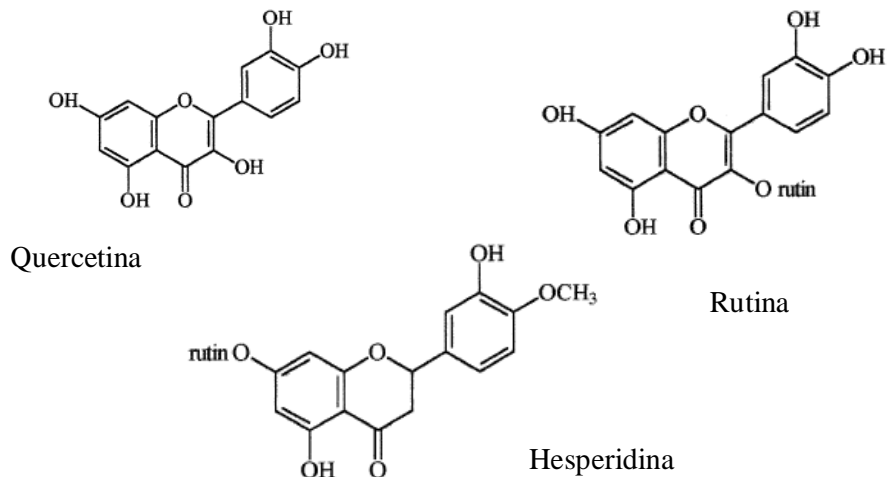


Figura 5. Estruturas dos compostos: quercetina, rutina e hesperidina (Guardia *et al.*, 2001).

Já a eficiência dos elagitaninos e do ácido elágico (Figura 6) como compostos antioxidantes dependem muito da sua estrutura química. A presença de várias funções hidroxí na posição orto nos elagitaninos é responsável pela forte capacidade de doar um átomo de hidrogénio e apoiar um eletrão desemparelhado. A eficiência antioxidante dos ETS e EA está diretamente correlacionada com seu grau de hidroxilação e diminui com a presença de uma molécula de açúcar (Landete, 2011).

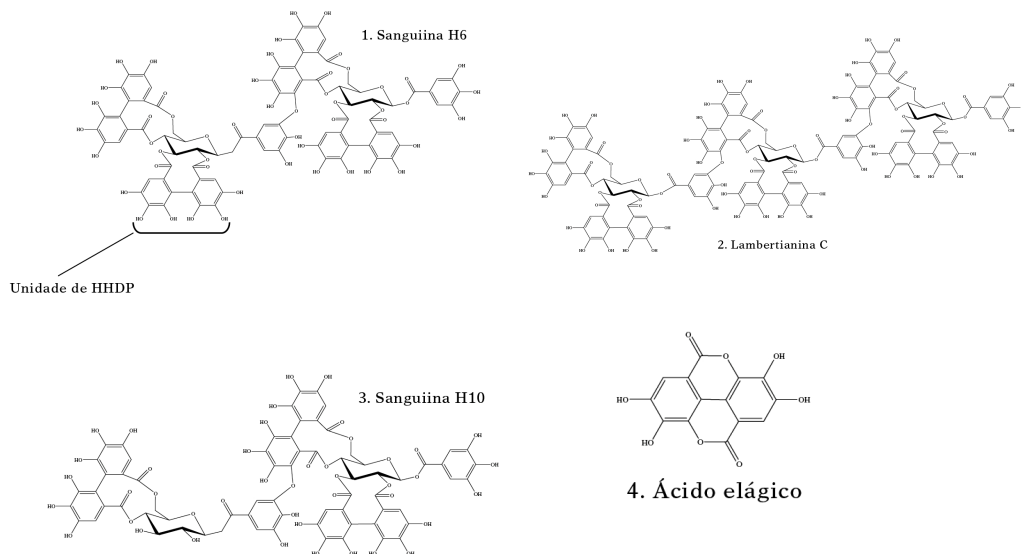


Figura 6. Estruturas químicas dos elagitaninos presentes em maior quantidade nas framboesas: Sanguina H-6; Lambertianina C e Sanguina H-10 e do ácido elágico (Ross *et al.*, 2007).

Quanto à ação anti-inflamatória, sabe-se que o ácido elágico inibe a IL-1 β e TNF- α e induz a ativação da proteína ativadora-1 e de proteínas quinases em células estreladas pancreáticas *in vitro*. O EA tem também propriedades anti-inflamatórias pela regulação de iNOS, COX-2, TNF- α e IL-6, devido a repressão do NF- κ B exerce seu efeito quimiopreventivo sobre a carcinogênese de cólon em ratos (Landete, 2011).

1.4 Biodisponibilidade/Metabolismo dos flavonóides, ácido elágico e derivados

É de extrema importância o conhecimento sobre a biodisponibilidade dos compostos fenólicos porque há grande diferença dessa biodisponibilidade entre os diversos compostos dentro desse grupo. Um composto com alta capacidade antioxidante intrínseca pode por exemplo, ao ser ingerido através da dieta, ser pouco absorvido, muito metabolizado ou rapidamente eliminado, o que leva a uma baixa atividade biológica. Também, alguns metabolitos produzidos por atividade digestiva ou hepática podem ser completamente inativos ou apresentar atividade maior que o composto original (Manach *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos na maioria das vezes apresentam-se na forma de glicósidos, ésteres ou polímeros e só serão absorvidos após hidrólise por enzimas intestinais ou da microbiota do cólon. Alguns flavonóides podem sofrer absorção gástrica desde que não estejam glicosilados e os glicósidos podem ser absorvidos no intestino delgado desde que não estejam ligados a açúcares, tais como a ramnose, que têm que ser hidrolisados pela microbiota. Os compostos fenólicos depois de absorvidos sofrem reações de metilação, sulfatação e glucuronidação no intestino delgado e posteriormente no fígado, o que facilita sua eliminação através da urina e bile por aumentar a sua polaridade (Manach *et al.*, 2004).

Os flavonóides não são todos absorvidos em iguais quantidades. Isoflavonas são os melhores absorvidos na dieta enquanto flavanonas, flavanóis e flavanóis glicosilados apresentam absorções médias e as proantocianidinas, antocianinas e algumas catequinas (galhocatequina e epigalhocatequina) são os menos absorvidos (Clifford & Brown, 2006). No entanto, a cinética de absorção varia consideravelmente entre os diferentes alimentos devido a heterogeneidade de açúcares e outros grupos funcionais no núcleo flavano. Os flavonóides absorvidos são ligados à albumina e transportados ao fígado pela veia porta enquanto que os não absorvidos podem ser degradados pelos microrganismos do cólon intestinal como já foi referido anteriormente e se mostra na

Figura 7. O fígado é o órgão mais importante, responsável por várias biotransformações que levam esses compostos a diferentes formas conjugadas (Viskupicova *et al.*, 2008).

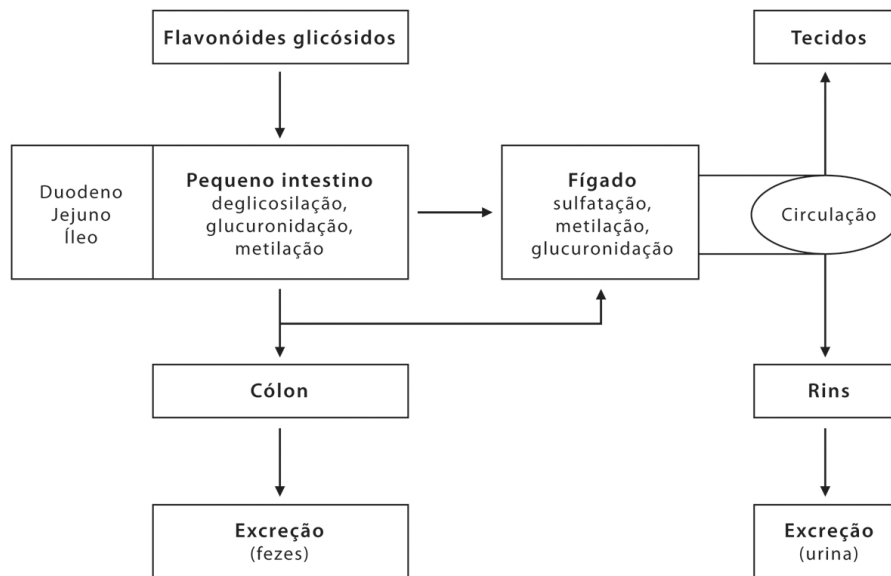


Figura 7. Esquema do metabolismo dos flavonóides (Viskupicova *et al.* 2008).

Estudos realizados por Netzel (2001) e Nielsen (2003) demonstraram baixa absorção e baixa excreção urinária e fecal dos glicosídeos das antocianinas. Estes resultados indicam a alta biotransformação destes compostos após ingestão oral e absorção. A degradação em pH neutro no pequeno e grande intestinos, o metabolismo pela microflora intestinal podem contribuir para a baixa biodisponibilidade das antocianinas. As bactérias da microflora possuem um grande potencial hidrolítico que pode quebrar as ligações glicosídicas. Após a hidrólise há liberação das agliconas que são estáveis em pH ácido porém instáveis em pH neutro. Forma-se uma α - dicetona que é muito reativa e decompõe-se facilmente em ácidos fenólicos e aldeídos. Portanto a degradação das antocianinas após deglicosilação bacteriana é um fator limitante da biodisponibilidade destes compostos (Keppler & Humpf, 2005).

Os elagitaninos, que são componentes importantes da framboesa, são bem mais difíceis de ser degradados por microrganismos devido à sua estrutura complexa. O ácido elágico, derivado dimérico do ácido gálico, é geralmente reconhecido como subproduto da hidrólise após perda de um grupo éster hexahidroxidifenico dos elagitaninos. Como se sabe a maioria dos elagitaninos estão presentes nos alimentos nas formas de ésteres, glicosídeos, ou polímeros que não podem ser absorvidos na sua forma natural. Essas substâncias precisam ser antes hidrolisadas por enzimas intestinais ou pela microbiota do cólon para que possam ser absorvidas (Mingshu; Kai; Qiang, 2006). Ainda

há também a questão da baixa solubilidade do ácido elágico que pode ser responsável pela não absorção desse composto (Clifford; Scalbert, 2000).

Segundo um estudo realizado por Boukharta *et al.* em 1992, verificaram-se quantidades muito baixas de ácido elágico na urina (0,05% da dose) e pulmões (0,01% da dose) de murganhos que foram previamente administrados com elagitaninos provenientes de framboesa (*Rubus idaeus*) ou de romãs (*Punica granatum* L.) na concentração de 60-600 mg/Kg de peso corporal. Já num outro estudo realizado com murganhos alimentados durante uma semana com uma dieta que continha 1% de ácido elágico (aprox. 1mg/Kg de peso corporal), não foi detectada presença de ácido elágico nos tecidos ou sangue desses animais (Smart *et al.*, 1986). Em ratos, após administração oral de ácido elágico, foi detectado na urina e nas fezes o metabolito (aproximadamente 10% da dose) 3,8-dihidróxi-6H-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona, resultado de ação microbiota. Na administração via intraperitoneal foi encontrado, na cavidade abdominal durante a autópsia, ácido elágico (Ayrton *et al.*, 1992).

Após incubação de fezes e urinas resultantes de metabolização de elagitaninos e ácido elágico pela microbiota, houve a formação dos metabolitos denominados por urolitinas (Figura 8) (Cerdá *et al.*, 2005).

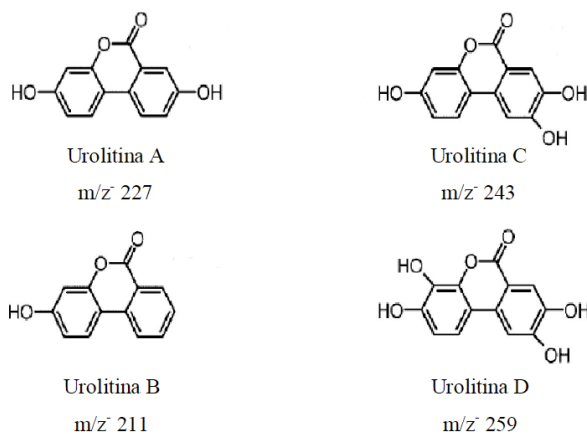


Figura 8. Estruturas dos metabolitos de elagitaninos e/ou ácido elágico: Urolitinas (Del Rio *et al.* 2010).

Posteriormente à ingestão de alimentos ricos em elagitaninos (16 a 48 horas), encontrou-se como principal metabolito na urina de humanos urolitina B (6-H-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona) conjugada com o ácido glucurónico (Cerdá *et al.*, 2005).

1.5 Inflamação

Segundo Ward, a resposta inflamatória ilustrada na Figura 9 consiste num sistema inato de respostas celulares e humorais seguido de lesão (como por exemplo após uma exposição ao frio ou calor, isquemia/reperfusão, trauma, etc.) em que o corpo tenta restaurar o tecido até ao seu estado inicial (Ward, 2010),

Numa resposta inflamatória aguda, desencadeiam-se eventos complexos que envolvem extravasamento de água, sais e proteínas a partir do compartimento vascular; ativação de células endoteliais; interações de adesão entre leucócitos e o endotélio vascular; recrutamento de leucócitos; ativação de macrófagos tecidulares; ativação e agregação das plaquetas; ativação dos sistemas do complemento, da coagulação e do sistema fibrinolítico; e libertação de proteases e agentes oxidantes a partir das células fagocíticas, que podem amplificar o quadro de lesão. Quer devido a causas físicas ou químicas, organismos infecciosos, ou por algumas outras razões que lesam os tecidos, a marca mais antiga *in vivo* da resposta inflamatória aguda é a adesão de neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares (PMN)) ao endotélio vascular (um fenómeno designado por "marginação") (Ward, 2010).

Já a resposta inflamatória crónica é definida de acordo com a natureza das células inflamatórias que aparecem nos tecidos. A duração da resposta inflamatória não está relacionada com a definição de inflamação crónica. A reversão ou resolução da resposta inflamatória implica que os leucócitos sejam removidos ou por via sistema linfático ou por apoptose (morte celular programada) e que a resposta inflamatória aguda em curso termine. Como consequência, durante a fase de resolução da inflamação o aumento da permeabilidade vascular é revertido porque a migração dos leucócitos PMN do compartimento vascular para o compartimento tecidular é interrompida. Em ambos os compartimentos, vascular e extravascular, depósitos de fibrina são removidos por vias que levam à ativação do plasminogénio (em plasmina), que degrada a fibrina. Detritos celulares e hemácias são removidos do compartimento extravascular por fagocitose pelos macrófagos tecidulares (Ward, 2010).

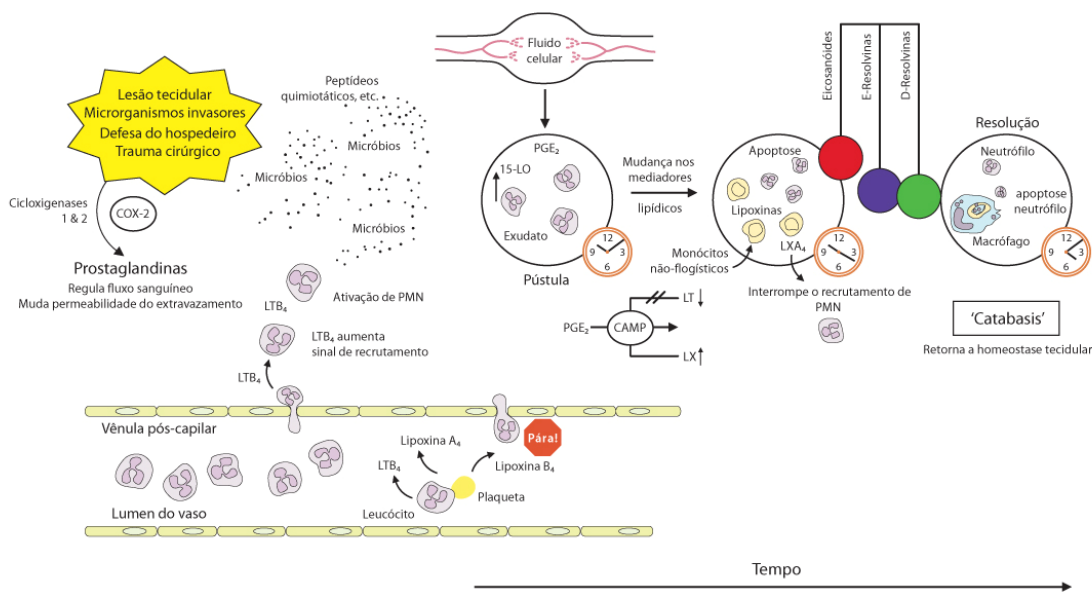


Figura 9. Esquema de uma resposta inflamatória (Gilroy; Lawrence, 2008).

Há muitas situações em que a resposta inflamatória aguda se torna excessiva ou prolongada, levando a sérias lesões dos tecidos e órgão.

1.6 Inflamação Aguda

A inflamação aguda é caracterizada pelo recrutamento de leucócitos da circulação sanguínea, classicamente definida pelo transporte inicial de granulócitos polimorfonucleares, seguidos de monócitos, que se diferenciam em macrófagos. Invariavelmente, essa resposta é desencadeada pelos mastócitos e macrófagos residentes do tecido, cuja desgranulação e ativação sequencialmente origina a produção de uma diversidade de mediadores inflamatórios, como aminas bioativas (histamina e 5-HT), citocinas, quimiocinas bem como mediadores lipídicos, que coletivamente recrutam e ativam células inflamatórias e que também resulta na formação do edema (Gilroy & Lawrence, 2008).

Os cinco sinais cardinais da inflamação são o calor, o rubor, o edema, a dor e a perda de função. O calor provém da dilatação de pequenos vasos e do aumento do fluxo sanguíneo na área afetada que ocasiona um enchimento dos capilares e vénulas. Portanto, a vermelhidão e o calor dependem do aumento do calibre das arteríolas que chegam à zona afetada. O edema deriva da acumulação de flúido extracelular, rico em

solutos e proteínas derivados do plasma, no tecido lesado. E a dor, que nem sempre está presente, geralmente é causada pela pressão exercida na área inflamada mas também a libertação de mediadores químicos endógenos como bradicinina, citocinas, isoprostanos e prostaglandinas contribui para a sensação de dor que acompanha as reações inflamatórias (Sepodes, 2006).

Um dos primeiros resultados da inflamação é o isolamento da área de tecido danificada. Os espaços do tecido e os vasos linfáticos da área inflamada são bloqueados por coágulos de fibrinogénio para que depois de algum tempo, o flúido passe através dos espaços. Esse processo de isolamento também retarda a propagação de bactérias ou produtos tóxicos (Guyton & Hall, 2006).

Poucos minutos após a resposta inflamatória ser iniciada, os macrófagos já existentes nos tecidos imediatamente iniciam suas ações fagocitárias. Quando ativados pelos produtos da infecção e da inflamação, o primeiro efeito é o alargamento de cada uma dessas células. Depois, muitos desses macrófagos tornam-se móveis e formam a primeira linha de defesa contra infecções durante a primeira hora. O número desses macrófagos móveis geralmente não é grande mas eles são de importância vital (Guyton & Hall, 2006).

Na primeira hora grande número de neutrófilos saem do compartimento vascular e começam a infiltrar na área lesada. Isto é causado pelos produtos do tecido inflamado que ativam as seguintes reações: (1) Alteram a superfície interior do endotélio capilar, assim causam a adesão dos neutrófilos às paredes capilares na área inflamada (marginação). (2) Causam alterações nas ligações intercelulares entre as células endoteliais dos capilares e vénulas, que podem permitir a formação de aberturas suficientemente largas para os neutrófilos passarem por diapedese (Figura 10) do sangue para o interior dos tecidos. (3) Outros produtos da inflamação fazem a quimiotaxia dos neutrófilos para os tecidos lesados (Guyton & Hall, 2006).

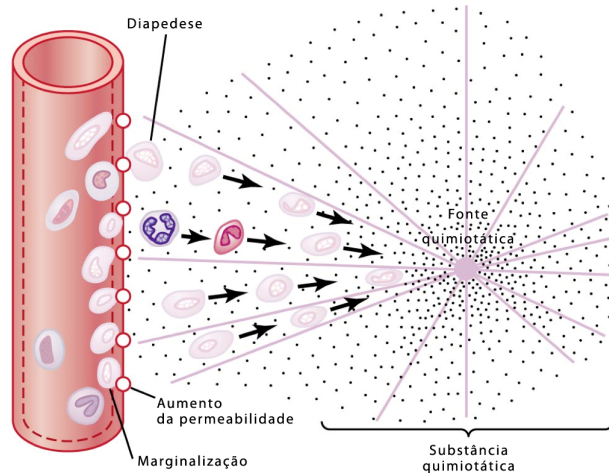


Figura 10. Movimento de neutrófilos por diapedese através de poros capilares e por quimiotaxia em direção a uma área de dano tecidual (Guyton & Hall, 2006).

Também dentro de algumas horas após o início da inflamação aguda, o número de neutrófilos no sangue algumas vezes aumenta quatro a cinco vezes mais, de um normal de 4000 a 5000 para 15000 a 25000 neutrófilos por microlitro de sangue (neutrofilia). Tal é geralmente causada pelos produtos da inflamação que entram na corrente sanguínea, são transportados para a medula óssea, e lá agem nos neutrófilos armazenados mobilizando-os para o sangue. O que torna ainda maior o número de neutrófilos disponíveis para a área de tecido inflamado (Marieb & Hoehn, 2007).

No decorrer da infiltração de neutrófilos, os monócitos do sangue entram no tecido lesado e aumentam de tamanho e tornam-se macrófagos. No entanto, o número de monócitos no sangue circulante é baixo: também, a taxa de monócitos armazenados na medula óssea é muito menor que a de neutrófilos. Portanto, a acumulação de macrófagos na área de tecido inflamado é mais lenta que a de neutrófilos, pelo que requer mais dias para se tornar eficaz. No entanto, mesmo após a invasão do tecido lesado, os monócitos ainda são células imaturas, precisam de 8 horas ou mais para aumentar de tamanho de forma significativa e desenvolver grandes quantidades de lisossomas; só então estas células ganham a plena capacidade de macrófagos tecidulares para fagocitar. Após alguns dias ou até semanas, os macrófagos finalmente chegam para dominar as células fagocitárias da área inflamada devido ao grande aumento da produção de novos monócitos na medula óssea (Guyton & Hall, 2006).

A última linha de defesa é o grande aumento da produção de ambos, granulócitos e monócitos pela medula óssea. Isso resulta do estímulo das células progenitoras granulocíticas e monocíticas na medula (Marieb & Hoehn, 2007). No entanto, é necessário aproximadamente 3 a 4 dias até que os granulócitos e monócitos

pré-formados alcancem o nível de desenvolvimento necessário para sair da medula. Se o estímulo do tecido inflamado continuar, a medula óssea pode continuar a produzir essas células em enormes quantidades por meses e até anos, algumas vezes numa taxa de 20 a 50 vezes mais que o normal (Guyton & Hall, 2006) .

Mais de 24 fatores têm efeito no controle dos macrófagos em resposta à inflamação, acredita-se que cinco deles possuem um papel dominante e são: Fator de necrose tumoral (TNF); interleucina –1 (IL-1); fator estimulador de colônias granulócito-monócito (GM-CSF); fator estimulador de colônias granulócitos (G-CSF) e fator estimulador de colônias monócitos (M-CSF) ilustrado na Figura 11. Esses fatores são formados tanto pela ativação de células macrófágicas como por outras células, mas em menores quantidades, no tecido inflamado (Guyton & Hall, 2006).

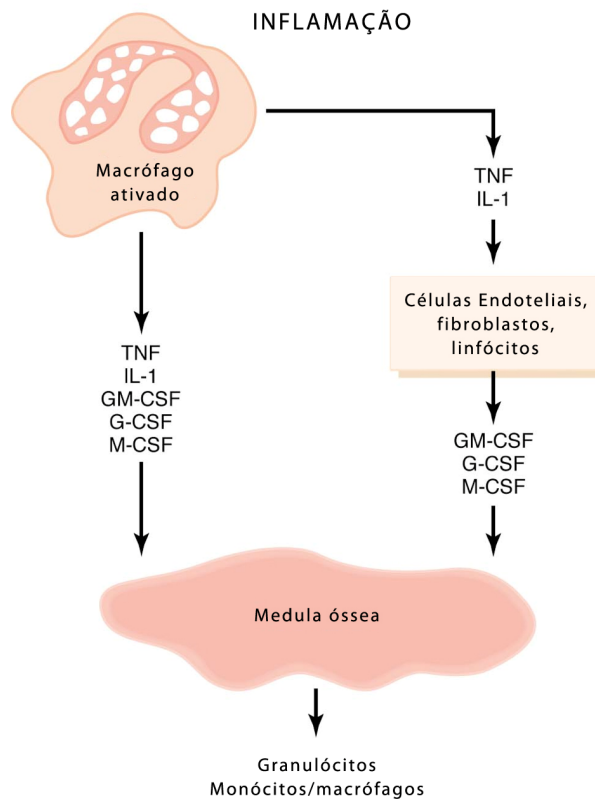


Figura 11. Controle da produção na medula óssea de granulócitos e monócitos macrófagos em resposta a múltiplos fatores de crescimento liberados de macrófagos ativados em um tecido inflamado (Guyton & Hall, 2006).

A combinação do TNF, IL-1, e dos fatores estimuladores de colônias é responsável pelo forte mecanismo de retroação (feedback) que se inicia com a

inflamação do tecido e procede para formação de um grande número de leucócitos que ajudam a remover a causa da inflamação (Guyton & Hall, 2006).

1.7 Inflamação Crónica

Poderíamos dizer na verdade, que a inflamação crónica é uma inflamação aguda mal sucedida, ou seja, difere da aguda por não terminar com a resolução e restauração do tecido lesado. Como por exemplo, alguns fatores que iniciam o programa de “cura” do tecido inflamado levam a uma acumulação inapropriada de leucócitos nos locais e tempo errados como mostra a Figura 12 (Gilroy; Lawrence, 2008).

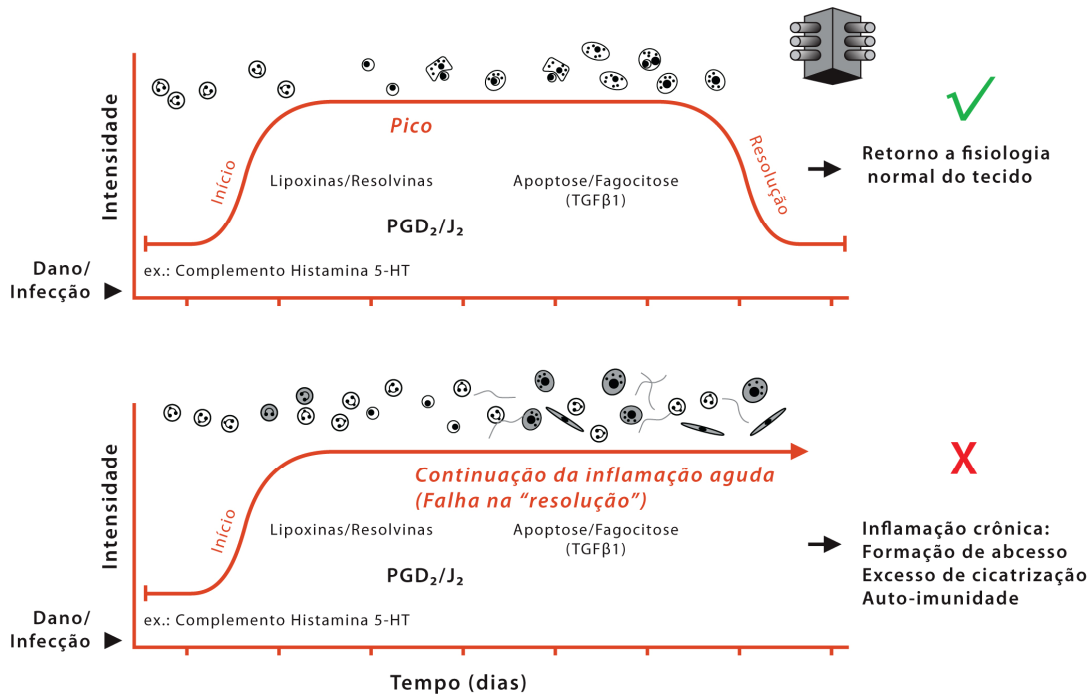


Figura 12. Esquema de comparação entre as respostas fisiológicas na inflamação aguda e na crónica (Gilroy; Lawrence 2008).

A inflamação aguda, como visto anteriormente, é caracterizada pela acumulação de neutrófilos e edema no início da resposta. Depois, células mononucleares e macrófagos acumulam-se e ajudam na preparação do tecido para resolução. Tanto na inflamação aguda como na inflamação crónica podemos identificar e descrever o papel que os mediadores moleculares específicos desempenham nestes eventos. Na primeira

sequência (inflamação aguda): mediadores pró-inflamatórios são apresentados bem cedo em resposta à lesão/infecção, os quais iniciam e aumentam a resposta na fase aguda. No entanto, isso é contrabalançado por sinais anti-inflamatórios endógenos como corticosterona, que servem para graduar a gravidade e limitar a duração dessa fase inicial. Com o progresso da inflamação, certos “sinais de stop” tentam também impedir o tráfico dos leucócitos para o tecido. Esses “sinais de stop” incluem as lipoxinas, resolvinas (ácidos gordos produzidos a partir do ômega 3 e de ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA)) e prostaglandinas (PGs) da série D, e preparam o caminho para migração de monócitos e sua diferenciação a macrófagos fagocitários. Esses removem células mortas e saem do sítio da inflamação. Os fibroblastos também contribuem para a resolução da inflamação pela retirada de sinais de sobrevivência e normalização de gradientes de quimiocinas, deste modo permite a infiltração de leucócitos para apoptose ou abandonam o tecido através da drenagem linfática. Essa sequência de respostas levam a completa resolução e, importante, a restauração do tecido inflamado para a sua anterior função fisiológica. Essa é a sequência ideal de eventos na inflamação fisiológica, que contrasta com a situação na inflamação patológica (crônica). A resolução deve ser destacada como uma faceta crítica da resposta inflamatória, e no mínimo, sublinhar a importância da inalteração do curso normal da ação no desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios (Gilroy; Lawrence, 2008).

1.8 Fisiologia da Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória crônica de etiologia auto-imune. Caracteriza-se basicamente por sinovite crônica, simétrica e erosiva, preferencialmente de articulações periféricas (Kelley; Ruddy; Sledge, 1997). O seu componente inflamatório está relacionado com a própria doença de base, caracterizado por infiltrado na camada intimal das artérias por monócitos ativados e células T e produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, assim como a presença de auto-anticorpos (Harris, 1997).

É uma patologia que afeta 3 vezes mais mulheres que homens e é mais comum a ocorrência entre 40-60 anos de idade podendo aparecer em qualquer idade. Estima-se que há em torno de 10% de crianças abaixo de 16 anos que sofrem da forma inicial da doença (Fauci *et al.*, 2008).

Inicia-se com um processo inflamatório com infiltrado de linfócitos e macrófagos na membrana sinovial que pode adquirir uma estrutura similar aos tecidos linfocitos terciários, com predomínio de linfócitos T CD4+. Há então formação do tecido sinovial proliferado (pannus), que atinge o osso subcondral e, em seguida, a cartilagem articular, com destruição progressiva (Figura 13) (Miossec, 2004).

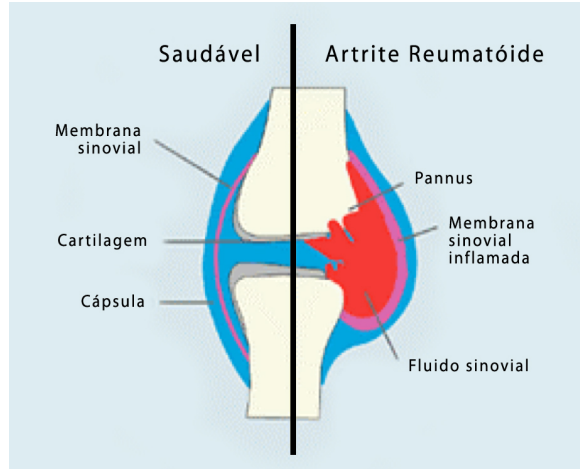


Figura 13. Comparação entre metade de uma articulação saudável e outra com AR (NRAS, 2011).

Segundo Klimiuk, Yang e Weyand (1999), a ativação e o recrutamento destas células são influenciados por citocinas e mediadores inflamatórios. Apesar da identificação de mais de 100 diferentes tipos de citocinas, quimiocinas e outros fatores envolvidos na patogênese da AR, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) continua

ocupando lugar de destaque na doença erosiva da articulação por meio da ativação dos osteoclastos.

A produção de citocinas, predominantemente as pró-inflamatórias, tem papel fundamental na iniciação e perpetuação da inflamação crônica na membrana sinovial. A resposta das células TH₁ gera a produção de interferão-gama (IFN- δ), que estimula a liberação de TNF- α , interleucina-1 beta (IL-1 β) e metaloproteinases pelos macrófagos e fibroblastos sinoviais (Domer & Burmester, 2004).

A figura 14 mostra imagens do progresso de uma erosão ao longo dos anos e destaca a formação do pannus.

Progressão de uma erosão na Artrite Reumatóide

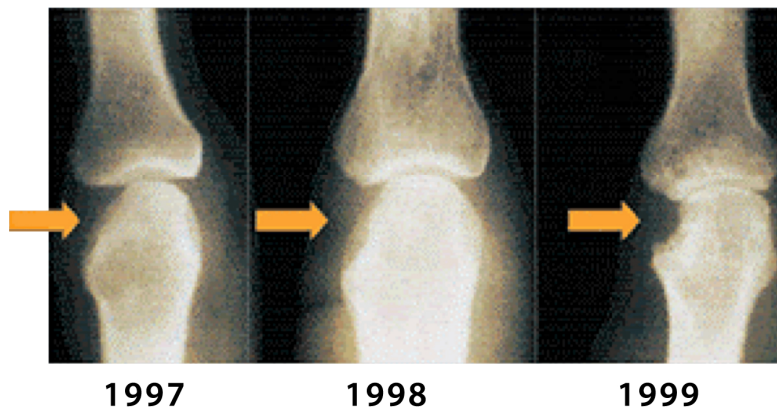


Figura 14. Progressão de uma erosão da AR ao longo dos anos (NRAS, 2011).

As funções desempenhadas pelos linfócitos B têm sido reconhecidas como significativas na patogênese da AR. A migração de células T e B (Figura 15) com formação de agregados com estrutura de folículos terciários, a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD 154) e a produção aumentada de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10), que estimulam linfócitos B, são indicadores da hiperatividade destas células na doença (Bauerova; Bezek ,1999).

Também, a presença de espécies reativas de oxigênio e azoto possuem um importante papel nessa patologia pois contribuem muito para a lesão tecidual (Doran *et al.*, 2002).

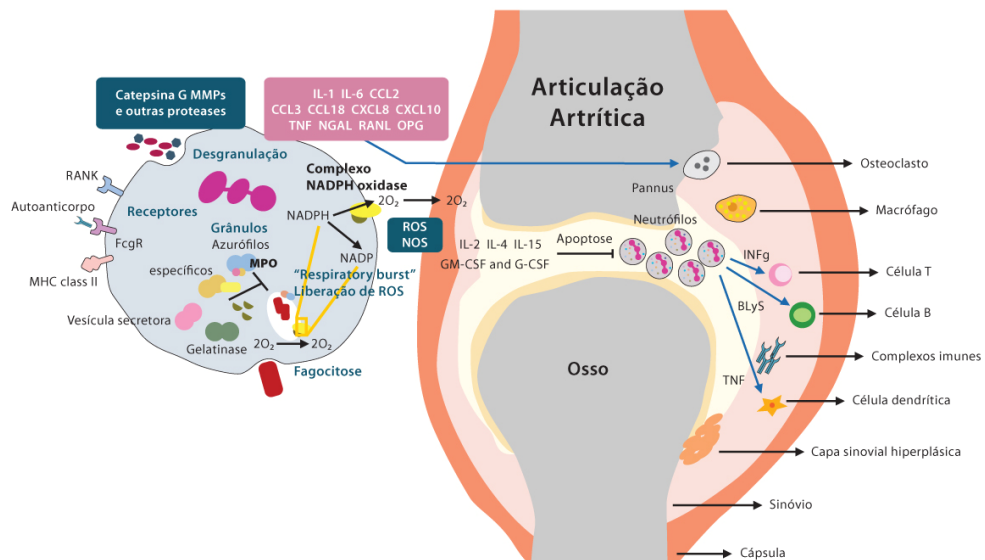


Figura 15- Esquema do mecanismo de inflamação na AR (Blys:estimulador de linfócitos-B; MHC class II:antígeno do complexo principal de histocompatibilidade; MMPs: metaloproteínas da matriz; MPO: mieloperoxidase) (Cascão *et al.*, 2010).

A Figura 15 mostra o mecanismo de inflamação na AR realçando as interações entre os tipos de leucócitos que infiltram na articulação inflamada e a superfície erosiva entre *pannus* e a cartilagem óssea causada pela ação osteoclástica. A figura também destaca a contribuição dos neutrófilos para o desenvolvimento da doença principalmente pela produção de mediadores imunológicos e enzimas (Cascão *et al.*, 2010).

2. Objetivos do trabalho

Os objetivos principais do trabalho foram:

- a) Caracterização dos compostos fenólicos num extrato de framboesa;
- b) Avaliação da resposta anti-inflamatória após ingestão deste extracto utilizando um modelo animal de artrite reumatóide (modelo de inflamação crónica).

Para atingir estes objetivos o trabalho foi desenvolvido da seguinte forma:

- Preparação de um extrato de framboesa e sua caracterização quanto à composição fenólica (teor de fenóis totais; de flavonóides; de antocianinas totais; de procianidinas totais; de taninos hidrolisáveis; de elagitaninos e de taninos condensados).

Estudo do efeito anti-inflamatório:

- Estudo do efeito anti-inflamatório do extrato de framboesa no modelo de edema da pata do rato induzido pela carragenina (modelo de inflamação aguda);
- Efeito do extrato num modelo de artrite reumatóide (AR) induzida no rato (modelo de inflamação crónica)

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1. Ensaios de caracterização química

- a) Amostras: uma cultivar de framboesas de variedade desconhecida proveniente da Costa Alentejana. As amostras foram utilizadas frescas para a preparação do extrato que depois foi armazenado a -18°C até o momento da utilização.
- b) Reagentes e soluções: etanol absoluto (Panreac Química Sau); metanol absoluto (Carlo Erba Reagents); acetona 99,9% (Sigma-Aldrich); ácido gálico 98% (Fluka); reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich); carbonato de sódio 99% (Sigma-Aldrich); nitrito de sódio 97% (Sigma-Aldrich); cloreto de alumínio 99,9% (Sigma-Aldrich); hidróxido de sódio 98% (Merck); catequina 98% (Sigma-Aldrich); ácido clorídrico 0,1M (Carlo Erba Reagents); bissulfito de sódio 58,5% SO_2 (Sigma-Aldrich); cianidina-3-glucósido 96% (Extrasynthese); vanilina 99% (Sigma-Aldrich); iodato de potássio 99,5% (Sigma-Aldrich); ácido tânico puro (BDH- Chemicals); água ultra pura (18.2 M Ω .cm) obtida a partir de um equipamento de Millipore-Direct Q3 UV system (USA); ácido sulfúrico 95 – 97% (Fluka); ácido fosfórico p.a. 85% (Panreac Química); acetonitrilo *HPLC gradient grade* (VWR); ácido fórmico *HPLC gradient grade* (VWR).
- c) Aparelhos: Espectrofotômetro Beckman_DU[®] - 70; HPLC da marca Thermo Finnigan (modelo Surveyor) com amostrador automático, bomba-detector de fotodíodos (DAD) e eletroquímico (DIONEX); HPLC Alliance 2695 Separations Module da Waters[®] com detectores de diodos Water 996 PDA e acoplado a um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo, Quattro micro API da Micromass[®]. O software utilizado para aquisição e processamento de dados dos ensaios de massa foi o Masslynx versão 4.1.

3.1.2. Ensaio *in vivo*

- a) Animais: foram utilizados para o ensaio do edema da pata 20 ratos Wistar machos de peso compreendido entre 140 e 165 g e 24 ratos Wistar machos de peso compreendido entre 290 e 325g para o ensaio de modelo de artrite reumatóide. Todos os animais foram sujeitos a um período de aclimação no Biotério de Manutenção da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, à temperatura de 25°C e com ciclos de luz diários de 14 horas, com uma dieta de manutenção de IPM-R20 (Letica) e água *ad libitum* até às 24 horas anteriores à data da experiência, no caso dos animais do ensaio do edema da pata, nesse momento foi suspensa a dieta e manteve apenas o acesso à água. No animais do ensaio da artrite reumatóide continuaram a ter a dieta e água mesmo durante o ensaio. Todos os animais foram manuseados de acordo com a *Guidance in the Operation of Animals (Scientific Procedures) Act 1986*, Reino Unido e com as regulamentações da União Europeia (Jornal Oficial da Comunidade Europeia L 358/1 de 18/12/1986).
- b) Reagentes e soluções: solução fisiológica estéril (B.Braun); carragenina- λ (Sigma-Aldrich); indometacina (Sigma-Aldrich); cloreto de sódio (Merck); solução de Triton X-100 (BDH-Chemicals); ácido acético glacial (Carlo Erba Reagents) ; colagénio (Sigma-Aldrich); adjuvante de Freund (Sigma-Aldrich).
- c) Aparelhos: Pletismómetro (Digital Plethysmometer LE7500 – Letica Scientific Instruments); Raio- X: Phillips Optimus ZBC6 (consola) Inclui: Phillips Bucky Diagnostic Phillips Device LeftOrtopantomografo OP100Ortoceph OC100Kodak Direct View CR Long – Lengh VerticalApelem Baccara (consola e equipamento) e Processador de imagem : Kodak DirectView System CR975- Leitor de Ip e processamento de imagem; Leitor de microplacas: Kinetic microplate reader Vmax – Milenia – Kinetic Analyzer DPC.

3.2 Métodos

3.2.1. Preparação do extrato rico em compostos fenólicos

O método utilizado para a preparação do extrato de framboesas foi baseado em consulta de literatura disponível Mullen *et al.* (2002) e o solvente utilizado foi uma mistura de metanol/acetona (50:50 v/v) (Daniel *et al.*, 1989).

Descrevem-se em seguida os passos para a obtenção do extrato:

- a) Pesou-se 250g de framboesas;
- b) Macerou-se as framboesas utilizando um almofariz;
- c) Adicionou-se 562mL de solução extractante metanol/acetona (50:50 v/v) e deixou-se em repouso por 10 minutos ao abrigo da luz;
- d) Filtou-se;
- e) Distribuiu-se em tubos de centrífuga de 45mL e centrifugou-se durante 20 minutos a 7000rpm a 4°C;
- f) Separou-se o sobrenadante;
- g) Macerou-se novamente as massas residuais e adicionou-se mais 438mL de solução extractante metanol/acetona (50:50 v/v) e deixou-se em repouso por 10 minutos ao abrigo da luz;
- h) Repetiu-se o passo d);
- i) Separou-se o sobrenadante e eliminou-se as massas residuais;
- j) Juntou-se os sobrenadantes e efetuou-se uma filtração com papel de filtro;
- k) Levou-se o filtrado ao evaporador rotativo para eliminar o máximo de extractante possível (praticamente à secura);
- l) Reconstituiu-se com água destilada para ficar um volume final de 50mL.

3.2.2. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada segundo o método de Folin Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999) e adaptada de Stamatakis *et al.*, 2009 por espectrofotometria UV-Visível a 725nm.

3.2.2.1 Análise pelo método Folin-Ciocalteu - Preparação de solução padrão de ácido gálgico

Primeiramente pesou-se 10mg de ácido gálgico e dissolveu-se em solução de metanol:água (80:20, v/v). Transferiu-se este conteúdo para um balão volumétrico de 10ml e acertou-se o volume com solução metanol:água (80:20, v/v), obtendo-se um padrão de concentração de 1000ppm (solução 1). A partir da solução anterior preparou-se uma solução de 100ppm (solução 2). Para tal transferiu-se 500 μ L da solução 1 para um balão volumétrico de 5mL e completou-se o volume com a solução de metanol:água (80:20, v/v); Armazenaram-se as soluções 1 e 2 no frigorífico até posterior utilização. A partir da solução 2 prepararam-se os padrões com as concentrações descritas na tabela 2.

Tabela 2. Tabela de volumes utilizados da solução padrão para obtenção de soluções padrão de ácido gálgico de concentrações pretendidas.

Concentração (ppm)	Volume a pipetar da solução 2 (V _{final} =5mL)
1	50 μ L
2	100 μ L
3	150 μ L
4	200 μ L
5	250 μ L
6	300 μ L

Após completar o volume de cada balão com água destilada, transferiu-se cada solução para um frasco convenientemente rolhado e rotulado.

3.2.2.2 Análise de soluções padrões de Catequina para construção da reta de calibração

Pipetou-se 3500 μ L de cada padrão para um frasco de vidro e adicionou-se 100 μ L de reagente Folin-Ciocalteau. Homogeneizou-se no vórtex e após 3 minutos em repouso adicionou-se 400 μ L de solução de carbonato de sódio (35%). Homogeneizou-se no vórtex novamente e deixou-se a mistura em repouso durante 1 hora e em seguida mediu-se a absorvância em célula de vidro de 1cm ao c.d.o de 725nm. Também foi feito um ensaio em branco segundo o procedimento descrito mas nesse caso pipetou-se 3500 μ L de água destilada em vez de pipetar o padrão.

3.2.2.3 Análise do teor de compostos fenólicos totais da amostra

De cada amostra pipetou-se 3500 μ L para um frasco de vidro e adicionou-se 100 μ L de reagente Folin-Ciocalteau. Homogeneizou-se no vórtex e após 3 minutos em repouso adicionou-se 400 μ L de solução de carbonato de sódio (35%). Homogeneizou-se no vórtex novamente e deixou-se a mistura em repouso durante 1 hora. Logo após este tempo mediu-se a absorvância em célula de vidro de 1cm a 725nm.

3.2.3. Determinação do teor de flavonóides totais

Para a determinação do teor de flavonóides totais seguiu-se o método descrito abaixo. Trata-se de um método espectrofotométrico com detecção a 510nm.

3.2.3.1 Procedimento para determinar o teor de flavonóides totais numa amostra - Preparação das soluções auxiliares

Para a preparação da solução de nitrito de sódio (5%) foi pesado 5g de nitrito de sódio e transferido para um balão volumétrico de 100mL. Logo completou-se o volume deste com água. Para preparar a solução de cloreto de alumínio (10%) pesou-se 10g de cloreto de alumínio e transferiu-se para um balão volumétrico de 100mL e em seguida completou-se o volume deste com água. Também foi preparado uma solução de hidróxido de sódio (1M) a partir de 3,9g de hidróxido de sódio que foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 100mL. O volume do balão também foi completado com água.

3.2.3.2 Preparação de soluções padrão de Catequina

Pesou-se 5mg de catequina e dissolveu-se com metanol. Transferiu-se este conteúdo para um balão volumétrico de 5mL e acertou-se o volume com metanol. A partir da solução anterior (catequina a 1000ppm) fez-se padrões com as concentrações e respectivas diluições demonstradas na tabela 3.

Tabela 3. Tabela de volumes utilizados da solução padrão para obtenção de soluções padrão de catequina de concentrações pretendidas.

Concentração (ppm)	Volume a pipetar da solução mãe ($V_{final}=5mL$)
20	100 μ L
40	200 μ L
60	300 μ L
80	400 μ L
100	500 μ L

Completo-se o volume de cada balão com água e transferiu-se cada solução para um frasco convenientemente rolhado e rotulado que foi armazenado no frigorífico até posterior utilização.

3.2.3.3 Análise de soluções padrões de Catequina para construção da reta de calibração

Retirou-se de cada padrão 1ml e transferiu-se um balão volumétrico de 10mL. Adicionou-se 4mL de água e em seguida 300 μ L de solução nitrito de sódio (5%). Aguardou-se 5 minutos e adicionou-se 300 μ L de solução cloreto de alumínio (10%); Aguardou-se 6 minutos. Adicionou-se 2mL de solução hidróxido de sódio (1M) e completou-se o volume do balão com água (a solução adquire uma tonalidade cor-de-rosa). Depois mediu-se a absorvância em célula de vidro de 1cm a 510nm. O branco foi obtido apenas com água.

3.2.3.4 Análise do teor de flavonóides totais da amostra

Para um balão volumétrico de 10mL, retirou-se de cada amostra 1mL e adicionou-se 4mL de água e em seguida mais 300µL de solução nitrito de sódio (5%). Aguardou-se 5 minutos e adicionou-se 300µL de solução cloreto de alumínio (10%). Aguardou-se mais 6 minutos e adicionou-se 2mL de solução hidróxido de sódio (1M). Completou-se o volume do balão com água (a solução adquire uma tonalidade cor-de-rosa) e mediu-se a absorvância em célula de vidro de 1cm a 510nm. O branco foi obtido apenas com água.

3.2.4. Determinação do teor de antocianinas totais

O teor de antocianinas totais foi determinado segundo o método descrito por Fernandes em 2007.

Nesse procedimento o valor final corresponde à diferença entre o valor da absorvância a 520nm da cianidina-3-glucósido em bissulfito de sódio (solução referência e o valor da absorvância a 520nm da cianidina-3-glucósido em água destilada (por solução padrão).

3.2.4.1 Procedimento para determinar o teor de antocianinas totais numa amostra - Preparação das soluções auxiliares

Para a preparar a solução de ácido clorídrico (2%) primeiramente mediu-se 5,4ml de ácido clorídrico. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100mL e completou-se o volume deste com água. Logo em seguida preparou-se uma solução de Bissulfito de sódio (20%) a partir de 20g de bissulfito de sódio que foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 100mL. Completou-se o volume deste com água.

3.2.4.2 Preparação de soluções padrão de Cianidina-3-Glucósido e análise dessas soluções para construção da reta de calibração

Pipetou-se 600µL de cianidina-3-glucósido dissolvida em água. Transferiu-se este conteúdo para um balão volumétrico de 5mL e acertou-se o volume com água. A partir da solução anterior (cianidina-3-glucósido a 300ppm) fez-se padrões com as concentrações e respectivas diluições demonstradas na tabela 4.

Tabela 4. Tabela de volumes utilizados da solução padrão para obtenção de soluções padrão de cianidina-3-glucósido de concentrações pretendidas.

Concentração (ppm)	Volume a pipetar da solução mãe (V_{final}=5mL)
10	50µL
25	125µL
50	250µL
75	375µL
125	625µL
150	750µL

Completo-se o volume de cada balão com água e transferiu-se cada solução para um frasco convenientemente rolhado e rotulado que foi armazenado no frigorífico até posterior utilização.

3.2.4.3 Análise do teor de antocianinas totais da amostra

Num tubo de ensaio, adicionou-se 5mL de ácido clorídrico (2%), depois 250µL de etanol e em seguida 250µL de amostra. Pipetou-se 1,25mL da mistura anterior para dois tubos de ensaio. Num dos tubos de ensaio, adicionou-se 500µL de bissulfito de sódio (20%) (referência) e no outro tubo de ensaio adicionou-se 500µL de água (amostra). Agitou-se no vórtex, colocou-se os tubos de ensaio ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, aguardou-se 20 minutos e mediu-se a absorvância das soluções a 520nm. O branco foi obtido apenas com água.

3.2.5. Determinação do teor de taninos hidrolisáveis

Para a determinação do teor de taninos hidrolisáveis seguiu-se o método descrito abaixo (M. Çam, Y. Hisil, 2010) . Trata-se de um método espectrofotométrico com detecção a 550nm no UV-visível. A partir de uma solução de ácido tânico em água a 5000ppm foram preparadas as soluções padrão a diferentes concentrações (300,500,800,1100,1400 e 1700ppm) para obtenção da reta de calibração.

O aparelho utilizado para as medições das absorvâncias foi o mesmo utilizado para a determinação do teor dos compostos fenólicos e as leituras também foram

efectuadas em células com 1cm de percurso ótico. A água também foi utilizada como branco.

3.2.5.1 Procedimento para determinar o teor de taninos hidrolisáveis numa amostra - Preparação das soluções auxiliares

Preparou-se uma solução de iodato de potássio (2,5%) pesando 2,5g de iodato de potássio que foi transferido para um balão volumétrico de 100mL. Completou-se o volume deste com água.

3.2.5.2 Preparação de soluções padrão de ácido tânico

Pesou-se 50mg de ácido tânico. Transferiu-se este conteúdo para um balão volumétrico de 10mL e acertou-se o volume com água. A partir da solução anterior (ácido tânico 5000ppm) fez-se padrões com as concentrações e respectivas diluições demonstradas na tabela 5.

Tabela 5. Tabela de volumes utilizados da solução padrão para obtenção de soluções padrão de ácido tânico de concentrações pretendidas.

Concentração (ppm)	Volume a pipetar da solução mãe ($V_{final}=5mL$)
300	300 μ L
500	500 μ L
800	800 μ L
1100	1100 μ L
1400	1400 μ L
1700	1700 μ L

Completou-se o volume de cada balão com água e transferiu-se cada solução para um frasco convenientemente rolhado e rotulado e armazenou-se a solução no frigorífico até posterior utilização.

3.2.5.3 Análise das soluções padrão de ácido tânico para a construção da reta de calibração

Para tubos de ensaio, retirou-se de cada padrão 1mL. Adicionou-se 5mL de solução de iodato de potássio (2,5%) e agitou-se. Após 4 minutos (a solução deverá ficar com uma tonalidade vermelha) mediu-se a absorvância em célula de vidro de 1cm a 550nm. O branco foi obtido com água.

3.2.5.4 Análise do teor de taninos hidrolisáveis da amostra

Para tubos de ensaio, retirou-se 1mL de amostra. Adicionou-se 5mL de solução de iodato de potássio (2,5%) e agitou-se. Aguardou-se 4 minutos (a solução deverá ficar com uma tonalidade vermelha) e em seguida mediu-se a absorvância em célula de vidro de 1cm a 550nm. O branco foi obtido com água.

3.2.6. Determinação do teor de taninos condensados

A quantificação do teor de taninos condensados foi realizada segundo o método descrito em seguida, por espectrofotometria UV-Visível a 500nm, utilizando-se a catequina em metanol (1000ppm) para a preparação das soluções padrão (10,20,40,60,80 e 100ppm) e obtenção da reta de calibração.

Utilizou-se um aparelho Beckman_DU® - 70 Spectrophotometer e células de quartzo de 1cm de percurso ótico para a determinação da absorção a 500nm. O branco foi preparado como descrito no procedimento .

3.2.6.1 Procedimento para determinar o teor de taninos condensados numa amostra - Preparação das soluções auxiliares

Para preparar a solução de vanilina (1%) primeiro pesou-se 1g de vanilina e transferiu-se para um balão volumétrico de 100mL. Completou-se o volume deste com metanol. A Solução de ácido sulfúrico (25%) foi preparada medindo-se 25mL de ácido sulfúrico em uma proveta. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100mL e completou-se o volume deste com metanol aos poucos devido ser uma reação exotérmica.

3.2.6.2 Preparação de soluções padrão de Catequina

Pesou-se 5mg de catequina. Transferiu-se este conteúdo para um balão volumétrico de 5mL e acertou-se o volume com metanol. A partir da solução anterior (catequina 1000ppm) fez-se padrões com as concentrações e respectivas diluições demonstradas na tabela 6.

Tabela 6. Tabela de volumes utilizados da solução padrão para obtenção de soluções padrão de catequina de concentrações pretendidas.

Concentração (ppm)	Volume a pipetar da solução mãe ($V_{final}=5mL$)
10	50 μ L
20	100 μ L
40	200 μ L
60	300 μ L
80	400 μ L
100	500 μ L

Completo-se o volume de cada balão com metanol e transferiu-se cada solução para um frasco convenientemente rolhado e rotulado. Armazenou-se a solução no frigorífico até posterior utilização

3.2.6.3 Análise das soluções padrão de Catequina para a construção da reta de calibração

Para tubos de ensaio, retirou-se de cada padrão 1mL e adicionou-se 2,5mL de solução de vanilina (1%). Em seguida adicionou-se 2.5mL de solução de ácido sulfúrico (25%). Agitou-se e aguardou-se 15 minutos. Mediu-se a absorvância em célula de vidro de 1cm a 500nm. O branco foi obtido da mesma forma utilizando-se 1mL de metanol.

3.2.6.4 Análise do teor de taninos condensados da amostra

Para frascos retirou-se 1mL da amostra (no caso de necessitar de diluição, retirar da diluída). Levou-se à corrente de azoto a 40°C para evaporar a água da amostra até secura. Depois adicionou-se 5mL de metanol; agitou-se. Retirou-se 1mL desta solução para um balão de 10mL e foi adicionado 2,5mL de solução de vanilina (1%). Em seguida também adicionou-se 2,5mL de solução de ácido sulfúrico (25%). Completo-se o balão

com metanol. Agitou-se e aguardou-se 15 minutos para medir a absorvância em célula de vidro de 1cm a 500nm. O branco foi obtido da mesma forma utilizando-se 1mL de metanol.

3.2.7. Análise cromatográfica (HPLC-DAD-ED)

Este método foi utilizado para determinar os compostos fenólicos presentes no extrato de framboesa. O equipamento utilizado é um HPLC da marca Thermo Finnigan (modelo Surveyor) com amostrador automático, bomba, detector de fotodiodos (DAD) e detector eletroquímico.

O detector de díodos efetuou varrimento de 192 a 798nm a uma velocidade de 1Hz e uma largura de banda de 5nm, com detecção de 3 canais individuais (254, 280 e 360nm) com uma velocidade de 10Hz e uma largura de banda de 11nm.

Utilizou-se uma coluna RP-18 (5 μ m) 250 x 4 - Lichrocart[®] e uma pré-coluna RP-18 (5 μ m) em forno termostatizado a 35°C. O volume de injeção foi de 20 μ L.

Foram utilizados os eluentes: A- Solução de ácido fosfórico *p.a* em água ultra pura (0,1%) e B- 1ml de ácido fosfórico *p.a* + 400ml de acetonitrilo HPLC gradient grade + 599ml de água ultra pura. Utilizou-se um fluxo de 0,700 mL/min e o programa de eluição utilizado durante a análise está descrito na Tabela 7.

O detector eletroquímico da marca Dionex tinha na sua constituição um eletrodo de carbono vítreo e efetuava medições de sinal por voltametria integrada em gamas de potenciais entre -1.0 V a 1.0V com um varrimento no tempo de 1.00s. Os resultados obtidos com o detector de eletroquímico foram adquiridos à frequência de 50Hz com um conversor analógico/digital.

A aquisição e o processamento dos resultados obtidos foi feita através do programa ChromQuest[®] para o detector de díodos HPLC e para o detector eletroquímico foi o software 4880 (Unicam).

Tabela 7. Programa de eluentes ao longo da análise no HPLC-DAD-ED.

Tempo (min)	Eluente A	Eluente B
10	100	0
15	80	20
25	80	20
70	30	70
75	30	70
85	0	100
100	0	100
101	100	0
110	100	0

3.2.8. Análise cromatográfica por (HPLC- MS/MS)

Foram utilizados dois programas nesta análise. Um programa mais longo de 100 minutos para a caracterização da amostra que permitia a separação dos compostos e um programa mais curto de 30 minutos utilizado para a quantificação dos compostos (MRM – Monitorização de reação múltipla).

O programa de eluição utilizado está apresentado na Tabela 8. O fluxo usado foi de 0,3mL/min e o volume de injeção de 5µL.

Tabela 8. Programa de eluentes ao longo da análise no HPLC- MS/MS

Tempo (min)	Eluente A	Eluente B
0	95	5
60	80	20
80	72	28
82	70	30
95	95	5
100	95	5

A coluna utilizada era uma Synergi 2.5µm MAX-RP (100x2.00mm) da Phenomenex®. O tempo total da análise foi de 120 minutos que incluiu o período de estabilização da coluna.

Quanto às condições no espectrómetro de massa na fonte de ionização foi utilizado o modo positivo para a análise das antocianinas e modo negativo para análise dos ácidos fenólicos e ácidos orgânicos com o capilar a 3,00kV e o cone a 30V . A temperatura da fonte era de 120°C e aplicou-se energia de colisão de 30eV nas experiências de fragmentação.

Para quantificação dos compostos identificados no modo negativo utilizou-se o método MRM (Monitorização de reacção múltipla) Os eluentes utilizados nessa análise foram: A- ácido fórmico (0,5% v/v) e B- acetoneitrilo (LC-MS grade) e o programa de eluição utilizado está apresentado na Tabela 9. O fluxo aplicado foi de 0,3mL/min e o volume de injeção de 10µL.

O software utilizado para aquisição e processamento de dados foi o Masslynx versão 4.1. Utilizou-se a função Quanlynx para a quantificação dos compostos..

Preparou-se uma mistura de padrões a 10ppm (Anexo VI) e depois construíram-se retas de calibração para a quantificação dos compostos.

Tabela 9. Programa curto de eluição ao longo da análise (MRM).

Tempo (min)	Eluente A	Eluente B
0	95	5
10	60	40
12	10	90
14	10	90
18	95	5
30	95	5

3.2.9. Determinação da atividade antioxidante – ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) , HORAC (*Hydroxyl Radical Capacity Antioxidant*) e CAA (*Cellular Antioxidant Activity*).

3.2.9.1 Método ORAC

Esse ensaio utilizado para avaliar a capacidade antioxidante do extrato de framboesa é um método modificado de Ou *et al* (2001) que mede a capacidade antioxidante de substâncias presentes numa amostra através da inibição da oxidação da fluoresceína catalisada pela formação de radicais peróxido induzida pelo AAPH [2,2 dicloridrato 1'-azobis (2-amidino-propano). Os valores resultantes do ensaio ORAC são calculados utilizando uma equação que considera a concentração de Trolox e a área sobre a curva de decréscimo da absorvância da fluoresceína.

Os resultados são expressos em capacidade anti-oxidante equivalente ao Trolox (*Trolox equivalents antioxidant capacity* – TEAC). O Trolox é um análogo da vitamina E, muitas vezes usado como padrão antioxidante.

3.2.9.2 Método HORAC

O ensaio de HORAC foi baseado num método já relatado anteriormente (Ou *et al*,2002) modificado para um leitor de microplacas (FL800), descrito por Serra *et al* (2010). Foram utilizados 10µL de amostras, adicionadas a 180µL de FL ($4 \times 10^{-3} \mu\text{M}$), e 10µL de CoF_2 (0,79 mg/ mL). A reação foi iniciada com a adição de 5µL H_2O_2 (1.1 M) numa microplaca de 96 poços, colocada a 37°C. A fluorescência emitida pela forma reduzida FI foi medida e registada a cada 1min durante aproximadamente 35min. A microplaca foi lida utilizando filtros de fluorescência para comprimentos de onda de

excitação de 485 ± 20 nm e de emissão de 530 ± 25 nm. O leitor de placas foi controlado pelo software Gen5. O ácido cafeíco foi usado como padrão, pois proporciona uma gama mais linear em relação ao ácido gálico. Os dados foram expressos em milimoles equivalentes de ácido cafeíco (CAE) por litro de sumo.

3.2.9.3 Método CAA

As células de carcinoma de cólon humanas Caco-2 foram obtidas da DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemanha), e foram cultivadas em RPMI 1640 suplementadas com 10% de FBS e 2mM de glutamina. As células de estoque foram mantidas em camadas em frascos de cultura de 175cm^2 e incubadas a 37°C numa atmosfera umidificada a 5% CO_2 . Para avaliar a capacidade antioxidante intracelular do extrato de framboesa, as células Caco-2 foram inoculadas a uma densidade de 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços e o meio foi mudado de 2 em 2 dias até as células atingirem confluência. A atividade antioxidante intracelular do extrato de framboesa foi avaliada seguindo a formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células Caco-2 após tratamento com um indutor de stress químico: AAPH. Este indutor gera radicais peróxido por degradação térmica a 37°C . A formação de ROS intracelular foi monitorizada usando prova fluorescente, DCF-DA, como descrito por Wang & Joseph (1999). Células diferenciadas Caco-2 foram incubadas por 1h com as respectivas diluições do extrato selecionadas e com $25\mu\text{M}$ de DCF-DA. Após remoção da DCF-DA e lavagem com PBS, foi adicionado em cada placa o indutor de stress (AAPH, $600\mu\text{M}$). A Fluorescência (F) foi medida para cada amostra durante 1 hora num leitor FL600 de microplacas (Izasa, Lisboa, Portugal). Foi medida emissão a 538nm após a excitação e a 485nm a cada 5 min durante 1 h. Os resultados da capacidade antioxidante celular (CAA) foram expressos em micromoles de equivalentes de quercetina/100mg de fenóis totais (equivalentes de ácido gálico).

3.3 Avaliação da ação anti-inflamatória do extrato de framboesas – Ensaios *in vivo*

3.3.1. Modelo de edema da pata induzido pela carragenina

Este modelo permite testar o efeito de fármacos tanto na fase aguda quanto na subaguda do processo inflamatório pelo facto do edema ser precisamente um dos sinais cardinais da inflamação.

A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas marinhas vermelhas (Hui, 2006) e sua administração desencadeia um estímulo quimiotáctico que culmina na infiltração de neutrófilos e macrófagos no local da inflamação conseqüentemente desencadeia um processo inflamatório local. Os neutrófilos e macrófagos ativados produzem anião superóxido através da reação catalisada pela NADPH oxidase. A produção deste radical livre então aumenta a expressão da enzima superóxido dismutase (SOD), que desta forma é ativada e catalisa a sua dismutação em peróxido de hidrogénio e oxigénio molecular. Através da reação de Fenton, o peróxido de hidrogénio formado pode originar o radical hidroxilo. Segue-se então uma amplificação desta resposta, com libertação de outras moléculas como IL-6, o TNF- α , IL-1 β , o NO, peroxinitrito e variadas prostaglandinas (Rocha, 2009).

3.3.1.1 Desenho e Procedimento experimental

Os animais (n=20) foram identificados, pesados e aleatoriamente divididos em 4 grupos: controlo (n=4), carragenina (n=6), framboesa p.o (15mg/Kg; n=5) e framboesa i.p. (15mg/Kg; n=5) . Ao grupo controlo apenas se administrou soro fisiológico por via subplantar não tendo sido sujeito à indução da formação de edema pela carragenina. Aos restantes grupos foi induzido edema na pata esquerda através da administração subplantar de 0.1 ml de uma dispersão a 1% de carragenina- λ em soro fisiológico. O grupo carragenina foi administrado com água destilada via oral (10ml/Kg) 30 minutos antes da injeção subplantar da carragenina, servindo este grupo de controlo do edema produzido pela carragenina. Ao grupo framboesa p.o foi administrado o extrato de framboesa (15mg/Kg) por via oral 30 minutos antes da injeção subplantar de carragenina e ao grupo framboesa i.p. foi administrado o extrato de framboesa (15mg/Kg) por via intraperitoneal 15 minutos antes da injeção subplantar de carragenina.

Em cada animal marcou-se com tinta (resistente à água) a articulação da pata esquerda de cada rato (ao nível do maléolo, eminência óssea do tornozelo) procedendo-se em seguida à medição do volume da pata. Ao momento de administração de

carragenina atribuiu-se o tempo zero (t=0h), procedendo-se imediatamente à medição do volume da pata esquerda, repetindo-se esta medição 6 horas após a administração da carragenina (t=6h). O volume medido antes de qualquer administração foi designado por V , o volume medido ao tempo zero é designado por V_0 , e o volume medido às 6 horas é designado por V_6 .

Todas as medições do volume da pata foram efectuadas num pletismómetro (Digital Plethysmometer LE7500 – Leticia Scientific Instruments). A pata é imersa numa solução detergente [solução de Triton X-100 a 0.15% (v/v) e cloreto de sódio 0.1% (m/v)] contida num vaso pertencente a um sistema de dois vasos comunicantes (Figura 16). Ao imergir a pata fez-se coincidir a marcação desta com a marcação existente no vaso. A variação do volume por imersão da pata é indicada directamente pelo aparelho.

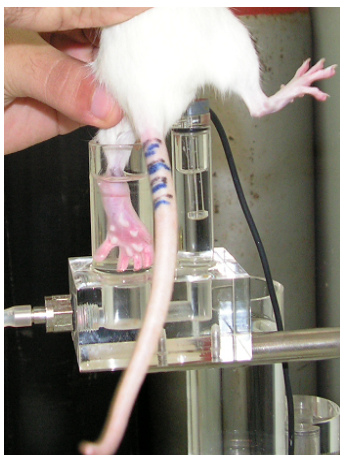


Figura 16. Avaliação do volume da pata no pletismómetro.

3.3.1.2 Expressão dos resultados e análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos em percentagem do aumento do volume da pata relativamente ao volume inicial da pata (antes de qualquer administração). A fórmula utilizada para calcular essa percentagem foi:

$$\% = [(V_6 - V_0) / V_0] \times 100$$

Para efeito de tratamento estatístico, os dados – apresentados na forma de média afectada do respectivo erro padrão associado de n observações (média \pm erro padrão), em que n corresponde ao número de animais em estudo – foram estudados através de uma análise de variância ANOVA de uma entrada, seguida de um pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de $p < 0,05$.

3.3.2. Modelo da Artrite Reumatóide

Como mencionado anteriormente, a artrite reumatóide (AR) é uma doença auto-imune caracterizada pela inflamação crônica das articulações sinoviais e subsequente destruição progressiva do tecido articular. Artrite induzida por colagénio (AIC) é um modelo experimental de artrite induzida como o próprio nome diz, pela injeção de colagénio tipo II (CII), um componente da matriz extracelular de cartilagens articulares localizadas em articulações diartroses (que permitem movimentos). A indução de artrite crónica em ratos imunizados com CII chamou a atenção da comunidade científica porque ratos com AIC, como em alguns mas não em todos os pacientes doentes com AR, apresentam elevadas taxas de anticorpos dirigidos ao CII. E ainda existem muitas similaridades entre a patologia articular na AIC e na AR (Cuzzocrea *et al.*, 2000).

De acordo com Yamada *et al.* (2009), a artrite induzida pelo colagénio (AIC) apresenta muitas das características patológicas da AR em humanos inclusive padrões similares de sinovite, formação de pannus, erosão da cartilagem e osso, fibrose, e perda funcional da articulação. A susceptibilidade tanto dos humanos com AR quanto dos animais da AIC está associada aos genes que codificam a classe II das principais moléculas dos complexos de histocompatibilidade. Em ambos AIC e AR, há um aumento nos níveis de monóxido de azoto (NO) gerados pela sintase do monóxido de azoto e ativação de múltiplas cascatas de sinalização inflamatória, com a libertação de moléculas bioativas circulantes, como citocinas (TNF- α e IL-1).

3.3.2.1 Desenho e Procedimento Experimental

Os animais (n=26) foram identificados, pesados e aleatoriamente divididos em 4 grupos: controlo (n=4), colagénio II (ou AR) (n=6), framboesa p.o (15mg/Kg, n=8) e framboesa i.p. (15mg/Kg, n=8). Ao grupo Controlo apenas se administrou soro fisiológico por via intradérmica na base da cauda não tendo sido sujeito à indução da inflamação crónica pelo colagénio. No dia 1 aos restantes grupos foi realizada a administração intradérmica de 0.1 ml de uma emulsão, previamente preparada de acordo com o procedimento descrito no Anexo X, que continha 100 μ g de CII em adjuvante de Freund na base da cauda para sensibilizar os animais para que assim produzissem anticorpos. No 21º dia foi induzida a inflamação crónica através da aplicação de uma segunda dose de 0.1ml de CII em adjuvante de Freund por via intradérmica na base da cauda. O grupo colagénio serviu de controlo da inflamação crónica induzida pelo colagénio. Do 23º dia ao 35º dia os grupos foram administrados,

uma vez ao dia, o extrato de framboesa nas doses descritas. Ao grupo Framboesa p.o foi administrado o extrato de framboesa (15mg/Kg) por via oral e ao grupo Framboesa i.p. foi administrado o extrato de framboesa (15mg/Kg) por via intraperitoneal.

Os animais foram sacrificados ao 35º dia, tendo sido feita a colheita de sangue que foi, posteriormente centrifugado, para separar o soro da fracção celular. Os soros foram separados e preparados para análise dos níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Para análise dos soros foram utilizados kits Quantikine® de imunoenaios ELISA de fase sólida da R&D Systems Inc (Minneapolis, USA).

Este ensaio emprega a técnica quantitativa sanduíche imunoenzimático. Um anticorpo monoclonal específico para o que se pretende pesquisar do rato (TNF- α ; IL-1 β ou IL-6) foi pré-revestido em uma microplaca. Padrões, controlo e amostras são pipetados para os poços e qualquer composto pesquisado presente está ligado pelo anticorpo imobilizado. Depois de lavar a placa para retirar quaisquer substâncias que não estão ligadas, uma enzima de ligação aos anticorpos policlonais específica para a citocina pesquisada do rato é adicionada aos poços. Após uma lavagem para remover o que não está ligado ao composto anticorpo-enzima, é adicionada uma solução de substrato aos poços. A reação enzimática origina um produto azul que fica amarelo quando a solução de parada é adicionado. A intensidade da cor medida é proporcional à quantidade de TNF- α ; IL-1 β ou IL-6 dos ratos ligados na etapa inicial. As densidades ópticas das amostras foram, então, lidas a 540nm num equipamento Kinetic microplate reader Vmax – Milenia – Kinetic Analyzer DPC leitor de microplacas e aplicadas às respectivas curvas de calibração.

3.3.2.2 Expressão dos resultados e análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos em picogramas por mililitro de soro (pg/mL). Para efeito de tratamento estatístico, os dados – apresentados na forma de média afectada do respectivo erro padrão associado de n observações (média \pm erro padrão), em que n corresponde ao número de animais em estudo – foram estudados através de uma análise de variância ANOVA de uma entrada. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussões

4.1 Caracterização em compostos fenólicos

Com base nos resultados obtidos, fez-se uma análise e uma comparação destes resultados com resultados reportados disponíveis na literatura.

4.1.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Os extratos foram analisados sempre em triplicado, tendo sido efectuada uma diluição de 1:4000 em água. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10.

A média dos valores obtidos foi de 171.03 ± 10.03 mg de eq. de ácido gálgico por 100g de peso fresco de framboesa sendo o valor comparável aos valores descritos na literatura por Anttonen MJ *et al.*, 2005, 192 ± 3.00 mg de eq. de ácido gálgico por 100g de fruto fresco e H.A. Ross *et al.*, 2007, 100 ± 1.62 mg de eq. de ácido gálgico por 100g de fruto fresco.

Tabela 10. Resultados das concentrações dos extratos utilizados nos ensaios em triplicados e média, desvio padrão, desvio padrão relativo e concentração em mg de equivalentes de ácido gálgico em 100g de fruto fresco

Amostras	[] (mg de EAG/L)	[] Média (mg de EAG/L)	DP	DPR	[] (mg de EAG/ 100g de fruto fresco)
Extrato1a	427.35	427.15	0.70	0.16	171.03
Extrato1b	427.15				
Extrato1c	426.95				

4.1.2 Determinação do teor de flavonóides totais

Os extratos foram analisados em triplicado tendo sido efectuada uma diluição de 1:20 em água e os resultados são apresentados na Tabela 11.

De acordo com Sariburun *et al.* (2010) o teor de flavonóides totais nas framboesas varia de 15.41 ± 0.1 mg a 41.1 ± 0.9 mg de eq. de catequina/100g de fruto fresco pelo que o valor obtido de 24.44 ± 0.37 mg de eq. de catequina/100g de peso fresco encontra-se no intervalo dos valores reportados.

Tabela 11. Resultados das concentrações dos extratos utilizados nos ensaios em triplicados e também média, desvio padrão, desvio padrão relativo e concentração em mg de equivalentes de catequina em 100g de fruto fresco para teor de flavonóides totais.

Amostras	[] (mg de ECT/L)	[] Média (mg de ECT/L)	DP	DPR	[] (mg de ECT/100g de fruto fresco)
Extrato1a	61.80	60.81	0.85	1.40	24.44
Extrato1b	60.37				
Extrato1c	60.27				

4.1.3 Determinação do teor de antocianinas totais

Os extratos foram analisados em triplicado tendo sido efetuada uma diluição de 1:20 em água e os resultados são apresentados na Tabela 12.

O resultado obtido para o valor de antocianinas totais foi de 20.03 ± 3.42 mg de eq. de cianidina-3-glucósido/100g de peso fresco é comparável aos valores reportados pela literatura – 20mg a 60mg de equivalente de cianidina-3-glucósido por 100g de fruto fresco (Bowen-Forbes *et al.*, 2010) e 12.4 a 69.5mg de eq. de cianidina-3-glucósido por 100g de fruto fresco (Sariburun *et al.*, 2010).

Tabela 12. Resultados das concentrações, média, desvio padrão, desvio padrão relativo e [] (mg de eq. de cianidina-3-glucósido) para 100g de fruto fresco para o teor de antocianinas totais.

Amostras	[] (mg de ECG/L)	[] Média (mg de ECG/L)	DP	DPR	[] (mg de ECG/100g de fruto fresco)
Extrato1a	50.02	50,08	0,06	0,11	20.03
Extrato1b	50.08				
Extrato1c	50.14				

4.1.4 Determinação do teor de taninos hidrolisáveis

Os extratos foram analisados em triplicado tendo sido efetuada uma diluição de 1:10 em água e os resultados são apresentados na Tabela 13. O valor obtido para o teor de taninos hidrolisáveis foi de 166.13 ± 0.19 mg de eq. de ácido tânico por 100g de peso fresco.

Tabela 13. Resultado das concentrações do extrato utilizado nos ensaios em triplicados, média, desvio padrão, desvio padrão relativo e concentração em mg de equivalentes de ácido tânico em 100g de fruto fresco para teor de taninos hidrolisáveis.

Amostras	[] (mg de EAT/L)	[] Média (mg de EAT/L)	DP	DPR	[] (mg de EAT/100g de fruto fresco)
Extrato 1a	415.13	415.33	0.47	0.11	166.13
Extrato1b	415.00				
Extrato1c	415.88				

4.1.5 Determinação do teor de taninos condensados

Os extratos foram analisados em triplicado tendo sido efetuada uma diluição de 1:10 em água e os resultados são apresentados na Tabela 14.

O valor obtido para o teor de taninos condensados na amostra foi de 17.71 ± 0.25 mg de eq. de catequina por 100g de peso fresco.

Tabela 14. Resultado das concentrações do extrato utilizado nos ensaios em triplicados, média, desvio padrão, desvio padrão relativo e concentração em mg de equivalentes de catequina em 100g de fruto fresco para teor de taninos condensados.

Amostras	[] (mg de ECT/L)	[] Média (mg de ECT/L)	DP	DPR	[] (mg de ECT/100g de fruto fresco)
Extrato 1a	44.23	44.28	0.61	1.39	17.71
Extrato1b	44.92				
Extrato1c	43.69				

Na Tabela 15 apresenta-se um resumo de teores em compostos (parâmetros globais) determinados no extrato.

Tabela 15. Resumo dos resultados obtidos e valores da literatura

Parâmetros analíticos	Resultados obtidos	Resultados reportados
Compostos Fenólicos Totais (mg de EAG ± DP/100g PF)	171.03 ± 10.03	100 ± 1.62 (H.A. Ross <i>et al.</i> , 2007)
		192 ± 3.00 (Antonnen MJ <i>et al.</i> , 2005)
Flavonóides Totais (mg de ECT ± DP/100g PF)	24.44 ± 0.37	15.41 ± 0.1 a 41.1 ± 0.9 (Sariburun <i>et al.</i> , 2010)
Antocianinas Totais (mg de eq Cianidina-3- Glucósido ± DP/100g PF)	20.03 ± 3.42	12.4 a 69.5 (Sariburun <i>et al.</i> , 2010)
		20 a 60 (Bowen-Forbes <i>et al.</i> ,2010)
Taninos Hidrolisáveis (mg de EAT± DP/100g PF)	166.13 ± 0.19	-
Taninos Condensados (mg de ECT ± DP/100g PF)	17.71 ± 0.25	-

4.2 Caracterização dos compostos fenólicos por HPLC-DAD-ED

A amostra foi analisada a alguns comprimentos de onda onde há maior absorção de energia para os compostos fenólicos. Os cromatogramas seguintes mostram comparações entre perfis cromatográficos a 280nm para os compostos fenólicos totais e a outro comprimento de onda para uma classe dos compostos fenólicos a 254nm para os ácido fenólicos hidroxibenzóicos, 320nm para os ácidos fenólicos hidroxicinâmicos, a 360nm para flavonóides e a 258nm e 378nm para os elagitaninos.

Na comparação dos perfis cromatográficos a 280nm (Figura 17) e 254nm verificou-se que os compostos que eluíram nos tempos de 6.70min, 9.09min, 11.04min (ácido gálgico), 13.86min e 16.84min apresentaram uma absorção máxima no comprimento de onda de 254nm, característico de compostos fenólicos hidroxibenzóicos.

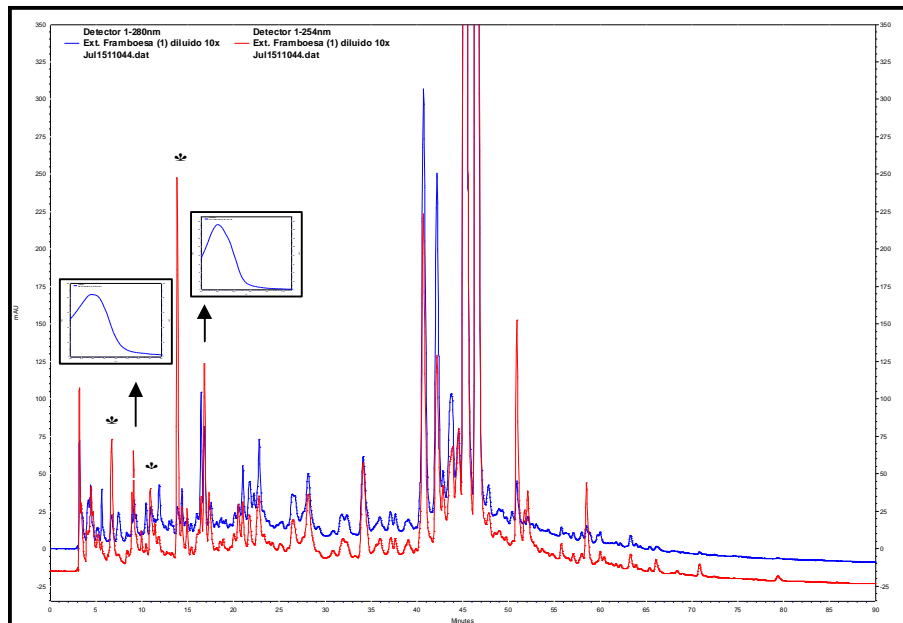


Figura 17. Sobreposição dos cromatogramas a 280nm (azul) e 254nm (vermelho). Os compostos que eluíram nos tempos 6.70min, 11.04min e 13.86min estão marcados com asterisco(*). E nos outros compostos que eluíram nos tempos 9.09min e 13.86min apresentam-se os seus respectivos espectros de absorção.

Na sobreposição dos cromatogramas a comprimentos de onda de 280nm e 320nm (Figura 18) evidenciou-se a presença de ácidos fenólicos hidroxicinâmicos, não identificados, nos tempos de 21.03min (*), 22.23min, 32.39min e 35.56min (*).

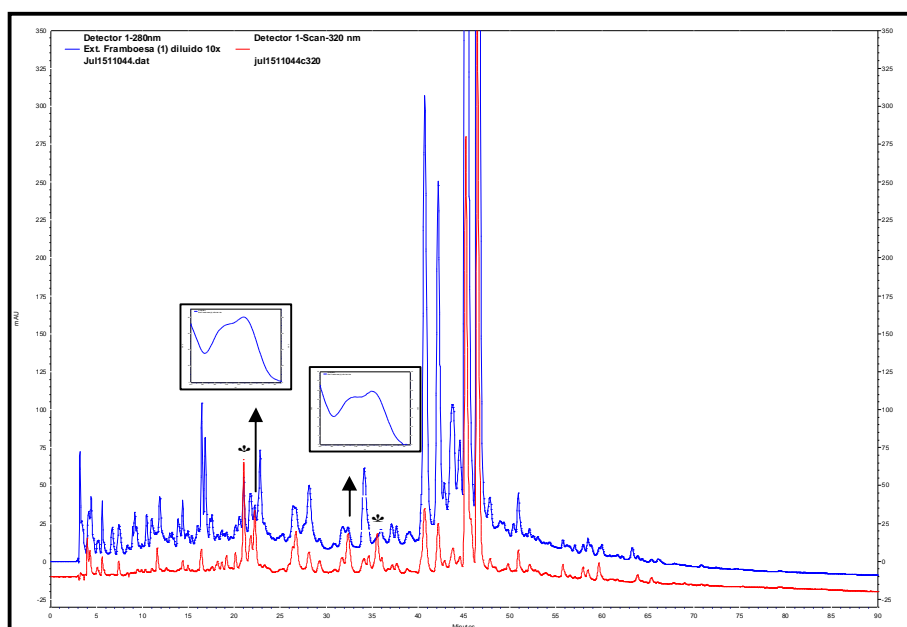


Figura 18. Sobreposição de cromatogramas a 280nm (azul) e 320nm (vermelho) e espectros de absorção dos compostos com tempos de eluição 22.23min e 32.39min.

Ao comparar os perfis cromatográficos do extrato de framboesa a 280nm e 360nm (Figura 19) constatou-se no extrato a presença das antocianinas que apresentam maior absorção a 520nm.

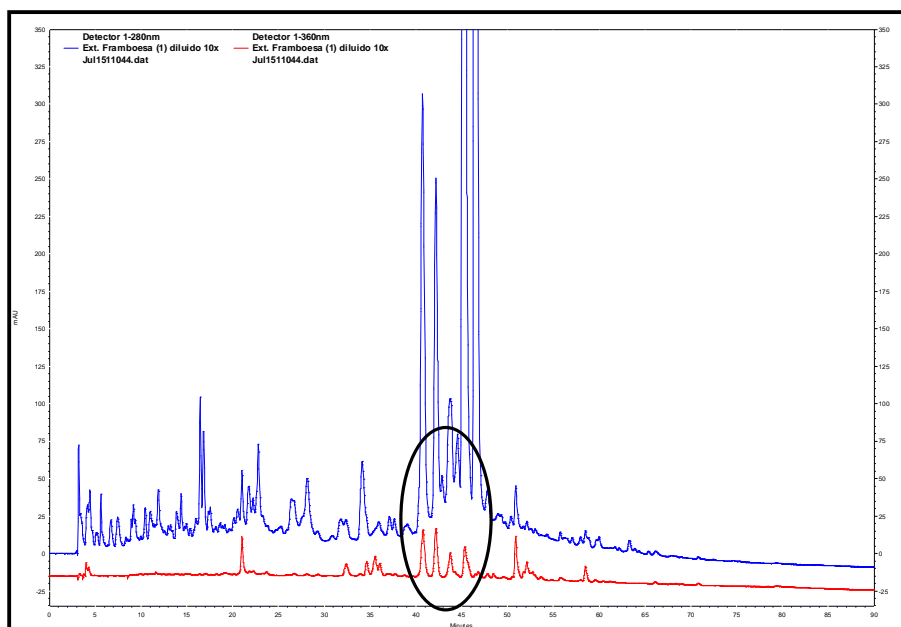


Figura 19. Sobreposição de cromatogramas a 280nm (azul) e 360nm (vermelho) com indicação onde encontram-se as antocianinas.

A Figura 20 mostra a identificação dos picos referentes às antocianinas que foi possível devido a identificação feita pela análise cromatográfica por HPLC e pela bibliografia (Mullen *et al.*, 2002). As antocianinas encontradas no extrato por ordem crescente de tempo de eluição foram as seguintes: 1- Cianidina-3-soforósido; 2- Cianidina-3-glucósido; 3- Pelargonidina-3-soforósido; 4- Pelargonidina-3-glucósido; 5- Cianidina-3-rutinósido; 6- Pelargonidina-3-(2^G-glucosilrutinosido); 7- Pelargonidina-3-rutinósido.

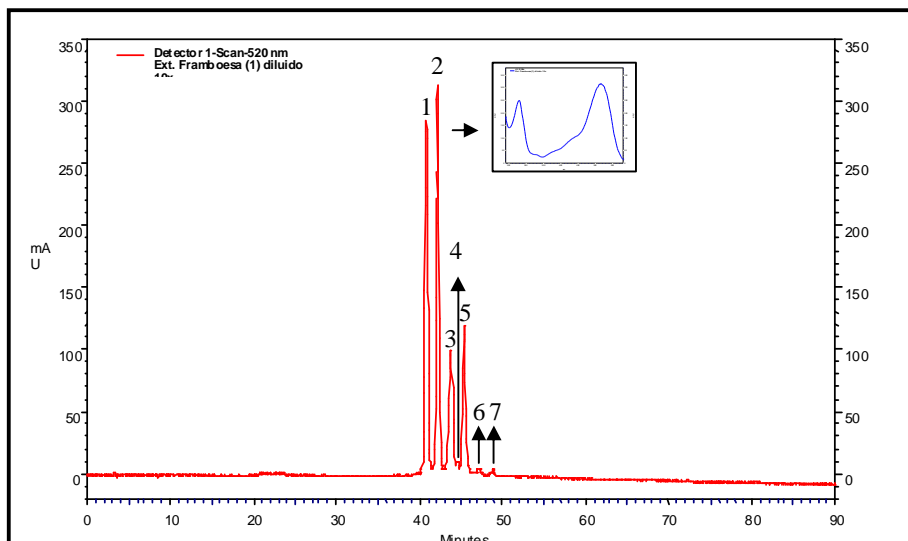


Figura 20. Cromatograma a 520nm com numeração dos picos das antocianinas identificadas e espectro de absorção da cianidina-3-glucósido. As antocianinas são: 1- Cianidina-3-soforósido; 2- Cianidina-3-glucósido; 3- Pelargonidina-3-soforósido; 4- Pelargonidina-3-glucósido; 5- Cianidina-3-rutinósido; 6- Pelargonidina-3-(2^G-glucosilrutinosido); 7- Pelargonidina-3-rutinósido.

Elagitaninos tem maior absorção aos comprimentos de onda de 258nm e 378nm. Fez-se a comparação dos perfis cromatográficos a esses comprimentos de onda (Figura 21). Os compostos marcados com asterisco (*) que aparecem nos tempos de 50.89min e 58.50min demonstram uma maior absorção no comprimento de 258nm. Dentre os compostos com o tempo de eluição de 52.56min está o composto já identificado como ácido elágico * (e).

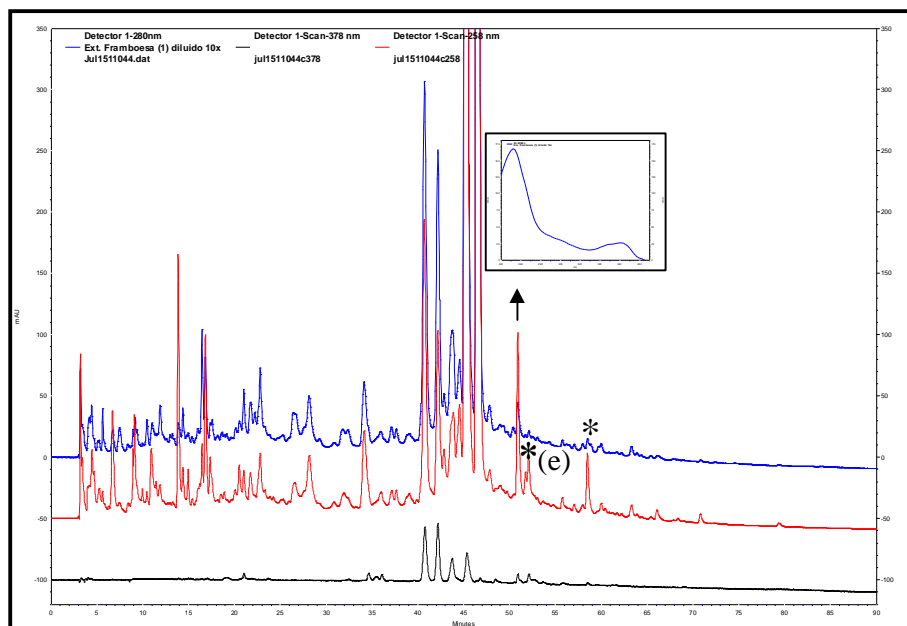


Figura 21. Sobreposição de cromatogramas a 280nm, 258nm e 378nm e espectro do composto derivado do ácido elágico com tempo de eluição de 50.89min e o ácido elágico * (e).

O extrato de framboesa foi analisado e comparou-se o perfil cromatográfico obtido com cromatogramas de misturas de padrões (100ppm). A mistura padrão contém padrões descritos na literatura como presentes no extrato de frutos vermelhos. Estes padrões estavam disponíveis e foram preparados de acordo com o procedimento descrito no Anexo VI. A composição destas misturas e os seus tempos de retenção estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16. Composição das misturas de padrões em metanol e seus tempos de retenção.

Mistura A 100ppm	
Padrões	TR (min)
1- Ác. Gálgico	11,13
5 - Epicatequina	36,19
9 - Ác. elágico	53,07
Mistura B 100ppm	
Padrões	TR (min)
2 - Ác. protocatechuico	16,10
4 - Ác. cafeico	29,50
6 - Cianidina-3-O-glucósido	43,90
8 - Ác. salicílico	50,15
10 - Resveratrol	61,73
Mistura C 100ppm	
Padrões	TR (min)
3 - Ác. Vanílico	37,00
7 - Ác. ferúlico	45,67

No cromatograma (Figura 22) encontra-se a sobreposição de cromatogramas das misturas de padrões A, B e C onde é feita a identificação dos picos dos padrões.

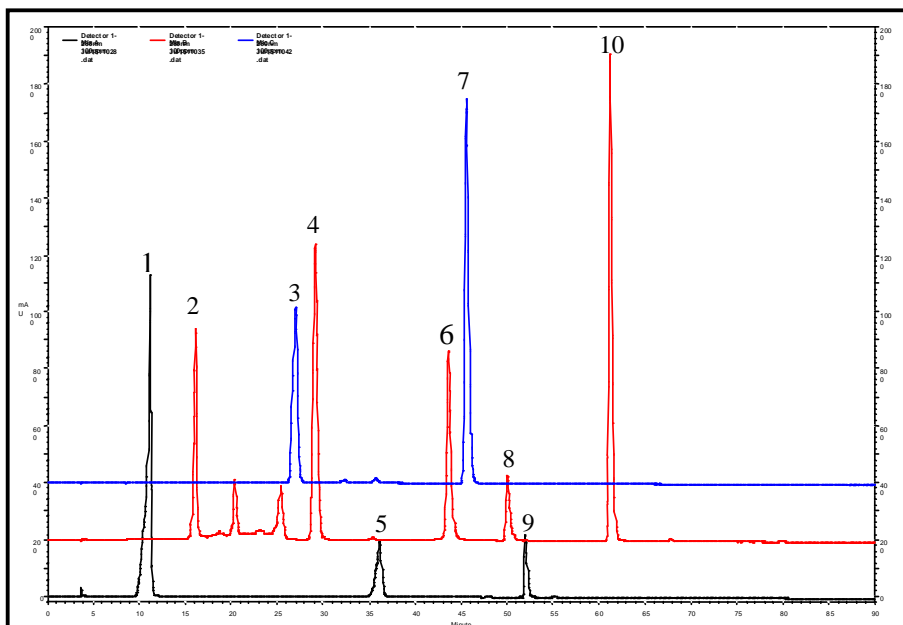


Figura 22. Sobreposição de cromatogramas das misturas de padrões a 280nm com a identificação dos picos: A: 1- ácido gálgico; 2- ácido protocatechuico; 3- ácido vanílico; 4- ácido cafeico; 5- epicatequina; 6- cianidina-3-O-glucósido; 7- ácido ferúlico; 8- ácido salicílico; 9- ácido elágico; 10- resveratrol.

Compararam-se os cromatogramas da amostra com os cromatogramas das misturas de padrões e identificaram-se 3 compostos (ácido gálgico, cianidina-3-O-glucósido e ácido elágico) na amostra. A presença destes compostos foi confirmada pela sobrecarga dos padrões na amostra. Para quantificá-los fizeram-se retas de calibração desses padrões a diferentes concentrações (Anexo VII) e os resultados estão de acordo com os valores já reportados por Mullen *et al.* (2003) e são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Compostos identificados com os tempos de retenção (min.) e concentração na amostra obtida através da equação da reta de cada composto em mg/L e em mg/100g de peso fresco de framboesa.

Tempos de retenção (min.)	Compostos	Conc.(mg/L)	Conc. (mg/100g de PF)
11.04	Ácido Gálgico	6.0	2.4
52.56	Ácido Elágico	4.50	1.8
43.90	Cianidina-3-O-glucósido	31.4	6.3

As três principais antocianinas detectadas a 520nm foram a Cianidina-3- O -soforósido (pico 1); a cianidina-3- O – glucósido (pico 2) e a cianidina-3- O – rutinósido (pico 5) como já reportado anteriormente por González-Barrio *et al.* (2010). Outras antocianinas identificadas foram a Pelargonidina-3-soforósido (pico 3), pelargonidina-3-glucósido (pico 4), pelargonidina-3-(2^G-glucosilrutinosido) (pico 6) e a pelargonidina-3-rutinósido (pico 7). Atendendo a que a quantificação das antocianinas individuais baseou-se na reta do padrão Cianidina-3-glucósido, para cada antocianina calculou-se o fator de correção de peso molecular (FCPM), tal como foi descrito por Chandra *et al.* (2001) (Tabela 18).

Tabela 18. Fator de correção de peso molecular (FCPM) para quantificação de cada antocianina identificada na amostra.

Pico	Antocianina	Catião Analito	Catião Padrão	FCPM
1	Cianidina-3-soforósido	611.16	449.1	1.36
2	Cianidina-3-glucósido	449.1	449.1	1
3	Pelargonidina-3-soforósido	595.16	449.1	1.32
4	Pelargonidina-3-glucósido	433.11	449.1	0.96
5	Cianidina-3-rutinósido	595.16	449.1	1.32
6	Pelargonidina-3-(2G-glucosilrutinosido)	741.22	449.1	1.65
7	Pelargonidina-3-rutinósido	579.14	449.1	1.29

Para a quantificação das antocianinas (mg/g) utilizando o FCPM foi utilizada a fórmula:

$$Quantificação = (AxFD) \times \frac{FCPM}{P_0 Amostra}$$

Onde A corresponde à quantidade de antocianina (equivalente de cianidina-3-glucósido mg/mL); FD corresponde ao fator de diluição que para fruto fresco é igual ao peso inicial da amostra + 20 a dividir pelo peso em gramas de 5mL de extrato x 10mL ; FCPM ao fator de correção de peso molecular e P₀Amostra corresponde ao peso inicial da amostra. A Tabela 19 apresenta os resultados das quantificações das antocianinas utilizando o fator de correção de peso molecular.

Tabela 19. Antocianinas identificadas com os tempos de retenção (min.) suas concentrações em mg/L na amostra e em mg/100g de peso fresco de framboesa.

Picos	Tr (min)	Antocianina	Conc.(mg/L)	Conc.(mg/100g de PF)
1	40.78	Cianidina-3-soforósido	16.6	2.58
2	42.28	Cianidina-3-glucósido	15.7	2.44
3	43.71	Pelargonidina-3-soforósido	6.4	1
4	44.53	Pelargonidina-3-glucósido	0.3	0.05
5	45.40	Cianidina-3-rutinósido	7.2	1.12
6	47.21	Pelargonidina-3-(2G-glucosilrutinosido)	0.4	0.06
7	48.81	Pelargonidina-3-rutinósido	0.95	0.15

A análise do cromatograma obtido com o detector eletroquímico (Figura 23) mostra que entre os compostos que apresentavam sinal e como tal podem contribuir para a atividade anti-oxidante do extrato estavam as antocianinas, a cianidina-3-O-glucósido. Também apresentavam sinal alguns compostos que não foram identificados mas pela análise do cromatograma a diferentes comprimentos de onda e de seus espectros de absorção, dá uma indicação a que classe de compostos fenólicos eles pertencem. Nas regiões destacadas 1 e 2 os compostos são ácidos fenólicos hidroxibenzoicos; na região 3 ácidos hidroxicinâmicos pois apresentavam espectros típicos desse grupo com absorvância de 289nm e máxima de 320nm; na região 4 as antocianinas (Cianidina-3-glucósido) e na região 5 compostos derivados do ácido elágico.

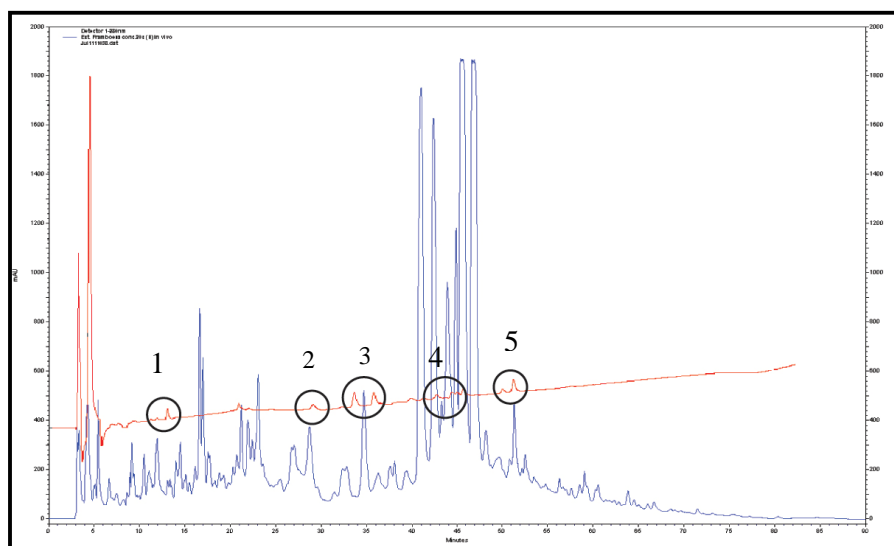


Figura 23. Cromatograma do eletroquímico sobreposto sobre o do HPLC da amostra concentrada 20x a 280nm indicando os sinais: 1 e 2 - Ácido hidroxibenzoicos; 3- ácidos fenólicos hidroxicinâmicos; 4- antocianinas (Cianidina-3-O-glucósido); 5- derivados do ácido elágico.

4.3 Análise cromatográfica (HPLC-MS/MS)

A cromatografia líquida associada à espectrometria de massa é muitas vezes utilizada para identificação e quantificação de compostos presentes em amostras complexas. Inicialmente fez-se um varrimento de valores de massa (m/z) entre 50 a 1500 (modo MS Scan) para se obter um conhecimento geral dos compostos presentes na amostra. Em seguida, fez-se uma pesquisa de alguns íons moleculares específicos reportados na literatura. Esta pesquisa foi realizada em modo SIR (Figura 24) e permitiu determinar os tempos de retenção dos compostos através dos valores de massa.

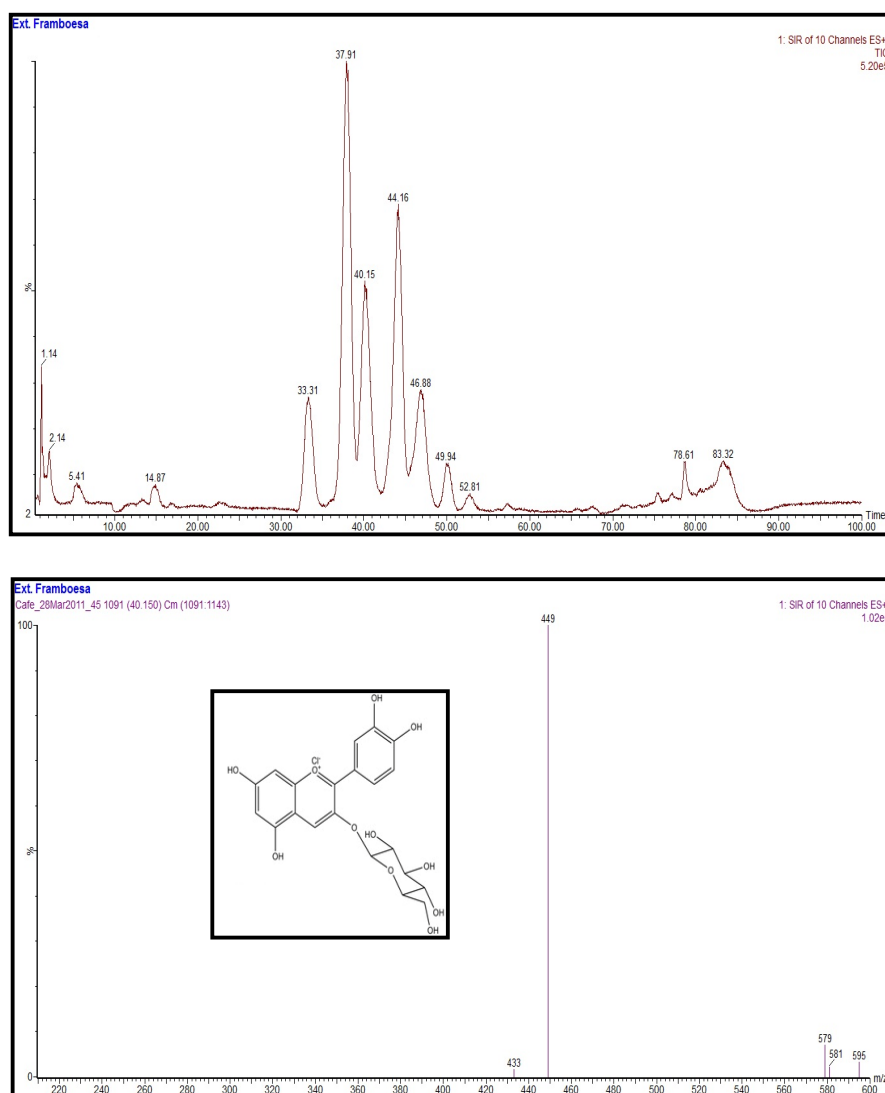


Figura 24. Cromatograma do modo SIR (modo programado para encontrar massas de interesse). Abaixo está o espectro do íon molecular $[M-H]^+ = 449 m/z$ no tempo de 40.15min que corresponde a cianidina-3-glucósido com sua estrutura química.

Depois seguiu-se a busca pelos fragmentos destas massas nos tempos de retenção determinados em modo DaughterScan (Figura 25). Os fragmentos são característicos de cada composto e permitem uma identificação inequívoca destes compostos. De forma a reforçar a identificação dos compostos também se comparam os resultados de fragmentação dos compostos com os dados disponíveis na literatura.

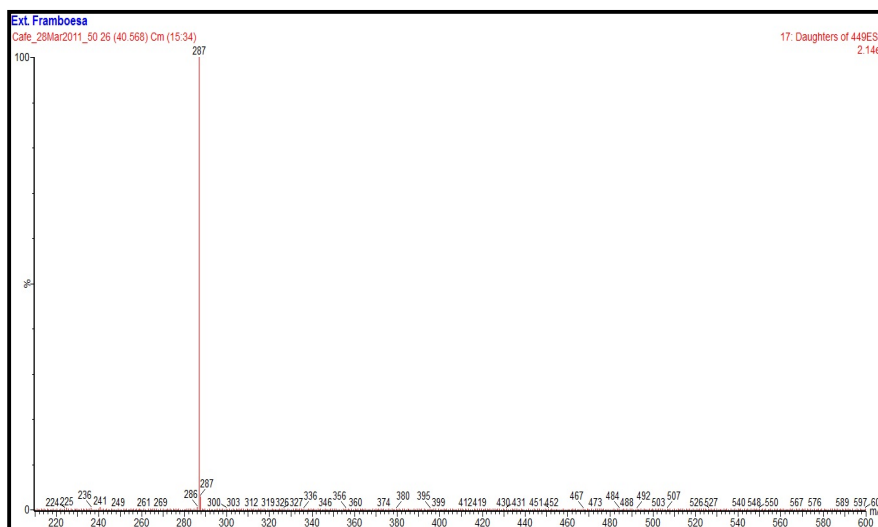


Figura 25. Espectro de massa da fragmentação do íon 449 m/z que mostra o único fragmento 287 m/z .

Na Figura 26 está o cromatograma da amostra a 520nm com a identificação das antocianinas em modo positivo e na Tabela 20 encontram-se os tempos de eluição, c.d.o. de absorção máxima, íon molecular e seus respectivos fragmentos. A ordem de eluição e a fragmentação estão de acordo com o reportado na literatura (Hager *et al.*, 2008); (Borges *et al.*, 2010).

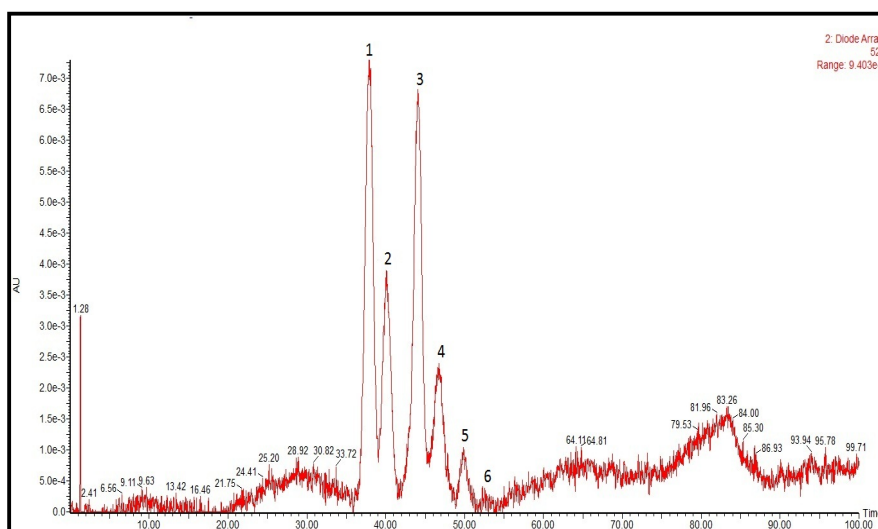


Figura 26. Cromatograma (HPLC-DAD-MS) a 520nm do extrato de framboesa metanol:acetona (50:50 v/v) com identificação dos picos.

Tabela 20. Antocianinas identificadas na análise por HPLC-MS-ESI+/3,0kv/30V no extrato de framboesa em metanol/acetona (50:50 v/v).

[M-H] ⁺ m/z	Pico	tr (min)	(λ)máxima	Fragmentos 30eV (m/z)	Composto
611	1	37,71	278,519	287	Cianidina-3-sophorosido
449	2	40,56	279,519	287	Cianidina-3-glucósido
581	2	41,47	279,519	449,287	Cianidina-3-sambubiosido
595	3	42,88	280,503	271	Pelargonidina-3-sophorosido
757	3	43,85	280,519	611,287	Cianidina-3(2 ^G -glucosilrutinosideo)
433	4	45,19	274,503	271	Pelargonidina-3-glucósido
595	4	46,91	274,519	287	Cianidina-3-rutinosideo
727	5	48,61	270,519	581,287	Cianidina-3-xilosilrutinosideo
741	5	49,91	270,503	271	Pelargonidina-3(2 ^G -glucosilrutinosideo)
579	6	52,8	262,503	535,271	Pelargonidina-3-rutinosideo

Para quantificação foram feitas condições de MRM para alguns compostos. Foram feitos ajustes nas condições do capilar e da fonte afim de se obter uma eficaz quantificação dos compostos.

Dentre os compostos identificados no modo negativo estão os ácidos orgânicos como o cítrico que foi identificado pela presença do ião molecular, m/z 191, o ácido málico (m/z 134) e o ácido succínico m/z 118).

Segundo Kalt *et al.* (1999) 6% da atividade antioxidante da framboesa provém da vitamina C. Por ser um composto com elevado poder redutor tem capacidade de doar elétrons, prevenindo a oxidação de outros compostos. A própria natureza da reação implica a oxidação da vitamina C o que dificulta a sua identificação (Padayatty *et al.*, 2003). Usando uma gama de concentração de 0.5 a 10ppm não foi detectada a presença deste composto na amostra.

Dentre os ácidos fenólicos presentes na amostra encontrou-se o ácido gálico (m/z 169), o ácido elágico (m/z 301), o ácido protocatechuico (m/z 153) e outros. Destaca-se a presença do galoil-bis-hexahidroxidifenol-hexósido (Figura 27) conhecido também como casuarinina ([M-H]⁻ = 935 m/z) que é a unidade monomérica básica dos elagitaninos de maiores massas moleculares encontrados na framboesa: dímeros (Sanguina H6, Lambertianina A) e trímeros (Lambertianina C) (Hager *et al.*, 2008). Os compostos identificados são apresentados na Tabela 21 e as quantificações de alguns destes compostos são apresentados na Tabela 22.

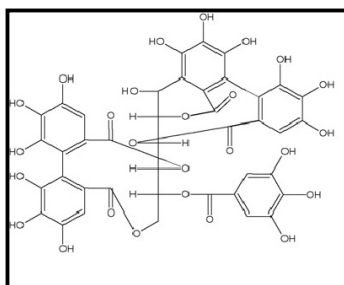


Figura 27. Estrutura da casuarinina (Lansky & Newman, 2007).

Tabela 21. Compostos identificados em análise por HPLC-MS- ESI-/3,0kV/30v no extrato de framboesa em metanol/acetona (50:50 v/v).

Tr(min)	Composto	[M-H] m/z	Fragmentos m/z	(λ) Máxima (nm)
1,45	Ácido cítrico	191	111	234
1,45	Ácido málico	134	115	229
2,00	Ácido succínico	118	73	224
2,39	Ácido gálico	169	125	269
4,45	Ácido protocatechuico	153	109	294
6,65	Ácido hidroxibenzóico	137	93	255
7,91	Ácido cafeico	341	179	293
8,49	Hexahidroxidifenol-hexósido	481	301	267
9,72	Ácido p-cumárico	163	119	304
10,61	Ácido elágico	301	229,185	367,265
12,06	Canferol-glucósido	447	285	368,254
13,07	Canferol-glucuronido	461	285	365,254
14,12	Quercetina	301	151	348,266
14,22	Quercetina-3-rutinósido (Rutina)	609	301	365,254
67,80	Galoil-bis-hexahidroxidifenol-hexósido (casuarinina)	935	633, 301	367,265

Tabela 22. Teor dos compostos identificados presentes no extrato.

Composto	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/100g de PF)	Valores Reportados
Ácido elágico	5.4	1.08	0.2-1.2 mg/100g de PF ^{ref-1}
Ácido hidroxibenzóico	0.8	0.16	-
Ácido protocatechuico	1	0.2	-
Ácido cítrico	211.5	42.3	15-24 mg/100g de PF ^{ref-1}
Ácido gálico	1.3	0.26	-
Ácido málico	9.3	3.72	4-8 mg/100g de PF ^{ref-1}
Ácido succínico	0.7	0.14	-
Ácido cafeico	0.6	0.12	-
Ácido p-cumárico	<LQ*	-	-
Canferol-glucósido	0.34	0.07	0.04-0.24 mg/100g de PF ^{ref-1}
Quercetina	0.49	0.08	0.07 mg/100g de PF ^{ref-1}
Rutina	0.45	0.18	-

*<LQ= inferior ao limite de quantificação = 0.5ppm.

Ref-1: J. Milivojevic *et al.*,2011.

4.4 Determinação da atividade antioxidante – ORAC, HORAC e CAA.

A realização destes ensaios é de extrema importância pois a atividade anti-inflamatória está diretamente ligada a atividade antioxidante visto que os processos metabólicos endógenos, especialmente as inflamações crônicas, são importantes fontes de radicais livres (Wolfe *et al.*, 2008).

O valor obtido para o ORAC foi de 1277 ± 38 μmol de CAET/ 100g de peso fresco sendo um pouco superior se comparado ao valor médio reportado para maçãs (*Fuji, Starking, Reineta Parda, Gala Galaxy e Golden*). Para o HORAC o valor obtido foi de 529 ± 33 μmol de CAE/ 100g de peso fresco enquanto que o valor médio reportado para maçãs (*Fuji, Starking, Reineta Parda, Gala Galaxy e Golden*) é de 612 ± 79 μmol de CAE/ 100g de peso fresco (Serra *et al.*, 2007).

O ensaio da atividade antioxidante intracelular possui uma vantagem em relação aos outros métodos. O método CAA não tem a limitação da inabilidade para representar a complexidade dos sistemas biológicos. Os outros métodos só medem as reações químicas que não podem ser interpretadas como na atividade *in vivo*, por não se considerar a biodisponibilidade, estabilidade, retenção tecidular, ou reatividade dos compostos sob condições fisiológicas (Huang *et al.*, 2005).

Para a atividade antioxidante celular o resultado obtido foi de 133 μmol QE/ 100g de peso fresco que é 4 ou mais vezes superior ao valor descrito para frutos como Mirtilo (47 μmol QE/ 100g de peso fresco) e maçãs (13 μmol QE/ 100g de peso fresco) (Wolfe *et al.*, 2007) como mostra a Tabela 23.

Tabela 23. Valores obtidos em ensaios de atividade antioxidante de alguns frutos vermelhos.

Atividade Antioxidante				
Fruto	ORAC (μmol CAET/100g)	HORAC (μmol de CAE /100g)	CAA (μmol de QE/100g)	Ref.
Framboesa	1277	529	133	a,b
Mirtilo	4826	1293	19	a,b
Amora	6221	834	154	a,b
Arando	8394	-	33.6	a
Morango	8348	-	42.2	a

Ref.- a) Wolfe *et al.*, 2008; b) P. Denev *et al.*, 2010.

4.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato

4.5.1 Modelo do edema da pata induzido pela carragenina

A manifestação do edema da pata deu-se pelo aumento estatisticamente significativo do volume da pata no grupo administrado apenas com carragenina em relação ao grupo controlo. Verificou-se uma percentagem de aumento de aproximadamente 50% 6 horas após a administração.. A administração do extrato de framboesa na dose de 15mg/Kg (p.o) não alterou o volume da pata após essas 6 horas comparando-se com o grupo carragenina ao contrário do que ocorreu com a administração do extrato pela via intraperitoneal que impediu o aumento do volume da pata, demonstrando resultado igual aos animais do grupo controlo que só receberam uma injeção intraplantar de soro fisiológico (Figura 28).

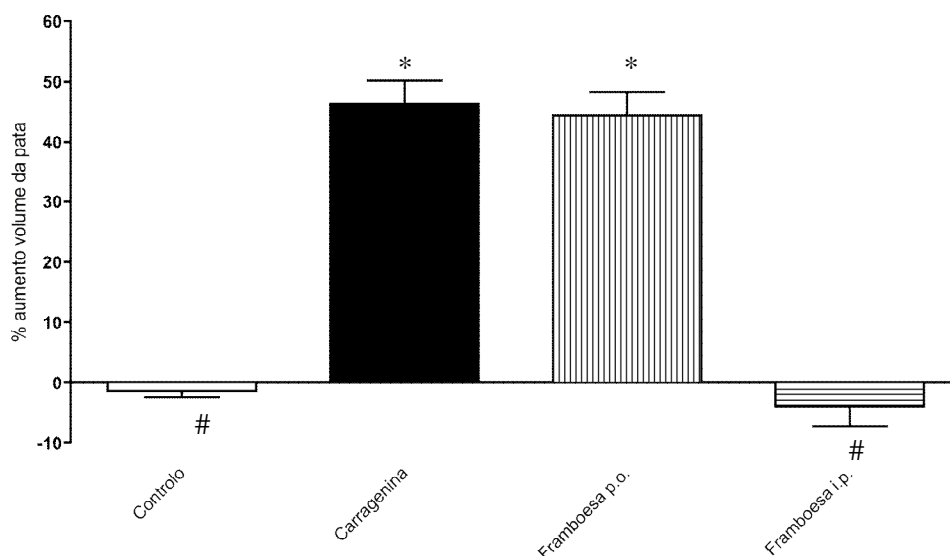


Figura 28. Efeito da administração p.o. e i.p. do extrato de framboesa no aumento do volume da pata 6 horas após a administração da carragenina (* $P < 0,001$ vs Controlo; # $P < 0,001$ vs Carragenina).

A administração do extracto de framboesa por via oral no ensaio da inflamação aguda não permitiu que se observasse a redução do edema após 6 horas da administração. Em oposição a estes resultados, a administração do extracto através de uma via parentérica permitiu que se observasse uma redução estatisticamente significativa do edema da pata nestes animais. Estes resultados sugerem as hipóteses de: i) a via oral ser responsável por um possível efeito de primeira passagem dos constituintes do extracto que possuem atividade farmacológica; ii) o tempo necessário para a observação do efeito através desta via ser superior a 6 horas e/ou necessitar de administrações repetidas.

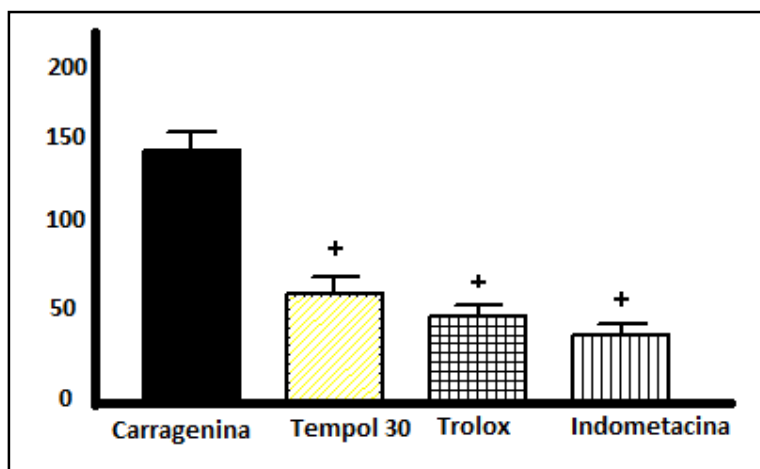


Figura 29. Efeito do pré-tratamento de anti-inflamatórios comerciais no ensaio do edema da pata em % do aumento do volume da pata (+ $P < 0,05$ vs Carragenina).

Se compararmos o efeito anti-inflamatório do extracto de framboesa obtido no modelo descrito com a percentagem de redução do edema da pata obtida com outros fármacos no mesmo modelo verificamos que os valores de redução do edema da pata são similares aos obtidos com o tempol na dose de 30mg/kg (um mimético da SOD de baixo peso molecular), que diminui o edema em aproximadamente 56%, e do trolox na mesma dose (análogo hidrossolúvel da vitamina E), que diminui o edema em aproximadamente 65%, o que vem justificar que pelo menos parte dos efeitos observados pela administração do extracto se devam às suas propriedades antioxidantes. Comparando ainda com o resultado obtido para a indometacina na dose de 10mg/kg (um anti-inflamatório não-esteróide não selectivo para as cicloxigenases), verificamos que este mecanismo de acção poderá também merecer investigação posterior no que concerne às possíveis atividades do extracto.

4.5.2 Modelo da Artrite Reumatóide

A avaliação da ação anti-inflamatória do extrato nesse modelo foi realizada através da análise de imagens radiográficas das patas dos animais e do doseamento dos níveis séricos das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

A análise radiográfica das patas posteriores dos ratos revelou que no grupo em que foi administrado o colagénio (Figura 30-b) é evidente a osteoesclerose da articulação, com a presença de áreas de erosão. Enquanto que nas patas dos animais

administrados com o extrato por via p.o (Figura 30-d) ou por via intra-peritoneal (Figura 30-c) a esclerose óssea e a erosão articular são menos evidentes apesar da indução da artrite reumatóide.



Figura 30. Imagens radiográficas das patas dos animais após o ensaio: a) controle; b) grupo colagénio II; c) grupo framboesa i.p.; d) grupo framboesa p.o

Durante o ensaio foram observados visualmente sinais indicadores da inflamação como rubor e aumento significativo dos volumes das patas devido a formação de edema que levou alguns dos animais a perda dos movimentos das patas posteriores. No final do ensaio os ratos administrados com o extrato apresentavam as patas com o aspecto semelhante às do grupo controle, sem evidência de edema. A determinação quantitativa do edema realizada recorrendo à utilização do pletismómetro e ao modelo de teste anteriormente descrito para a inflamação aguda. Os resultados estão apresentados na Figura 31.

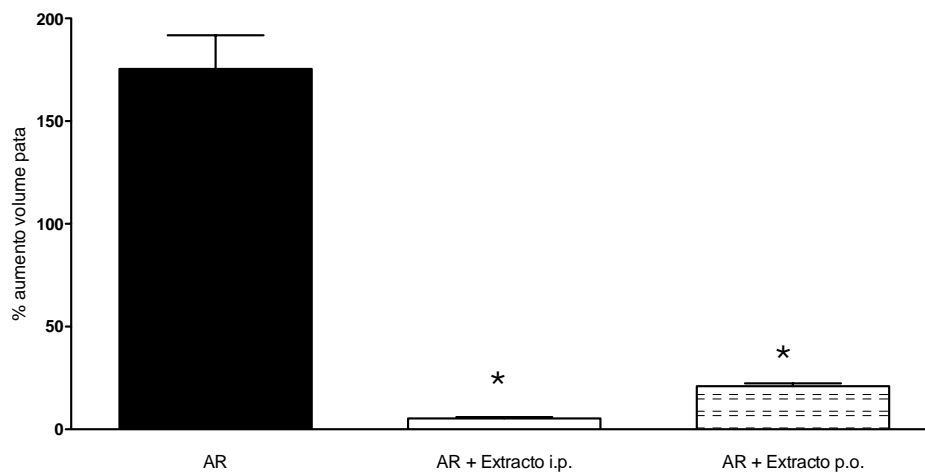


Figura 31. Percentagem de aumento do volume da pata em relação aos animais do grupo controle. *P<0.05 vs AR (AR corresponde ao grupo colagénio II)

A colheita do sangue para a análise dos níveis séricos das citocinas foi realizada através de punção cardíaca e a sua quantificação foi feita utilizando-se retas de calibração (concentração x densidade ótica) que são apresentadas no Anexo XI.

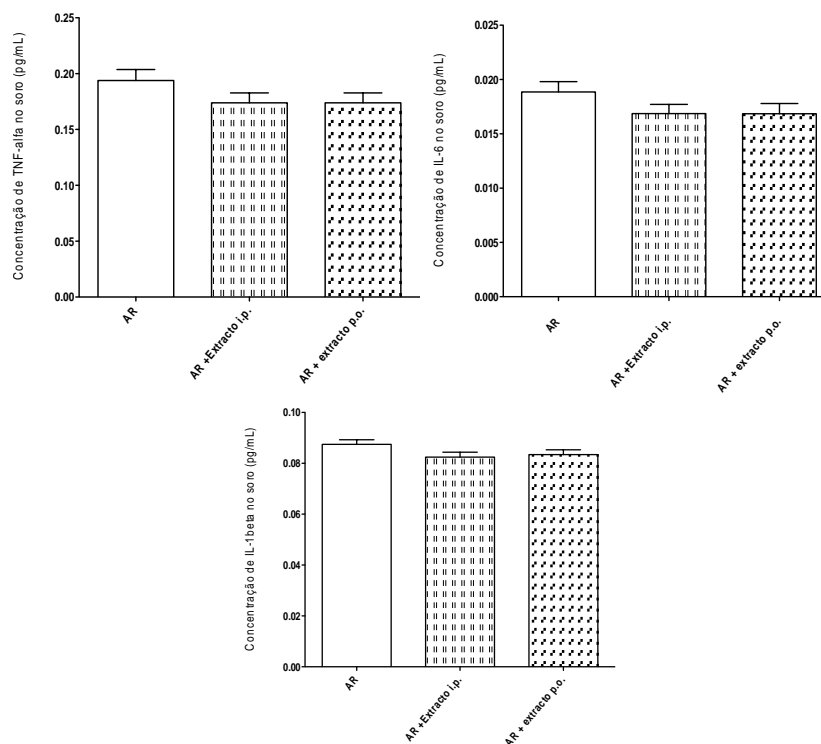


Figura 32. Níveis de interleucinas (TNF-alfa, IL-1beta e IL-6) no soro dos animais de cada um dos grupos. *P<0.05 vs AR (AR corresponde ao grupo colagénio II).

Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa nas quantidades de citocinas determinadas no ensaio da Artrite Reumatóide, houve ainda assim uma visível diminuição do edema nas patas dos animais administrados com o extracto de framboesa tanto por via oral como por via intraperitoneal, o que sugere um efeito anti-inflamatório do extrato quando administrado por via oral, o que difere dos resultados anteriormente obtidos no ensaio de inflamação aguda. Talvez por ser este ser um ensaio com um número maior de administrações do extrato seja possível atingir níveis plasmáticos significativos dos compostos necessários para haver uma diminuição da atividade inflamatória. A inexistência de variações estatisticamente significativas nos níveis de citocinas reflecte apenas que a elevação dos valores das citocinas poderá ocorrer numa fase inicial do modelo e, posteriormente, em fases mais tardias pelo que apenas prolongando o modelo ou então criando um grupo de animais que fosse sacrificado nas fases iniciais de indução da artrite reumatoide poderíamos ter obtido outros resultados.

5. Conclusão

A análise química do extrato de framboesa revelou a riqueza deste em compostos fenólicos especialmente antocianinas e elagitaninos. Ácidos fenólicos como o gálico e o cafeico e alguns ácidos orgânicos como o ácido málico e o ácido cítrico foram identificados e quantificados. Dentre as antocianinas identificadas destacaram-se a cianidina-3-sorofósido, a cianidina-3-glucósido e a cianidina-3-rutinósido por estarem em maior quantidade no extrato. Observou-se concordância entre os resultados apresentados pela análise por HPLC-DAD e por HPLC-MS em relação aos compostos identificados. Os resultados obtidos em análise por HPLC-DAD-ED demonstraram que os possíveis responsáveis pela atividade anti-oxidante do extrato são os ácidos fenólicos, as antocianinas e os elagitaninos. Obteve-se um valor de atividade antioxidante intracelular do extrato significativo em relação aos valores obtidos para outros frutos vermelhos.

Os compostos fenólicos nos frutos vermelhos são reportados como os responsáveis pelas propriedades biológicas antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e propriedades anti-degenerativas neurológicas (Sariburun *et al.*, 2010) e muitos desses efeitos estão associados principalmente à presença das antocianinas e elagitaninos (Bowen-Forbes *et al.*, 2010).

A ação anti-inflamatória está relacionada com a atividade antioxidante dos compostos e na framboesa 80% ou mais dessa atividade é devido a presença dos

compostos fenólicos (Beekwilder *et al.*, 2005). O que justifica a preocupação em realizar uma boa extração destes compostos e posterior realização de ensaios de avaliação da atividade antioxidante do extrato.

A administração do extrato de framboesa por via oral num ensaio destinado a avaliar a capacidade deste modular a inflamação aguda revelou que esta administração não foi eficaz na redução do volume da pata. Neste momento não dispomos dos dados que justifiquem este resultado mas pode, eventualmente, dever-se ao facto da administração do extrato ser aguda e não crónica como no modelo seguinte.. No entanto, a administração intraperitoneal do extracto permitiu observar a sua atividade farmacológica, levando a uma redução do edema de aproximadamente 50%, ou seja, uma acção anti-inflamatória comparável com a obtida com drogas anti-inflamatórias comerciais.

Quando se realizou um ensaio de inflamação crónica utilizando um modelo de artrite reumatoide verificou-se uma redução estatisticamente significativa da lesão articular e do edema da pata após administração do extracto diariamente quer por via oral quer por via intraperitoneal. Apesar de não se terem observado diferenças estatisticamente significativas nas quantidades de citocinas determinadas ao dia 35 do ensaio da Artrite Reumatóide, a visível diminuição do edema nas patas dos animais administrados com o extracto de framboesa tanto por via oral como por via intraperitoneal, sugere que o extracto tem uma atividade significativa. A avaliação anti-inflamatória em modelos animais dá-nos idéia de como estes compostos comportam-se dentro dos sistemas biológicos de acordo com a sua biodisponibilidade através da absorção, metabolização e excreção. São da maior importância também os estudos toxicológicos futuros para se conhecerem as doses de ingestão seguras visto que alguns destes compostos, como o ácido elágico (100mg/kg) , provocaram noutros estudos danos no fígado de ratos (Clifford; Scalbert, 2000).

Em conclusão, este estudo demonstra pela primeira vez que o extracto de framboesa e os seus constituintes poderão representar uma abordagem inovadora como terapêutica adjuvante de doenças inflamatórias crónicas com a vantagem dos resultados parecerem ser observados em doses facilmente transponíveis para a ingestão diária de framboesas pelo Homem.

6. Referências Bibliográficas

Agar IT, Streif J, Bangerth F. Effect of high CO₂ and controlled atmosphere (CA) on the ascorbic and dehydroascorbic acid content of some berry fruits. *Postharv. Biol. Technol.* 1997; 11:47-55.

Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan L, Favela-Torres E, Aguilar CN. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 78:189-199.

Anttonen Mikko J, Karjalainen Reijo O. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis* 2005; 18:759-769.

Arosa FA, Cardoso EM, Pacheco FC. Fundamentos de imunologia, Lisboa, Ed. Lidel, 2007:56-57.

Asard H, May JM, Smirnoff N. Ascorbate as an antioxidant. In: Buettner GR, Schafer F.Q. *Vitamin C- Functions and biochemistry in animals and plants* 1997; 173-188.

Ayrton AD, Lewis DFV, Walker R and Ioannides C. Antimutagenicity of ellagic acid toward the food mutagen IQ: investigations into the possible mechanisms of action. *Food Chem Toxicol.* 1992; 30:289-295.

Bagchi D, Sen CK, Bagchi M, Atalay M. Anti angiogenic, antioxidant, and anti carcinogenic properties of a novel anthocyanin rich berry extract formula. *Biochemistry* 2004; 69:75-80.

Bauerova K, Bezek A. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys.* 1999; 18:15-20.

Beattie J, Crozier A, Duthie GG. Potential health benefits of berries. *Cur. Nutr. Food Sci.* 2005; 1:71-86.

Beekwilder J, Jonker H, Meesters P, Hall Robert D, Van der Meer I M, De Vos CH. Antioxidants in raspberry: On-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53:3313-3320.

Biesalski, Hans K. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10:724-728.

Borges G, Degeneve A, Mullen W, and Crozier A. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58:3901-3909.

Boukharta M, Jalbert G, Castonguay A. Efficacy of ellagitannins and ellagic acid as cancer chemopreventive agents. *Proc XVIth Int Conf of the Groupe Polyphenols*, 1992;245-249

Bowen-Forbes CS, Zangh Y, Nair MG. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 2010;23:554-560.

Cascão R, Rosário HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in Rheumatoid Arthritis: More than a simple final effectors. *Autoimmunity Reviews* 2010.

Cerdá B, Periago P, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. *J. Agr. Food Chem.* 2005; 53:5571-5576.

Cerqueira F M, Medeiros M H G, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quím. Nova* [online]. 2007; 30(2):441-449.

Chandra A, Rana J, Li Y. Separation, Identification, Quantification, and Method Validation of Anthocyanins in Botanical Supplement Raw Materials by HPLC and HPLC-MS. *J. Agr. Food Chem.* 2001; 49:3515-3521.

Clifford MN, Scalbert A. Ellagitannins- nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 2000; 80:1118-1125.

Clifford M, Brown JE. Dietary Flavonoids and health – broadening the perspective. In: Andersen RM, Markham KR. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. New York: Taylor and Francis Group, CRC Press, 2006:319-370.

Cuzzocrea S, McDonald MC, Mota-Filipe H, Mazzon E, Constantino G, Britti D, Mazzullo G, Caputi AP, Thiemermann C. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical

scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2000; 43(2):320-328.

Daniel EM, Krupnick AS, Heur Young-Hun, Blinzler Jane A, Nims Raymond W, Stoner Gary D. Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1989;2:338-349.

Dartsch PC, Kler A, Kriesl E. Antioxidative and antiinflammatory potential of different functional drink concepts *in vitro*. *Phytoter. Res.* 2009;23:165-171.

Del Rio D, Costa LG, Lean MEJ, Crozier A. Polyphenols and health: What compounds are involved? *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2010; 20:1-6.

Denev Petko, Ciz Milan, Ambrozova Gabriela, Lojek Antonin, Yanakieva Irina, Kratchanova Maria. Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry*. 2010; 123:1055-1061.

Dillard CJ, German JB. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J. Sci. Food Agric.* 2000; 80:1744-1756.

Doran MF, Pond GR, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in incidence and mortality in rheumatoid arthritis in Rochester-Minnesota, over a forty-year period. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:625-31.

Dorner T, Burmester GR. The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets. *Curr Opin Rheumatol.* 2003; 15:246-52.

Fauci Anthony S, Braunwald Eugene, Kasper Dennis L, Hauser Stephen L, Longo Dan L, Larry Jameson J, Loscalzo Joseph. *Harrison's Principles of Internal medicine*. 17th Ed. McGraw-Hill Professional; 2008.

Gilroy D, Lawrence T. The resolution of acute inflammation: A 'tipping point' in the development. In: Rossi Adriano G, Sawatzky Deborah A. *The resolution of inflammation* 2008;1-18.

González-Barrio R, Borges G, Mullen W, Crozier A. Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *J. Agric. Food. Chem.* 2010; 58:3933-3939.

Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *IL Farmaco* 2001; 56:683-687.

Guyton AC, Hall John E. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006;429-438.

Hager Tiffany J, Howard Luke R, Liyanage Rohana, Lay Jackson O, Prior Ronald L. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and Maldi-TOF-MS. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56:661-669.

Harris ED. *Rheumatoid arthritis*. Philadelphia: WB Saunders; 1997.

Huang D, Ou B, Prior R L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53:1841-1856.

Hubel, 2011. Boas Notícias. Consultado em 05 de Dezembro de 2011. Disponível em <http://www.boasnoticias.clix.pt>

Hui YH. *Handbook of food science, technology, and engineering*. CRC Press. 2006: 528.

INRB- Instituto Nacional dos Recursos Biológicos. A planta da framboesa. *Divulgação Agro* 2007;556: 1.

INRB- Instituto Nacional dos Recursos Biológicos. Framboesa – Tecnologias de Produção. *Divulgação Agro* 2007;556: 3.

Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior RL. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47:4638-4644.

Kelley WN, Ruddy S, Sledge CB. eds. *Textbook of rheumatology*. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1997.

Keppler K, Humpf H-U. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2005; 13:5195-5205.

Klimiuk PA, Yang H, Goronzy JJ, Weyand CM. Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. *Clin Immunol*. 1999; 90:65-78.

Landete JM. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research international* 2011; 44:1150-1160.

Lansky Ephraim P, Newman Robert A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 109:177-206.

Lin J-K, Weng M-S. Flavonoids as nutraceuticals. In: Grotewold E. *The science of flavonoids* 2006;213-238.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79:727-747.

Marieb Elaine N, Hoehn Katja. *Human Anatomy & Physiology*. 7th edition. Benjamin Cummings. 2006.

Martínez-Calatrava MJ, Largo R, Herrero-Beaumont G. Improvement of experimental accelerated atherosclerosis by chondroitin sulphate. *Joint and Bone Research Unit, Osteoarthritis and Cartilage* 2010; 18:S12-S16.

Milivojevic J, Maksimovic V, Nikolic M, Bogdanovic J, Maletic R, Milatovic D. Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of Food Quality*. 2011; 34:1-9.

Mingshu L, Kai Y, Qiang H, Dongying J. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *J. Basic Microbiol.* 2006; 46:68-84.

Miossec P. An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:218-22.

Mullen W, Yokota T, Lean MEJ, Crozier A. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSⁿ. *Phytochemistry* 2003; 64:617-624.

Mullen W, McGinn J, Lean MEJ, MacLean MR, Gardner P, Duthie GG, Yokota T, Crozier A. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in Red Raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50:5191-5196.

Mustafa Çam, Yasar Hisil. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food chemistry.* 2010; 123:878-885.

Netzel M, Strass G, Janssen M, Bitsch I, Bitsch R. Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology : Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer.* 2001; 20(2):89-95.

Nielsen I L F, Dragsted L O, Ravn-Haren G, Freese R, Rasmussen S E. Absorption and Excretion of Black currant anthocyanins in Humans and Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51 (9):2813-2820.

Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen P. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74:418-425.

NRAS. National Rheumatoid Arthritis Society. Consultado em 08 de Agosto de 2011. Disponível em: <http://www.nras.org.uk>

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R L. Development and Validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Natur. Prod.* 2001; 49:4619-4626.

Padayatty Sebastian J, Katz Arie, Wang Yaohui, Eck Peter, Kwon O, Lee J-H, Chen S, Corpe C, Dutta A, Levine M. Vitamin C as antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *Journal of American College of Nutrition.* 2003; 22: 18-35.

Paredes-López O, Cervantes-Ceja ML, Vigna-Pérez M, Hernández-Pérez T. Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life- A review. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010; 65:299-308.

Pinto M S. Bioactive compounds from brazilian strawberry cultivars(*Fragaria x ananassa* Duch.): Characterization and bioavailability of ellagic acid derivatives (São Paulo) 2008;8-9.

Pourcel L, Routaboul Jean-Marc, Cheynier V, Lepinac L, Debeaujon. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* 2006; 12:29-36.

Rahman M, Halade GV, Bhattacharya A, Fernandes G. The fat-1 transgene in mice increases antioxidant potential, reduces pro-inflammatory cytokine levels, and enhances PPAR-gamma and SIRT-1 expression on a calorie restricted diet. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(5):307-16.

Rocha JPF. Avaliação da actividade anti-inflamatória do ácido rosmarínico e de um extracto de *Rosmarinus officinalis*. Tese de mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2009.

Ross Julie A, Kasum Christine M. Dietary Flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* 2002; 22:19-34.

Ross Heather A, McDougall Gordon J, Stewart Derek. Antiproliferative activity is predominantly associated with ellagitannins in raspberry extracts. *Phytochemistry* 2007; 68:218-228.

Sariburun E, Sahin S, Demir C, Turkben C, Uylaser V. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of Food Science* 2010; 75(4):328-335.

Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, Heber D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54:9329-9339.

Sepodes BMN. Contribuição para a avaliação da segurança não-clínica do tempol como fármaco anti-inflamatório. Tese de mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2006.

Serra A T, Matias Ana A, Frade Raquel FM, Duarte Rui O, Feliciano Rodrigo P, Bronze Maria R, Figueira M. E, De Carvalho A, Duarte Catarina MM. Characterization of traditional and exotic apples varieties from Portugal. Part 2 – Antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Functional Foods* 2010; 2:46-53.

Singleton Vernon L, Orthofer Rudolf, Lamuela-Raventós Rosa M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*. 1999; 299:152-178.

Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology & Medicine* 2000; 29:375-383.

Smart RC, Huang M-T, Chang RL, Sayer JM, Jerina DM, Wood AW, Conney AH. Disposition of the naturally occurring antimutagenic plant phenol, ellagic acid, and its synthetic derivatives, 3-O-decylellagic acid and 3,3'-di-O-methylellagic acid in mice. *Carcinogenesis*. 1986; 7:1663-1667.

Stamatakis G, Tsantila N, Samiotaki M, Panayotou G N, Dimopoulos AC, Halvadakis C P, Demopoulos CA. Detection and Isolation of Antiatherogenic and Antioxidant Substances Present in Olive Mill Wastes by a Novel Filtration System. *J. Agr. Food Chem.* 2009; 57:10554-10564.

Smart RC, Huang M-T, Chang RL, Sayer JM, Jerina DM, Wood AW, Conney AH. Disposition of the naturally occurring antimutagenic plant phenol, ellagic acid, and its synthetic derivatives, 3-O-decylellagic acid and 3,3'-di-O-methylellagic acid in mice. *Carcinogenesis*. 1986; 7:1663-1667.

Viskupicová J, Ondrejovic M, Sturdik E. Bioavailability and metabolism of flavonoids. *Journal of Food and Nutrition Research* 2008; 47:151-162.

Wang L-S, Hecht S, Carmella S, Seguin C, Rocha C, Yu N, Stoner C, Chiu S, Stoner G. Berry ellagitannins may not be sufficient for prevention of tumors in the rodent esophagus. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58:3992-3995.

Ward Peter A. Acute and Chronic Inflammation. In: Serhan Charles N, Ward Peter A, Gilroy Derek W. *Fundamentals of inflammation*. 2010; 1-252.

Wolfe Kelly L, Liu Rui Hai. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for assessing antioxidants , foods, and dietary supplements. J. Agric. Food Chem. 2007; 55:8896-8907.

Wolfe Kelly L, Kang Xinmei, He Xiangjiu, Dong Mei, Zhang Qingyuan. Liu Rui Hai. Cellular Antioxidant Activity of Common Fruits. J. Agric. Food Chem. 2008; 56:8418-8426.

World Healthiest's foods. Consultado em 2 de Agosto de 2011. Disponível em <http://www.whfoods.com>

Yamada T, Place N, Kosterina N, Ostberg T, Zhang S-J, Grundtman C, Erlandsson-Harris H, Lundberg IE, Glenmark, Bruton JD, Westerblad H. Impaired myofibrillar function in the soleus muscle of mice with collagen-induced arthritis. Arthritis & Rheumatism 2009; 60(11):3280-3289.

7. ANEXOS

Anexo I

Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Na Tabela 24 apresentam-se os resultados referente às leituras de absorvância efetuadas a 725nm nas soluções padrão de ácido gálico e na Figura 33 está a reta de calibração..

Tabela 24. Leituras das absorvâncias a 725nm da solução padrão de ácido gálico a concentrações de 1 a 6ppm e do branco.

[]ppm	(λ) Abs.
1	0,0866
2	0,1783
3	0,2722
4	0,3614
5	0,4379
6	0,5488
Branco	0,0001

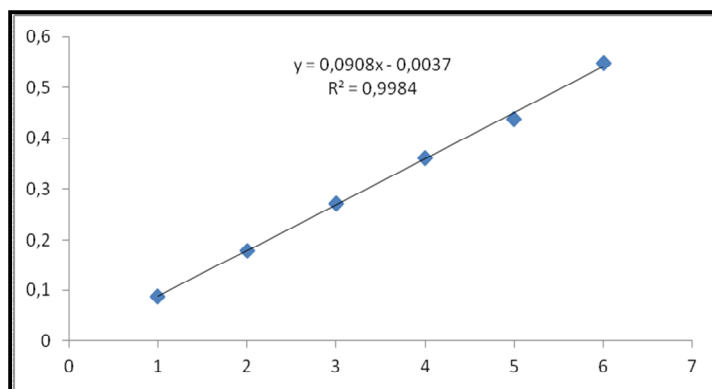


Figura 33. Reta de calibração do ácido gálico para o teor de compostos fenólicos totais.

Anexo II

Determinação do teor de flavonóides totais

Na Tabela 25 apresentam-se os valores de absorvância lidos a 510nm com as soluções padrão de catequina para obtenção da reta de calibração (Figura 34).

Tabela 25. Leituras das absorvâncias a 510nm das soluções padrão de catequina.

[]ppm	Abs. a 510nm
20	0,0644
40	0,1243
60	0,2094
80	0,2816
100	0,3392
Branco	0,0001

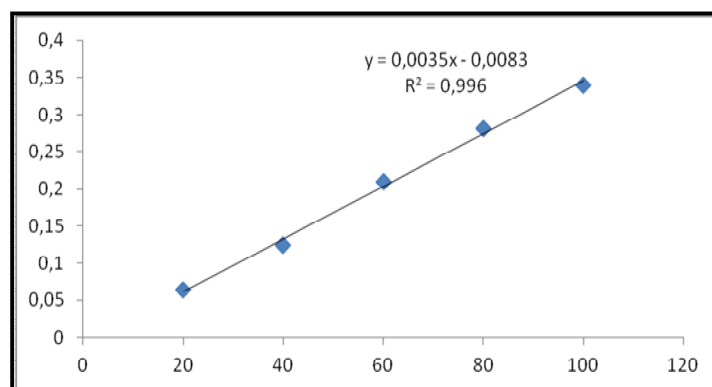


Figura 34. Reta de calibração da catequina para o teor de flavonóides totais.

Anexo III

Determinação do teor de antocianinas totais

Na Tabela 26 apresentam-se os valores de absorvância lidos a 520nm com as soluções padrão de cianidina-3-glucósido para obtenção da reta de calibração (Figura 35).

Tabela 26. Leituras das absorvâncias padrão e referência a 520nm das soluções de cianidina-3-glucósido e valor da absorvância final que representa a diferença entre a abs. Referência e a abs.

Padrão.

[ppm	Abs. Padrão	Abs. Ref.	Abs.Final (Abs. Ref- Abs. Padrão)
10	0,0004	0,0184	0,018
25	0,0004	0,0443	0,0439
50	0,0004	0,0912	0,0908
75	0,0004	0,1356	0,1355
125	0,0012	0,228	0,2268
150	0,0006	0,2739	0,2733
Branco	0,0001		

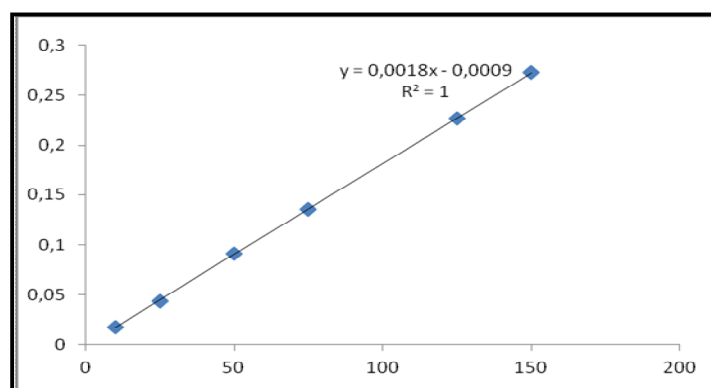


Figura 35. Reta de calibração da cianidina-3-glucósido para o teor de antocianinas totais.

Anexo IV

Determinação do teor de taninos hidrolisáveis

Na Tabela 27 apresentam-se os valores de absorvância lidos a 550nm com as soluções padrão de ácido tânico para obtenção da reta de calibração (Figura 36).

Tabela 27. Leituras das absorvâncias a 550nm das soluções padrão de ácido tânico.

[]ppm	Abs. a 550nm
300	0.1429
500	0.2319
800	0.3595
1100	0.4782
1400	0.5901
1700	0.6973
B	0.0000

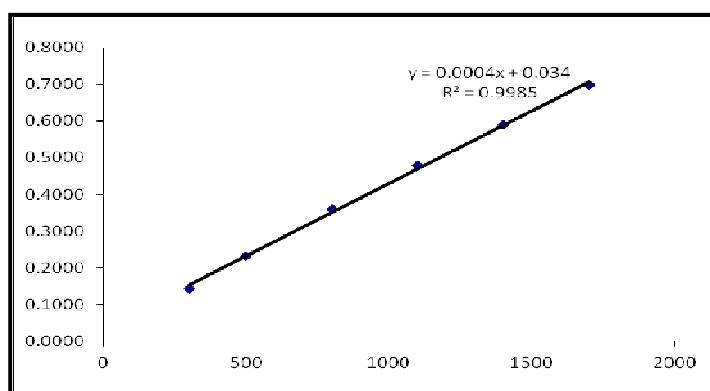


Figura 36. Reta de calibração do ácido tânico para o teor de taninos hidrolisáveis.

Anexo V

Determinação do teor de taninos condensados

Na Tabela 28 apresentam-se os valores de absorvância lidos a 500nm com as soluções padrão de catequina para obtenção da reta de calibração (Figura 37).

Tabela 28. Leituras das absorvâncias a 500nm das soluções padrão de catequina.

[]ppm	Abs. a 500nm
10	0.0316
20	0.0601
40	0.109
60	0.1584
80	0.2109
100	0.2645
B	0.0000

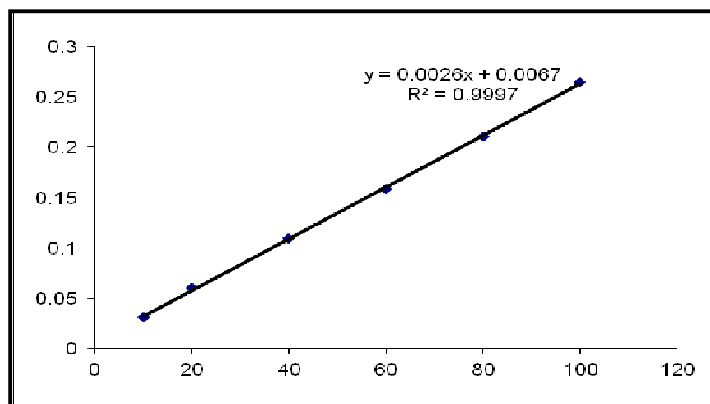


Figura 37. Reta de calibração da catequina para o teor de taninos condensados.

Anexo VI

Preparação das misturas de soluções padrão para HPLC

As soluções padrão de 100ppm em 5mL de água destilada foram preparadas a partir de soluções de 1000ppm (5mg de padrão em 5mL de metanol). Na Tabela 29 abaixo foi sistematizada a preparação das diferentes soluções constituintes das misturas de padrões utilizadas.

Tabela 29. Esquema para preparação das soluções das misturas de padrões.

Composto Fenólico	[] final (ppm)	V final (mL)	[] solução mãe (ppm)	V solução mãe (µL)
Mix A (100ppm)				
Ácido gálico	100	5	1000	500
Epicatequina	100	5	1000	500
Ácido elágico	100	5	1000	500
Mix B (100ppm)				
Ácido protocatechuico	100	5	1000	500
Ácido cafeico	100	5	1000	500
Cianidina-3-glucósido	100	5	1000	500
Ácido salicílico	100	5	1000	500
Resveratrol	100	5	1000	500
Mix C (100ppm)				
Ácido vanílico	100	5	1000	500
Ácido ferúlico	100	5	1000	500

Anexo VII

Na Tabela 30 encontram-se as áreas dos picos do cromatograma a 280nm das misturas de padrões elaboradas para a construção das retas de calibração utilizadas na quantificação dos compostos identificados. Na tabela 31 estão apresentadas as equações das retas destes compostos.

Tabela 30. Áreas dos picos para as respectivas concentrações utilizadas na obtenção das retas de calibração para quantificação.

[] ppm	ácido gálgico	cianidina-3-O-glucósido	ácido elágico
	Áreas (280nm)	Áreas (280nm)	Áreas (280nm)
5	1666567	1051013	224215
10	3299447	2196543	298423
20	5993141	4397106	595154
40	11742463	9228890	1331352
80	24045204	18374772	2999744
100	31485206	22716272	4464937

Tabela 31. Tabela com as equações de reta obtidas para quantificação dos compostos identificados por HPLC-DAD-ED.

Composto	Gama de concentração	Equação da reta	R ²
Ácido gálgico	5ppm -100ppm	$y=309355x-108904$	0.9983
Cianidina-3-glucósido	5ppm -100ppm	$y=229259x-82760$	0.9998
Ácido elágico	5ppm -100ppm	$y=43499x-196401$	0.9815

Anexo VIII

Tabela 32. Lista dos compostos pesquisados no HPLC-MS/MS no modo MRM realizados a 3.00 kV com o potencial do cone, energia de colisão e suas respectivas gamas de concentração utilizadas para quantificação. Também mostra a equação da reta e R².

Composto	Potencial do cone (V)	Energia de colisão (eV)	Gama de concentração (ppm)	Equação da reta	R ²
Ácido elágico	25	30	5 - 50	y=176.914x-5784.95	0.9985
Ácido hidroxibenzoico	20	20	0.1 - 5	y=3433.92x+176.49	0.9913
Ácido protocatechuico	20	20	0.5 - 50	y=5092.09x+533.821	0.9979
Ácido cítrico	20	15	0.1 - 10	y=3037.58x+4321.58	0.9983
Ácido gálico	30	20	0.5 - 10	y=6560.67x+600.942	0.9975
Ácido málico	20	15	0.1 - 5	y=11728.7x-798.53	0.9988
Ácido succínico	20	15	0.1 - 5	y=3919.76x+1040.13	0.9920
Ácido cafeico	25	15	0.1 - 10	y=15759.4x+1559.37	0.9952
Ácido p-cumárico	25	15	0.1 - 10	y=10558x+1541.44	0.9885
Canferol-glucósido	30	25	0.1 - 10	y=4474.61x+91.5175	0.9998
Quercetina	35	20	0.1 - 25	y=9517.53x-2051.25	0.9994
Rutina	30	35	0.1 - 10	y=6358.76x-487.327	0.9995
Ácido ascórbico	20	15	0.5 - 10	y=1205.8x-187.25	0.9988

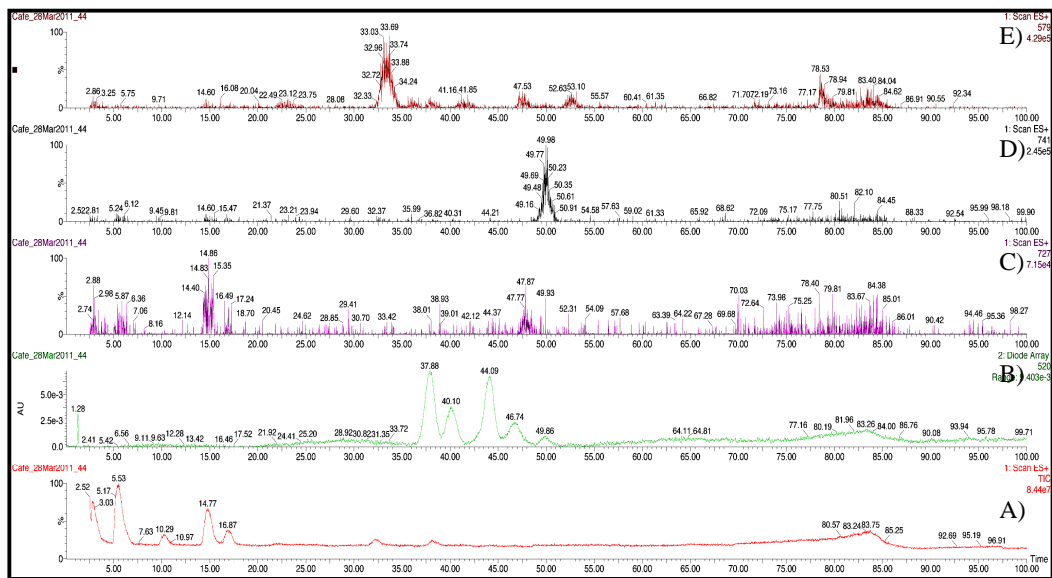


Figura 40. Do inferior para o superior: cromatogramas de corrente iônica total (A), UV a 520nm (B) e cromatogramas de massa de íão extraído para os m/z 727 (C); 741 (D) ; 579 (E).

ANEXO X

Preparação da emulsão de Colagénio CII em adjuvante de Freund

Preparação da solução de ácido acético 0,01M

Primeiro pipetou-se 0,6ml de ácido acético para um balão de 100mL e completou-se o volume com água e teve-se uma solução de ácido acético a 0,1M. Em seguida pipetou-se 10ml da solução de 0,1M para um balão de 100mL e completou-se com água e teve-se uma solução de ácido acético 0,01M.

Preparação da emulsão de CII

Pesou-se 4,2mg de colagénio e adicionou-se 2,1mL da solução de ácido acético 0,01M. Deixou-se uma noite com agitador magnético a 4°C e no dia seguinte na hora da aplicação nos animais juntou-se a esta solução 2,1mL do adjuvante de Freund.

ANEXO XI

Retas de calibração para quantificação das citocinas.

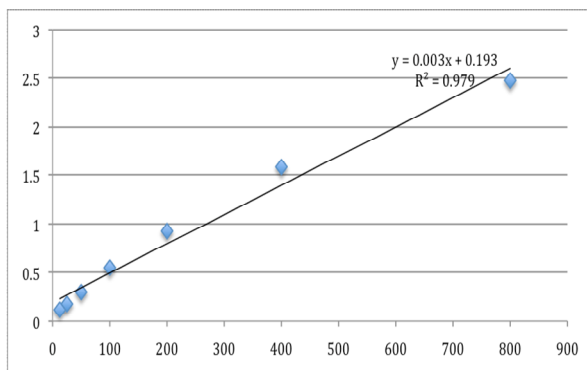


Figura 41. Reta de calibração do TNF- α .

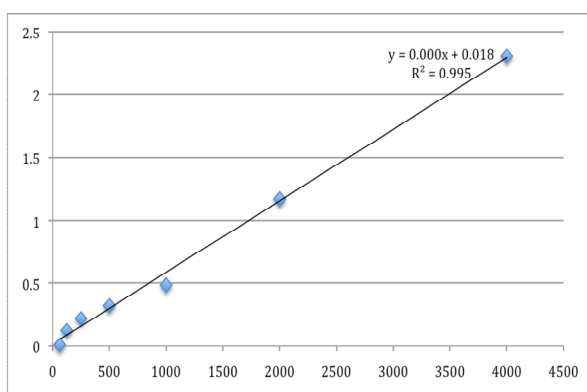


Figura 42. Reta de calibração da IL-6.

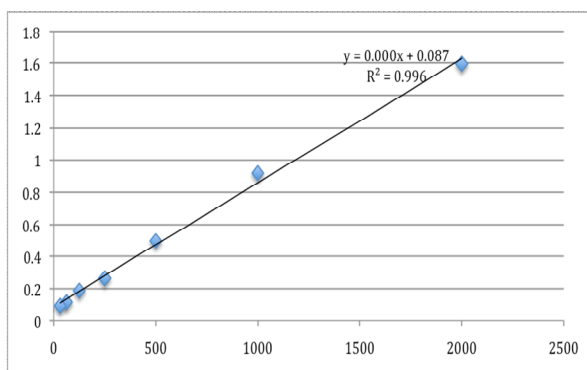


Figura 43. Reta de calibração da IL-1 β .

Tabela 33. Tabela da leitura das densidades óticas para o TNF- α .

TNF- α	
Conc.	DO
800	2.473
400	1.583
200	0.928
100	0.548
50	0.299
25	0.178
12.5	0.119

Tabela 34. Tabela da leitura das densidades óticas para a IL-6.

IL-6	
Conc	DO
4000	2.305
2000	1.17
1000	0.486
500	0.325
250	0.224
125	0.127
62.5	0.0087

Tabela 35. Tabela da leitura das densidades óticas para a IL-1 β .

IL-1 β	
Conc	DO
2000	1.594
1000	0.916
500	0.496
250	0.263
125	0.187
62.5	0.116
31.2	0.094

Tabela 36. Resultados da ANOVA para os teores das citocinas quantificadas.

	Controlo	Framboesa i.p. (15mg/Kg)	Framboesa p.o (15mg/kg)
n	6	8	8
Média	0.193894	0.19380075	0.19379475
Desvio Padrão	0.000192362	1.46E-05	1.35E-05
Erro padrão média	7.85E-05	5.15E-06	4.77E-06