

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Influência de infusões de plantas na permeação de aminoácidos
pela barreira intestinal e identificação de compostos bioativos
com propriedades antioxidantes**

Joana Peres dos Reis Moita

Orientadora:

Prof.^a Doutora Maria Luísa Mourato de Oliveira Marques Serralheiro
(Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade
de Lisboa)

Dissertação
Mestrado em Química
Química Analítica

2015

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação contou com o importante apoio de várias pessoas, sem as quais não teria sido possível a sua realização e aos quais estarei eternamente agradecida! Como o espaço é limitado, não consigo agradecer, como devia, a todos os que me ajudaram ao longo deste Mestrado, direta ou indiretamente.

A todas estas pessoas, um enorme obrigada!

À minha orientadora Professora Doutora Maria Luisa Serralheiro, por me ter aceite e recebido de braços abertos e pela sua orientação, disponibilidade e apoio constante.

À Doutora Rita, por todos os ensinamentos que me transmitiu e por todo o tempo que disponibilizou comigo. Obrigada pela paciência e preocupação constante em me esclarecer todas as dúvidas que pudessem surgir!

Um obrigada do tamanho do mundo, à Andreia Correia, ao André Filipe e à Andreia Maia, e em particular à Elsa e à Inês Silva, por terem permitido que cada dia no laboratório fosse vivido com muito mais motivação. Por toda a ajuda que me deram quando mais precisei e pelas noitadas a trabalhar. Obrigada especialmente pelos momentos de brincadeira e constante alegria! Aos passeios e aos jantares.. à amizade!

Às minhas amigas, tão especiais, Margarida e Victorina, pela amizade verdadeira que nos une. E que mesmo estando tão longe, vão sempre ter um lugar bem especial no meu coração. Obrigada também à Rute, pela grande companhia dos últimos dois anos.

Aos meus amigos Cecília, Cláudio, David, Jorge, Rui, Sofia e Anabela por me terem recebido de braços abertos em Lisboa e nas vossas vidas! Levar-vos-ei para sempre na minha memória e no meu coração! Um obrigada muito especial ao André, meu grande e importante amigo, pelas noitadas de estudo e por todo o apoio que me deu nos momentos mais difíceis!

Por fim, tendo consciência que nada disto teria sido possível sem os meus pais, agradeço-lhes do fundo do coração, pelo apoio incondicional, incentivo, amor, amizade e muita, muita paciência!

A todos, obrigada!

RESUMO

O uso das mais variadas plantas na preparação de infusões com objetivos medicinais é um acontecimento milenar, que recentemente têm voltado a aumentar de importância, devido às características dos extratos, que lhes conferem benefícios para a saúde.

Derivado de resultados obtidos em estudos anteriormente desenvolvidos no laboratório, relativos à absorção de colesterol, verificou-se a possibilidade de na presença das infusões estudadas, ocorrer uma inibição na absorção de aminoácidos por parte das células da barreira intestinal. Assim, o estudo deste acontecimento tornou-se necessário, pois o facto de tal inibição acontecer pode levar a graves problemas de saúde se os aminoácidos não conseguirem ser absorvidos a nível celular, principalmente aminoácidos essenciais.

Para este estudo foram usadas linhas celulares Caco-2, que permitem mimetizar as células presentes na barreira intestinal.

Assim sendo, as infusões, de folhas, estudadas foram: *Pterospartum tridentatum* (carqueja), *Annona cherimola* (anona), *Peumus boldus* (boldo), *Cynara cardunculus* subsp. *Scolymus* (alcachofra) e *Fraxinus angustifolia* (freixo).

Aos extratos de folhas das plantas acima referidas, foram também adicionadas para este estudo infusões de casca de *Persea americana* Mill. (abacate), *Annona cherimola* (anona) e *Actinidea deliciosa* (kiwi).

Dada a incapacidade dos aminoácidos de serem detetados por UV, na sua forma original, foi necessário realizar uma derivatização dos mesmos, tendo-se, após a escolha do método de derivatização adequado, optado por usar como agente derivatizante o composto PITC.

Os aminoácidos presentes no meio de cultura foram então detetados e quantificados fazendo-se a análise deste meio por HPLC-RP-DAD.

Foi então verificado que a permeação dos aminoácidos foi inibida, na presença de qualquer uma das infusões, especialmente aminoácidos como a Phe, a Lys e a Met, tidos como essenciais.

De modo a compreender melhor a ação dos frutos, os extratos de folhas, cascas e polpa dos três foram preparados.

Quantificou-se o seu conteúdo em fenóis totais e taninos, onde se verificou que os melhores resultados foram obtidos para a casca de *Persea americana* Mill. para os fenóis, $105,9 \pm 9,1$ $\mu\text{g/mL}$, e também para os taninos, $8,3 \pm 0,1$ $\mu\text{g/mL}$.

Determinou-se ainda a atividade antioxidante dos extratos, pelo método do DPPH. Para tal foi determinado o valor de EC_{50} , tendo o extrato de folhas de *Persea americana* Mill. ($15,4 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$) apresentado o melhor valor.

Através dos resultados obtidos foi possível relacionar a composição em compostos fenólicos com a atividade antioxidante, sendo que são diretamente proporcionais.

A identificação dos compostos bioativos foi feita recorrendo a LC-MS e HPLC-RP-DAD, nos casos em que o primeiro se mostrou inadequado. Os cromatogramas e espetros obtidos foram comparados com os padrões existentes, o que permitiu identificar a presença de procianidina para a casca de *Persea americana* Mill., rutina para as folhas de *Annona cherimola* e de *Actinidea deliciosa*, quercetina para folhas de *Annona cherimola* e derivados de ácido cafeico para as folhas de *Persea americana* Mill, *Annona cherimola* e *Actinidea deliciosa*.

O estudo da citotoxicidade foi feito em linhas celulares de HepG2 e Caco-2, para os extratos de casca e polpa de *Persea americana* Mill., *Annona cherimola* e *Actinidea deliciosa*, tendo-se considerado que eram pouco citotóxicos, com valores de IC_{50} iguais ou superiores a 1 mg/mL.

Palavras-chave: infusões, permeação, aminoácidos, compostos fenólicos, antioxidante

ABSTRACT

The use of plants in the preparation of infusions for medicinal purposes is an ancient event, which have recently increased its importance due to the characteristics of the extracts, which give them health benefits.

By results obtained from studies developed in the laboratory, for the absorption of cholesterol, there was the possibility to, due the presence of the studied infusions, occur inhibition in amino acid uptake by the cells of the intestinal barrier. Thus, this study has become necessary due the fact that such inhibition can lead to serious health problems if the amino acids are unable to be absorbed at the cellular level, especially essential amino acids.

For this study we used cell lines Caco-2, which permit simulate the cells present in the intestinal barrier.

Therefore, the infusions of leaves studied, were: *Pterospartum tridentatum*, *Annona cherimola*, *Peumus boldus*, *Cynara cardunculus* subsp. *Scolymus* and *Fraxinus angustifolia*.

To leaf extracts of the plants specified above, they were also added for this study peel infusions of *Persea americana* Mill., *Annona cherimola* and *Actinidea deliciosa*.

Given the inability of amino acids to be detected by UV, it was necessary to perform a derivatization, after choosing the suitable derivatization method and the derivatizing agent was PITC.

The amino acids in the culture medium were then detected and quantified by making the analysis of this medium by HPLC-RP-DAD.

It was then found that the permeation of amino acids was inhibited in the presence of the infusions, particularly amino acids such as Phe, Lys, and Met, considered essential.

In order to better understand the action of the fruits, the extracts of leaves, peel and pulp of the three were prepared.

The content in total phenols and tannins was quantified, where it was found that the best results were obtained for the *Persea americana* Mill. peel. for phenols, 105.9 ± 9.1 $\mu\text{g/mL}$, and also tannins, 8.3 ± 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

It has been determined the antioxidant activity of the extracts by DPPH method. It was then determined the EC₅₀, and therefore the leaf extract of *Persea americana* Mill. (15.4±0.2 µg/mL) presented the best value.

Through the results it was possible to relate the composition of phenolic compounds with antioxidant activity and they are directly proportionals.

The identification of bioactive compounds was made using LC-MS and HPLC- RP -DAD, when the first proved inadequate. The chromatograms and spectra were compared with existing standards, which allowed identifying the presence of procyanidin in *Persea americana* Mill. peel, Rutin in leaves of *Annona cherimola* and *Actinidea deliciosa*, quercetin in *Annona cherimola* leaves and derivatives of caffeic acid in leaves of *Persea americana* Mill., *Annona cherimola* and *Actinidea deliciosa*.

The study of cytotoxicity was done on cell lines Caco-2 and HepG2, for peel and pulp extracts of *Persea americana* Mill., *Actinidea deliciosa* and *Annona cherimola*, and it is considered that the cytotoxicity was low, with IC₅₀ values equal or above 1 mg/mL.

Keywords: infusions, permeation, amino acids, phenolic compounds, antioxidant

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Carqueja (<i>Pterospartum tridentatum</i>)	7
Figura 2- Boldo (<i>Peumus boldus</i>)	8
Figura 3- Alcachofra (<i>Cynara cardunculus</i> subsp. <i>Scolymus</i>)	9
Figura 4- Freixo (<i>Fraxinus angustifolia</i>).....	10
Figura 5- Kiwi (<i>Actinidea deliciosa</i>)	11
Figura 6- Abacate (<i>Persea americana</i> Mill.)	12
Figura 7- Anona (<i>Annona cherimola</i> Mill.)	13
Figura 8- Estrutura geral de um aminoácido.....	14
Figura 9- Mecanismo de absorção pela membrana lipídica, de aminoácidos e péptidos	17
Figura 10- Esquema reacional da interação do PITC com os aminoácidos	31
Figura 11- Aparelho de HPLC.....	32
Figura 12-Representação esquemática do princípio básico de um ensaio em Transwell®	34
Figura 13- Representação esquemática da redução do radical livre DPPH• na presença de uma substância com propriedades antioxidantes	36
Figura 14- Estrutura química do ácido gálico	38
Figura 15- Estrutura química do ácido tânico	39
Figura 16- Esquema reacional da redução do MTT, através da enzima succinato desidrogenase..	40
Figura 17- Esquema reacional da interação do PITC com os aminoácidos	46
Figura 18- Cromatograma obtido com derivatização adaptada de [121].....	47
Figura 19- Cromatograma obtido com derivatização do protocolo Sigma®	48
Figura 20- Cromatograma obtido para a derivatização e HPLC finais, com 10 µL de amostra.....	49
Figura 21- Cromatograma obtido para a derivatização e HPLC finais, com 20 µL de amostra.....	49
Figura 22- Método 1 testado em HPLC-RP-DAD	51
Figura 23- Método 2 testado em HPLC-RP-DAD	51
Figura 24- Método 3 testado em HPLC-RP-DAD	53
Figura 25- Método 4 testado em HPLC-RP-DAD	53
Figura 26- Perfis cromatográficos de misturas: preparada no laboratório (a); (b) padrões de aminoácidos comercial.....	55
Figura 27- Percentagem de aminoácidos presentes no meio de cultura, após 24h de exposição às infusões	57

Figura 28- Percentagem de aminoácidos presentes no meio de cultura, para t_0 e t_{24} , na presença da infusão de folhas de alcachofra.....	60
Figura 29- Percentagem de aminoácidos presentes no meio de cultura, para t_0 e t_{24} , na presença da infusão de folhas de boldo	60
Figura 30- Percentagem de aminoácidos presentes no meio de cultura, para t_0 e t_{24} , na presença da infusão de folhas de carqueja	60
Figura 32- Percentagem de aminoácidos presentes no meio de cultura, para t_0 e t_{24} , na presença da infusão de cascas de anona.....	63
Figura 31- Percentagem de aminoácidos presentes no meio de cultura, para t_0 e t_{24} , na presença da infusão de cascas de kiwi	63
Figura 33- Espectro de UV-Vis e estrutura do ácido cafeico.....	68
Figura 34- Espectro de UV-Vis e estrutura da rutina	68
Figura 36- Espectro de UV-Vis do extrato para $T_R=10,95$ min	69
Figura 35- Perfil cromatográfico, obtido por LC, da infusão de cascas de <i>Persea americana</i> Mill. .	69
Figura 37- Perfil cromatográfico, obtido por LC, do extrato de polpa de <i>Persea americana</i> Mill. .	71
Figura 38- Espectro de UV-Vis do extrato para $T_R=13,23$ min (a) e $T_R=13,50$ min (b)	71
Figura 39-Perfil cromatográfico, obtido por HPLC-RP-DAD, do extrato de folhas de <i>Persea americana</i> Mill.	72
Figura 40- Espectro de UV-Vis do extrato para $T_R=8,9$ min (a) e $T_R=11,89$ min (b)	72
Figura 41- Perfil cromatográfico, obtido por LC, da infusão de cascas de <i>Annona cherimola</i>	73
Figura 42- Perfil cromatográfico, obtido por LC, do extrato de polpa de <i>Annona cherimola</i>	74
Figura 43- Perfil cromatográfico, obtido por LC, da infusão de folhas de <i>Annona cherimola</i>	74
Figura 44- Espectro de UV-Vis do extrato para $T_R=3,80$ min (Pico 1), $T_R=8,80$ min (Pico 2) , $T_R= 13,48$ min (Pico 3) e $T_R=15,22$ min (Pico 4)	75
Figura 45- Perfil cromatográfico, obtido por LC, da infusão de cascas de <i>Actinidea deliciosa</i>	76
Figura 46- Perfil cromatográfico, obtido por LC, do extrato de polpa de <i>Actinidea deliciosa</i>	77
Figura 47- Perfil cromatográfico, obtido por LC, da infusão de folhas de <i>Actinidea deliciosa</i>	77
Figura 48- Espectro de UV-Vis do extrato para $T_R=5,13$ min (Pico 1), $T_R=8,76$ min (Pico 2) , $T_R= 10,56$ min (Pico 3) e $T_R=15,27$ min (Pico 4)	78
Figura 49- Conteúdo em fenóis totais, em $\mu\text{g equiv./mg}$ extrato, para os extratos de <i>Persea americana</i> Mill., <i>Annona cherimola</i> e <i>Actinidea deliciosa</i>	80
Figura 50- Conteúdo em taninos, em $\mu\text{g equiv./mg}$ extrato, para os extratos de <i>Persea americana</i> Mill., <i>Annona cherimola</i> e <i>Actinidea deliciosa</i>	82

Figura 51- Atividade antioxidante, em $\mu\text{g/mL}$ extrato, dos extratos de *Persea americana* Mill.,
Annona cherimola e *Actinidea deliciosa* 85

Figura 52- Esquema ilustrativo da placa de MTT para a linha celular (a) HepG2 e (b) Caco-2 88

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Requisitos dos aminoácidos indispensáveis no adulto	15
Tabela 2- Reagentes utilizados para a realização dos ensaios.....	25
Tabela 3- Identificação dos picos correspondentes aos aminoácidos	45
Tabela 4- Parâmetros otimizados no processo de detecção e quantificação de aminoácidos	54
Tabela 5- Composição percentual dos aminoácidos no meio, após 24 horas de exposição às diferentes infusões.....	59
Tabela 6- Quantidade relativa de aminoácidos absorvidos pelas células, para t_{24} , em percentagem, para as infusões de folhas de alcachofra, carqueja e boldo	61
Tabela 7- Quantidade relativa de aminoácidos absorvidos pelas células, para t_{24} , em percentagem, para as infusões de cascas de kiwi e anona	64
Tabela 8- Identificação dos compostos do extrato de cascas de <i>Persea americana</i> Mill. por espectrometria de massa.....	70
Tabela 9- Atividade antioxidante, em $\mu\text{g/mL}$ extrato, dos extratos de <i>Persea americana</i> Mill., <i>Annona cherimola</i> e <i>Actinidea deliciosa</i>	84
Tabela 10- Valores de fenóis totais, taninos e EC_{50} para os extratos de <i>Persea americana</i> Mill., <i>Annona cherimola</i> e <i>Actinidea deliciosa</i>	87
Tabela 11- Valores de IC_{50} , em mg/mL extrato , para os extratos de <i>Persea americana</i> Mill., <i>Annona cherimola</i> e <i>Actinidea deliciosa</i>	89

ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala	Alanina
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ANOVA	Análise de variância (do inglês <i>Analysis of variance</i>)
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil (do inglês 2,2-diphenylpicrylhydrazyl)
EC ₅₀	Concentração eficiente (do inglês <i>Efficient concentration</i>) correspondente a 50% de extinção do radical
FBS	Soro fetal bovino (do inglês <i>Fetum bovine serum</i>)
FCUL	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
FeCl ₃	Cloreto de ferro (III)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina (do inglês <i>Glycine</i>)
His	Histidina
HPLC-RP-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência, de fase reversa, com detetor <i>diode array</i> (do inglês <i>High-performance liquid chromatography with reverse phase and diode array detector</i>)
IC ₅₀	Concentração inibitória (do inglês <i>Inhibitory concentration</i>) correspondente a 50% de inibição
Isl	Isoleucina
K ₄ [Fe(CN) ₆]	Ferrocianeto de potássio
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa
LD	Limite de deteção
Leu	Leucina
Lys	Lisina (do inglês <i>Lysine</i>)

Met	Metionina
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-1-il]-2,5-difenil-tetrazólio (do inglês 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
PBS	Tampão de sais de fosfatos (do inglês <i>Phosphates buffer solution</i>)
Pen-Strep	Penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL
Phe	Fenilalanina (do inglês <i>Phenylalanine</i>)
PITC	Fenilisotiocianato
Pro	Prolina
PTC	Feniltiocarbamil
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
Ser	Serina
Subsp.	subespécie
t ₀	Tempo 0 horas (amostra retirada às 0 horas de ensaio)
t ₂₄	Tempo 24 horas (amostra retirada às 24 horas de ensaio)
TFA	Ácido trifluoroacético (do inglês <i>Trifluoroacetic acid</i>)
Thr	Treonina (do inglês <i>Threonine</i>)
T _R	Tempo de retenção
Tyr	Tirosina (do inglês <i>Tyrosine</i>)
Val	Valina

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	ii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	ix
ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
I. INTRODUÇÃO	16
1.1. Utilização de plantas para fins medicinais	1
1.2. Problemática	3
II. OBJETIVOS.....	4
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1. Plantas e frutos em estudo	7
3.1.1. <i>Pterospartum tridentatum</i>	7
3.1.2. <i>Peumus boldus</i>	8
3.1.3. <i>Cynara cardunculus</i> subsp. <i>Scolymus</i>	9
3.1.4. <i>Fraxinus angustifolia</i>	10
3.1.5. <i>Actinidea deliciosa</i>	11
3.1.6. <i>Persea americana</i> Mill.....	12
3.1.7. <i>Annona cherimola</i> Mill.	13
3.2. Aminoácidos- valor nutricional, absorção gastrointestinal e sua quantificação	14
3.2.1. Valor nutricional.....	14
3.2.2. Absorção gastrointestinal.....	16
3.2.3. Métodos analíticos de detecção e quantificação de aminoácidos	18
3.3. Atividade antioxidante vs composição fenólica.....	20
3.3.1. Atividade antioxidante	20
3.3.2. Compostos fenólicos	21
3.3.2.1. Ácidos fenólicos.....	21
3.3.2.2. Flavonóides.....	22
3.3.2.3. Taninos	23
IV. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	24
4.1. MATERIAIS.....	25

4.1.1.	Material vegetal	25
4.1.2.	Reagentes	25
4.1.3.	Linhas celulares	27
4.1.4.	Equipamento	27
4.2.	MÉTODOS	29
4.2.1.	Preparação de extratos	29
4.2.1.1.	Preparação de infusões	29
4.2.1.2.	Digestão ácida	29
4.2.2.	Identificação e quantificação de aminoácidos	30
4.2.2.1.	MS (injeção direta)	30
4.2.2.2.	Derivatização	30
4.2.2.3.	HPLC-RP-DAD.....	32
4.2.3.	Biodisponibilidade e permeação da barreira intestinal	33
4.2.4.	Determinação de atividades biológicas	35
4.2.4.1.	Atividade antioxidante	35
4.2.5.	Identificação dos compostos bioativos	37
4.2.5.1.	Fenóis Totais.....	37
4.2.5.2.	Taninos	38
4.2.6.	Determinação da citotoxicidade dos extratos aquosos (HepG2 e Caco-2).....	40
V.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1.	Identificação e quantificação de aminoácidos	44
5.1.1.	MS (injeção direta)- aminoácidos	44
5.1.2.	Derivatização e análise por HPLC-DAD.....	46
5.2.	Permeação de aminoácidos pela barreira intestinal.....	57
5.2.1.	Infusões de folhas de alcachofra, carqueja, freixo, boldo e anona.....	57
5.2.2.	Infusões de cascas	62
5.2.3.	Discussão e Conclusão.....	65
5.3.	Determinação de compostos fenólicos.....	67
5.3.1.	Identificação HPLC-DAD e LC-MS em infusões de cascas e frutos de <i>Persea americana</i> Mill., <i>Actinea deliciosa</i> e <i>Anona cherimola</i>	67
5.3.1.1.	<i>Persea americana</i> Mill.....	69
5.3.1.2.	<i>Annona cherimola</i> Mill.	73
5.3.1.3.	<i>Actinidea deliciosa</i>	76

5.3.1.4. Conclusão	78
5.3.2. Quantificação de fenóis totais e taninos.....	79
5.3.2.1. Fenóis totais	80
5.3.2.2. Taninos	82
5.4. Determinação de atividade biológica e citotoxicidade	83
5.4.1. Atividade Antioxidante de infusões de cascas, polpa e folhas de <i>Persea americana</i> Mill., <i>Actinidea deliciosa</i> e <i>Annona cherimola</i>	84
5.4.2. Determinação da Citotoxicidade dos extratos de casca e polpa de <i>Persea americana</i> Mill., <i>Actinidea deliciosa</i> e <i>Annona cherimola</i>	88
VI. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	91
VII. BIBLIOGRAFIA	96
VIII. ANEXOS	104

I. INTRODUÇÃO

1.1. Utilização de plantas para fins medicinais

Ao longo dos anos, o ser humano tem confiado na natureza para as suas necessidades básicas, para a produção de alimentos, abrigos, roupa, meios de transporte, fertilizantes, fragrâncias e também medicamentos [1-4].

A ligação entre o homem e a sua procura de soluções terapêuticas na natureza data de um passado já longínquo, onde eram usados em diferentes civilizações, como a egípcia, a chinesa e a greco-árabe.

Petrovska [5] relata que as provas escritas mais antigas do uso de plantas medicinais com fim à preparação de fármacos foram encontradas em placas de barro, em Nagpur, com aproximadamente 5000 anos. Estas placas, continham cerca de 12 receitas de preparação de fármacos, referindo-se a mais de 250 plantas.

Desde então, várias são as referências usadas para o entendimento deste tipo de plantas e seus usos.

O livro chinês “Pen T’Sao” escrito pelo imperador Shen Nung e que ronda de 2500 a.c, refere-se a mais de 360 medicamentos feitos de partes secas de plantas medicinais.

Também o papiro de Ebers, escrito por volta de 1550 a.c, apresenta uma coleção de 800 receitas, referentes a 700 plantas e medicamentos, usados para terapia. Nas várias receitas era sugerido o uso de várias plantas e alimentos, tal como a romã, o aloé, o alho, a cebola e o figo.

Mais tarde, surgiram os estudos de Hipócrates (459–370 a.c), que contêm 300 plantas medicinais classificadas pela sua ação fisiológica. Assim, o absinto e o fel da terra eram usados para baixar a febre; o alho era consumido para eliminar parasitas intestinais; o ópio era usado como narcótico; o aipo, a salsa, os espargos como diuréticos e o carvalho e a romã como adstringentes.

O “pai” da farmacognózia, Dioscórides, surge por volta de 77 d.c, quando escreve “De Materia Medica.”, um livro sob a temática de fármacos derivados de plantas.

Como já referido anteriormente, o uso de plantas como tratamento medicinal para o controlo ou cura de determinadas doenças é uma prática com milhares de anos [6].

As populações que utilizam estes tratamentos podem não entender a razão científica por trás dos seus efeitos, mas sabem por experiência própria que algumas plantas medicinais podem ser bastante eficientes, se usadas em doses terapêuticas. [1]

Contudo, com o decorrer dos anos, este tipo de medicina, medicina tradicional ou natural, passou de solução principal a alternativa, devido ao desenvolvimento e crescimento da indústria farmacêutica e à conseqüente facilidade de acesso a outros medicamentos, comercialmente disponíveis [7].

Segundo a *WHO* cerca de $\frac{3}{4}$ da população mundial, especialmente nos países em desenvolvimento, usa remédios tradicionais para os cuidados de saúde, sendo que aproximadamente 25 000 espécies são utilizadas para este fim [7].

A forma de utilização mais conhecida e com maior uso na medicina natural são as infusões. O começo da sua utilização deu-se na China, há aproximadamente 5000 anos, onde era usado para fins terapêuticos. Esta é uma bebida inteiramente baseada em espécies vegetais, onde as plantas são submergidas em água aquecida [8].

Apesar das plantas medicinais serem um importante recurso no tratamento de inúmeros malefícios, não deve ser esquecida a importância que a alimentação diária tem, na prevenção destes mesmos problemas.

Estudos previos demonstraram que o consumo de frutas e vegetais está fortemente associado à redução do risco de doenças cardiovasculares, cancro [9], diabetes, doença de Alzheimer e cataratas [10].

Os fitoquímicos, compostos não-nutrientes bioativos presentes nas frutas, vegetais, grãos e noutros alimentos derivados de plantas, estão associados à redução do risco do aparecimento de doenças crónicas.

Apesar de muitos fitoquímicos e das suas potencialidades ainda serem desconhecidos, muitas estudos sugerem que os seus benefícios podem ser de elevado interesse, devido à sua ação sobre o stress oxidativo [10, 11].

1.2. Problemática

Estudos efetuados no laboratório do grupo de Espectrometria de Massa do Centro de Química e Bioquímica da FCUL, indicaram que infusões de folhas de anona, carqueja, boldo, freixo e alcachofra poderiam ter influência na permeação de aminoácidos através de barreira intestinal, através da sua simulação com linhas celulares Caco-2. Caso se verificassem estes resultados, onde ocorria inibição na absorção de aminoácidos essenciais, poderiam existir consequências no consumo em simultâneo de alimentos com este tipo de infusões ou alternativamente, se existisse aumento na absorção destes aminoácidos, poderia também levar ao desenvolvimento de novas bebidas funcionais.

O estudo do efeito de infusões na absorção de aminoácidos é a base deste estudo experimental.

II. OBJETIVOS

Na sequência de estudos efetuados anteriormente no grupo de investigação do GEMAB, referentes à absorção de colesterol, foi verificada a possibilidade de ocorrer alteração na absorção de aminoácidos existentes no meio das células intestinais, aquando na presença de determinadas infusões frequentemente consumidas pela população.

Para o desenvolvimento deste estudo impõe-se, em primeiro lugar, um método adequado à análise deste tipo de aminoácidos. Para tal, é necessário metodologia apropriada para a deteção e quantificação destes aminoácidos, dado que estes compostos não absorvem no UV-Vis, o que impossibilita a deteção pelos métodos mais usuais e como tal é necessário recorrer a uma etapa prévia de derivatização a fim de os tornar absorptivos na gama UV-Vis, com recurso ao HPLC-RP-DAD.

Um dos principais objetivos deste trabalho recai na seleção de um método de derivatização em que não seja necessário o uso de piridina, utilizado nalguns dos métodos de derivatização, visto este ser um reagente bastante prejudicial para a saúde.

Como complemento ao seu estudo, os frutos de algumas plantas utilizadas na preparação de infusões, irão também ser caracterizados quanto à sua atividade antioxidante e aos seus compostos bioativos bem como a sua influência na toxicidade celular em células HepG2 e Caco-2.

Assim, como objetivo principal tem-se o estudo da influência de infusões de folhas de freixo, carqueja, anona, boldo e alcachofra e de cascas de frutos como kiwi, anona e abacate, na permeação de aminoácidos através das células da barreira intestinal, bem como a avaliação da utilização de sub-produtos no desenvolvimento de bebidas funcionais com vista a esta permeação e que, simultaneamente apresentem atividade antioxidante.

Para isso é necessário cumprir os seguintes objetivos parciais: método analítico para aminoácidos; identificação de compostos nos extratos aquosos e estudos de toxicidade destes extratos.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Plantas e frutos em estudo

3.1.1. *Pterospartum tridentatum*

A carqueja, de nome científico *Pterospartum tridentatum*, pertence à família Fabaceae [12] e encontra-se no norte e centro da Península Ibérica, incluindo todo o território continental de Portugal, principalmente nas zonas de grande altitude, sendo também frequente no Norte de África [13].

Na sua constituição apresenta um elevado teor em isoflavonas e outros flavonóides como constituintes maioritários [14], sendo que devido ao seu teor nestes últimos componentes bioativos, o extrato de carqueja, Figura 1, apresenta uma significativa ação contra os diabetes [14].

As infusões das flores da carqueja são recomendados também para o tratamento de constipações, dores de cabeça e de estômago e para baixar a tensão arterial. Para além disto, a carqueja tem propriedades diuréticas e digestivas [15].



Figura 1- Carqueja (*Pterospartum tridentatum*)

3.1.2. *Peumus boldus*

O boldo, de nome científico *Peumus boldus*, pertence à família *Moriniaceae* e é uma planta nativa das regiões central e sul do Chile [16].

As suas folhas são constituídas por fenóis, essencialmente taninos e flavonóides, bem como por glicolípidos [16].

Dado o elevado teor em fenóis, o boldo, na Figura 2, apresenta elevada atividade antioxidante [16].

As infusões realizadas com as folhas desta planta são usadas no tratamento de problemas digestivos. É usada também para dores abdominais, flatulência e tem efeito hepatoprotetor [17].



Figura 2- Boldo (*Peumus boldus*) (Retirado de: http://www.plantsystematics.org/imgs/dws/r/Monimiaceae_Peumus_boldus_14792.html)

3.1.3. *Cynara cardunculus* subsp. *Scolymus*

A alcachofra, de nome científico *Cynara cardunculus* subsp. *Scolymus*, pertence à família *Asteraceae* e é nativa de várias regiões mediterrânicas [18].

Na sua constituição surgem componentes bioativos como saponinas e nas suas folhas, flavonas.

Dada esta constituição, as folhas são usadas para os diabetes e como diurético e têm também capacidade de prevenir a perda de funções vasomotoras associadas ao envelhecimento [19].

Para além das aplicações enunciadas, a alcachofra, Figura 3, e as suas folhas têm efeito hepatoprotetor, anti-microbiano, anti-inflamatório, sendo que estes efeitos fisiológicos são maioritariamente atribuídos ao teor em compostos fenólicos, como as flavonas acima referidas.



Figura 3- Alcachofra (*Cynara cardunculus* subsp. *Scolymus*)

3.1.4. *Fraxinus angustifolia*

O freixo, de nome científico *Fraxinus angustifolia*, pertence à família *Oleaceas* e encontra-se presente em no centro e sul do continente europeu, sendo que em Portugal está distribuído por todo o continente.

Os compostos bioativos maioritariamente presentes são taninos e iridóides, bem como cumarina [20].

Devido à sua rica composição em compostos fenólicos, principalmente flavonóides, apresenta elevado potencial antioxidante [20, 21].

As folhas de freixo, Figura 4, são tradicionalmente usado pelas suas propriedades anti-inflamatórias e digestivas.



Figura 4- Freixo (*Fraxinus angustifolia*) (Retirado de: <http://www.newworldencyclopedia.org/>)

3.1.5. *Actinidea deliciosa*

O kiwi, de nome científico *Actinidea deliciosa*, tem sido cultivada maioritariamente em países como a Nova Zelândia, Chile, França e Japão [22].

Este fruto com alto valor nutricional visto ser uma fonte de vitaminas A, C e E e minerais [23]. A sua casca é uma boa fonte de flavonóides [24], carotenóides e luteína, que apresentam propriedades antioxidantes [25, 26].

As isoflavonas e flavonóides presentes são importantes fitoquímicos, que têm uma importante função como anti-carcinogénico, neuroprotetor e protetor da atividade cardiovascular.

Os extratos de kiwi, Figura 5, inibem também o crescimento de células cancerígenas e demonstram protecção celular contra os danos oxidativos no DNA, *in vitro* [25].



Figura 5- Kiwi (*Actinidea deliciosa*) (Retirado de: <http://www.newworldencyclopedia.org/>)

3.1.6. *Persea americana* Mill.

O abacate, de nome científico *Persea americana* Mill. [27], é nativa da América Central e México [28].

Da sua constituição fazem parte componentes bioativos como a vitamina B, C e E [29, 30], ácidos gordos insaturados [29, 31], ácido ascórbico, carotenóides, riboflavinas e compostos fenólicos.

O abacate, Figura 6, contém também elevados níveis de proteína, manganês, fósforo, ferro e potássio [29].

Os benefícios deste fruto devem-se, em parte, aos mais de 20 nutrientes essenciais e variados fitoquímicos capazes de detectar células pré-cancerígenas e cancerígenas, prevenindo o aparecimento de cancro [32].

É usado como remédio para a hipertensão [30], problemas renais, diabetes e como analgésico e antipirético.

As suas folhas apresentam propriedades antioxidantes [25, 33, 34] e atividade anti-inflamatória.

Dois análogos, persenonas A e B e a persina, mostraram-se capazes de inibir a formação de superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO), em culturas celulares e por conseguinte apresentam aplicação como agentes quimiopreventivos [35].



Figura 6- Abacate (*Persea americana* Mill.)

3.1.7. *Annona cherimola* Mill.

A anona, Figura 7, mais vendida comercialmente, de nome científico *Annona cherimola* Mill., é originária de regiões sub-tropicais da América do Sul (Equador e Peru). Em Portugal esta espécie existe nas Regiões Autónomas [36].

Este fruto tem elevado teor de água, hidratos de carbono e proteínas, mas baixo conteúdo em colesterol. É uma boa fonte de vitaminas e outros componentes bioativos como os polifenóis ou carotenóides e a sua capacidade antioxidante confere-lhe propriedades muito benéficas [36].

Os compostos isolados das folhas e caules de *A. cherimola* enunciados em Arunjyothi et al. (2011) foram alcalóides, flavonóides, glicosídeos, saponinas e taninos.

O fruto é utilizado como insecticida [37] e anti-microbiano [38], em doenças intestinais e problemas de pele. Também, na medicina tradicional mexicana, por exemplo, existem registos de uso para tratamento de problemas relacionados com o sistema nervoso, nomeadamente, como calmante e tranquilizante [39].



Figura 7- Anona (*Annona cherimola*)

3.2. Aminoácidos- valor nutricional, absorção gastrointestinal e sua quantificação

3.2.1. Valor nutricional

Os aminoácidos são definidos como substâncias orgânicas que contêm uma estrutura comum, em que apresentam na sua constituição um grupo amina e grupo ácido, ligados ao mesmo átomo de carbono (carbono α), representados na Figura 8.

Como é possível observar pela representação da Figura 8, a estrutura de cada aminoácido varia no grupo R que se encontra ligado ao carbono α , representados a cor vermelha e azul, respectivamente.

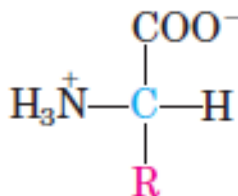


Figura 8- Estrutura geral de um aminoácido (retirado de: [40])

À exceção da glicina, todos os aminoácidos têm um carbono assimétrico e por conseguinte apresentam atividade óptica, assim como devido a estas variações nas suas cadeias laterais, os aminoácidos têm propriedades bioquímicas bastante diferentes e apresentam funções distintas.

De entre os 300 aminoácidos presentes na natureza, apenas 20 fazem parte da constituição das proteínas, sendo que são necessários para a fisiologia normal da célula e para as suas funções.

Ao longo dos anos, a necessidade pela definição dos requisitos ótimos de aminoácidos necessários pelo o Homem, sob variadas condições nutricionais, de desenvolvimento, ambientais e patológicas, tem intensificado. Como é possível observar na Tabela 1, tem-se que a quantidade de aminoácidos, tidos como indispensáveis para o bom funcionamento do organismo, aumentou significativamente desde 1985 até à atualidade.

Tabela 1- Requisitos dos aminoácidos indispensáveis no adulto (adaptado de: [41])

	PRESENTE	1985 FAO/WHO/UNU
AMINOÁCIDO	mg/kg por dia	mg/kg por dia
Histidina	10	8-12
Isoleucina	20	10
Leucina	39	14
Lisina	30	12
Metionina	10	13
Cisteína	4	
Fenilalanina+Tirosina	25	14
Treonina	15	7
Triptofano	4	3,5
Valina	26	10
Total	184	93,5

Os aminoácidos, com base no seu papel nutricional e fisiológico, podem ser classificados como nutricionalmente essenciais (indispensáveis) ou não essenciais (dispensáveis).

Os aminoácidos essenciais são definidos pelos aminoácidos cuja estrutura de carbono não consegue ser sintetizada ou que é sintetizada inadequadamente. Como tal, necessitam de ser consumidos através da dieta diária. Exemplos destes aminoácidos são: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina.

Os aminoácidos não-essenciais são aqueles sintetizados no organismo, em quantidades suficientes para um bom funcionamento do organismo, como por exemplo, a alanina, a asparagina, a cisteína, a glutamina, a glicina, a prolina, a serina e a tirosina.

Tendo em atenção diversos estudos realizados, existe cada vez mais a garantia de que para além da sua função como elementos estruturais das proteínas, alguns aminoácidos, como a arginina, a cisteína, a glutamina, a prolina e o triptofano [42], são importantes reguladores de vias metabólicas, que por sua vez são necessárias para a manutenção, crescimento, reprodução e imunidade nos organismos.

Para além destas funções, os aminoácidos participam também na sinalização celular [43, 44], no metabolismo de nutrientes específicos das células [45], no stress oxidativo [46] e intensificam a eficácia na utilização das proteínas da dieta [47].

3.2.2. Absorção gastrointestinal

Todas as células do organismos necessitam de ser nutridas, sendo que esta tarefa é maioritariamente conseguida pela assimilação de compostos externos ao organismo, provenientes da alimentação diária dos indivíduos. Para tal, através de uma série de transformações físico-químicas, o aparelho digestivo, em conjunto com o circulatório, proporcionam a estas células os nutrientes necessários à vida [48].

O tubo digestivo humano é constituído por boca, faringe, esófago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso, reto e ânus, estando-lhe associados a outros órgãos e glândulas secretoras que também participam na digestão [48, 49].

As proteínas, quando ingeridas, não sofrem na boca qualquer modificação química. No entanto, no estômago as proteínas e péptidos são desnaturados por ação do HCl presente e hidrolisadas pela pepsina, uma protease com especificidade preferencial para determinadas ligações peptídicas presentes no suco, que ajuda na eliminação das bactérias presentes nos alimentos [50].

Seguidamente, no intestino delgado, a enteropeptidase, em pH neutro, activa o tripsogénio, que por ação enzimática origina a tripsina, que por sua vez promove a activação das outras peptidases do suco pancreático. A hidrólise de proteínas e polipéptidos, produz então aminoácidos livres e péptidos mais pequenos [50, 51].

O processo de absorção dos produtos, através da membrana lipídica do intestino, resultantes da digestão proteica, como aminoácidos, di e tripéptidos, ocorre por processos complementares, podendo ser transportados por três mecanismos: transporte passivo por difusão simples; transporte passivo por difusão facilitada; ou transporte ativo [51].

O transporte passivo por difusão simples ocorre principalmente com aminoácidos livres e é inversamente proporcional à hidrofília e diretamente proporcional ao gradiente de

concentração do aminoácido, ou seja, quanto mais hidrofóbico for o aminoácido e quanto maior for o seu gradiente de concentração através da membrana, maior será a importância da transferência por difusão simples.

O transporte passivo por difusão facilitada ocorre também principalmente em aminoácidos livres, porém o transporte dá-se mais rapidamente, por ser mediado por transportadores, independentes de sódio, Na^+ , e da energia metabólica. É importante para equilibrar a concentração de aminoácidos no citoplasma e no meio extracelular, transportados através da membrana [50].

O transporte ativo por co-transporte, como é possível observar na Figura 9, ocorre com os aminoácidos livres, di e tripéptidos. É mediado por transportadores, porém é capaz de libertar uma substância contra o gradiente de concentração, sofrendo com isso elevado gasto energético.

Os aminoácidos livres são co-transportados juntamente com o Na^+ e o seu transporte depende do gradiente electroquímico do Na^+ , gerado pelo transporte ativo Na^+-K^+ -ATPase na membrana basolateral, sendo chamado de transporte ativo secundário [50].

Os di e tripéptidos são co-transportados juntamente com os prótons H^+ e o seu transporte depende do gradiente electroquímico de H^+ [50].

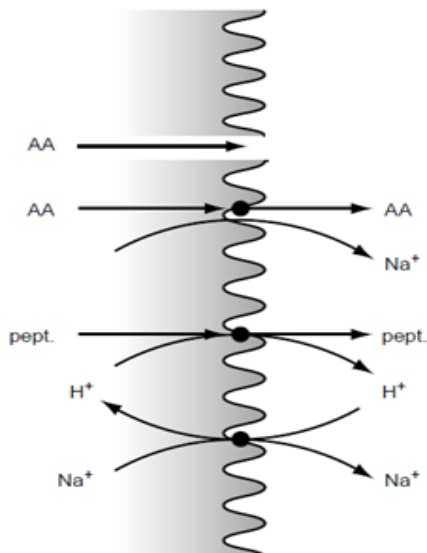


Figura 9- Mecanismo de absorção pela membrana lipídica, de aminoácidos e péptidos

Por fim, os aminoácidos originalmente livres, bem como os resultantes da hidrólise de proteínas, são transportados do lúmen intestinal, através da barreira de células epiteliais da mucosa, para o sistema sanguíneo ou linfático [42, 51, 52].

3.2.3. Métodos analíticos de detecção e quantificação de aminoácidos

A determinação dos aminoácidos tem vindo a ser usada na pesquisa em sistemas biológicos, na pesquisa de doenças, por exemplo, e mais recentemente na área da ciência de alimentos, com o principal objetivo de determinar e quantificar a composição proteica dos mesmos. Dado que os aminoácidos pertencem à estrutura das proteínas, o estudo qualitativo e quantitativo é necessário [53].

As técnicas usadas para a análise dos aminoácidos são frequentemente realizadas utilizando métodos cromatográficos.

As primeiras técnicas de determinação basearam-se na utilização de uma resina sulfonatada de troca iónica, onde se procedia à derivatização pós-coluna, seguida de detecção colorimétrica.

Mais tarde foi introduzida a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que se demonstrava mais vantajoso, dado ser mais versátil. Nesta técnica, vários tipos de coluna e gradientes de eluição podem ser utilizados, assim como diversos reagentes de derivatização, consoante o objetivo pretendido [54].

Em suma, é possível dividir as técnicas mais frequentes em, cromatografia líquida de troca iónica; HPLC-DAD, juntamente com a derivatização em pré- ou pós-coluna e com a detecção por UV/Vis ou fluorescência [55] e LC acoplado à espectrometria de massa com ionização por electrospray (LC-ESI-MS). Também é possível o recurso ao LC acoplado com o MSⁿ, que fornece uma técnica de elevada especificidade e sensibilidade para a análise de aminoácidos sem ser necessária derivatização e por fim o GC acoplado à espectrometria de massa (GC-MS) também pode ser usado na separação de derivados voláteis [56, 57].

Como referido anteriormente, nem sempre o analito a ser estudado apresenta as características necessárias para poder ser detetado, como por exemplo não absorver na gama de comprimentos de onda correspondentes ao UV, no caso de HPLC-RP-DAD, ou não serem voláteis, no caso de GC e como tal é necessário uma etapa prévia de derivatização [58].

A derivatização, de um modo geral, conjugada com uma separação cromatográfica adequada, pode superar alguns problemas como a baixa sensibilidade do detector,

através da formação de compostos menos polares, que podem ser analisados mais facilmente por LC/HPLC.

Como referido anteriormente a derivatização pode ocorrer em duas fases distintas, em pré- ou pós-coluna.

Na derivatização pós-coluna, passível de ser aplicada em inúmeros tipos de amostras e em análises rotineiras de quantificação, ocorre a separação dos resíduos numa coluna de troca iónica, seguida de reacção com um composto cromóforo ou fluoróforo.

Este tipo de reacção apresenta vantagens como a sua boa reprodutibilidade e capacidade de quantificação, bem como o facto de que, dado que os componentes são separados na coluna, antes da reacção, esta não é afetada pela matriz da amostra durante a reacção com o reagente derivatizante. Contudo, apresenta algumas desvantagens, como a difícil utilização em análises altamente sensíveis, a variedade de reagentes derivatizantes é limitada e não pode ser usada cromatografia de fase reversa.

Na derivatização pré-coluna, mais apropriada para para análises altamente sensíveis, os aminoácidos são derivatizados previamente e de seguida os seus derivados são separados por coluna de fase reversa em HPLC.

A derivatização pré-coluna apresenta vantagens, como o facto de consumir menos reagente, quando comparado com pós-coluna, permite aumentar a hidrofobicidade do aminoácidos de maneira a que possam ser retidos nas colunas de fase reversa e consequentemente aumentar a sensibilidade do método, existe também uma extensa variedade de agentes derivatizantes possíveis de serem usados, podendo ser escolhido o mais apropriado para o tipo de detector (UV,Vis).

Apresenta algumas desvantagens, como a eficiência da reacção de derivatização ser afetada pela matriz da amostra, dado que o processo ocorre antes de qualquer separação cromatográfica e por fim, os produtos de reacção podem ser por vezes instáveis.

Alguns exemplos de reagentes derivatizantes mais comumente usados e disponíveis comercialmente são: fenilisotiocianato (PITC), cloreto de 4-nitrobenzoilo, brometo de p-nitrobenzil, o-ftaldialdeido (OPA), cloroformato de 9-fluorenilmetil (FMOC-Cl), cloreto de dansilo (Dns-Cl), 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) e naftaleno-2,3-dicarboxaldeido [59].

3.3. Atividade antioxidante vs composição fenólica

3.3.1. Atividade antioxidante

Os radicais livres são moléculas que possuem átomos que contêm um ou mais elétrons não emparelhados, sendo que essa configuração faz deles moléculas altamente instáveis e quimicamente muito reativas.

Os radicais livres têm ganho muita importância, pois contribuem para o desenvolvimento de diversas patologias, como envelhecimento e doenças degenerativas como o cancro, doenças cardiovasculares, enfraquecimento do sistema imunitário, problemas cerebrais, entre outras [60].

Os antioxidantes, importantes nutraceuticos, são constituídos por compostos fenólicos podem funcionar como agentes redutores, neutralizando o radical livre e algumas vezes como quelantes de metais agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias [61].

Apesar de o organismo ser capaz de sintetizar uma parte dos antioxidantes, a maioria tem origem externa, sendo consumidos na alimentação diária. Estes compostos podem ser encontrados maioritariamente em frutas e vegetais, mas também em alguns tipos de sementes e frutos secos.

Quando a disponibilidade de antioxidantes é limitada, estes problemas podem-se acumular, resultando em stress oxidativo [60].

Os antioxidantes podem ser naturais ou artificiais, sendo que os naturais se encontram principalmente em plantas, como referido anteriormente, na forma de compostos fenólicos ou carotenóides. Os antioxidantes artificiais podem ser casos como, o butil-hidroxi-tolueno - BHT e o butil-hidroxi-anisol – BHA.

3.3.2. Compostos fenólicos

Os fitoquímicos são definidos como os nutrientes não essenciais derivados das plantas. Estes compostos têm uma variedade de efeitos benéficos na saúde humana, como serem anti-cancerígenos e anti-mutagénicos [62].

Estima-se que existam mais de 5000 fitoquímicos individuais, identificados em frutas, vegetais e outras plantas e podem ser classificados, por exemplo, em compostos fenólicos, carotenóides, vitaminas, alcalóides, entre outros [62].

De entre a grande diversidade estrutural dos fitoquímicos, os compostos fenólicos têm requerido um grande interesse, dado compreenderem inúmeros efeitos benéficos para o ser humano [62].

Os compostos fenólicos são compostos amplamente distribuídos no reino vegetal e são metabolitos secundários das plantas, estando geralmente envolvidos nos mecanismos de defesa contra a radiação UV ou agressões por parte de patogénicos em particular nos frutos e outros vegetais.

Mais de 8000 compostos polifenólicos foram identificados em várias espécies de plantas. Este tipo de compostos podem apresentar um vasto conjunto de estruturas e funções, mas apresentam, na sua maioria, um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilos substituintes, sendo classificados em diferentes grupos, consoante o número de anéis fenólicos e nos elementos estruturais que ligam estes anéis uns aos outros [63].

O grupo dos compostos fenólicos é constituído maioritariamente por ácidos fenólicos (constituídos pelos ácidos hidroxibenzóicos (por ex. ácido gálico) e ácidos hidroxicinâmicos (por ex. ácido cafeico)), flavonóides (quercetina, cianidina e catequina), taninos e coumarinas [64].

3.3.2.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são a classe de compostos fenólicos mais frequentes na natureza e incluem predominantemente os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos.

A presença destes compostos nos alimentos consumidos e em plantas usadas na preparação de infusões apresenta inúmeras vantagens farmacológicas, tais como o combate de doenças neurodegenerativas [65].

De um modo geral esta grupo de compostos apresenta propriedades anti-bacterianas e anti-inflamatórias. Estas propriedades estão, em parte, associadas à sua capacidade antioxidante que é atribuída à sua capacidade de quelatar metais, inibir enzimas, como a lipoxigenase e conseguir interagir com radicais livres, como acima descrito [66].

3.3.2.2. Flavonóides

Os flavonóides são um grupo constituído por mais de 4000 compostos. Estes compostos são compostos por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos, que estão normalmente num anel contendo oxigénio.

Os flavonóides são constituídos por um número alargado de compostos, divididos por famílias, tais como os flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides [67, 68]. Estes compostos estão diretamente relacionados com a capacidade antioxidante das amostras [69].

O flavonóides estão presentes em frutos, vegetais, flores, sementes e portanto integram a alimentação diária do ser humano [70].

A atividade bioquímica dos flavonóides e dos seus metabolitos depende da sua estrutura química. Este grupo de compostos fenólicos apresenta benefícios para a saúde, tais como o seu efeito anti-bacteriano, anti-inflamatório [71], doença coronária [72] e apresenta efeito vasoprotetor [68].

Os flavonóides são de particular interesse pela sua possível atividade farmacológica, derivada da sua capacidade de inibir determinadas enzimas [72-74], pela sua atividade antioxidante [63, 75-78], pelo facto de serem quelantes de metais [72] e fazerem ligação com radicais livres, eliminando o seu efeito negativo [68].

3.3.2.3. Taninos

Os taninos são dos compostos fenólicos com maior massa molecular e com grande capacidade de interagir com as proteínas salivares, dando origem a complexos insolúveis que provocam a sensação de adstringência [79].

De acordo com a sua estrutura química, distinguem-se em dois grupos: hidrolisáveis e condensados, sendo que estes últimos são mais comuns que os hidrolisáveis [80]. Este tipo de taninos são polímeros constituídos por unidades de flavanóis [80, 81].

Este grupo de compostos fenólicos é definido como anti-nutriente de origem vegetal, devido ao facto de conseguirem fazer precipitar proteínas, inibir enzimas digestivas e diminuir a utilização de vitaminas e minerais, sendo que não devem ser consumidos em elevadas quantidades [82]. Por outro lado, os taninos são também vantajosos para a saúde, sendo constituintes de alimentos derivados de plantas e bebidas. Por exemplo, foi reportada o seu potencial anti-cancerígeno e anti-mutagénico, bem como propriedades antimicrobianas e apresentam também atividade antioxidante [82, 83].

IV. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Material vegetal

Neste trabalho foram utilizadas as folhas e caules secos de alcachofra, freixo, boldo e carqueja, comercializadas em Portugal, para uso na preparação de chás. Este material vegetal foi adquirido num estabelecimento comercial, sendo da marca “Diética”.

As frutas usadas na preparação dos extratos de polpa e casca (anona, abacate e kiwi), bem como as folhas de abacateiro, da marca “Botanicum”, foram adquiridas num estabelecimento comercial.

Por fim, as folhas de kiwi e anona foram colhidas em Castelo Branco e em Ponta Delgada, respetivamente.

4.1.2. Reagentes

Todos os reagentes usados ao longo deste trabalho estão apresentados de seguida, na Tabela 2.

Tabela 2- Reagentes utilizados para a realização dos ensaios

ENSAIO	Reagente	Marca
HPLC	Acetonitrilo	Fisher®
	Acetato de sódio	Fluka®
	Ácido acético glacial	Merck®
	PITC	Thermo Scientific®
	Mistura padrão aminoácidos	Thermo Scientific®
	Fenilalanina	Sigma®
	Ácido glutâmico	BDH chemicals®
	Ácido aspártico	BDH chemicals®
	Glicina	Sigma®
	Lisina	Sigma®
	Leucina	BDH chemicals®
	Histidina	Sigma®
	Alanina	Sigma®
Prolina	Sigma®	

	Metionina	Sigma [®]
	Tirosina	Sigma [®]
	trietilamina	Fisher Scientific [®]
	Ácido clorídrico	Merck [®]
TOXICIDADE	MTT	Sigma [®]
COMPOSTOS BIOATIVOS	DPPH	Alfa Aesar [®]
	Metanol	Fisher [®]
	NaNO ₂	Riedel-de Haen [®]
	AlCl ₃	Riedel-de Haen [®]
	NaOH	J.T.Baker [®]
	Folin-Ciocalteu	Sigma [®]
	Na ₂ CO ₃	Merck [®]
	Acido gálico	Sigma [®]
	Catequina	Sigma [®]
	Rutina	Sigma [®]
	Acido tânico	Merck [®]
	FeCl ₃	Fluka [®]
	K ₄ [Fe(CN) ₆]	Merck [®]
	LINHAS CELULARES	DMEM
RPMI		Lonza [®]
Tripsina		Lonza [®]
Pen-strep		Lonza [®]
FBS		Lonza [®]
PBS		Lonza [®]
L-Glutamina		Lonza [®]
DMSO		Fisher Scientific [®]

4.1.3. Linhas celulares

As linhas celulares utilizadas nos ensaios foram Caco-2 (ATCC#HTB-37) e HepG2 (ATCC#HB-8065), sendo linhas celulares derivadas de epiteliais do adenocarcinoma col-retal e do carcinoma hepatocelular, respetivamente.

A linha celular de Caco-2 foi colocada a crescer e desenvolver-se em meio RPMI, onde foi adicionado 10 % de FBS, pen-strep e L-glutamina, numa estufa a 37°C e 5% de CO₂.

A linha celular de HepG2 foi colocada a crescer e desenvolver-se em meio DMEM, onde foram adicionados os mesmos componentes referenciados para o meio RPMI, numa estufa a 37°C e 5% de CO₂.

A ambas as linhas celulares, o meio de cultura foi mudado a cada 48h.

4.1.4. Equipamento

A centrifugação dos preparados de polpa de todas as frutas foi feita numa centrífuga Beckman[®], modelo J2-21 e as amostras mais pequenas foram centrifugadas numa Mini Spin F45-12-11 da Eppendorf[®].

A liofilização das amostras foi feita num liofilizador Heto[®] PowerDry 3000 e as medições de pH num aparelho WTW inoLab[®].

As análises por HPLC (*High Precision Liquid Chromatography*) foram realizadas num aparelho VWR- Hitachi LaChrom Elite[®], com uma coluna LiChroCART[®] 250-4 LiChrospher[®] 100 RP-18 (5µm) da Merck[®] e *software* EZChrom Elite[®] para a análise dos dados obtidos. A deteção foi realizada com recurso a um detector do tipo DAD (*diode array detector*).

Foi também utilizado um espectrofotómetro M350 Double Beam UV-Vis Spectrophotometer e um espectrofotómetro multi-canal leitor de microplacas Tecan[®] Sunrise.

As condições de esterilidade/assépsia necessárias para o trabalho com as linhas celulares foram garantidas usando uma câmara de fluxo laminar Esco® *Class II Biohazard Safety Cabinet*, sendo a incubação de amostras realizada numa estufa *Shel Lab CO2 Series* da Sheldon Mfg.Inc®.

A medição da resistência das membranas celulares foi efetuada recorrendo ao uso de um medidor Millicell® ERS-2 equipado com um eléctrodo MERSSTX01.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparação de extratos

4.2.1.1. Preparação de infusões

Para a preparação dos extratos, foram efetuadas infusões das folhas e das cascas de *Actinidia deliciosa*, *Persea americana* Mill. e de *Annona cherimola*, bem como de folhas de *Fraxinus angustifolia*, *Pneumus boldus*, *Pterospartum tridentatum* e *Cynara cardunculus* da subspécie *scolymus*.

Para a infusão colocou-se 10g de folhas e cascas em 100 mL de água da torneira, previamente colocada em ebulição, durante 10 min. Findado este tempo, a infusão foi filtrada, em papel de filtro Whatman 1 e foi congelada para posteriormente liofilizar.

4.2.1.2. Digestão ácida

Para a preparação da polpa de *Actinidia deliciosa*, *Persea americana* Mill. e de *Annona cherimola*, os frutos, sem casca e caroços, foram pesados. Assim, 150 g de fruto foram triturados, formando uma polpa ao qual se adicionou uma solução de HCl a pH 1, de modo a simular o ambiente ácido sentido no estômago, pela qual a polpa passa na digestão. Seguidamente este preparado foi colocado em agitação permanente por 1h, a 37°C, de modo a também simular o processo ocorrido na fruta aquando a sua ingestão. Após este tempo, o preparado foi guardado, para posterior centrifugação e liofilização.

4.2.2. Identificação e quantificação de aminoácidos

4.2.2.1. MS (injeção direta)

Os espectros de massa com ionização por *electrospray* (ESIMS) foram obtidos utilizando um espectrômetro de massa LCQDuo (Thermoquest). Todas as amostras foram dissolvidas em ácido clorídrico e as respectivas soluções introduzidas diretamente no sistema, a uma velocidade de fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. O capilar foi aquecido a 200 $^{\circ}\text{C}$ e mantido a uma voltagem de 4,5 kV. As condições experimentais foram otimizadas de modo a que os iões de interesse (moléculas protonadas) apresentassem uma abundância máxima. Foram realizadas experiências MS/MS de modo a obter fragmentações características das moléculas protonadas. Como gás de colisão foi usado hélio e a energia de colisão foi sendo gradualmente aumentada até serem observados quer o ião precursor, quer os iões fragmento. Todos os espectros foram adquiridos no modo de ionização positivo. A aquisição e tratamento de dados foi feita recorrendo ao software Xcalibur.

4.2.2.2. Derivatização

Vários são os métodos que permitem a identificação e quantificação de aminoácidos em diversos tipos de amostras. Existem várias abordagens específicas para a sua deteção [84-87], contudo estes métodos requerem instrumentação dispendiosa, nem sempre disponível.

A determinação destes aminoácidos pode ser conseguida recorrendo tanto a GC-MS, como a LC-MS, contudo a sua deteção direta por UV ou fluorescência é difícil devido à ausência de grupos cromóforos ou fluoróforos fortes [88]. Como tal, a sua maioria necessita de uma etapa de derivatização [89].

Tendo em conta todas as vantagens e desvantagens apresentadas para o uso dos vários agentes, optou-se por realizar a derivatização em pré-coluna, com o uso do reagente derivatizante PITC.

Foram testados vários métodos de derivatização, sendo que o método seleccionado foi optimizado, alterando-se algumas das suas variáveis.

O método escolhido foi o recomendado pelo fornecedor do agente derivatizante escolhido (PITC), com algumas alterações.

Assim, colocou-se 20 µL de solução padrão/extratos aquosos a secar, sob corrente de N₂. Após secagem, a película de amostra resultante foi dissolvida em 100 µL de “coupling solution” (acetonitrilo:triethylamina:água – 10:2:3) e levada novamente a secar. De seguida, os aminoácidos residuais foram novamente dissolvidos em 100 µL de “coupling solution”, tendo-se adicionado também 5 µL de PITC. Deixou-se a reacção a dar-se por 10 min, à temperatura ambiente.

Findado o tempo de reacção, as soluções foram postas a secar, até que uma nova película esteja formada e toda a solução tenha evaporado.

O produto resultante, complexo PTC-aminoácidos, cuja reacção de formação é apresentada na Figura 10, foi dissolvido em 250 µL de solvente de análise (água:acetonitrilo – 7:2) e analisado por HPLC-RP-DAD a 254nm.

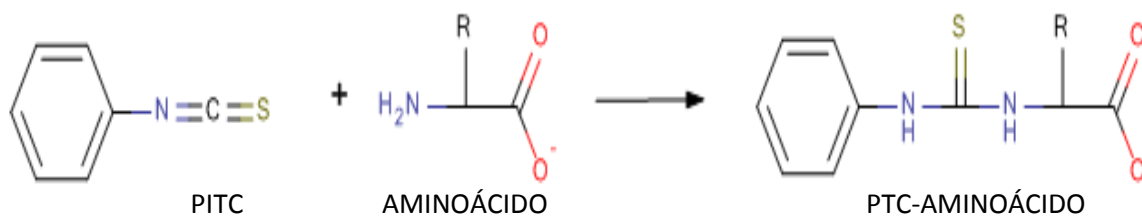


Figura 10- Esquema reacional da interação do PITC com os aminoácidos

4.2.2.3. HPLC-RP-DAD

Nas diversas indústrias (farmacêutica-princípios ativos [90], alimentar-açúcares, vitaminas, proteínas [91], ambiental [92]) é frequentemente necessário separar, isolar, identificar e quantificar componentes de misturas por vezes bastante complexas [93]. Como é o caso dos aminoácidos, na indústria alimentar, por exemplo [94].



O método para quantificação de aminoácidos por HPLC, Figura 11, é de um modo geral, rápido e bastante sensível [95], para além do facto de este tipo de instrumentação ter a versatilidade de poder ser usado para muitos outros tipos de ensaios [96].

Este tipo de instrumentação apresenta ainda a importante vantagem de pode ser utilizado em análises de compostos não voláteis ou termicamente instáveis, onde o GC-MS não pode ser utilizado.

A cromatografia é uma técnica analítica baseada na separação de moléculas devido às suas diferenças na sua estrutura ou composição.

A separação por cromatografia dá-se através da migração dos diversos componentes da amostra através de uma fase estacionária, por ação de uma outra fase, a fase móvel [96]. Após a introdução da amostra no sistema cromatográfico, os componentes desta distribuem-se entre as duas fases e são transportadas, mais ou menos lentamente que a fase móvel consoante a sua afinidade com esta fase. Sendo que os componentes com maior afinidade com a fase estacionária movem-se mais lentamente [95, 96].

No caso do estudo em questão a coluna usada foi de fase reversa, ou seja, com uma fase estacionária de baixa polaridade ou mesmo apolar.

Heinrikson [97] sugere um método cromatográfico usado para deteção e separação de aminoácidos com aplicação comprovada. Contudo, este método sofreu otimização, a fim a se conseguir obter uma melhor resolução cromatográfica.

Após o término do processo de otimização, o método definitivo foi aplicado a uma mistura padrão, bem como às amostras em estudo.

Por conseguinte, para a análise das amostras (padrão e extratos) por HPLC-RP-DAD foi utilizado um gradiente de eluição composto por uma solução A (acetato de sódio 0,14M a ph 6,5), uma solução B (acetonitrilo) e um eluente C (água).

O método usado segue o seguinte programa: 0 minutos: 100% A; 30 minutos: 75% A e 25% B; 31 minutos: 70% B e 30% C; 36 minutos: 70% B e 30% C; 40 minutos: 100% A; 45 minutos: 100% A.

4.2.3. Biodisponibilidade e permeação da barreira intestinal

Durante os últimos anos, o interesse pela interação de compostos, com o organismo tem vindo a aumentar. Tal interesse é aplicado, por exemplo, à indústria farmacêutica, onde a importância da percepção dos mecanismos pelos quais existe absorção de compostos a nível celular é evidente. Um dos casos recai sobre a adsorção de fármacos pelo epitélio intestinal. A permeabilidade da barreira gastrointestinal é assim uma das importantes características que deve ser considerada nestes estudos [98, 99].

Desta maneira, é necessário o desenvolvimento de ensaios *in vitro* capazes de simular as condições verificadas *in vivo* para este tipo de transporte e absorção.

As células Caco-2 são as mais aconselháveis de usar nestes ensaios, pois são células de origem humana e podem ser facilmente manipuladas em culturas, de maneira a que exibam diversas características similares ao epitélio do intestino delgado humano [100].

Após crescimento e diferenciação, as células são colocadas em suportes, do tipo Transwell[®], representada na Figura 12, contendo um suporte poroso e permeável, que permitem o acesso de iões e nutrientes a ambos os lados da monocamada celular.

Neste modelo, são colocados *inserts* permeáveis de culturas celulares. Nestes *inserts*, as células são deixadas a crescer e a diferenciarem-se por determinado tempo, até que se verifique a formação de de camadas confluentes, com propriedades de barreira bem definidas [100, 101].

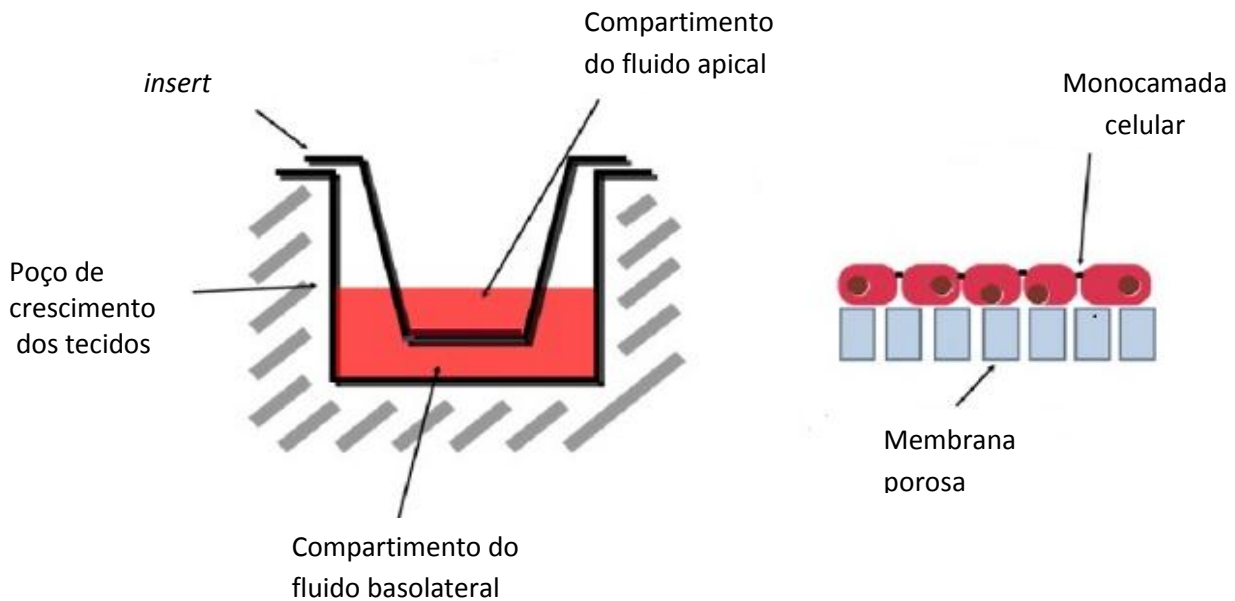


Figura 12-Representação esquemática do princípio básico de um ensaio em Transwell® (adaptado de : <http://www.solvobiotech.com/technologies/monolayers-assay>)

O movimento de compostos, adicionados à câmara superior (lado apical) da Transwell® e que se deslocam para a câmara inferior (lado basolateral), mede a absorção. Enquanto que o movimento de compostos adicionados ao lado basolateral e que se deslocam para o lado apical, mede o transporte ativo.

Para os ensaios de permeação, as células Caco-2 foram colocadas a crescer e a diferenciarem-se em placas Transwell® de 12 poços.

No lado apical foram colocados 500 µL de suspensão celular (5×10^4 células) e no lado baso-lateral foi colocado 1 mL de meio RPMI. A ambos os lados foi renovado o meio a cada 48h.

Ao fim de 21 dias, quando a confluência celular pretendida se verificou, foi avaliada a integridade das monocamadas formadas, recorrendo a um medidor de resistência da membrana. Para valores acima de 250 Ohm considera-se que a membrana se encontra nas condições ideais para a realização dos ensaios.

O meio foi removido e substituído, no lado apical por 600 µL de solução de RPMI com extrato, numa concentração de 0,5 mg/mL, tendo-se realizado também poços de controlo onde apenas foi colocado meio RPMI e no lado basolateral 1,6 mL de meio RPMI.

Incubaram-se as amostras durante 24h numa estufa a a 37°C contendo 5% de CO₂.

As amostras foram recolhidas no tempo 0h (quando foram colocados os extratos) e no tempo 24h (passadas 24h da colocação dos extratos) e congeladas a -20°C para posterior análise por HPLC-RP-DAD.

Findadas as 24h, adicionou-se PBS ao lado apical (2x 200 μL) com o fim de lavar a membrana, tendo-se depois adicionado 100 μL de PBS para ressuspender as células. Estas células foram recolhidas e congeladas a -80°C .

4.2.4. Determinação de atividades biológicas

4.2.4.1. Atividade antioxidante

Os antioxidantes são importantes nutracêuticos, devido ao facto de apresentarem inúmeros benefícios para a saúde [61].

Estes compostos interagem com os radicais livres, neutralizando-os e consequentemente prevenindo danos a nível celular. Assim, os antioxidantes, entre outros, apresentam a elevada vantagem de terem capacidade de controlar naturalmente a formação destes radicais.

Tem havido um aumento do interesse na procura destes compostos e consequente aplicação de diversos métodos na sua procura [102-105].

Um dos métodos mais usados recorre ao uso 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), devido à estabilidade do seu radical DPPH:

Quando a solução de DPPH é misturada com uma substância com capacidade de doar um átomo de hidrogénio, ocorre a formação da sua forma reduzida (difenil-picril-hidrazina), como pode ser observado na Figura 13, havendo por conseguinte perda da cor roxa inicial.

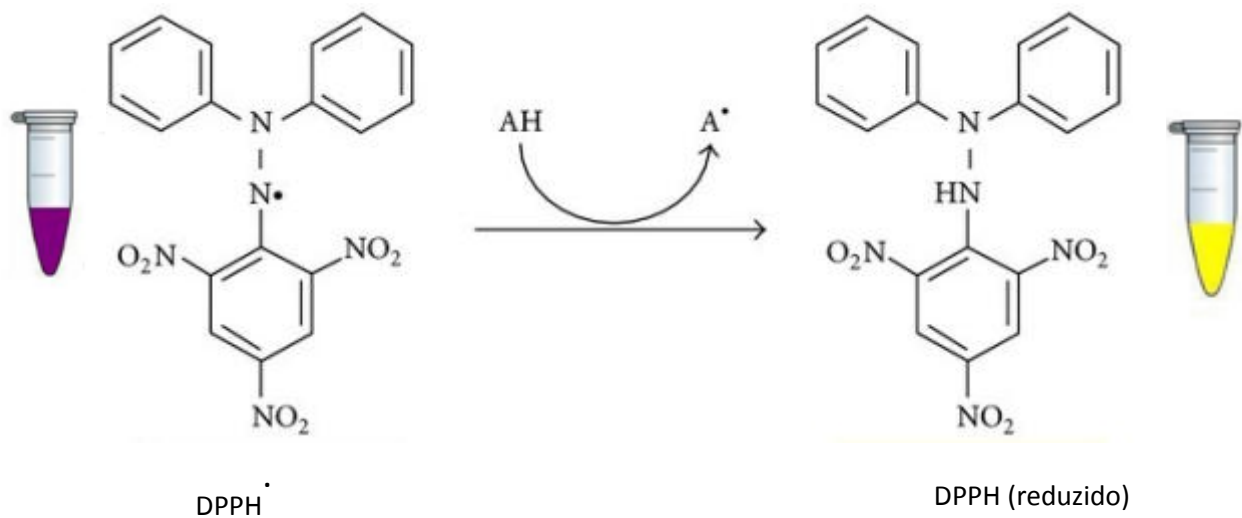


Figura 13- Representação esquemática da redução do radical livre DPPH• na presença de uma substância com propriedades antioxidantes (adaptada de : (Teixeira et al. 2013))

Os ensaios de DPPH foram realizados seguindo a metodologia descrita por [106], sendo um método espectrofotométrico.

O equipamento utilizado requer o uso de uma cuvette na frente ao qual é subtraído o valor da absorvância da cuvette de trás. Assim, para a leitura do branco foi colocado na cuvette de trás 1000 µL de metanol e na da frente 1000 µL de solução de DPPH com 10 µL de água destilada.

Para a leitura das amostras de extratos, foram colocados na cuvette de trás 10 µL de solução de extrato com 1000 µL de metanol e na cuvette da frente 10 µL de solução de extrato com 1000 µL de DPPH. De seguida, esperou-se 30 minutos e leram-se as absorvâncias a 517nm.

Os ensaios realizados foram realizados em triplicado.

Os resultados foram expressos em percentagem de redução do DPPH• relativamente ao controlo e calculado através da seguinte equação:

$$AA(\%) = [(A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}}) / (A_{\text{controlo}})] \times 100$$

onde AA (%) representa a atividade antioxidante e A_{controlo} e A_{amostra} são absorvâncias da solução de controlo e da amostra, respetivamente. Os ensaios foram realizados a diferentes concentrações, de modo a permitir a determinação da concentração para a qual a atividade antioxidante é 50% (EC_{50}).

4.2.5. Identificação dos compostos bioativos

Os compostos fenólicos são compostos amplamente distribuídos no reino vegetal (considerados metabolitos secundários das plantas), em particular nos frutos e outros vegetais.

Este tipo de compostos podem apresentar um vasto conjunto de estruturas e funções, mas apresentam, na sua maioria, um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilos substituintes [63].

O grupo dos compostos fenólicos inclui os ácidos fenólicos (constituídos pelos ácidos hidroxibenzóicos (por ex. ácido gálico) e ácidos hidroxicinâmicos (por ex. ácido cafeico)), flavonóides (quercetina, cianidina e catequina) e compostos altamente polimerizados (lenhinas, melaninas e taninos) [64].

Para ser possível uma identificação e quantificação mais rigorosa destes compostos (fenóis e taninos) deverá recorrer-se a técnicas adicionais, como as cromatográficas.

4.2.5.1. Fenóis Totais

A presença destes compostos nos alimentos consumidos e em plantas usadas na preparação de infusões apresenta inúmeras vantagens farmacológicas, entre elas o combate de doenças neurodegenerativas [65].

O ensaio mais comumente utilizado para a quantificação de compostos fenólicos totais recorre ao uso do reagente de Folin-Ciocalteu [107]. Na presença de compostos fenólicos, o reagente faz com que ocorra a transferência de eletrões, em meio alcalino [108], desses mesmos compostos e de outras espécies redutoras, para o Molibdénio

presente na constituição do reagente [109]. Tal reação faz com que sejam formados complexos azuis [109, 110], passíveis de serem lidos espectrofotometricamente, em comprimentos de onda compreendidos entre 760-765 nm [111].

A determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos aquosos foi efetuada recorrendo a um método espectrofotométrico, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, adaptado da metodologia descrita na literatura [112]. Para a realização da curva de calibração foi utilizado o reagente padrão de ácido gálico, cuja estrutura se encontra representada na Figura 14.

Foram colocados 30 µL de extrato (1 mg/mL) juntamente com 1350 µL de água destilada. De seguida, foram adicionados 30 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e esperou-se cerca de 3 min. Por fim, foram adicionados 90 µL de Carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 2%. As amostras foram colocadas sob agitação durante 2h e por fim foram lidas a 760 nm.

Reta de calibração: Absorvância=0,0693 Ácido gálico - 0,0394

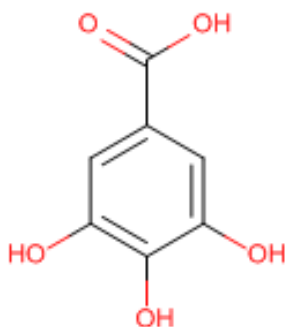


Figura 14- Estrutura química do ácido gálico

4.2.5.2. Taninos

De acordo com a sua estrutura química, os taninos distinguem-se em dois grupos: hidrolisáveis e condensados, sendo que estes últimos são mais comuns que os hidrolisáveis [80]. Este tipo de taninos são polímeros constituídos por unidades de flavanóis [80, 81].

Este grupo de compostos fenólicos é definido como anti-nutriente de origem vegetal, devido ao facto de conseguirem fazer precipitar proteínas, inibir enzimas digestivas e diminuir a utilização de vitaminas e minerais, sendo que não devem ser consumidos em elevadas quantidades [82]. Por outro lado, os taninos são também vantajosos para a saúde, sendo constituintes de alimentos derivados de plantas e bebidas.

Para a realização da curva de calibração foi utilizado o padrão de ácido tânico, representado na Figura 15.

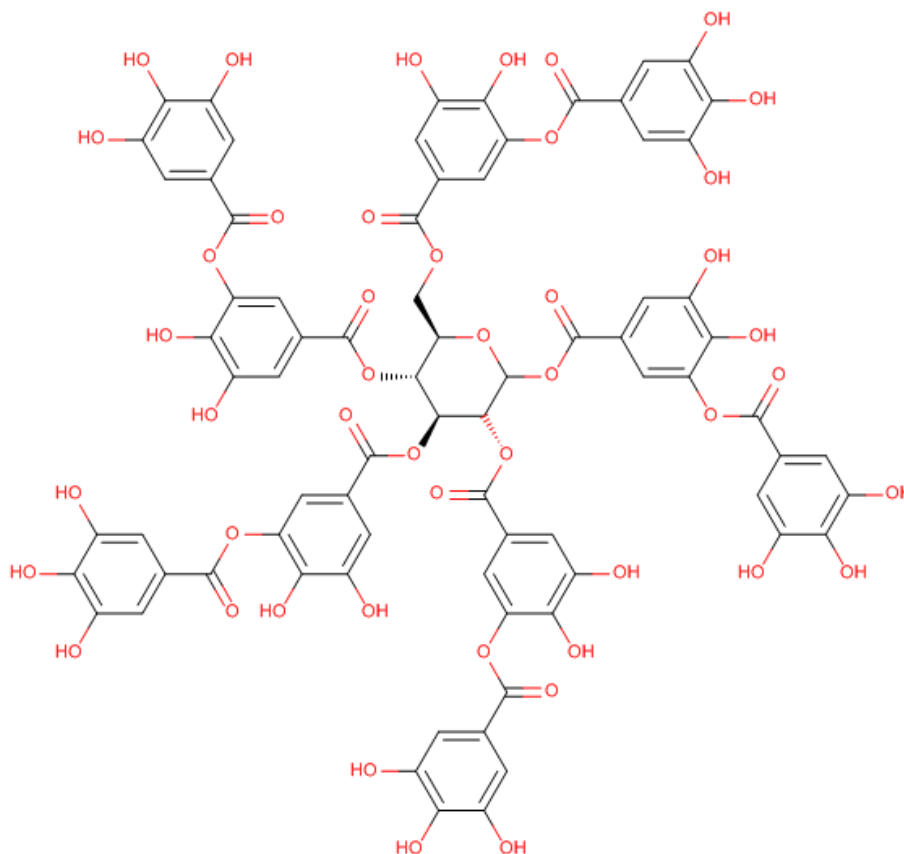


Figura 15- Estrutura química do ácido tânico

A 300 μL de água destilada adicionou-se 100 μL de extrato (1 mg/mL). De seguida foram adicionados 300 μL de Cloreto de Ferro (III) 0,1M em(FeCl_3 - preparado em HCl 0,1M) e 300 μL de Ferrocianeto de potássio ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$). As amostras foram lidas a 605 nm.

Retas de calibração: Absorvância=0,0052 Ácido tânico + 0,2745

4.2.6. Determinação da citotoxicidade dos extratos aquosos (HepG2 e Caco-2)

Em ensaios realizados *in vitro* é necessário avaliar o efeito que os compostos colocados em contacto com as células têm nestas. É necessário verificar se a resposta celular aos compostos farmacêuticos, químicos e a nutrientes colocados no seu meio, representam uma situação de risco para as células ou se, pelo contrário, lhes conferem benefícios [113].

Um dos ensaios mais comumente usados para testar a citotoxicidade é o MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol), que essencialmente monitoriza a perda de células viáveis.

Este é um ensaio colorimétrico que mede a redução do MTT de cor amarela, pelo succinato desidrogenase mitocondrial, refletindo de forma rápida e precisa, a atividade metabólica de células viáveis. Como a redução do MTT só pode ocorrer em células metabolicamente activas, o nível de atividade é uma medição da viabilidade das células.

O principio básico do ensaio baseia-se no facto de o MTT entrar na célula e seguidamente na mitocôndria, onde é reduzido a um produto insolúvel de cor roxa, o formazan. O esquema reacional desta reação encontra-se apresentado na Figura 16.

Sendo que a quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis na amostra.

O produto formado pode ser solubilizado usando metanol ou DMSO e o material resultante dissolvido é medido espectrofotometricamente.

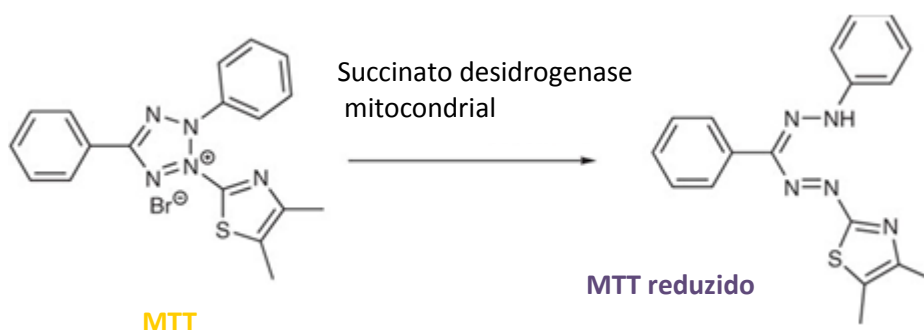


Figura 16- Esquema reacional da redução do MTT, através da enzima succinato desidrogenase (adaptado de: (Ebada et al. 2008))

O ensaio de citotoxicidade foi realizado em células HepG2, utilizando os extratos de cascas e polpa de *Actinidia deliciosa*, *Persea americana* Mill. e de *Annona cherimola* Mill.

Numa primeira abordagem, a linha celular foi colocada a crescer e a desenvolver em frascos de cultura, em meio DMEM, numa estufa, a 37°C contendo 5% de CO₂.

Após a observação da confluência celular adequada, o meio foi descartado e as células lavadas com 2 mL de PBS (1:9 (v/v)). De seguida adicionou-se 1 mL de tripsina para que haja remoção das células das paredes do frasco e incubou-se durante 5 min na estufa.

Findados os 5 min procedeu-se à contagem de células viáveis num hemacitómetro, recorrendo à solução de azul tripiano. Às células retiradas do frasco adicionou-se meio DMEM de forma a obter uma concentração final de 5x10⁴ células/mL.

Assim, as células (100 µL) foram colocadas a crescer e a diferenciarem-se em microplacas de 96 poços com uma concentração de 5x10³ células/poço em meio DMEM, até atingirem a aderência e confluência pretendida (cerca de 48 h), na estufa anteriormente usada.

Seguidamente, o meio foi descartado, e substituído por 100 µL/poço de solução de concentração crescente dos extratos, dissolvidos em DMEM. Ao fim de 24 h de incubação na estufa, as soluções foram substituídas por 100 µL/poço de solução de MTT (1mg/mL de meio de cultura) e voltou a incubar-se, nas mesmas condições, durante 4h.

Retirou-se o MTT e adicionou-se 100 µL/poço de DMSO a cada poço. Após 1h de incubação, leu-se absorvância 595 nm (referência 630 nm) num leitor de microplacas. O ensaio de controlo foi preparado com as células crescidas em DMEM, sem a adição dos extratos em estudo. Os ensaios foram realizados em quadruplicado.

A densidade óptica celular média dos poços foi comparada com a densidade média dos poços de controlo. A concentração que provoca a diminuição de 50% de viabilidade celular (IC₅₀), foi determinado a partir de uma regressão linear, por correlação da percentagem de inibição em função do logaritmo das concentrações testadas.

A percentagem de viabilidade celular é obtida através da seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{Absorvância}_{\text{amostra}} / \text{média de Absorvância}_{\text{controlo}}) \times 100$$

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados e discutidos neste trabalho tiveram como base o estudo do efeito de infusões de folhas de várias plantas utilizadas na medicina tradicional portuguesa para reduzir o colesterol na corrente sanguínea ou facilitar o processo digestivo, na permeação de aminoácidos através da barreira intestinal. Antes de se proceder a este estudo foi necessário desenvolver um método analítico para deteção de aminoácidos, que permitisse uma identificação sem a utilização de compostos muito nocivos para a saúde como a piridina, encontrando-se estes resultados apresentados na secção 5.1. Após a definição do método analítico procedeu-se ao estudo do efeito de infusões de anona, alcachofra, freixo, carqueja, boldo, e kiwi sobre a permeação de aminoácidos em sistemas celulares que simulam a barreira intestinal, formada por linhas celulares Caco-2, cujos resultados se apresentam na secção 5.2. Este estudo foi dividido em extratos aquosos de folhas da planta respetiva, que é o sistema utilizado na preparação das infusões, estando os resultados apresentados em 5.2.1 e em extratos aquosos de cascas dos frutos, anona, abacate e kiwi, numa tentativa de eventual valorização destes resíduos, estando os resultados descritos na secção 5.2.2. Uma vez que, com qualquer um destes dois sistemas se encontraram modificações na permeação de aminoácidos, procedeu-se em seguida à identificação (resultados na secção 5.3.1) e quantificação de compostos fenólicos presentes nestes diferentes extratos (resultados na secção 5.3.2). Neste estudo de identificação preliminar optou-se por iniciar o processo de extração de compostos fenólicos e aminoácidos dos frutos (anona, kiwi e abacate) para que no futuro se pudesse entender a ação dos sumos de fruta neste processo de permeação de aminoácidos. Uma vez que estas preparações aquosas mostraram ter efeito na permeação de aminoácidos estudou-se também a sua atividade antioxidante (resultados na secção 5.4.1) e fizeram-se estudos de toxicidade em linhas celulares, na perspetiva de desenvolvimento de novos alimentos funcionais (resultados na secção 5.4.2).

5.1. Identificação e quantificação de aminoácidos

A análise de aminoácidos é uma importante técnica, com inúmeras aplicações em diversas áreas como a bioquímica, farmacêutica ou em investigação clínica.

A presença de um número substancial de aminoácidos em diferentes concentrações exige o recurso a sistemas cromatográficos, para separação, identificação e quantificação destes. Estes métodos de determinação envolvem, normalmente, uma cromatografia de troca iónica ou HPLC de fase reversa [114].

No presente estudo recorreu-se a HPLC-RP-DAD, contudo os compostos necessitam de sofrer uma etapa prévia de derivatização dado que a estrutura dos aminoácidos, por não conter duplas ligações conjugadas, não torna possível a determinação por UV, a comprimentos de onda relativamente baixos. Assim, sendo que o grupo amino destes compostos pode ser facilmente derivatizado, são formados produtos capazes de absorver nesta gama de comprimentos de onda [114-117].

Os agentes derivatizantes, utilizados em pré- ou pós-coluna podem ser de vários tipos, dependendo do que se apresente mais conveniente tendo em conta as características da amostra a analisar [117-120].

Os aminoácidos também podem ser analisados por métodos, como a espectrometria de massa, que não requerem derivatização e que são baseados nas diferenças de massas moleculares entre cada um.

Neste capítulo apresentam-se os resultados preliminares por espectrometria de massa (5.1.1), os resultados de derivatização para análise por HPLC-DAD (5.1.2), bem como as respetivas conclusões.

5.1.1. MS (injeção direta)- aminoácidos

Para obviar ao processo de derivatização, pode recorrer-se à espectrometria de massa com injeção direta num espectrómetro de massa. Para avaliar esta possibilidade começou por injetar-se os aminoácidos individualmente para estabelecer uma base de dados e verificar a possibilidade de identificar cada um dos aminoácidos numa mistura.

O método de injeção direta consiste na introdução direta da amostra no equipamento, sem que exista um processo prévio de extração e derivatização.

Uma análise por injeção direta no MS e MS/MS foi realizada para cada analito individualmente, a fim de se verificar a sua presença na mistura. Os respectivos espectros encontram-se no Anexo A. A espectroscopia MS/MS permite a aquisição de maiores informações sobre a amostra, pois inclui uma etapa adicional de colisão do fragmento, que permite a detecção de novos fragmentos formados a partir do primeiro.

Na tabela 3 encontram-se resumidos a identificação dos picos maioritários em MS e os respectivos fragmentos em MS/MS.

Tabela 3- Identificação dos picos correspondentes aos aminoácidos

Pico	lão precursor	lão produto MS²	Aminoácido
1	[M-H] 134,04	(134) 116,88	Ácido Aspártico
2	[M-H] 148,10	(148) 130,102	Ácido Glutâmico
3	[M-H] 89,95	(90) 62	Alanina
4	[M-H] 175,17	(175) 157,130,116	Arginina
5	[M-H] 166,10	(166) 120	Fenilalanina
6	[M-H] 75,95	-----	Glicina
7	[M-H] 156,14	(156) 110	Histidina
8	[M-H] 132,01	(132) 86	Leucina
9	[M-H] 147,13	(147) 130	Lisina
10	[M-H] 150,01	(150) 133,104	Metionina
11	[M-H] 116,06	(116) 70	Prolina
12	[M-H] 182,12	(182) 165	Tirosina

A injeção direta de aminoácidos foi realizada com o intuito de se poder comprovar a possibilidade de detectar e quantificar a presença de aminoácidos em amostras, sem que seja necessário uma etapa prévia de derivatização.

Contudo, como as amostras em estudo são misturas de elevada complexidade e como tal, a realização da derivatização seguida de análise por HPLC-RP-DAD foi preferencial.

5.1.2. Derivatização e análise por HPLC-DAD

Como referido anteriormente, a deteção por UV é uma das técnicas mais comuns em HPLC, mas por vezes apresenta baixa sensibilidade para determinados compostos.

A deteção cromatográfica de compostos que não possuem um grupo cromóforo ou fluoróforo podem ser alterados e melhorados através da derivatização, de modo a produzir derivados que absorvam nos comprimentos de onda desejados.

A derivatização também pode melhorar a retenção cromatográfica de compostos polares e a resolução de compostos que eluam a tempos de retenção similares, dado que os seus derivados são usualmente mais hidrofóbicos que os analitos não derivatizados.

No procedimento usado, os aminoácidos reagem com o agente derivatizante, fenilisotiocianato (PITC) dando origem a feniltiocarbamil (PTC-aminoácidos). Estes PTC-aminoácidos são posteriormente separados por HPLC e identificados e quantificados com elevada sensibilidade a 254 nm. A reação de derivatização pode ser visualizada na Figura 17.

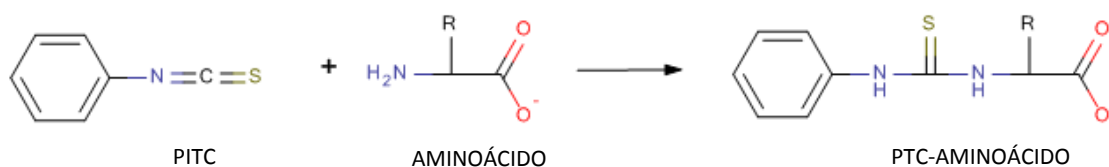


Figura 17- Esquema reacional da interação do PITC com os aminoácidos

Um dos métodos mais comumente usados [97] envolve a utilização de piridina. Neste tipo de reação, a piridina é usada como catalisador da reação, com o objetivo maioritário de aumentar a reatividade do reagente usado. Dado o elevado interesse em eliminar a sua utilização, devido à sua toxicidade e visto que não representa parte fundamental no processo de derivatização, outras soluções podem surgir. Assim, uma das soluções é a utilização de um excesso dos restantes reagentes, podendo-se também fazer uso de acetonitrilo para facilitar a reação.

Nesta etapa foram modificadas as seguintes condições experimentais: i) método de derivatização; ii) volume de amostra.

A otimização de i) foi feita recorrendo a uma mistura padrão em solução, de aminoácidos. Nesta etapa foram seleccionados dois métodos distintos de derivatização, com PITC, um retirado da literatura [121] e o outro adaptado das indicações retiradas do fornecedor do agente derivatizante (Sigma[®]). O método de derivatização retirado do fornecedor do agente derivatizante sugeria na constituição da “*coupling solution*” uma fração de piridina (acetonitrilo:piridina:triethylamina:água- 10:5:2:3), contudo esta foi retirada, pelas razões atrás referidas.

Os métodos foram posteriormente avaliados pelo cromatograma obtido para cada um no HPLC-RP-DAD.

As Figuras 18 e 19, mostram os cromatogramas obtidos, usando o mesmo método de HPLC, fazendo-se variar o método de derivatização usado.

A Figura 18 corresponde ao método de derivatização retirado da literatura (aminoácidos → secar → adição metanol:água:triethylamina (2:2:1) → secar → adição metanol:água:triethylamina:PITC (7:1:1:1) → secar → HPLC) e a Figura 19 corresponde ao método de derivatização adaptado do fornecedor de PITC (aminoácidos → secar → adição acetonitrilo:triethylamina:água (10:2:3) → secar → adição acetonitrilo:triethylamina:água (10:2:3) → adição PITC → secar → HPLC).

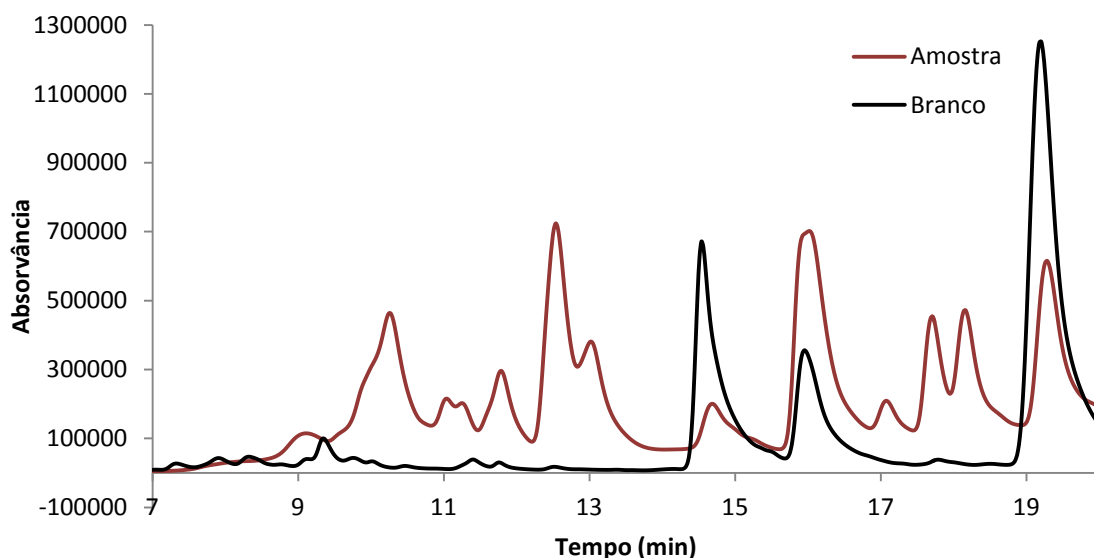


Figura 18- Cromatograma obtido com derivatização adaptada de [121]

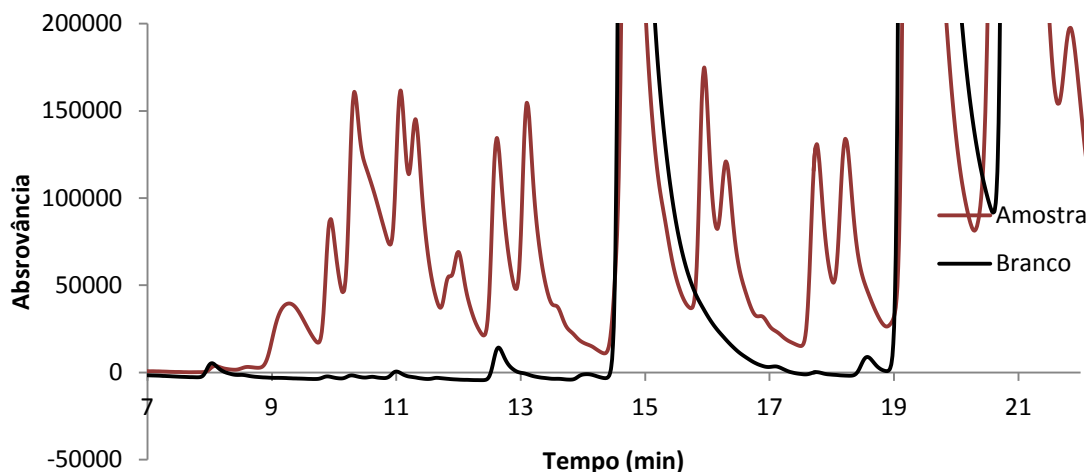


Figura 19- Cromatograma obtido com derivatização do protocolo Sigma®

Pela a análise dos cromatogramas acima mostrados, é possível observar que o método adaptado do fornecedor de PITC leva ao aparecimento de um maior número de picos e consequentemente à deteção de um maior número de aminoácidos da mistura.

Uma das hipóteses apresentada para as diferenças observadas reside, por um lado, no facto do agente derivatizante ser adicionado isoladamente, na derivatização do fornecedor ou em mistura, no caso da derivatização retirada da literatura, o que poderá sugerir que é necessário realizar a diluição do resíduo de aminoácidos que fica após secagem, previamente à adição do PITC. Por outro lado, é colocada a hipótese de o acetonitrilo ser mais eficaz como catalisador da reação e por conseguinte dar origem a um cromatograma com maior resolução e com mais picos detectados, como referido anteriormente.

Por estas razões, este método foi o escolhido para a realização das derivatizações efetuadas no decorrer dos restantes estudos.

A otimização ii) foi realizada fazendo-se variar o volume de amostra usada na derivatização, tendo-se realizado os ensaios iniciais com 10 μL de amostra e com 20 μL de amostra. Após a escolha do método de derivatização e de HPLC-RP-DAD e com o intuito de obter picos de maior área optou-se por usar 20 μL , como é possível comprovar pelas Figuras 20 e 21.

Dado que a reação de derivatização consiste em dois passos, de relativa simplicidade, re-hidratação com “*coupling solution*” e derivatização com PITC, esta etapa não requeriu grandes alterações, tendo-se atingido os objetivos de forma rápida.

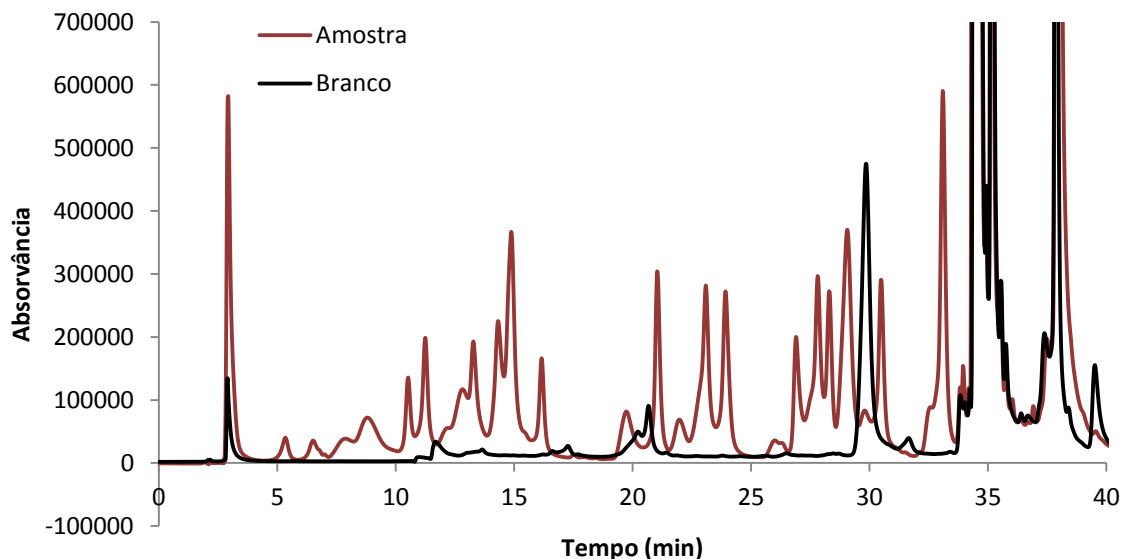


Figura 20- Cromatograma obtido para a derivatização e HPLC finais, com 10 μ L de amostra

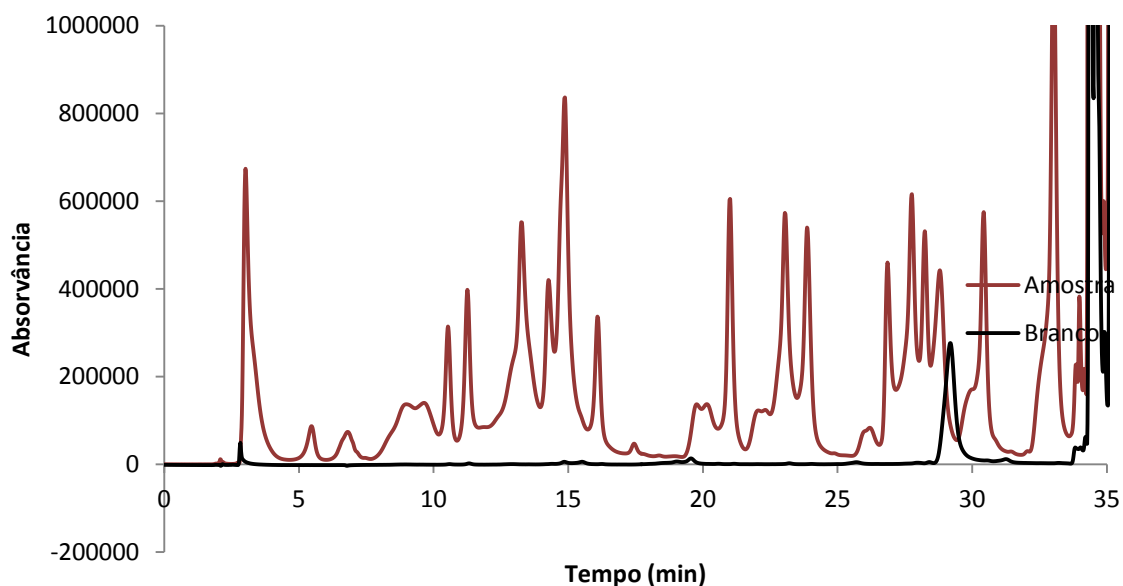


Figura 21- Cromatograma obtido para a derivatização e HPLC finais, com 20 μ L de amostra

Optimizadas as condições de derivatização, foram testados vários processos de análise por HPLC-RP-DAD, tendo-se feito variar a composição dos eluentes e seus respectivos valores de pH, bem como o programa de gradiente, ou seja, as proporções em que cada eluente é usado ao longo da análise e o tempo da mesma. Foi usado um HPLC-RP-DAD em modo gradiente, em que a composição varia ao longo da eluição, visto a amostra utilizada ser uma mistura de vários componentes.

Numa primeira abordagem foi experimentado um método (1), adaptado de [97] com tempo de corrida de 67 minutos, a 30 °C e com eluentes acetonitrilo e TFA, como mostra a Figura 22. Como é possível observar pelo cromatograma, o tempo necessário para a eluição nestas condições é de cerca de 20 min e os picos encontram-se com baixa resolução, assim como é insuficiente a deteção de todos os aminoácidos presentes na amostra.

Desta maneira, foi experimentado um segundo método (2) [122], Figura 23, desta vez de apenas 25 minutos de análise, à mesma temperatura do método (1) e com a substituição do TFA por acetato de sódio a pH 5,7 e adição de água na fração de acetonitrilo.

Estas alterações levaram a uma diminuição dos tempos de retenção dos componentes. Para além disso, foi visível o aumento do número de picos, sendo portanto possível detectar um maior número de componentes.

Estas alterações podem ser explicadas essencialmente por dois pontos. Por um lado, é de salientar que a adição de água ao acetonitrilo apresenta vantagens, pois uma maior percentagem de solventes orgânicos, como é o caso do método (1), originam uma menor resolução, logo as quantidades usadas devem ser controladas e daí a melhoria na resolução verificada no método (2).

Por outro lado, o pH do primeiro para o segundo método foi aumentado, podendo também este facto contribuir para uma maior resolução, sendo este um facto que é corroborado pela literatura [123, 124], pois sabe-se que, teoricamente, um aumento no pH da fase móvel leva a um aumento na resolução dos picos, para determinados compostos, como os aminoácidos.

Tempo	Temperatura	Eluentes
67 min	30 °C	Acetonitrilo (A); TFA(B); Metanol (C); Água (D)
Programa de eluição: 0 minutos: 2,5% A e 97,5% B; 14 minutos: 3,7% A, 94,6% B, 0,5% C e 1,2% D; 24 minutos: 5% A, 91,7% B, 0,9% C e 2,4% D; 30 minutos: 6,3% A, 88,7% B, 1,4% C e 3,6% D; 50 minutos: 17% A, 64,4% B, 5% C e 13,6% D; 62 minutos: 17% A, 64,4% B, 5% C e 13,6% D; 63 minutos: 45% A, 15% C e 40% D ; 66 minutos: 45% A, 15% C e 40% D ; 67 minutos: 2,5% A e 97,5% B		

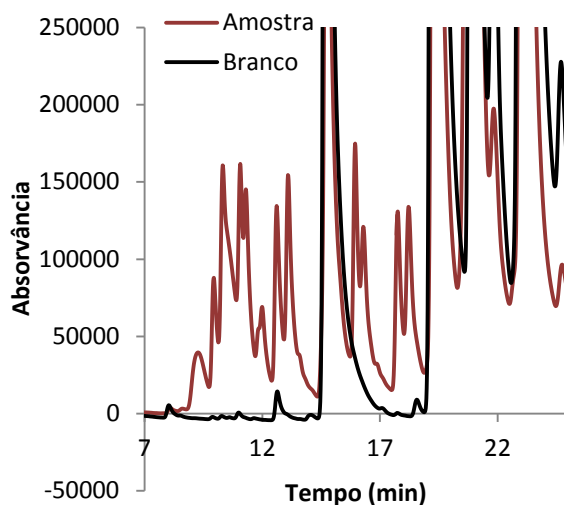


Figura 22- Método 1 testado em HPLC-RP-DAD

Tempo	Temperatura	Eluentes
25 min	30 °C	Acetato de sódio 0,07M a pH 5,7 (A) ; Acetonitrilo: Água (B)
Programa de eluição: 0 minutos: 90% A e 10% B; 5 minutos: 70% A e 30% B; 13 minutos: 52% A e 48% B; 13,5 minutos: 100% B; 16 minutos: 100% B ; 16,9 minutos: 100% B; 17 minutos: 90% A e 10% B; 24,5 minutos: 90% A e 10% B; 25 minutos: 90% A e 10% B		

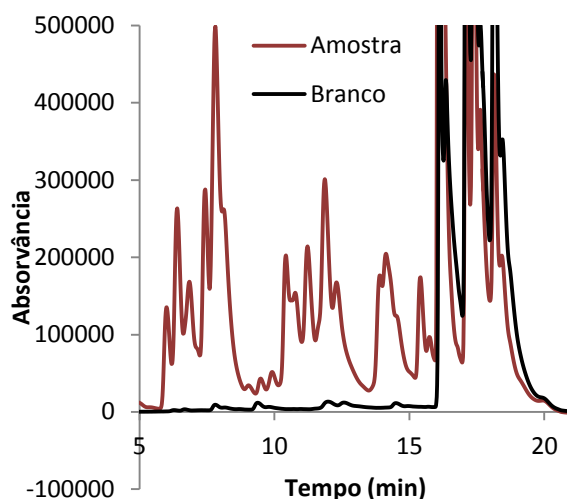


Figura 23- Método 2 testado em HPLC-RP-DAD

De seguida, foi testado um método (3) adaptado de [97] com tempo de análise de 45 minutos, pois tinha sido verificado que um método de análise de 69 minutos eram excessivo, contudo 25 minutos de tempo de análise era insuficiente para a deteção de todos os componentes da amostra.

Foi mantida a concentração de acetato de sódio, com aumento do seu pH e a temperatura do forno do HPLC-RP-DAD também foi aumentada.

Estas alterações nos parâmetros levaram ao aparecimento de um maior número de picos, como mostra a Figura 24, comparativamente com os métodos anteriormente experimentados, a uma melhoria significativa da resolução da maioria dos picos e por fim a uma diminuição na retenção dos componentes.

Neste caso, o aumento do pH para um valor de 6,5, possibilitou novamente um aumento na resolução dos picos, comparativamente com o método anterior (2) em que foi aplicado um pH 5,7. Para além disso, é sabido que também um aumento significativo da temperatura leva a uma melhor separação entre solutos [125], que a temperaturas mais baixas não seria possível. Não obstante, este aumento de temperatura origina uma diminuição na retenção dos analitos.

Em [125] é descrito que um aumento da temperatura leva também à possibilidade de diminuir a utilização de solventes orgânicos, como o acetonitrilo. Este, é um factor de elevada importância, devido ao actual interesse em diminuir a utilização destes mesmos eluentes, com base numa química mais verde ("*green chemistry*").

Numa última abordagem, Figura 25, foi testado um método (4) [97] semelhante ao anterior, alterando apenas a concentração do acetato de sódio usado na eluição. Esta alteração levou a uma ligeira diminuição nos tempos de retenção.

Como é possível observar existe uma diferença bastante significativa na detecção dos picos dos aminoácidos, comparativamente com o método inicialmente experimentado (1), sendo que um maior número de aminoácidos consegue ser detectado, associado a um aumento de resolução na eluição dos picos, tornando-os mais acessíveis de quantificar. Por estas razões, o último método testado foi aplicado nas amostras posteriormente obtidas na realização dos ensaios de permeabilidade da barreira intestinal.

Tempo	Temperatura	Eluentes
45 min	52 °C	Acetato de sódio 0,07M a pH 6,5 (A) ; Acetonitrilo (B)
Programa de eluição: 0 minutos: 100% A; 30 minutos: 75% A e 25% B; 31 minutos: 30% A e 70% B; 36 minutos: 30% A e 70% B; 40 minutos: 100% A; 45 minutos: 100% A		

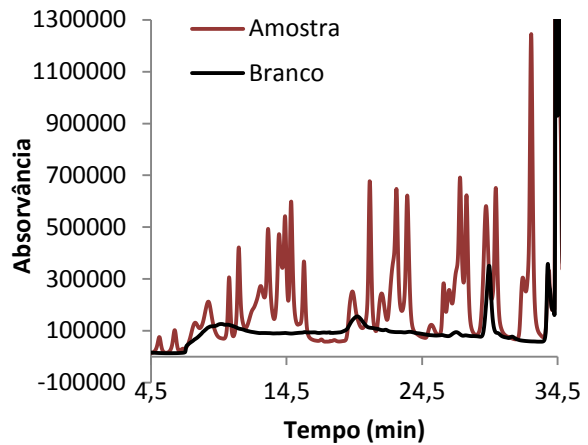


Figura 24- Método 3 testado em HPLC-RP-DAD

Tempo	Temperatura	Eluentes
45 min	52 °C	Acetato de sódio 0,14M a pH 6,5 (A); Acetonitrilo (B)
Programa de eluição: 0 minutos: 100% A; 30 minutos: 75% A e 25% B; 31 minutos: 30% A e 70% B; 36 minutos: 30% A e 70% B; 40 minutos: 100% A; 45 minutos: 100% A		

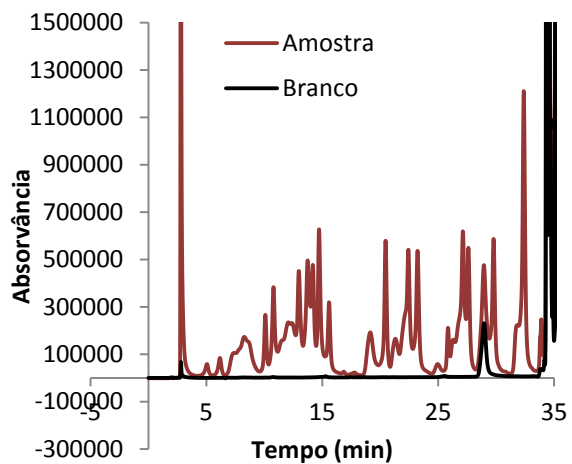


Figura 25- Método 4 testado em HPLC-RP-DAD

Em modo de resumo, os parâmetros otimizados encontram-se explicitados na Tabela 4.

Tabela 4- Parâmetros otimizados no processo de detecção e quantificação de aminoácidos

Ensaio	Derivatização		Quantidade amostra		Método HPLC			
	Artigo [121]	Fornecedor PITC (Sigma®)	10 µL	20 µL	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4
1	X		X		X			
2	X			X	X			
3		X	X		X			
4		X		X	X			
5		X	X			X		
6	X			X		X		
7		X	X				X	
8		X		X			X	
9		X	X					X
10		X		X				X
11		X		X				X

Findado o processo de otimização, o método modificado foi aplicado a uma mistura de aminoácidos preparada no laboratório (Fig 26a) e a amostras padrão em mistura comercial (Fig 26b). Foi assim possível a realização de uma correspondência entre ambos os cromatogramas, bem como fazendo uso de comparações com outros estudos efetuados [122] com fim à identificação de cada pico do cromatograma da mistura, Figura 26.

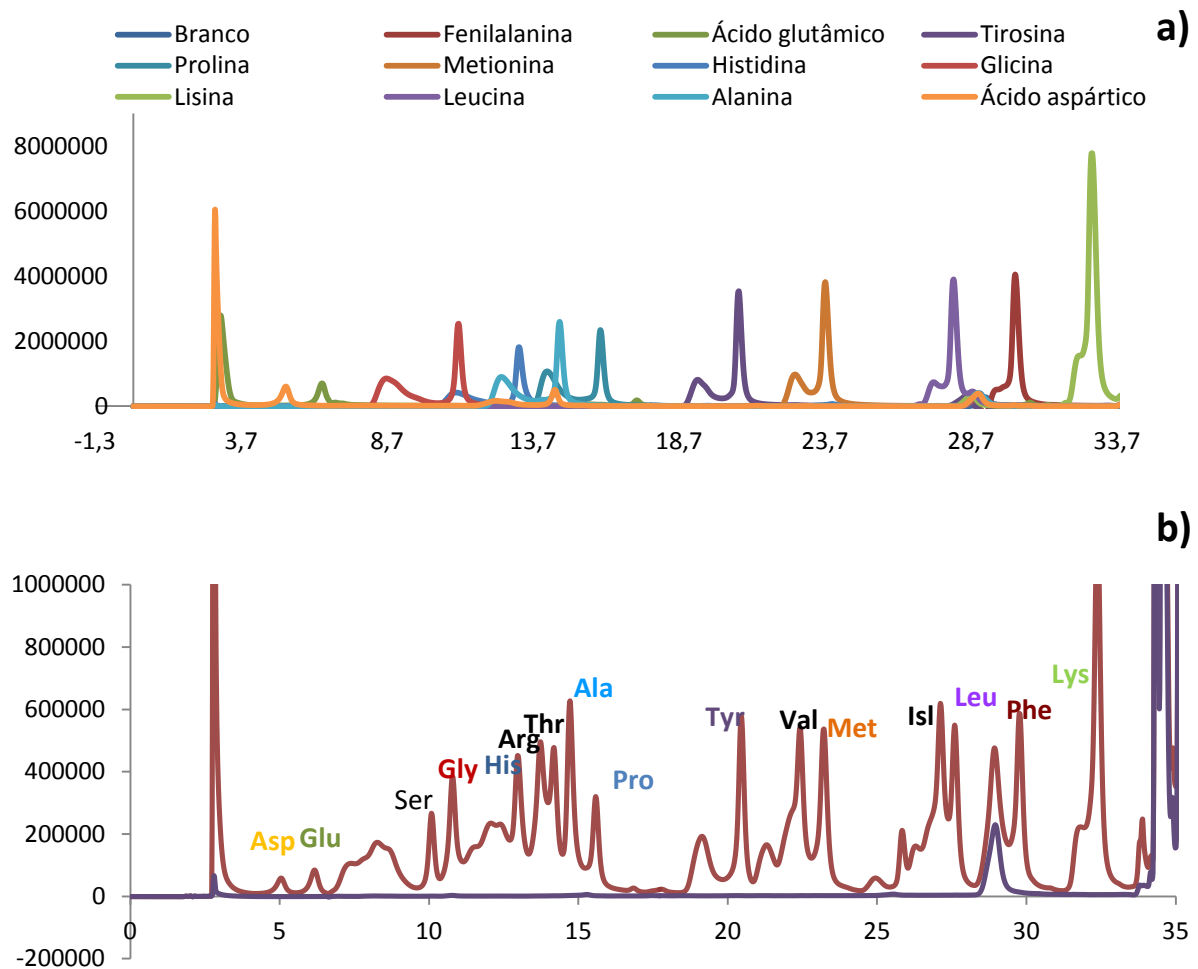


Figura 26- Perfis cromatográficos de misturas: preparada no laboratório (a); (b) padrões de aminoácidos comercial

Os aminoácidos apresentam características muito específicas e como tal, os tempos de retenção a que cada amostra é eluída são dependentes dessas mesmas características.

Os cromatogramas para a mistura padrão e para os aminoácidos individuais foram realizados recorrendo a HPLC-RP-DAD, com amostras previamente derivatizadas.

Com recurso aos tempos de retenção (T_R) dos aminoácidos individuais usados, foi possível realizar a correspondência entre os picos obtidos no cromatograma final e os aminoácidos correspondentes.

5.2. Permeação de aminoácidos pela barreira intestinal

5.2.1. Infusões de folhas de alcachofra, carqueja, freixo, boldo e anona

Escolhidos os métodos de derivatização e de HPLC, estes foram aplicados no estudo da influência de infusões na permeação de aminoácidos do meio de cultura, em linhas celulares Caco-2 que simulam a barreira intestinal [99, 126]. As infusões seleccionadas foram as obtidas a partir de folhas de anona, freixo, carqueja, alcachofra e boldo, previamente utilizadas no laboratório para estudo da redução do colesterol total na corrente sanguínea [127]. As amostras foram compostas por meio celular colocadas em contacto com células Caco-2 e expostas a várias infusões, por um período de 24h, sendo que também foram obtidas amostras, em que o meio de cultura foi colocado em contacto com células Caco-2, mas sem serem expostas à ação das infusões, funcionando, este último, como controlo.

As amostras foram recolhidas do compartimento apical das Transwell e os aminoácidos derivatizados e analisados por HPLC-RP-DAD, como já referido.

A Figura 27 apresenta a composição percentual dos vários aminoácidos, presentes no meio de cultura, após 24h de exposição às infusões usadas, ou seja, quanto maior a percentagem, mais o aminoácido se encontra presente no meio de cultura, indicando que menos quantidade foi absorvida pelas células.

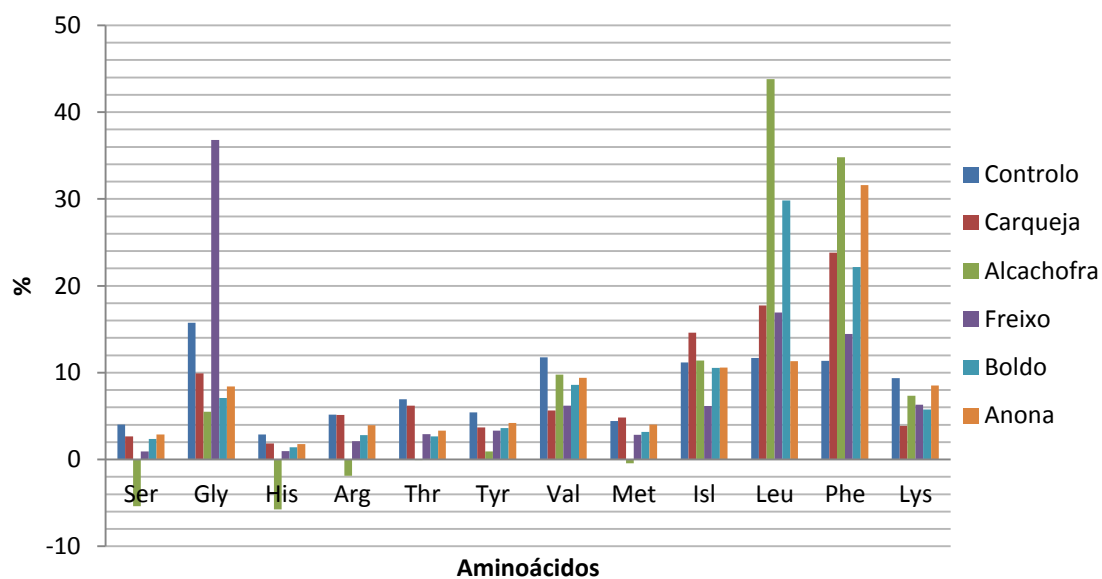


Figura 27- Percentagem de aminoácidos presentes no meio de cultura, após 24h de exposição às infusões

Pela análise e interpretação dos resultados obtidos é possível observar que a percentagem de absorção de cada aminoácido nas monocamadas de Caco-2 varia consoante a infusão em que foi colocada em contacto, sendo perceptível o efeito das infusões na permeação de vários aminoácidos.

Assim, pode ser observado que em comparação com a concentração de aminoácidos presentes no meio do controlo (meio celular sem infusão) as alterações mais significativas de absorção se verificam com a presença da infusão de alcachofra, sendo que na presença desta infusão determinados aminoácidos são mais absorvidos pelas células, enquanto que outros se encontram mais presentes no meio celular, não sendo tão absorvidos. Para esta infusão, os aminoácidos Ser, His, Arg, Thr e Met foram totalmente absorvidas pelas células ou a sua quantidade no meio é tao reduzida, que ficaram abaixo do limite de deteção do HPLC. Os aminoácidos Gly, Tyr, Val, Lys apresentam uma percentagem, no meio, menor que para o controlo, indicando que esta infusão facilita a absorção dos aminoácidos por parte das células. Os restantes aminoácidos, Isl, Leu e Phe, apresentam uma quantidade percentual no meio, superior à quantificada para o controlo, indicando que possivelmente esta infusão poderá inibir a sua absorção por parte das células.

Para a infusão de carqueja, os aminoácidos ser, Gly,His,Thr,Tyr, Val e Lys apresentam quantidades no meio inferiores às do controlo, enquanto que a Arg apresenta igual percentagem e os aminoácidos Met, Isl, Leu e Phe estão em quantidade superior à do controlo.

Na presença da infusão de freixo, os aminoácidos Ser, His, Arg, Thr, Tyr, Val, Met, Isl e Lys estão em quantidades inferiores no meio, comparativamente com o controlo e os aminoácidos Gly, Leu e Phe foram menos absorvidos que os equivalentes presentes no controlo, visto a sua presença no meio ser superior que à no controlo.

Os resultados obtidos na presença da infusão de boldo foram semelhantes aos obtidos para a infusão de freixo, sendo que os aminoácidos Ser, Gly, His, Arg, Thr, Tyr, Val, Met, Isl e Lys encontram-se em menores percentagens no meio, que os mesmos aminoácidos na amostra de controlo e os aminoácidos Leu e Phe estão em maior percentagem que os mesmos, nas amostras de controlo.

Por fim, na presença da infusão de anona, os resultados foram mais uma vez semelhantes aos obtidos para as infusões de freixo e boldo, onde os aminoácidos Ser, Gly, His, Arg, Thr, Tyr, Val, Met, Isl, Leu e Lys apresentam quantidades percentuais no meio inferiores aos mesmos aminoácidos no controlo e a Phe foi o único aminoácido, para esta infusão que apresentou quantidade percentual no meio, superior à apresentada para o mesmo aminoácido no controlo.

São apresentadas na Tabela 5, como forma de resumo, as quantidades percentuais relativas de cada aminoácido, presentes no meio celular, após um período de exposição às infusões de 24h, onde a sigla "ld" significa que as quantidades de aminoácidos presentes no meio ficaram abaixo do limite de deteção do HPLC-RP-DAD.

Tabela 5- Composição percentual dos aminoácidos no meio, após 24 horas de exposição às diferentes infusões

Composição percentual dos aminoácidos, após 24 horas de exposição às diferentes infusões

	Controlo	Carqueja	Alcachofra	Freixo	Boldo	Anona
Ser	4,03	2,65	ld	0,91	2,36	2,89
Gly	15,8	9,93	5,48	36,8	7,09	8,41
His	2,87	1,86	ld	0,98	1,41	1,76
Arg	5,16	5,13	ld	2,10	2,82	3,96
Thr	6,95	6,22	ld	2,94	2,65	3,31
Tyr	5,44	3,69	0,91	3,32	3,64	4,20
Val	11,8	5,66	9,78	6,22	8,59	9,40
Met	4,42	4,83	ld	2,83	3,16	4,02
Isl	11,2	14,6	11,4	6,18	10,5	10,6
Leu	11,7	17,7	43,8	16,9	29,8	11,3
Phe	11,4	23,8	34,8	14,5	22,1	31,6
Lys	9,38	3,87	7,34	6,32	5,76	8,52

Como as infusões que melhores resultados tinham dado na redução do colesterol para os utentes que se disponibilizaram para o estudo [127] foram as de boldo, carqueja e alcachofra, o estudo com estas infusões foi repetido, tendo-se reportado agora os valores de quantidade relativa de aminoácidos no início de cada ensaio, t_0 , de modo a ser possível quantificar a permeação de cada aminoácido.

Nas Figuras 28-30, apresenta-se a composição percentual dos vários aminoácidos, presentes no meio de cultura no início do ensaio, t_0 , e ao fim de 24h, t_{24} , representando as variações nas absorvências para os diferentes aminoácidos, quando colocados em contacto com as diversas infusões, tal como no ensaio anterior.

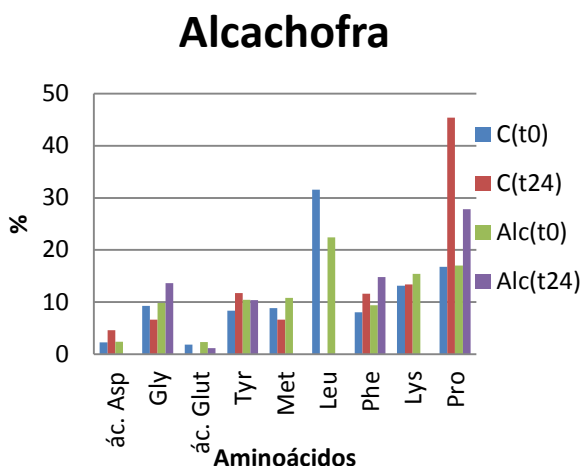


Figura 29- Percentagem de aminoácidos presentes no meio de cultura, para t_0 e t_{24} , na presença da infusão de folhas de alcachofra

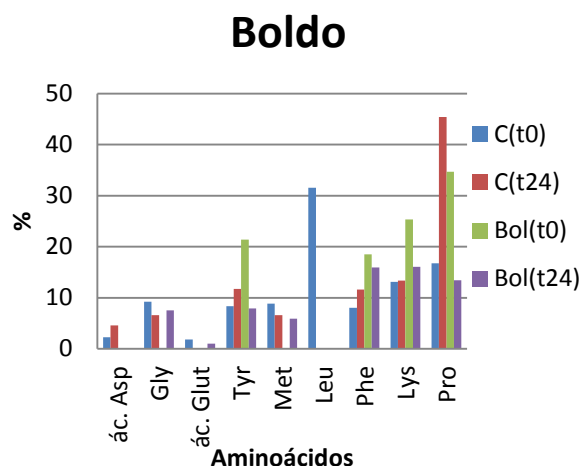


Figura 28- Percentagem de aminoácidos presentes no meio de cultura, para t_0 e t_{24} , na presença da infusão de folhas de boldo

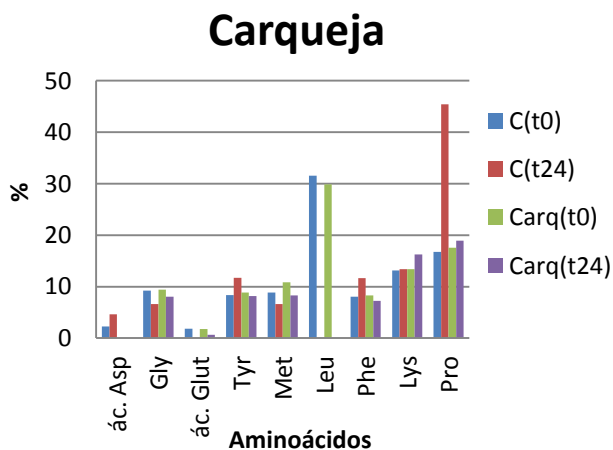


Figura 30- Percentagem de aminoácidos presentes no meio de cultura, para t_0 e t_{24} , na presença da infusão de folhas de carqueja

Através da quantificação da quantidade percentual de cada aminoácido no meio, no início e no fim do ensaio, foi também possível a determinação da quantidade percentual de cada um absorvida pelas células. Esta determinação encontra-se na Tabela 6, onde o símbolo “+” significa que na presença dessa infusão foi detectada uma maior percentagem de aminoácido no meio, comparativamente com a percentagem quantificada no início do ensaio, t_0 , significando que em vez do aminoácido ter sido absorvido pelas células, uma maior quantidade surgiu no meio e a sigla “ld” significa que as quantidades de aminoácidos presentes no meio foram tão diminutas que ficaram abaixo do limite de deteção do HPLC-RP-DAD.

Tabela 6- Quantidade relativa de aminoácidos absorvidos pelas células, para t_{24} , em percentagem, para as infusões de folhas de alcachofra, carqueja e boldo

	Controlo	Carqueja	Boldo	Alcachofra
Ác. Aspártico	+2,34	ld	ld	2,39
Gly	2,63	1,40	+7,53	+3,84
Ác. Glutâmico	1,83	1,13	+1,02	1,19
Tyr	+3,38	0,69	13,5	0,07
Met	2,21	2,56	+5,89	10,8
Leu	31,6	29,9	ld	22,4
Phe	+3,57	+2,53	+0,98	+8,95
Lys	+0,27	+3,09	9,32	15,4
Pro	+28,7	+30,1	+7,37	+39,5

Comparativamente com as amostras de controlo, tem-se que, ao fim de 24 horas, os aminoácidos Gly, Phe e Lys foram menos absorvidos, na presença da infusão de boldo. Os aminoácidos Gly e Phe foram menos absorvidos que no controlo, na presença da infusão de alcachofra e por fim, os aminoácidos Gly, Met e Lys foram menos absorvidos, na presença da infusão de carqueja.

Por outro lado, houve aminoácidos que foram mais absorvidos aquando na presença das infusões, como por exemplo, o ácido aspártico e ácido glutâmico, Tyr, Met e Pro, para a infusão de boldo. No caso da infusão de alcachofra o mesmo foi verificado no ácido aspártico, Tyr, Met, Lys e Pro e por último, para a infusão de carqueja, tal foi verificado nos aminoácidos ácido aspártico, Tyr, Phe e Pro.

É de especial interesse o facto de em alguns casos a presença de um determinado aminoácido no meio ser superior à quantidade percentual verificada no t_0 , ou seja, no momento inicial do ensaio, aquando a colocação das infusões. Por exemplo, tanto na presença de infusão de alcachofra, como de carqueja, foi verificado uma quantidade do aminoácido Pro superior à inicial. Tal acontecimento também foi verificado para os aminoácidos Phe e Lys, na presença da infusão de alcachofra para o primeiro aminoácido e na presença da infusão de carqueja para o segundo. Na presença da infusão de boldo, os aminoácidos ácido aspártico e o glutâmico, a Gly, a Met e a Leu, também apresentaram o mesmo comportamento acima descrito.

Os restantes aminoácidos apresentaram uma variação de percentagem considerada expectável, em que a quantidade percentual presente no meio é inferior ao fim de 24 horas, indicando que parte terá sido absorvida pelas células.

5.2.2. Infusões de cascas

Uma vez que foram verificadas alterações com as folhas de algumas plantas como a anona [128] e foi verificado que também o kiwi e o abacate tinham atividade biológica como antioxidantes e inibidoras de enzimas [23, 33], foram testadas as cascas destes frutos numa tentativa de valorizar produtos da indústria de sumos de fruta. Assim, foi estudada a ação das infusões das cascas na permeação dos aminoácidos do meio de cultura, tal como anteriormente.

O objetivo último seria verificar se as cascas de frutos como a anona, o kiwi e o abacate poderiam ter alguma influência positiva na absorção de aminoácidos, ou seja, que se pudesse verificar o aumentando da sua absorção, especialmente em aminoácidos essenciais.

Os resultados obtidos para o extrato de abacate não foram reprodutíveis e como tal não serão apresentados.

Os resultados encontram-se nas Figuras 31 e 32 e apresentam a composição percentual dos vários aminoácidos, presentes no meio de cultura, às 0h e após 24h de exposição às infusões usadas, ou seja, quanto maior a percentagem, mais o aminoácido se encontra

presente no meio de cultura, indicando que menos quantidade foi absorvida pelas células.

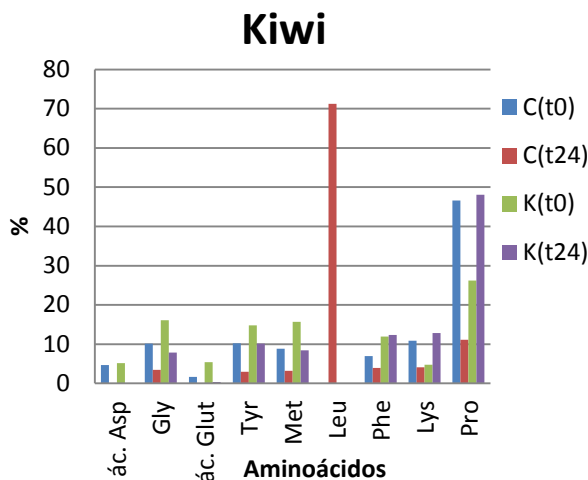


Figura 32- Percentagem de aminoácidos presentes no meio de cultura, para t₀ e t₂₄, na presença da infusão de cascas de kiwi

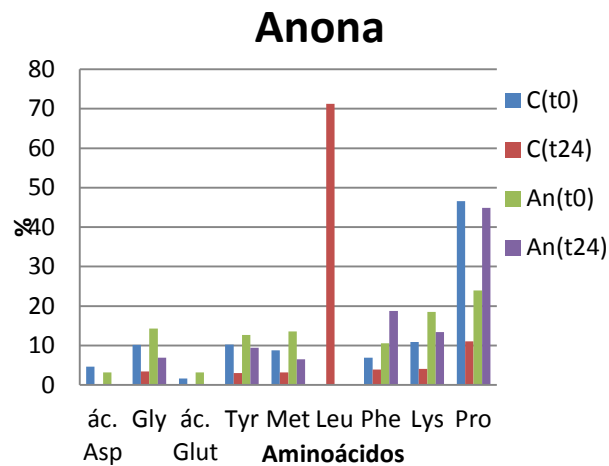


Figura 31- Percentagem de aminoácidos presentes no meio de cultura, para t₀ e t₂₄, na presença da infusão de cascas de anona

Através da quantificação da quantidade percentual de cada aminoácido no meio, no início e no fim do ensaio, foi também possível a determinação da quantidade percentual de cada um absorvida pelas células. Esta determinação encontra-se na Tabela 7, onde o símbolo “+” significa que na presença dessa infusão foi detectada uma maior percentagem de aminoácido no meio, comparativamente com a percentagem quantificada no início do ensaio, t₀, significando que em vez do aminoácido ter sido absorvido pelas células, uma maior quantidade surgiu no meio e a sigla “ld” significa que as quantidades de aminoácidos presentes no meio foram tão diminutas que ficaram abaixo do limite de detecção do HPLC-RP-DAD.

Tabela 7- Quantidade relativa de aminoácidos absorvidos pelas células, para t_{24} , em percentagem, para as infusões de cascas de kiwi e anona

	Controlo	Kiwi	Anona
Ác. Aspártico	4,69	5,14	3,17
Gly	6,72	8,24	7,35
Ác. Glutâmico	1,67	5,10	3,23
Tyr	7,22	4,71	3,27
Met	5,65	7,18	7,03
Leu	+71,2	Id	Id
Phe	3,01	+0,41	+8,21
Lys	6,78	+8,10	5,13
Pro	35,5	+21,9	+20,9

Quanto aos resultados obtidos para as cascas, e comparativamente com as amostras de controlo, tem-se que, ao fim de 24 horas, os aminoácidos Gly, Tyr, Met, Phe, Lys e Pro foram menos absorvidos, na presença da infusão de anona e os aminoácidos Gly, Tyr, Met, Phe, Lys e Pro foram menos absorvidos, na presença da infusão de kiwi.

É também visível que na presença da infusão de anona, o ácido glutâmico e o ácido aspártico foram completamente absorvidos pelas células ou a sua quantidade final no meio foi muito pequena, não conseguindo ser detetada pelo aparelho.

O mesmo acontece no caso da infusão de kiwi, em que também o ácido aspártico não é detetado no meio e o ácido glutâmico apresenta uma quantidade muito reduzida, podendo indicar que foram totalmente absorvidos.

Observou-se ainda que existem novamente valores superiores de absorvência para t_{24} , quando comparados com o t_0 , tais como a Phe, Lys e Pro na presença de infusão de kiwi e Phe e Pro na presença de infusão de anona. Os restantes aminoácidos apresentaram uma variação de absorvência considerada expectável, em que a quantidade percentual presente no meio é inferior ao fim de 24 horas, indicando que parte terá sido absorvida pelas células.

5.2.3. Discussão e Conclusão

Em ambos os ensaios é de destacar o facto de a absorção dos aminoácidos ser bastante diferente quando alterada a constituição do meio onde estão inseridos, bem como as visíveis alterações quando deixados em contacto com as mesmas por um período de 24h. Como acima observado, na presença de todas as infusões testadas, alguns aminoácidos, apresentam uma quantidade percentual ao fim das 24h superior à apresentada no início do ensaio. Este acontecimento pode ser explicado pela possibilidade de ocorrer hidrólise de determinadas proteínas do próprio meio, estimulada pela presença das infusões, que na ausência destas não acontece e que por conseguinte leva à quantificação de uma maior quantidade de aminoácidos para t_{24} .

Também no controlo foi verificado o aumento da quantidade de alguns aminoácidos no meio, em vez de terem sido absorvidos pelas células, o que irá requer estudos futuros para compreender a sua causa.

Os resultados obtidos são de extrema importância se se tiver em conta o facto de aminoácidos como a His, Isl, Leu, Lys, Met e Phe serem aminoácidos essenciais e como tal necessitem de ser consumidos na dieta.

É possível observar pelas quantidades percentuais de absorção celular, que o aminoácido Phe foi menos absorvido pelas células, comparativamente com os valores de controlo, quando na presença de todas as infusões testadas. Contrariamente, a absorção do aminoácido Met, tanto com a infusão de a casca de anona, como de kiwi é facilitada.

O aminoácido Phe na presença de ambas as infusões de cascas, surge em maiores quantidades que no início do ensaio, bem como o mesmo acontece para a Lys, na presença da infusão de casca de kiwi, podendo significar que estimularam a hidrólise de proteínas que continham estes aminoácidos, como explicado anteriormente.

A ser verificada a sua alteração na absorção por parte das células do organismo, tal facto pode originar graves problemas para a saúde devido ao desequilíbrio originado.

Estes resultados podem também ser explicados, pelas características de cada substância, que determinam a maneira como serão absorvidas, como por exemplo, o tamanho, carga, solubilidade, estrutura da substância, bem como se é uma substância hidrofílica ou lipofílica [129].

A absorção é uma função específica da membrana plasmática das células epiteliais do intestino, através da qual as moléculas conseguem penetrar a membrana lipídica destas células, por vários mecanismos, difusão simples passiva, difusão facilitada, transporte ativo e pinocitose. No caso dos aminoácidos, o mecanismo transportador ocorre por transporte ativo [51].

A viabilidade do uso das células Caco-2 como objetivo de mimetizar este ambiente membranar é corroborada em diversos estudos, que demonstram a sua capacidade de apresentar ambos os sistemas de transporte necessários para os aminoácidos, quer sejam dependentes ou independentes de Na^+ [98, 99, 126].

Embora sendo um método muito usado, a utilização das Caco-2 apresenta algumas limitações para avaliar a absorção, entre elas pode citar-se o número de transportadores, que pode ser insuficiente para realizar o transporte de todos os aminoácidos presentes no meio e, apesar de em humanos a absorção ser superior a 50%, nas células Caco-2 a permeabilidade de compostos mais hidrofílicos é baixa.

Para além destas desvantagens, outros factores podem ser tidos em conta quando observamos os resultados obtidos. O facto de existirem vários aminoácidos estruturalmente análogos, fazendo com que apresentem uma ação competitiva durante a absorção por parte do intestino, como são exemplo a L-valina, L-leucina e L-isoleucina, bem como a L-metionina diminui a absorção de L-valina, mas não é recíproco [130].

Aminoácidos neutros também estimulam cineticamente os aminoácidos ácidos, por mecanismos desconhecidos. Recentemente foi sugerido que os aminoácidos neutros podem estimular o sistema transportador X_{AG}^- , característico de aminoácidos ácidos, contudo o seu mecanismo continua desconhecido [131].

Por último, o transporte paracelular (passagem de moléculas proteicas através dos espaços entre os enterócitos) pode aumentar quando os transportadores membranares dependentes de Na^+ , provocam alterações na permeabilidade das junções (impermeáveis, que normalmente impedem esta passagem). Os aminoácidos ao interagirem com o meio extra ou intracelular dos transportadores ligados à membrana, podem alterar a cinética da atividade do transportador. As taxas de absorção podem diminuir ou aumentar, dependendo do sistema transportador em específico.

5.3. Determinação de compostos fenólicos

Os fitoquímicos têm sido associados à redução do risco de aparecimento de doenças crónicas de alto risco. Mais recentemente têm sido comprovados os efeitos benéficos dos fitoquímicos presentes nas frutas e vegetais, devido à sua influência na redução do stress oxidativo, induzido pelos radicais livres presentes no organismo.

As células e outros organismos constituintes do corpo humano são constantemente expostos a uma diversidade de agentes oxidantes. Como método de prevenção, é necessário o consumo de quantidades suficientes de alimentos ricos neste tipo de compostos, como é o caso dos compostos fenólicos, como os flavonóides e taninos.

Nesta secção procedeu-se à identificação quantitativa e qualitativa dos constituintes bioativos maioritários dos extratos aquosos das folhas, cascas de anona, kiwi e pera abacate, bem como da polpa do próprio fruto. Para uma identificação mais precisa dos compostos maioritários, permitindo a análise simultânea de vários compostos, recorreu-se ao HPLC-RP-DAD e ao LC-MS. Esta identificação preliminar é baseada no tempo de retenção dos compostos e no seu espectro de absorção UV-visível, comparativamente a padrões cromatografados sob as mesmas condições. Inicialmente fez-se uma determinação de valores globais de fenóis totais e taninos foi realizada nas folhas das plantas, na casca dos frutos e na polpa dos frutos no caso da anona, kiwi e abacate.

5.3.1. Identificação HPLC-DAD e LC-MS em infusões de cascas e frutos de *Persea americana* Mill., *Actinea deliciosa* e *Anona cherimola*

Os extratos de folhas de anona e kiwi já tinham sido efetuados em estudos anteriores [128, 132] tendo-se verificado em todos eles a presença de vários flavonóides e derivados de ácidos fenólicos. Procedeu-se neste trabalho a uma identificação prévia de compostos fenólicos existentes nos extratos de de folhas e cascas de *Persea americana* Mill, *Actinidea deliciosa* e *Annona cherimola*, e das respetivas polpas, tendo sido realizados com recurso a LC-MS e HPLC-RP-DAD, nos casos em que o primeiro não demonstrou resultados satisfatórios.

Para facilitar a identificação dos compostos foram obtidos os espectros de UV-Vis das amostras, que se encontram de seguida ilustrados.

Todas as identificações foram realizadas com base na comparação dos espectros com os resultantes de compostos padrões.

O espectro de UV-Vis dos compostos padrão de ácido cafeico e rutina e a respetiva estrutura são apresentadas nas Figuras 33 e 34, dado que foi o tipo de composto mais frequentemente encontrado nos extratos dos três frutos.

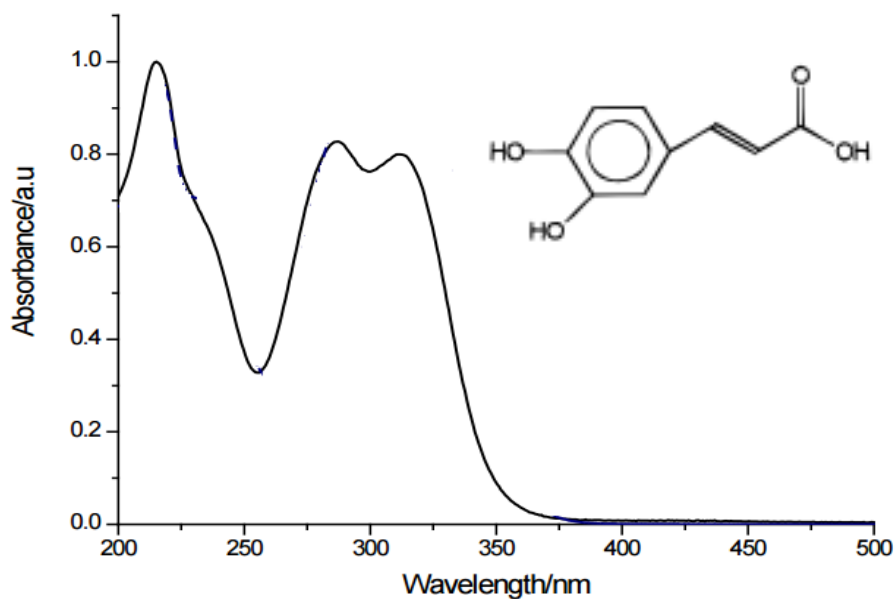


Figura 33- Espectro de UV-Vis e estrutura do ácido cafeico

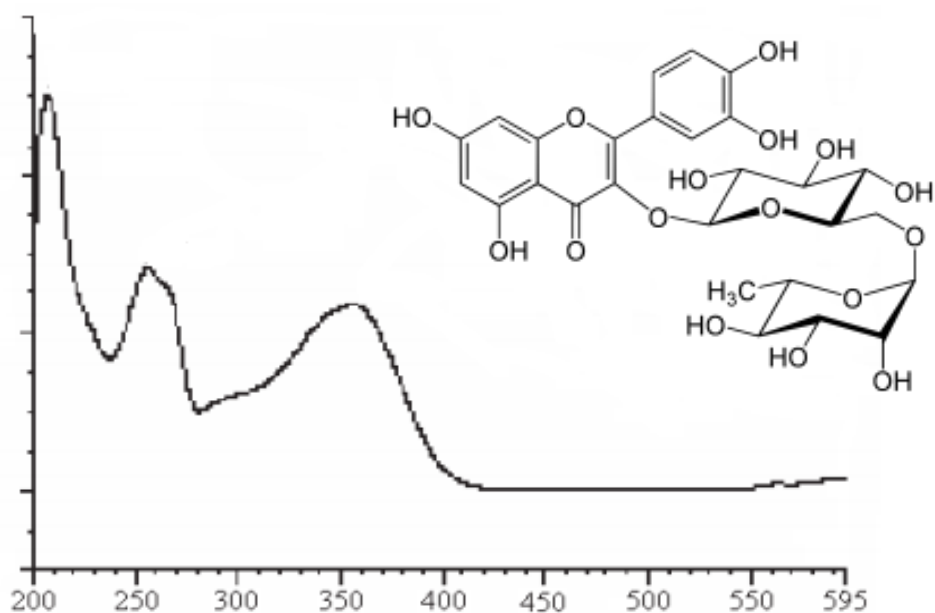


Figura 34- Espectro de UV-Vis e estrutura da rutina

5.3.1.1. *Persea americana* Mill.

Fez-se o estudo da análise qualitativa preliminar na infusão de **casca** de *Persea americana* Mill. Como se pode verificar no cromatograma da Figura 35, obtido para o extrato das cascas, há existência de um pico a Tr 10,95 minutos. Assim, para este pico foi observado o respectivo espectro UV-Vis e os valores de ponto molecular do espectro de massa obtido por LC-MS, Figura 36 e Tabela 8, respectivamente.

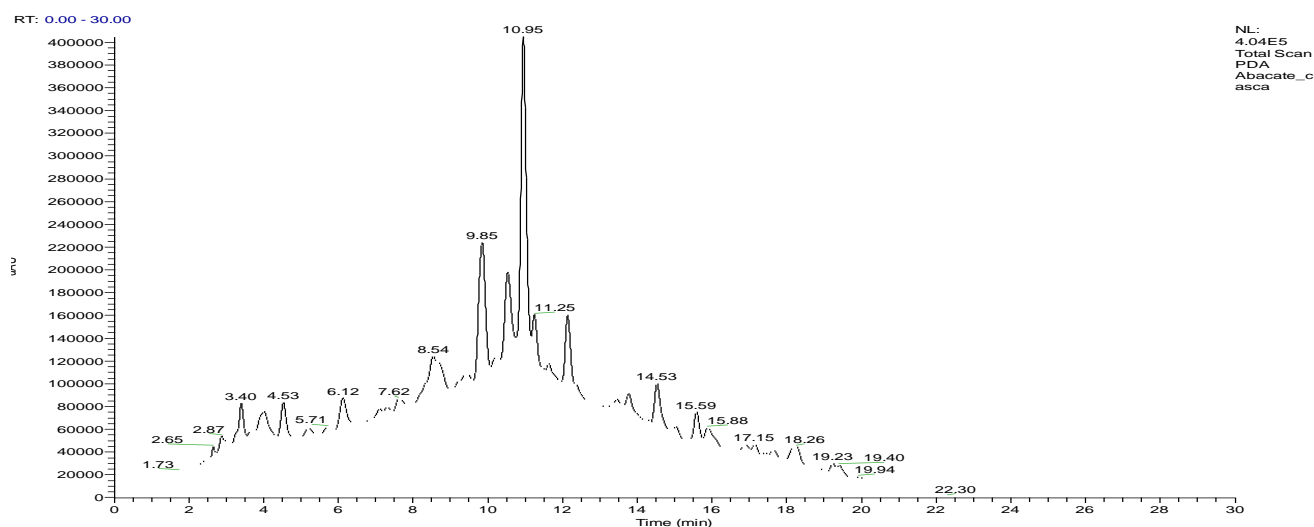


Figura 35- Perfil cromatográfico, obtido por LC, da infusão de cascas de *Persea americana* Mill.

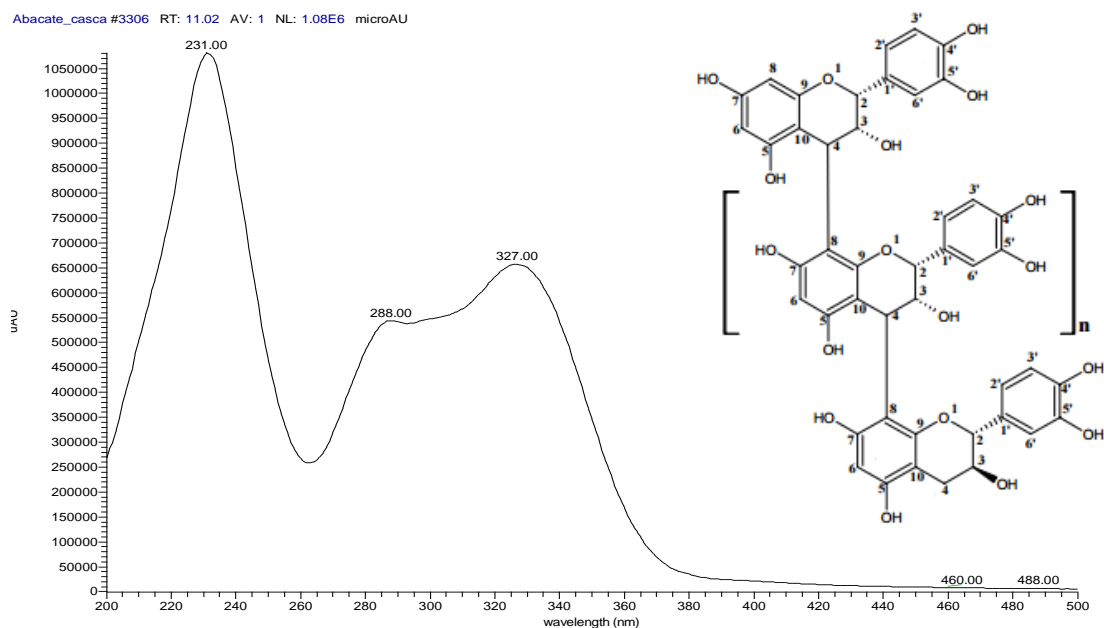


Figura 36- Espectro de UV-Vis do extrato para $T_R=10,95$ min

Tabela 8- Identificação dos compostos do extrato de cascas de *Persea americana* Mill. por espectrometria de massa

lão precursor (m/z)	Composto
1152,94	Procianidina
865,01	Procianidina
577,04	Procianidina
289,03	Procianidina

Por comparação com a base de dados de compostos fenólicos, como os flavonóides e os taninos, é possível concluir que o pico corresponde a uma molécula de procianidina, ou seja, um tanino condensado composto por quatro unidades de epicatequina.

Os restantes picos, por comparação com os espectros de UV-Vis e com o T_R dos padrões, foram classificados como não sendo derivados de ácido cafeico e aguardam futura identificação.

No cromatograma obtido para o extrato da **polpa**, representado na Figura 37, é demonstrada a existência de uma mistura complexa, com uma elevada diluição. Contudo, é possível averiguar que na sua maioria, a amostra é constituída por polímeros de fibras, tendo sido já verificado em trabalhos anteriores.

Com vista à obtenção de picos mais distintos e à deteção dos compostos bioativos, seria necessário realizar uma diálise, onde os compostos de maior tamanho como as fibras seriam separados, dando lugar aos flavonóides e outros compostos mais pequenos.

Ainda assim, foi possível a identificação de dois picos a T_R 13,23 e 13,50 minutos, que por observação do respetivo espectro de UV-Vis e comparação com espectros de padrões, concluí-se serem der compostos derivados de ácido cafeico, Figura 38.

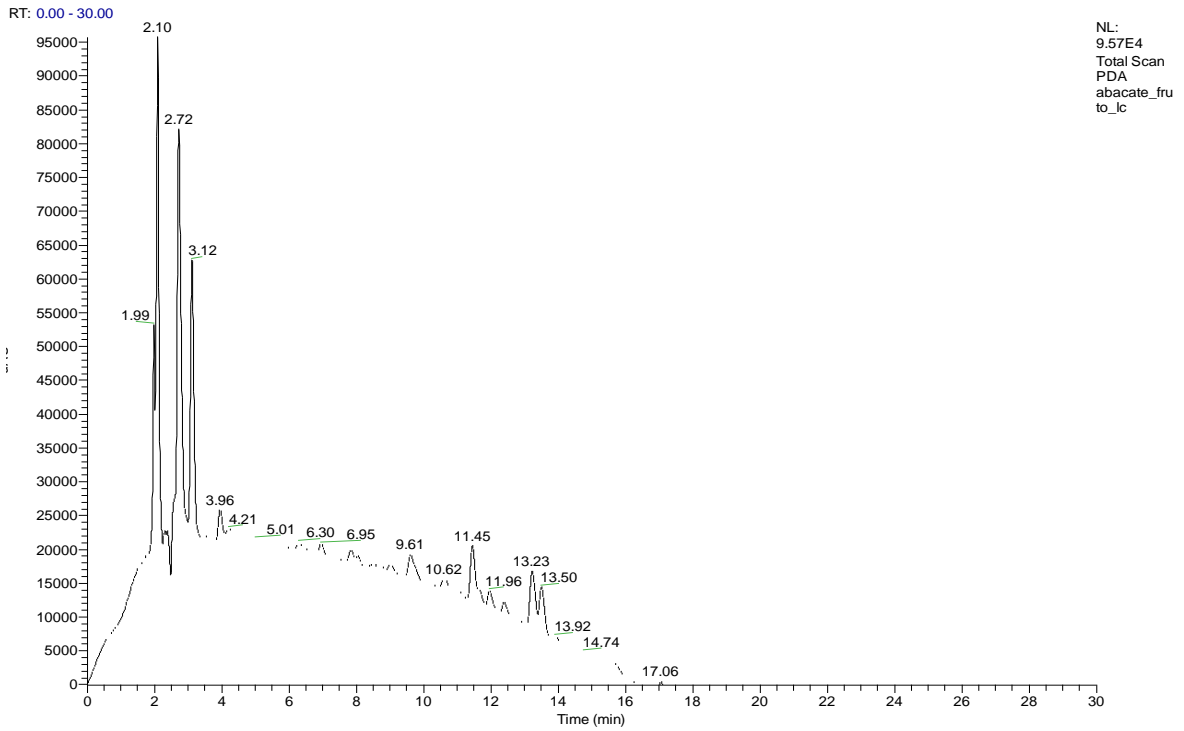


Figura 37- Perfil cromatográfico, obtido por LC, do extrato de polpa de *Persea americana* Mill.

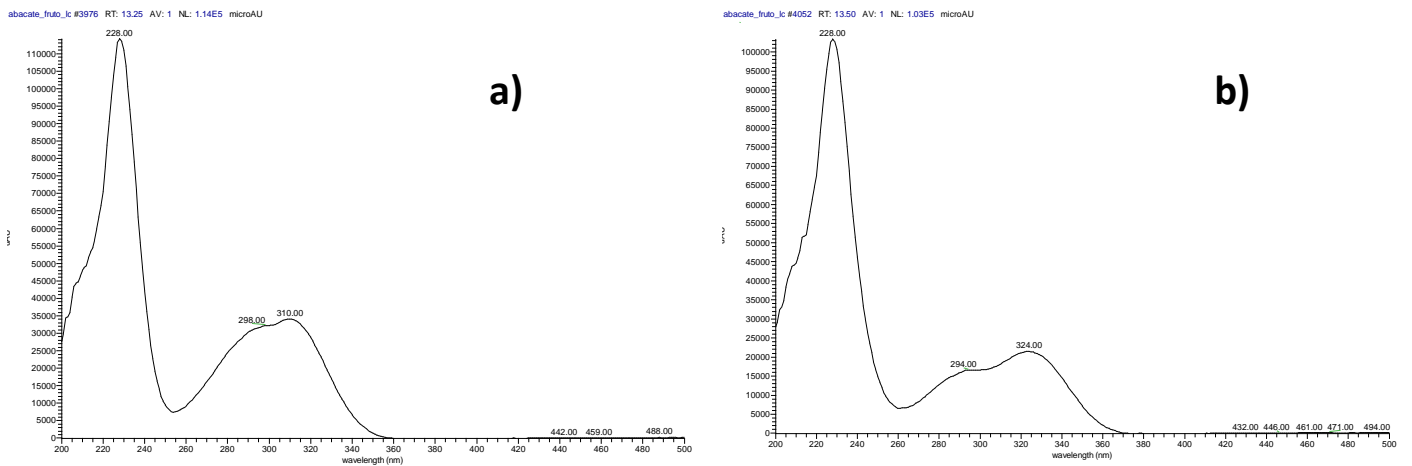


Figura 38- Espectro de UV-Vis do extrato para $T_R=13,23$ min (a) e $T_R=13,50$ min (b)

As **folhas** de *Persea americana* Mill. foram analisadas por HPLC-RP-DAD, Figura 39. Por comparação com padrões conhecidos, foram seleccionados os picos 1 e 2, tendo-se de seguida efetuado os espetros de UV-Vis correspondentes.

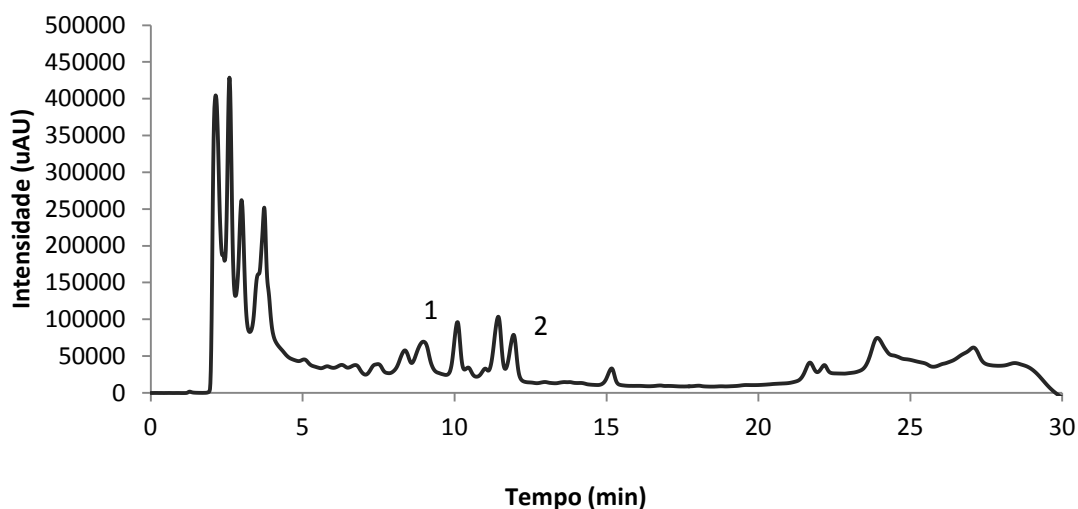


Figura 39-Perfil cromatográfico, obtido por HPLC-RP-DAD, do extrato de folhas de *Persea americana* Mill.

Os espetros dos picos indicados estão representados na Figura 40, tendo-se identificado o pico a $T_R = 8,9$ como sendo um composto derivado de ácido cafeico e o $T_R = 11,89$ como sendo também um derivado de ácido cafeico.

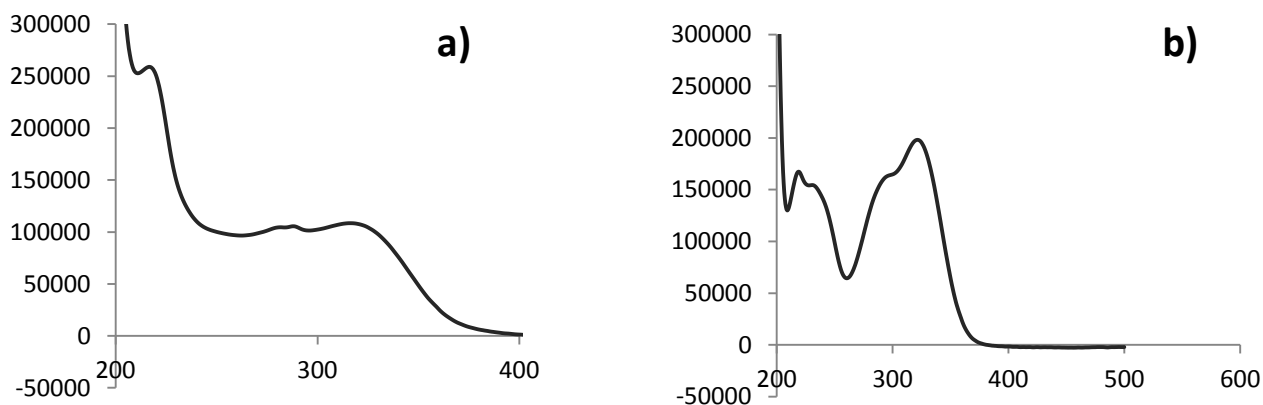


Figura 40- Espectro de UV-Vis do extrato para $T_R = 8,9$ min (a) e $T_R = 11,89$ min (b)

5.3.1.2. *Annona cherimola* Mill.

O cromatograma realizado por LC-MS para o extrato de **cascas** de *Annona cherimola*, apresentado na Figura 41, foi inconclusivo, devido à presença de uma mistura complexa composta maioritariamente por fibras.

Para solucionar este problema, seria necessário uma etapa prévia de diálise, para eliminar estes compostos.

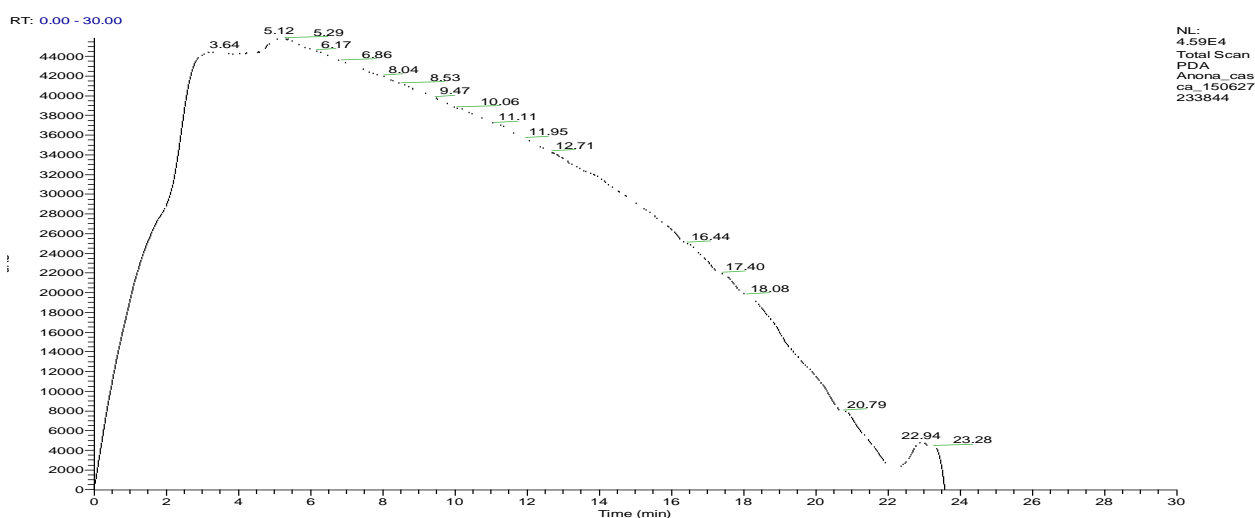


Figura 41- Perfil cromatográfico, obtido por LC, da infusão de cascas de *Annona cherimola*

O cromatograma apresentado abaixo, Figura 42, corresponde à análise do extrato de **polpa** de *Annona cherimola*.

Contudo, e como verificado para o extrato da casca deste mesmo fruto, o cromatograma foi inconclusivo, devido à presença de fibras, não se tendo conseguido realizar a análise do espectro UV-Vis dos picos e por conseguinte proceder à identificação dos compostos.

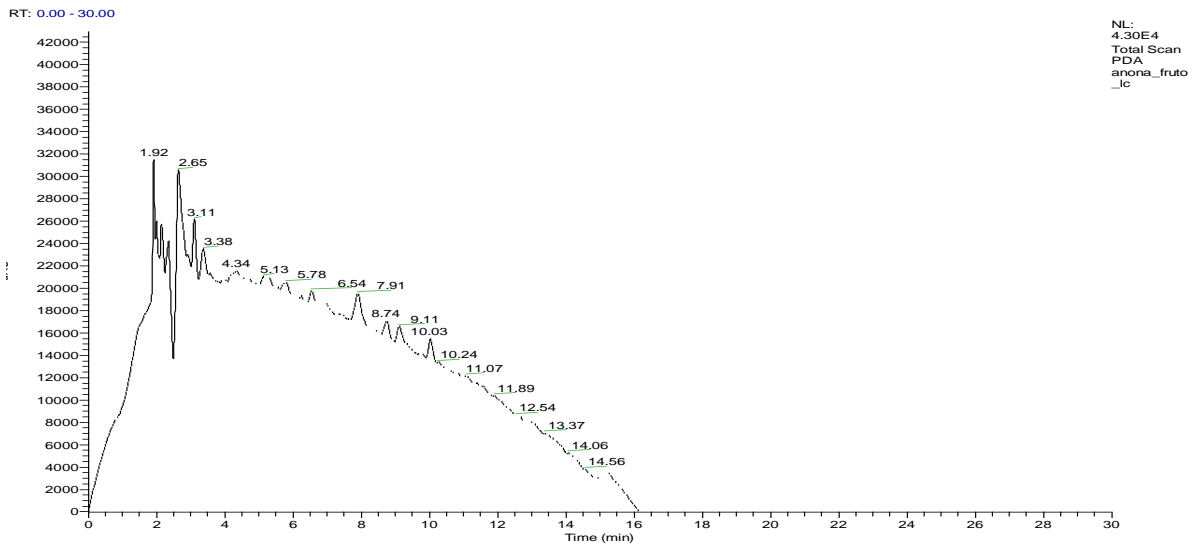


Figura 42- Perfil cromatográfico, obtido por LC, do extrato de polpa de *Annona cherimola*

Os extratos analisados por LC-MS das **folhas** de *Annona cherimola* revelaram a presente de quatro picos de interesse, como apresentado na Figura 43.

Consultada a base de dados confirmou-se a presença de compostos como rutina, quercetina e de derivados de ácido cafeico. Os espectros de absorção UV-Vis para cada um dos picos encontra-se na Figura 44.

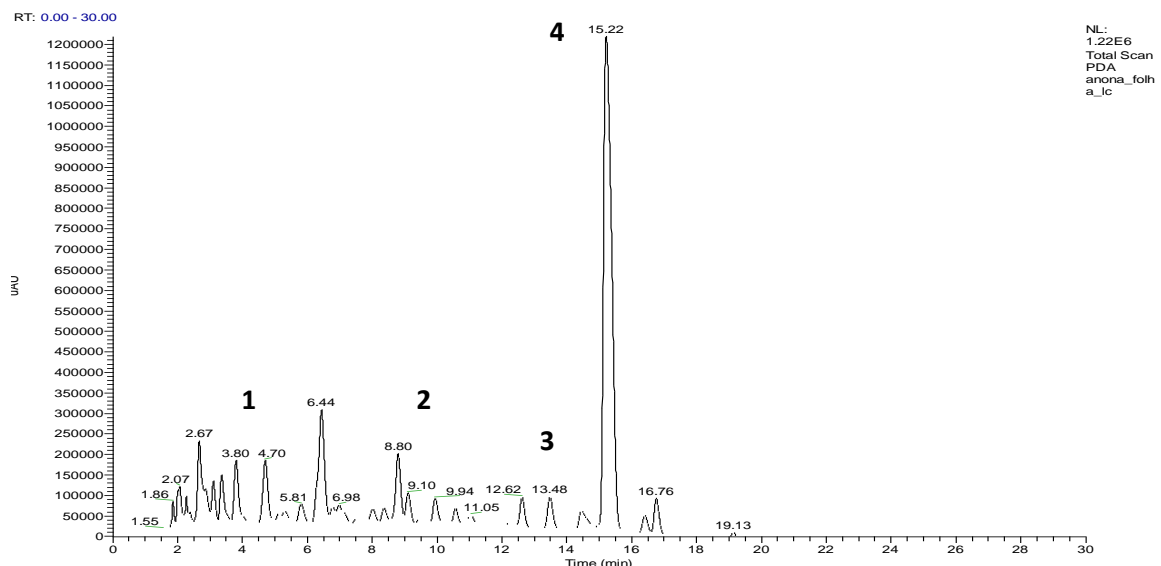


Figura 43- Perfil cromatográfico, obtido por LC, da infusão de folhas de *Annona cherimola*

Resultados e discussão

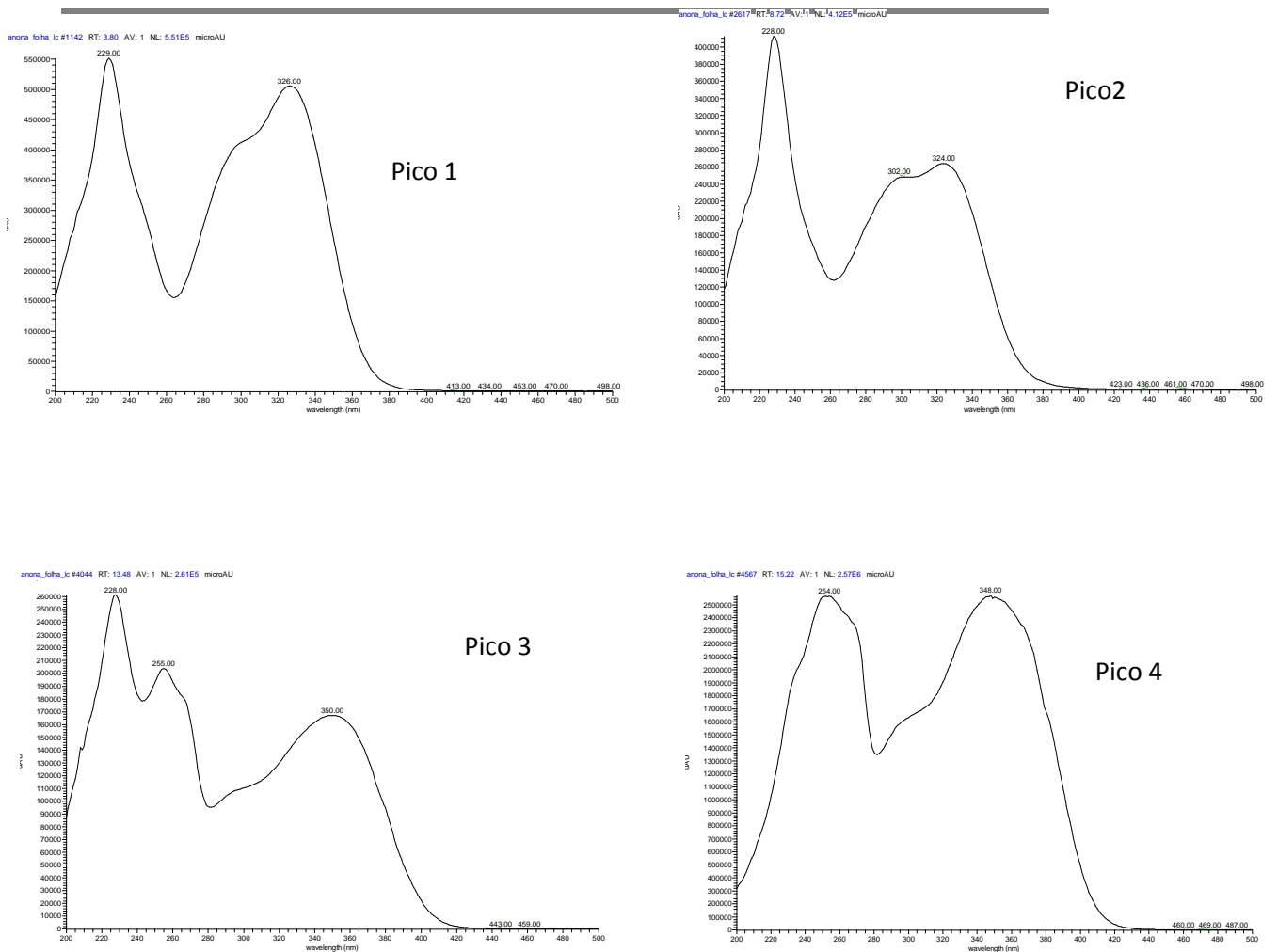


Figura 44- Espectro de UV-Vis do extrato para $T_R=3,80$ min (Pico 1), $T_R=8,80$ min (Pico 2), $T_R=13,48$ min (Pico 3) e $T_R=15,22$ min (Pico 4)

Com recurso aos espectros de UV-Vis padrão e aos T_R dos respetivos compostos é possível concluir que o composto correspondente ao pico 1 é um derivado de ácido cafeico. O composto correspondente ao pico 2 também se trata de um derivado de ácido cafeico. Quanto ao pico 3 foi identificado como sendo correspondente ao composto quercetina (m/z 300), apesar de apresentar uma abundância relativa baixa. O pico 4 foi identificado como sendo correspondentes a uma molécula de rutina (m/z 609).

5.3.1.3. *Actinidea deliciosa*

O cromatograma obtido para o extrato de **casca** de *Actinidea deliciosa*, apresentado na Figura 45, mostrou mais uma vez, como verificado para outros extratos, a presença de grandes quantidades de fibra, que devido ao seu tamanho superior, não permitem a detecção de compostos como os flavonóides, de tamanhos mais reduzidos. Assim, e como nos casos anteriores, seria necessária uma etapa prévia de diálise.

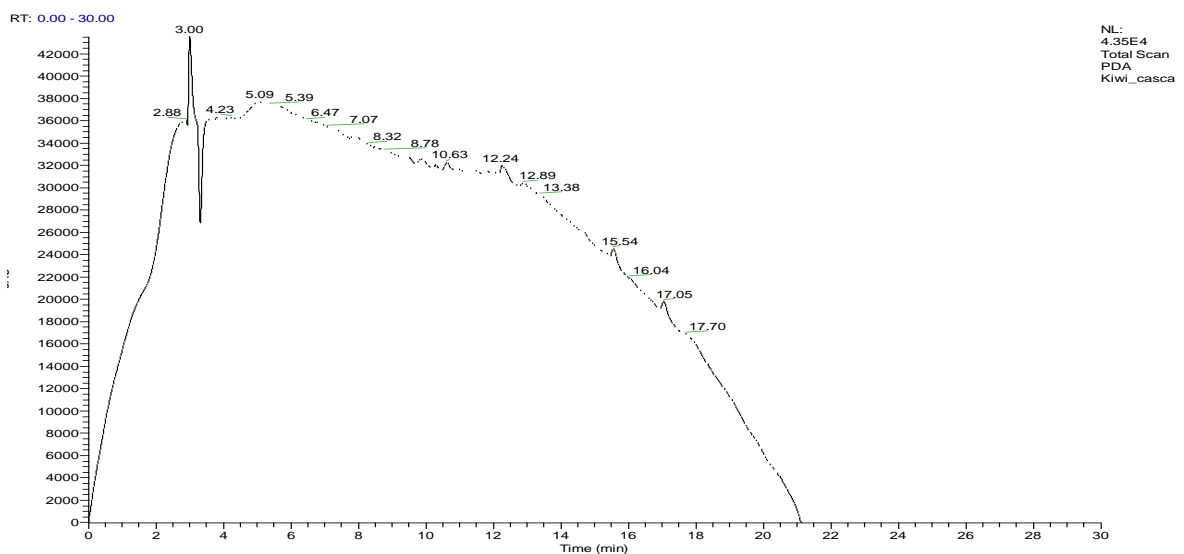


Figura 45- Perfil cromatográfico, obtido por LC, da infusão de cascas de *Actinidea deliciosa*

O extrato da **polpa** de *Actinidea deliciosa* demonstrou a presença de quantidades de fibra suficientes para não permitir a detecção de moléculas mais pequenas, Figura 46.

É possível concluir então, que o fruto apresenta alto teor e fibra na sua constituição, tendo em conta os resultados obtidos para os extratos da sua casca e da sua polpa.

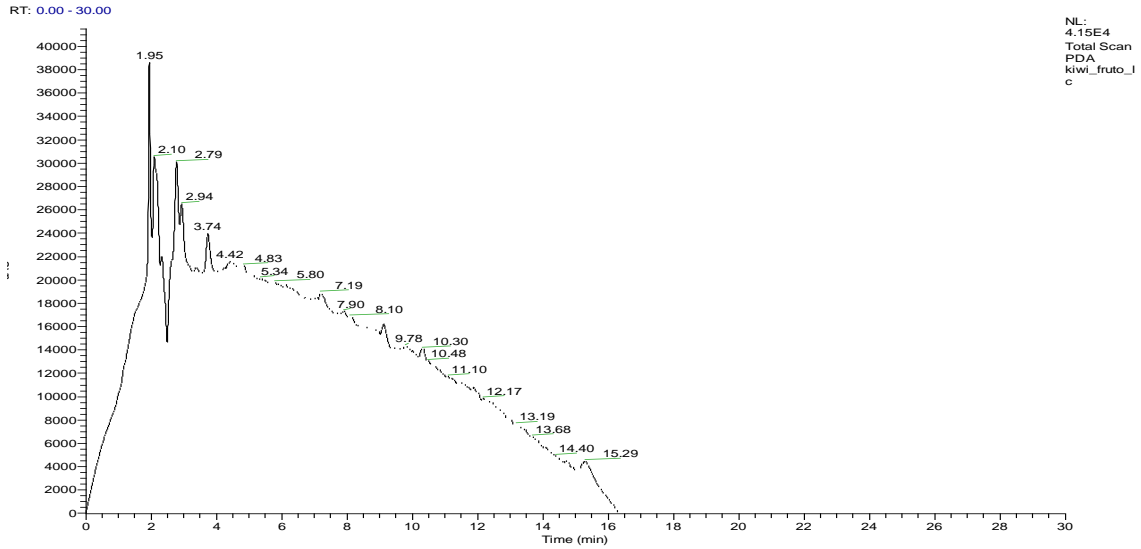


Figura 46- Perfil cromatográfico, obtido por LC, do extrato de polpa de *Actinidea deliciosa*

Quanto ao extrato de **folhas** deste fruto, obtido com recurso a LC-MS, foi possível observar a presença de alguns picos maioritários, como indica a Figura 47.

Os respetivos espectros de UV-Vis correspondentes aos picos assinalados, encontram-se ilustrados na Figura 48.

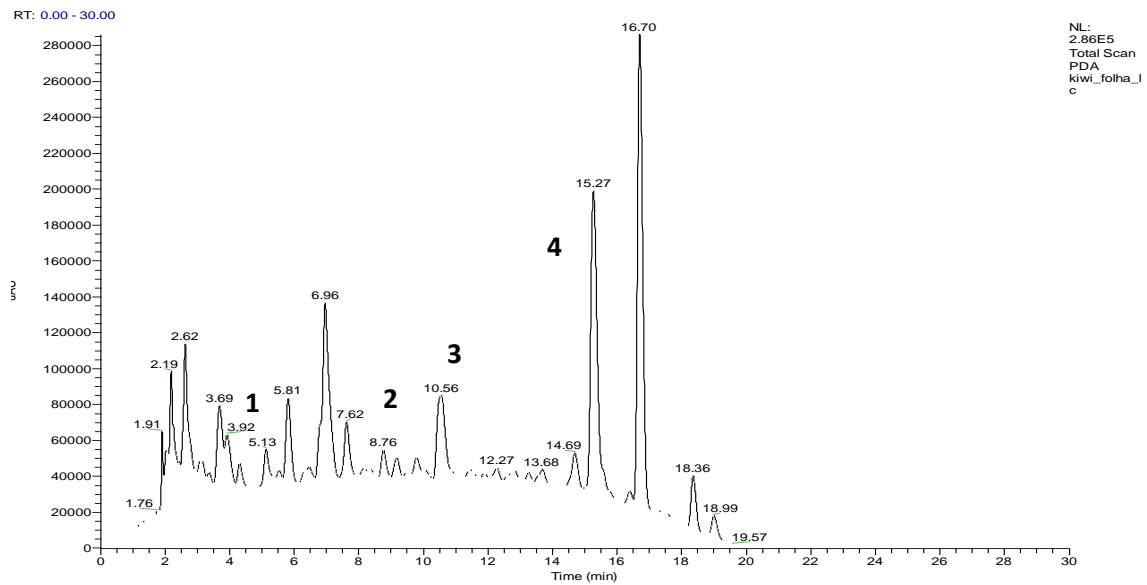


Figura 47- Perfil cromatográfico, obtido por LC, da infusão de folhas de *Actinidea deliciosa*

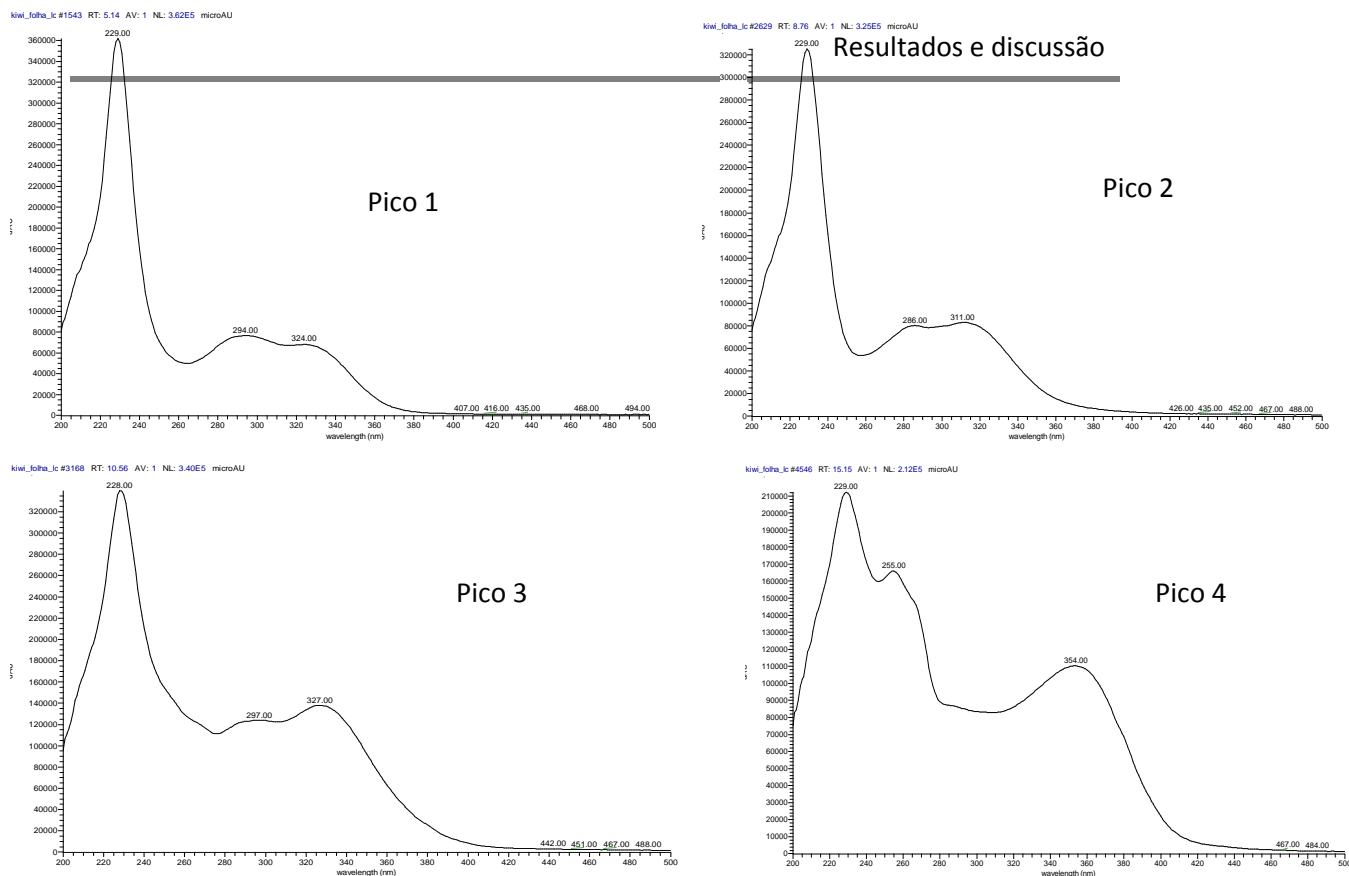


Figura 48- Espectro de UV-Vis do extrato para $T_R=5,13$ min (Pico 1), $T_R=8,76$ min (Pico 2) , $T_R= 10,56$ min (Pico 3) e $T_R=15,27$ min (Pico 4)

Os compostos presentes nos picos 1, 2 e 3 foram identificados como sendo derivados de ácido cafeico, através da comparação com o espectro do composto padrão correspondente.

O composto presente no pico 4 apresenta um T_R e um espectro característico, com m/z 609, tendo sido identificado como sendo uma molécula de rutina.

5.3.1.4. Conclusão

Em suma, é possível concluir que a *Annona cherimola* e a *Actinidea deliciosa* são frutas que apresentam um alto teor de fibra, visível maioritariamente nos extratos das suas cascas e polpas. Para além disto, em ambas foi possível a identificação de rutina nos extratos das suas folhas e de quercetina, no caso da *Annona cherimola*.

Nos extratos de *Persea americana* Mill. foi verificada a presença de compostos bastante distintos das restantes frutas, tendo sido possível identificar uma molécula de

procianidina, composta por quatro unidades de epicatequina, nas suas cascas, bem como uma grande quantidade de derivados de ácido cafeico, nos restantes extratos.

Em todos os cromatogramas dos frutos em estudo foi verificada a presença de um conjunto de picos maioritários superior aos identificados, contudo a sua identificação não foi possível, de momento, devido à falta de compostos padrões para comparação e devido ao facto de ainda não ser bem conhecida na literatura a composição de todos os extratos, para que seja possível uma identificação e comparação mais correta. Por último, os métodos de extração de alguns extratos também se mostrou insuficiente, tendo que se otimizar este parâmetro.

5.3.2. Quantificação de fenóis totais e taninos

Os estudos do conteúdo em fenóis totais e taninos, foram realizados nos extratos aquosos da polpa e casca (digestão acida e infusão, respetivamente) de abacate, kiwi e anona, bem como nas folhas de abacate.

As folhas de kiwi e anona já foram anteriormente estudadas quanto ao seu conteúdo em antioxidantes, sendo que neste trabalho foram realizados os ensaios quanto ao seu conteúdo em fenóis totais e taninos.

Foi realizada ANOVA a uma dimensão, com $P=0.05$ para os resultados obtidos. Nos fenóis apenas a relação cascas/polpa da anona não apresentou diferenças significativas. As restantes relações apresentam diferenças significativas. Nos taninos, todas as relações apresentam diferenças significativas.

5.3.2.1. Fenóis totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos das cascas, polpas e folhas dos frutos em estudo foi efetuada usando o reagente de Folin-Ciocalteu, tendo sido usado como composto padrão o ácido gálico, Figura 49. Assim, os resultados apresentados são expressos em equivalentes de ácido gálico por miligrama de extrato.

Como é possível observar, a quantidade de conteúdo fenólico varia consoante a parte do fruto a ser estudada e apresenta diferenças de fruto para fruto.

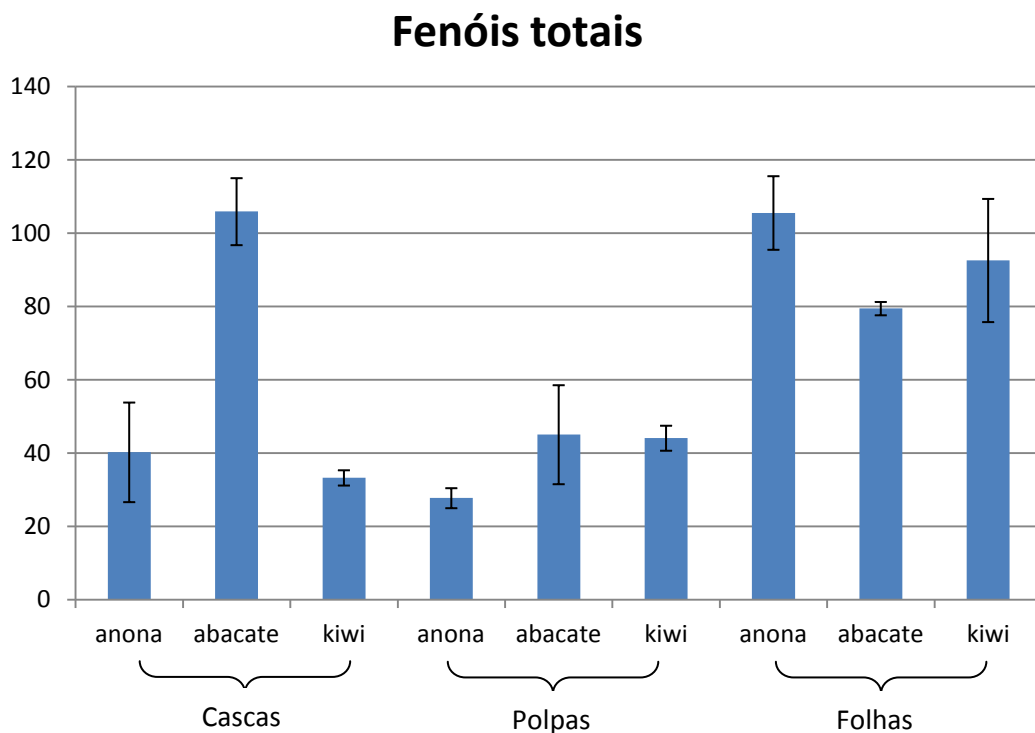


Figura 49- Conteúdo em fenóis totais, em μg equiv./mg extrato, para os extratos de *Persea americana* Mill., *Annona cherimola* e *Actinidea deliciosa*

Os resultados mostram uma maior existência de conteúdo fenólico total no abacate, sendo que a casca apresenta a maior quantidade, aproximadamente $105 \mu\text{g}/\text{mg}$, seguido das folhas, $79 \mu\text{g}/\text{mg}$ e da polpa, $45 \mu\text{g}/\text{mg}$.

Para os restantes extratos tem-se que a folha de anona apresenta a maior quantidade, seguida da sua casca e da polpa, enquanto que para o kiwi a folha continua a apresentar a maior quantidade e contrariamente à anona a casca apresenta um conteúdo fenólico inferior à polpa.

Os resultados obtidos mostraram-se concordantes com os descritos na literatura, em que a polpa de abacate tem maior quantidade que polpa de kiwi [24, 25]. Contudo, os valores encontrados para as amostras de abacate (polpa, casca e folhas) são superiores aos apresentados na literatura [33], enquanto que relativamente à polpa de anona os valores apresentados são inferiores aos obtidos no ensaio realizado [39, 133] e para a polpa de kiwi, os resultados obtidos são superiores aos apresentados na literatura [25, 134].

Como referido anteriormente, a classe de compostos fenólicos apresenta elevado valor no que diz respeito às suas qualidades como “protetor” da saúde.

A relação entre a concentração de fenóis totais e a capacidade antioxidante verificada neste trabalho são bastante esclarecedoras, visto que as amostras com maior concentração de fenóis totais são aproximadamente as mesmas que apresentam maior atividade antioxidante. Estes resultados corroboram outros estudos, na qual a atividade antioxidante foi também relacionada com o teor de taninos [135].

Esses resultados corroboram outros trabalhos, na qual a atividade antioxidante foi relacionada também com o teor de taninos [135].

Os resultados apresentados na literatura são bastante distintos, visto que alguns autores observam elevada correlação, enquanto que outros não. Estes últimos, apontam que a correlação entre estes factores pode estar influenciada pelo método selecionado. Para além disto, outras moléculas podem estar a agir sinergicamente, fazendo com que passem por compostos fenólicos, causando elevada concentração de atividade antioxidante (falso positivo).

Outro factor a ter em conta, é que durante a absorção os polifenóis sofrem várias modificações. Eles são conjugados nas células intestinais e mais tarde no fígado, por metilação e sulfatação. Como consequência, as formas que chegam ao sangue e aos tecidos são diferentes das presentes nos alimentos e é muito difícil de identificar todos os metabolitos e avaliar a sua atividade biológica.

5.3.2.2. Taninos

A determinação do teor de taninos nos extratos das cascas, polpas e folhas dos frutos foi efetuada usando como composto padrão o ácido tânico. Os resultados apresentados na Figura 50, encontram-se expressos em equivalentes de ácido tânico por miligrama de extrato.

Tendo em conta que este é apenas um ensaio de deteção da sua presença, não existe distinção entre taninos hidrolisáveis e condensados.

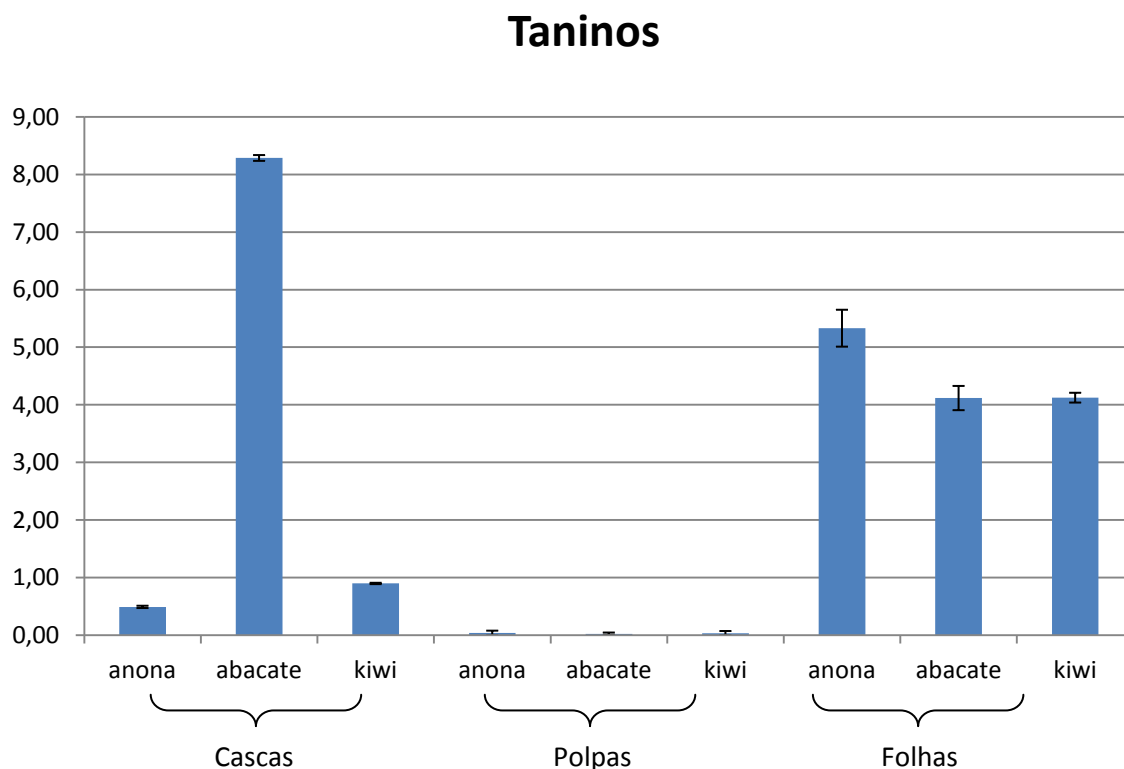


Figura 50- Conteúdo em taninos, em µg equiv./mg extrato, para os extratos de *Persea americana* Mill., *Annona cherimola* e *Actinidea deliciosa*

Tal como no caso dos fenóis totais, é possível observar que a quantidade destes compostos bioativos variam consoante a parte o fruto em estudo e a sua parte constituinte.

Analisando a Figura 50, é possível observar que as cascas do abacate são o extrato que apresenta maior conteúdo em taninos, com aproximadamente 8,29 µg /mL, seguindo-se

das folhas de anona (5,33 $\mu\text{g} / \text{mL}$) e das de abacate e kiwi, que apresentam aproximadamente a mesma quantidade (4,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Contudo, é de constatar que as polpas dos três frutos não apresentam valor de quantidade de taninos alta o suficiente para ser contabilizada. Assim, é de concluir que, de um modo geral, as polpas não apresentam conteúdo de taninos significativo ou que o método de extração aplicado não foi o mais adequado.

Para o abacate, observa-se uma grande diferença entre as suas partes constituintes, sendo que as cascas apresentam uma quantidade muito superior comparativamente com as suas folhas e polpa.

No caso da anona e do kiwi, as folhas apresentam o maior conteúdo em taninos, seguindo-se da sua casca e por último da sua polpa.

Segundo Chung (1998) a presença de pequenas quantidades de taninos nos frutos confere-lhes características sensoriais desejáveis, contudo, se presentes em quantidades mais elevadas irão conferir aos frutos características adstringentes. Esta característica deve-se ao facto de estes compostos possuírem a capacidade de precipitar proteínas, entre outros, quando em contacto com as proteínas da saliva, formando um complexo insolúvel que provoca a sensação de adstringência [136].

Por existirem poucos estudos efetuados no âmbito dos frutos estudados, sendo que são praticamente inexistentes os direcionados para a quantificação do conteúdo em taninos, não é possível reportar qualquer comparação bibliográfica.

5.4. Determinação de atividade biológica e citotoxicidade

Foi estudada a atividade antioxidante de infusões de folhas, cascas e polpas e a citotoxicidade de infusões de cascas e polpas, de *Annona cherimola*, *Actinidea deliciosa* e *Persea americana* Mill., respetivamente

A atividade antioxidante foi determinada com recurso ao método colorimétrico utilizando DPPH \cdot e a citotoxicidade foi estudada utilizando o teste de MTT em células HepG2 e Caco-2 que simulam o metabolismo do fígado e do intestino, respetivamente.

5.4.1. Atividade Antioxidante de infusões de cascas, polpa e folhas de *Persea americana* Mill., *Actinidea deliciosa* e *Annona cherimola*

Enúmeros estudos têm demonstrado que vários extratos de plantas e frutos são fontes de diversos nutrientes e outras moléculas que apresentam propriedades antioxidantes e antimicrobianas, que têm a capacidade de proteger o organismo das reações de oxidação celular, bem como de outros elementos patogénicos [104, 137, 138].

Para a determinação da atividade antioxidante recorreu-se ao uso do método DPPH. Como referido na secção 4.2.4.1, este é um método colorimétrico, na qual a cor roxa do reagente DPPH muda para amarelo, quando o seu eletrão desemparelhado, é emparelhado com um átomo de Hidrogénio dos possíveis agentes antioxidantes presentes nos extratos. Este ensaio foi realizado a diferentes concentrações dos extratos, afim de se conseguir determinar o valor de EC₅₀ dos mesmos.

Os resultados obtidos, em EC₅₀, pelo método encontram-se na Tabela 9, bem como se encontram representados na Figura 51.

Tabela 9- Atividade antioxidante, em µg/mL extrato, dos extratos de *Persea americana* Mill., *Annona cherimola* e *Actinidea deliciosa*

	CASCAS			POLPAS			FOLHAS		
	Kiwi	Anona	Abacate	Kiwi	Anona	Abacate	Kiwi	Anona	Abacate
Fruto									
EC₅₀	134,7	195,9	15,5	776,5	214,3	40,6	58,6	15,4	25,6
Desvio Padrão	5,7	3,9	0,3	7,8	35,0	4,9	2,7	0,2	0,8

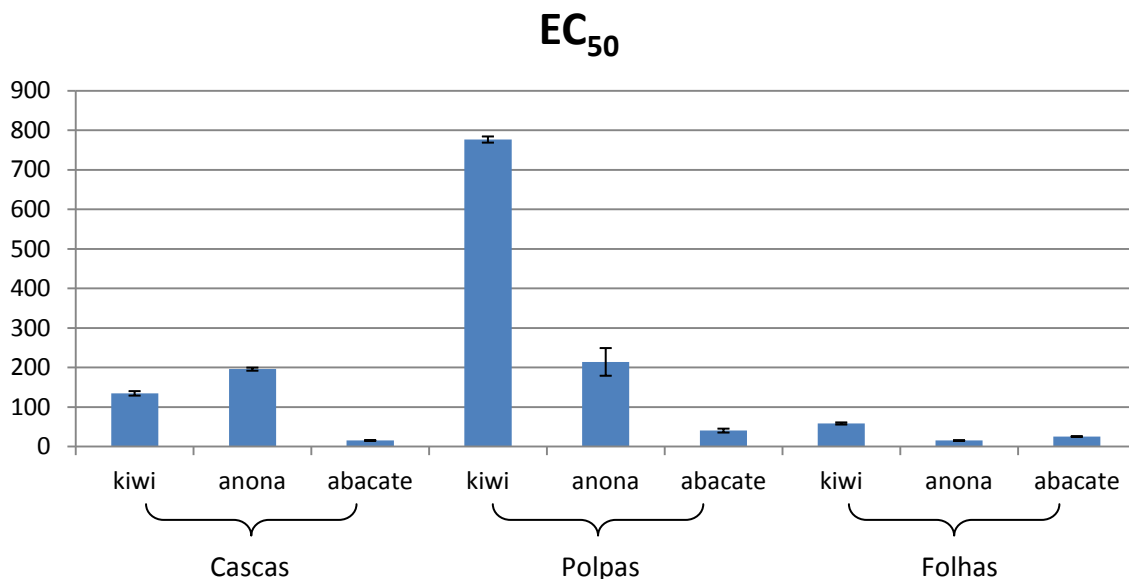


Figura 51- Atividade antioxidante, em $\mu\text{g/mL}$ extrato, dos extratos de *Persea americana* Mill., *Annona cherimola* e *Actinidea deliciosa*

A atividade antioxidante foi determinada recorrendo à determinação do valor de EC_{50} , que corresponde à concentração necessária para originar 50% de extinção de radicais livres DPPH \cdot .

Observando a Tabela e o respetivo Gráfico é possível verificar que, de um modo geral, os extratos de abacate, de qualquer uma das suas partes constituintes é a que apresenta a maior capacidade antioxidante de entre todos os extratos em análise. O menor EC_{50} para este fruto é encontrado na casca ($15,536 \mu\text{g/mL}$), seguindo-se as folhas ($25,555 \mu\text{g/mL}$) e por último a polpa ($40,553 \mu\text{g/mL}$). De entre as cascas dos diferentes frutos, a pertencente ao abacate apresenta o menor valor de EC_{50} e por conseguinte a maior capacidade antioxidante, enquanto que a com menor capacidade antioxidante pertence à anona ($195,92 \mu\text{g/mL}$). Quanto às polpas tem-se novamente que a que apresenta menor EC_{50} é o abacate, enquanto que a que apresenta maior EC_{50} é o kiwi ($776,53 \mu\text{g/mL}$). E por fim, quanto às folhas tem-se que as folhas de anona apresentam o valor de EC_{50} mais baixo ($15,435 \mu\text{g/mL}$), ou seja, é necessária uma menor quantidade de extrato para obter 50% de extinção dos radicais livres DPPH \cdot . Assim, é possível concluir que as folhas de anona têm a maior concentração de compostos com efeito antioxidante, seguindo-se das folhas de abacate ($25,55 \mu\text{g/mL}$) e das folhas de kiwi ($58,6 \mu\text{g/mL}$).

Vários estudos recentes mostram que as frutas são ricas em muitos nutrientes e compostos antioxidantes, sendo que há relatos de que esses constituintes se concentram maioritariamente nas cascas e nas sementes, seguindo-se das polpas [34, 139].

Para a anona é possível observar pelos resultados, que o extrato de folha apresenta a maior capacidade antioxidante, seguindo-se das cascas e da sua polpa. Tal facto é suportado por alguma da literatura encontrada literatura [133], sendo que outros estudos reportam que as polpas apresentam maior atividade antioxidante que as cascas [140].

É possível concluir que o abacate, em toda a sua constituição (exceptuando o caroço que não foi estudado) e devido à existência de componentes de elevado valor antioxidante na sua constituição, apresenta uma elevadíssima capacidade de reduzir a quantidade de radical DPPH geradas no organismo. Os resultados que dão como maior a capacidade antioxidante as folhas, seguido das cascas e das polpas, confirmam o descrito pela literatura, em que a maior capacidade antioxidante se verifica na casca, seguida da polpa [33].

Esta característica confere ao abacate uma elevada importância na dieta do ser humano, visto apresentar características tão vantajosas.

Como já referido anteriormente, os polifenóis, como antioxidantes podem proteger os constituintes celulares contra os danos oxidativos e como tal, limitar o risco de inúmeras doenças degenerativas associadas a estes danos. Por exemplo, apresentam efeito cardio protetor, anti- envelhecimento, anti-cancerígeno e neuroprotetor.

Em suma, e tendo em conta os resultados obtidos, é possível concluir que as cascas e folhas de todos os frutos estudados são de elevada importância quanto ao poder antioxidante. Esta conclusão leva a crer que o possível aproveitamento destes extratos é vantajoso para várias indústrias, como a farmacêutica ou a cosmética.

Em modo de resumo, são apresentados na Tabela 10 os resultados obtidos para os frutos em estudo, nos ensaios de fenóis totais, taninos e atividade antioxidante.

Tabela 10- Valores de fenóis totais, taninos e EC₅₀ para os extratos de *Persea americana* Mill., *Annona cherimola* e *Actinidea deliciosa*

		Abacate	Anona	Kiwi
Fenóis totais ($\mu\text{g equiv.}/\text{mg}$)	Folhas	79,41 \pm 1,82	105,51 \pm 10,04	92,54 \pm 16,80
	Casca	105,9 \pm 9,1	40,2 \pm 13,6	33,2 \pm 2,08
	Polpa	45,02 \pm 13,5	27,7 \pm 2,7	44,06 \pm 3,4
Taninos ($\mu\text{g equiv.}/\text{mg}$)	Folhas	4,1 \pm 0,2	5,3 \pm 0,3	4,1 \pm 0,09
	Casca	8,3 \pm 0,05	0,5 \pm 0,02	0,9 \pm 0,01
	Polpa	0,02 \pm 0,02	0,04 \pm 0,04	0,03 \pm 0,04
EC₅₀ ($\mu\text{g equiv.}/\text{mL}$)	Folhas	15,4 \pm 0,2	25,6 \pm 0,8	58,6 \pm 2,7
	Casca	15,5 \pm 0,3	195,9 \pm 3,9	134,7 \pm 5,7
	Polpa	214,3 \pm 35,0	40,5 \pm 4,9	776,5 \pm 7,8

5.4.2. Determinação da Citotoxicidade dos extratos de casca e polpa de *Persea americana* Mill., *Actinidea deliciosa* e *Annona cherimola*

A citotoxicidade dos extratos de cascas e polpas, dos frutos em estudo (kiwi, anona e abacate), foi avaliada recorrendo ao uso de células humanas tendo-se optado por estudar o efeito nas células HepG2 e Caco-2, linhas celulares do carcinoma hepatocelular e do adenocarcinoma colo-rectal, respetivamente.

O ensaio realizado tem por base o uso do reagente MTT e tem como objetivo determinar o valor de IC₅₀ dos vários extratos, ou seja, a concentração na qual a viabilidade celular é reduzida em 50%. Os esquemas ilustrativos das placas e da respetiva distribuição das amostras encontram-se na Figura 52 para as linhas celulares HepG2 e Caco-2, bem como os resultados obtidos para os valores de IC₅₀, em ambas as linhas celulares, se encontram resumidos na Tabela 11.

Para ambos os ensaios, as concentrações testadas foram de 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL.

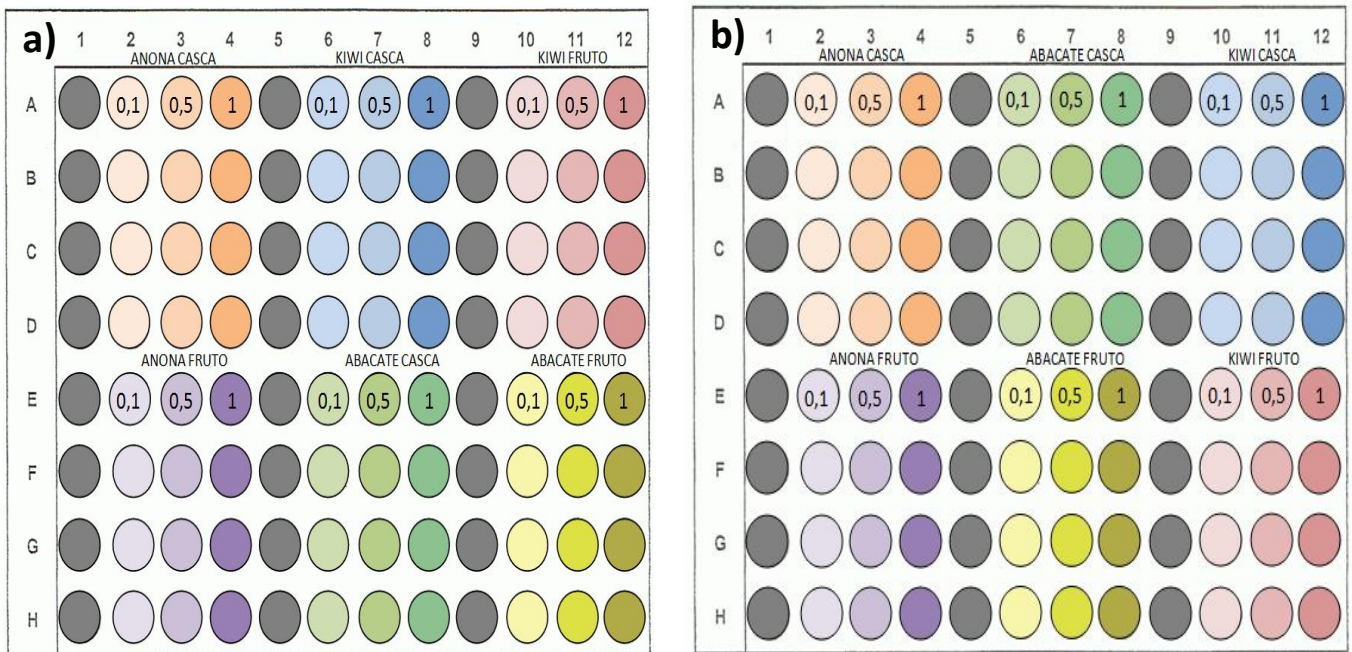


Figura 52- Esquema ilustrativo da placa de MTT para a linha celular (a) HepG2 e (b) Caco-2

Tabela 11- Valores de IC₅₀, em mg/mL extrato , para os extratos de *Persea americana* Mill., *Annona cherimola* e *Actinidea deliciosa*

		IC ₅₀ (mg/mL)	
		HEPG2	CACO -2
<i>Persea americana</i> Mill.	Casca	0,8 ± 0,08	0,8 ± 0,1
	Polpa	1,4 ± 0,7	1,4 ± 31,7
<i>Actinidia deliciosa</i>	Casca	1,5 ± 0,4	3,7 ± 1,6
	Polpa	1,5 ± 0,1	4,0 ± 2,5
<i>Annona cherimola</i>	Casca	2,8 ± 10,9	5,7 ± 14,0
	Polpa	0,8 ± 1,4	3,6 ± 12,6

O ensaio de MTT revelou que os extratos apresentaram valores de IC₅₀ próximos ou superiores a concentrações de 1 mg/mL, para ambas as linhas celulares.

Através dos resultados apresentados é possível observar que os valores de IC₅₀ são superiores a 1 mg/mL, em ambas as linhas celulares, para os extratos de polpa de abacate, casca e polpa de kiwi e casca de anona. As cascas de abacate apresentaram valores inferiores, contudo próximos, de 1 mg/mL em ambas as linhas celulares. O extrato de polpa de anona foi o único que demonstrou diferenças nos dois ensaios realizados, tendo-se para as HepG2 um valor de IC₅₀ inferior a 1mg/mL e para as Caco-2 um valor de IC₅₀ superior a 1 mg/mL.

Nenhum dos extratos apresentou um valor de IC₅₀ próximo do limite biológico de 0,1 mg/mL, sendo este um valor de referência usado em vários estudos relativos ao estudo de citotoxicidade para várias linhas celulares.

Assim, é possível concluir que todos os extratos estudados não apresentaram toxicidade em ambos os ensaios e que apesar de alguns apresentarem valores de IC₅₀ inferiores a 1 mg/mL, estes são bastante próximos, pelo que se considera a sua toxicidade muito baixa.

Em suma, é de constatar que os extratos de abacate diminuíram em 50% a viabilidade celular em concentrações inferiores às verificadas para os restantes frutos, em ambas as linhas celulares, pelo que o seu efeito citotóxico é superior aos restantes.

Tendo em conta que se tratam de ensaios recorrendo a células cancerígenas e se as tomarmos como tal, esta conclusão é corroborada por diversos estudos realizados, que revelam a capacidade deste fruto para inibir a proliferação de linhas celulares cancerígenas. Assim, tendo em consideração o facto de as linhas celulares usadas serem derivadas de adenocarcinomas, os resultados obtidos são corroborados quanto à sua eficácia na redução da viabilidade celular [29, 32].

O alto conteúdo em luteína, com propriedades anti-proliferativas e anti-tumorais, conjugado com a presença de outros carotenóides, terpenóides, fenóis, glutatiónas e vitaminas, pode por conseguinte ser o principal responsável por este efeito [32].

Os resultados obtidos permitem concluir que nenhuma das frutas testadas apresenta toxicidade significativa, se considerarmos as células usadas como uma simulação de células saudáveis, considerando-se portanto como não prejudiciais para as células presentes no organismo, podendo por conseguinte ser consumidas sob a forma de infusões ou no aproveitamento das suas polpas e cascas para indústrias várias, como a farmacêutica.

VI. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Nos últimos anos têm-se intensificado os estudos em alimentos como frutos e vegetais, devido à sua elevada constituição em fitoquímicos, bem como o frequente uso de plantas ditas medicinais, afim de naturalmente tentar tratar inúmeros problemas de saúde.

Como tal, o consumo destes alimentos encontra-se fortemente associada a benefícios para a saúde, dadas as suas propriedades como antioxidantes, antimicrobianos e antimutagénicos. Assim, revela-se de extrema importância o estudo destes, com vista à sua caracterização e identificação dos seus compostos maioritários, que possam ser responsáveis por essas mesmas propriedades benéficas.

Devido ao facto de a ingestão de plantas medicinais ser feita maioritariamente sob forma de chá é relevante conhecer as potencialidades destes extratos.

Em estudos anteriormente realizados no laboratório, referentes à redução do colesterol total na corrente sanguínea e na sua absorção por parte de células da barreira intestinal, quando colocadas em contacto com infusões de folhas de carqueja, boldo, anona, alcachofra e freixo, contudo associado aos efeitos benéficos no controlo do colesterol, ocorreu simultaneamente a inibição da absorção de aminoácidos pelas mesmas células.

Como tal, revelou-se imperativo o estudo destes componentes, dado que este acontecimento poderá originar graves consequências para a saúde humana.

Usando os extratos enunciados, foi feito o estudo da permeação de aminoácidos pelas células da barreira intestinal, quando colocadas em contacto com os extratos por um período de 24 horas. Dado terem revelado propriedades de interesse em estudos anteriormente realizados, foram também estudados os extratos de cascas e polpas de anona, kiwi e abacate, bem como as folhas de kiwi e abacate, com vista à promoção das cascas destas frutas como de interesse para indústrias como a farmacêutica.

Os resultados, referentes ao desenvolvimento e aplicação de um método para detecção e quantificação dos aminoácidos em matrizes biológicas, foram obtidos por HPLC-RP-DAD.

Para a obtenção destes resultados, os compostos necessitaram de uma etapa prévia de derivatização dado não apresentarem na sua constituição grupos cromóforos, impossibilitando a sua deteção por UV.

Na derivatização, foi usado o composto fenilisotiocianato (PITC) como agente derivatizante, dando origem a feniltiocarbamil (PTC–aminoácidos) que são posteriormente separados por HPLC e identificados e quantificados.

Tanto nos ensaios com extratos de plantas, como com os extratos das cascas dos frutos, é de destacar o facto da absorção dos aminoácidos ser bastante diferente quando em contacto com as diferentes infusões presentes no meio, por um período de 24h.

Para todas as infusões testadas, determinados aminoácidos apresentaram uma quantidade percentual ao fim das 24h superior à apresentada no início do ensaio, que poderá ser explicado pela possibilidade de ocorrência de hidrólise de proteínas constituintes do meio.

Contrariamente, determinados aminoácidos, especialmente a Phe, foram inibidos quanto à sua absorção celular, sendo este um fator de elevada importância, visto este ser um aminoácido essencial e como tal necessitar de ser consumido na dieta.

Foi também observado que a absorção do aminoácido Met foi facilitada, tanto com a infusão de a casca de anona, como de kiwi.

As propriedades benéficas da anona, kiwi e abacate encontram-se diretamente relacionadas com as suas atividades antioxidantes, que por sua vez estão diretamente relacionada com o seu conteúdo em compostos fenólicos como taninos e flavonóides.

Um estudo quantitativo preliminar da composição em fenóis totais e taninos, revelou um conteúdo fenólico total superior no abacate, sendo que a casca apresenta a maior quantidade, seguido das folhas, e da polpa. O conteúdo em taninos foi superior nas cascas do abacate, seguindo-se das folhas de anona e das de abacate e kiwi, que apresentam aproximadamente a mesma quantidade.

O estudo da atividade antioxidante concluiu que os extratos de abacate, apresentam a maior capacidade antioxidante de entre todos os extratos em análise. Sendo que o

menor valor de EC_{50} para este fruto é encontrado na casca, seguindo-se as folhas e a polpa.

É evidente a relação entre a concentração de fenóis totais e a capacidade antioxidante, dado que as amostras com maior concentração de fenóis totais são as mesmas que apresentam maior atividade antioxidante, especialmente nas folhas e cascas dos frutos.

Esta conclusão leva a crer que o possível aproveitamento destes extratos, como agentes protetores celulares contra os danos oxidativos é possível em várias indústrias, como a farmacêutica ou a cosmética.

Numa segunda abordagem, foram estudados, por LC-MS e HPLC-RP-DAD os componentes maioritários dos extratos aquosos.

De uma maneira geral, os extratos revelaram a existência de misturas complexas onde predominam as fibras, que impossibilitam a deteção e identificação dos seus componentes bioativos. Contudo, em alguns extratos foi possível esta identificação, como é o caso das cascas de abacate, onde foi identificada a molécula de procianidina e as folhas de abacate onde foram identificadas estruturas químicas semelhantes aos derivados de ácido cafeico. Como componentes maioritários do extrato de folhas de anona foram identificados compostos como a rutina e a quercetina e também derivados de ácido cafeico. No extrato de folhas de kiwi foi identificada a presença de rutina e de outros compostos com estruturas semelhantes aos derivados de ácido cafeico.

Nenhuma das frutas testadas apresentou citotoxicidade para as células HepG2 e Caco-2, podendo ser consumidas sob a forma de chás ou no aproveitamento das suas polpas e cascas para indústrias, como a farmacêutica.

A realização deste trabalho e os resultados obtidos para os extractos mostraram-se bastantes promissores, o que permite propor a sua continuação nos seguintes pontos:

- Optimizar, recorrendo ao método de diálise, o processo de identificação dos os constituintes dos extractos aquosos de cascas e polpa de *Annona cherimola* e *Actinidea deliciosa*
- Estudar o interior das células de modo a aferir que porção de aminoácidos é absorvida ou libertada para a corrente sanguínea
- Verificar a causa do aumento da quantidade percentual de aminoácidos no meio das amostras sem infusões
- Estudar os transportadores celulares responsáveis pela biodisponibilidade dos aminoácidos são afectados pelos compostos fenólicos existentes nas infusões.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Gurib-Fakim, A., *Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow*. Molecular Aspects of Medicine, 2006. **27**(1): p. 1-93.
2. Stepp, J.R. and D.E. Moerman, *The importance of weeds in ethnopharmacology*. Journal of Ethnopharmacology, 2001. **75**(1): p. 19-23.
3. May, B.H., et al., *Herbal medicine for dementia: a systematic review*. Phytotherapy Research, 2009. **23**(4): p. 447-459.
4. Phillipson, J.D., *Phytochemistry and medicinal plants*. Phytochemistry, 2001. **56**(3): p. 237-243.
5. Petrovska, B.B., *Historical review of medicinal plants' usage*. Pharmacognosy Reviews, 2012. **6**(11): p. 1-5.
6. Phillipson, J.D., *Phytochemistry and pharmacognosy*. Phytochemistry, 2007. **68**(22-24): p. 2960-2972.
7. Gilani, A.H. and R. Atta ur, *Trends in ethnopharmacology*. Journal of Ethnopharmacology, 2005. **100**(1-2): p. 43-49.
8. Chan, E., et al., *Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas*. Journal of Food Composition and Analysis, 2010. **23**(2): p. 185-189.
9. Steinmetz, K.A. and J.D. Potter, *Vegetables, Fruit, and Cancer Prevention: A Review*. Journal of the American Dietetic Association, 1996. **96**(10): p. 1027-1039.
10. Van Duyn, M.A.S. and E. Pivonka, *Overview of the Health Benefits of Fruit and Vegetable Consumption for the Dietetics Professional: Selected Literature*. Journal of the American Dietetic Association, 2000. **100**(12): p. 1511-1521.
11. Liu, R.H., *Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2003. **78**(3): p. 517S-520S.
12. Grosso, A.C., et al., *Essential oil composition of Pterospartum tridentatum grown in Portugal*. Food Chemistry, 2007. **102**(4): p. 1083-1088.
13. Luís, Â., et al., *Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: Pterospartum tridentatum, Cytisus scoparius and Erica spp*. Journal of Medicinal Plants Research, 2009. **3**(11): p. 886-893.
14. Vitor, R.F., et al., *Flavonoids of an extract of Pterospartum tridentatum showing endothelial protection against oxidative injury*. Journal of Ethnopharmacology, 2004. **93**(2-3): p. 363-370.
15. Coelho, M.T., et al., *Antioxidant activity and phenolic content of extracts from different Pterospartum tridentatum populations growing in Portugal*. Procedia Food Science, 2011. **1**: p. 1454-1458.
16. Ruiz, A.L.T., et al., *Pharmacology and toxicology of Peumus boldus and Baccharis genistelloides*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2008. **18**(2): p. 295-300.
17. de Oliveira Lima, I., et al., *Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2006. **16**(2): p. 197-201.
18. Fernández, J., M.D. Curt, and P.L. Aguado, *Industrial applications of Cynara cardunculus L. for energy and other uses*. Industrial Crops and Products, 2006. **24**(3): p. 222-229.
19. Kukić, J., et al., *Antioxidant and antimicrobial activity of Cynara cardunculus extracts*. Food Chemistry, 2008. **107**(2): p. 861-868.
20. Kostova, I. and T. Iossifova, *Chemical components of Fraxinus species*. Fitoterapia, 2007. **78**(2): p. 85-106.
21. Atmani, D., et al., *Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants*. Food Chemistry, 2009. **112**(2): p. 303-309.
22. Motohashi, N., et al., *Biological activity of kiwifruit peel extracts*. Phytotherapy Research, 2001. **15**(4): p. 337-343.

23. Fiorentino, A., et al., *Identification and assessment of antioxidant capacity of phytochemicals from kiwi fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(10): p. 4148-4155.
24. Gorinstein, S., et al., *Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits: In vitro and in vivo studies*. Food Research International, 2011. **44**(7): p. 2222-2232.
25. Shehata, M.M. and S.S. Soltan, *Effects of Bioactive Component of Kiwi Fruit and Avocado (Fruit and Seed) on Hypercholesterolemic Rats*. World Journal of Dairy & Food Sciences, 2013. **8**(1): p. 82-93.
26. Imeh, U. and S. Khokhar, *Distribution of Conjugated and Free Phenols in Fruits: Antioxidant Activity and Cultivar Variations*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(22): p. 6301-6306.
27. Bergh, B. and N. Ellstrand, *Taxonomy of the avocado*. California Avocado Society Yearbook, 1986. **70**: p. 135-145.
28. Yasir, M., S. Das, and M. Kharya, *The phytochemical and pharmacological profile of Persea americana Mill*. Pharmacognosy Reviews, 2010. **4**(7): p. 77.
29. Dreher, M.L. and A.J. Davenport, *Hass avocado composition and potential health effects*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2013. **53**(7): p. 738-750.
30. Ojewole, J.A. and G.J. Amabeoku, *Anticonvulsant effect of Persea americana Mill (Lauraceae)(Avocado) leaf aqueous extract in mice*. Phytotherapy Research, 2006. **20**(8): p. 696-700.
31. Ikhuria, E. and M. Maliki, *Characterization of avocado pear (Persea americana) and African pear (Dacryodes edulis) extracts*. African Journal of Biotechnology, 2007. **6**(7).
32. Lu, Q.-Y., et al., *Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2005. **16**(1): p. 23-30.
33. Wang, W., T.R. Bostic, and L. Gu, *Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars*. Food Chemistry, 2010. **122**(4): p. 1193-1198.
34. Daiuto, É.R., et al., *Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate 'Hass'*. Revista Brasileira de Fruticultura, 2014. **36**: p. 417-424.
35. Ding, H., et al. *Chemopreventive characteristics of avocado fruit*. in *Seminars in cancer biology*. 2007. Elsevier.
36. Albuquerque, T.G., et al., *Nutritional and phytochemical composition of Annona cherimola Mill. fruits and by-products: Potential health benefits*. Food Chemistry, 2014.
37. Castillo-Juárez, I., et al., *Anti-Helicobacter pylori activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders*. Journal of Ethnopharmacology, 2009. **122**(2): p. 402-405.
38. Rios, M.Y., et al., *Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from Annona cherimola (Annonaceae)*. Revista de la sociedad Quimica de Mexico, 2003. **47**(2): p. 139-142.
39. Barreca, D., et al., *Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit Annona cherimola Mill. (Annonaceae)*. Food Research International, 2011. **44**(7): p. 2302-2310.
40. Nelson, D.L., A.L. Lehninger, and M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry* 2008: Macmillan.
41. Joint, W., *Protein and amino acid requirements in human nutrition*. World health organization technical report series, 2007(935): p. 1.
42. Wu, G., *Amino acids: metabolism, functions, and nutrition*. Amino acids, 2009. **37**(1): p. 1-17.

43. Ou, D., et al., *Dietary supplementation with zinc oxide decreases expression of the stem cell factor in the small intestine of weanling pigs*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2007. **18**(12): p. 820-826.
44. Rhoads, J.M. and G. Wu, *Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine*. Amino acids, 2009. **37**(1): p. 111-122.
45. Jobgen, W.S., et al., *Regulatory role for the arginine–nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2006. **17**(9): p. 571-588.
46. Galli, F., *Amino acid and protein modification by oxygen and nitrogen species*. Amino acids, 2007. **32**(4): p. 497-499.
47. Wang, J., et al., *Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation*. The Journal of Nutrition, 2008. **138**(6): p. 1025-1032.
48. Borges, M.B., *Avaliação do efeito da simulação in vitro da digestão gastrointestinal nas propriedades antioxidantes das infusões de cidreira e tília*. 2012.
49. Seeley, R.R., *Anatomia & fisiologia*. 2001.
50. FRENHANI, P.B. and R.C. BURINI, *Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídios. Controle e implicações na dietoterapia humana*. Arquivos de Gastroenterologia, 1999. **36**: p. 227-237.
51. Caspary, W.F., *Physiology and pathophysiology of intestinal absorption*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1992. **55**(1): p. 299S-308S.
52. Garrido, A., et al., *Amino acid and peptide absorption after proximal small intestinal resection in the rat*. Gut, 1979. **20**(2): p. 114-120.
53. Fountoulakis, M. and H.-W. Lahm, *Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*. Journal of Chromatography A, 1998. **826**(2): p. 109-134.
54. Carreira, R.L., et al., *Emprego de cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína*. Food Science and Technology (Campinas), 2002. **22**: p. 229-232.
55. Thippeswamy, R., et al., *Determination of theanine in commercial tea by liquid chromatography with fluorescence and diode array ultraviolet detection*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(19): p. 7014-7019.
56. Hušek, P., *Amino acid derivatization and analysis in five minutes*. FEBS Letters, 1991. **280**(2): p. 354-356.
57. Pisano, J., *Analysis of Amino Acid Phenylthiohydantoin by Gas Chromatography and High Performance Liquid Chromatography*, in *Protein Sequence Determination*, S. Needleman, Editor 1975, Springer Berlin Heidelberg. p. 280-297.
58. Bailey-Shaw, Y., et al., *Characterization of Jamaican Agro-Industrial Wastes. Part I: Characterization of Amino Acids Using HPLC: Pre-column Derivatization with Phenylisothiocyanate*. Journal of Chromatographic Science, 2009. **47**(8): p. 674-680.
59. Gheshlaghi, R., et al., *Application of statistical design for the optimization of amino acid separation by reverse-phase HPLC*. Analytical Biochemistry, 2008. **383**(1): p. 93-102.
60. Percival, M., *Antioxidants*. 1998.
61. Lee, J., N. Koo, and D.B. Min, *Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2004. **3**(1): p. 21-33.
62. Huang, W.-Y., Y.-Z. Cai, and Y. Zhang, *Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention*. Nutrition and Cancer, 2009. **62**(1): p. 1-20.
63. Van Acker, S.A.B.E., et al., *Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids*. Free Radical Biology and Medicine, 1996. **20**(3): p. 331-342.
64. Silva, E.M., et al., *Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region*. Food Chemistry, 2007. **101**(3): p. 1012-1018.

65. Minussi, R.C., et al., *Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines*. Food Chemistry, 2003. **82**(3): p. 409-416.
66. Sousa, C.M.d.M., et al., *Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais*. Química Nova, 2007. **30**: p. 351-355.
67. Ratnam, D.V., et al., *Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective*. Journal of Controlled Release, 2006. **113**(3): p. 189-207.
68. Cook, N.C. and S. Samman, *Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 1996. **7**(2): p. 66-76.
69. Rice-Evans, C., N. Miller, and G. Paganga, *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Trends in Plant Science, 1997. **2**(4): p. 152-159.
70. Peterson, J. and J. Dwyer, *Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity*. Nutrition Research, 1998. **18**(12): p. 1995-2018.
71. Hanasaki, Y., S. Ogawa, and S. Fukui, *The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids*. Free Radical Biology and Medicine, 1994. **16**(6): p. 845-850.
72. Havsteen, B.H., *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. Pharmacology & Therapeutics, 2002. **96**(2-3): p. 67-202.
73. Hope, W.C., et al., *In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity by quercetin*. Biochemical Pharmacology, 1983. **32**(2): p. 367-371.
74. Hodnick, W.F., et al., *Electrochemistry of flavonoids: Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids*. Biochemical Pharmacology, 1988. **37**(13): p. 2607-2611.
75. Havsteen, B., *Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency*. Biochemical Pharmacology, 1983. **32**(7): p. 1141-1148.
76. Brandi, M.L., *Flavonoids: biochemical effects and therapeutic applications*. Bone and Mineral, 1992. **19**, Supplement 1(0): p. S3-S14.
77. Pietta, P.-G., *Flavonoids as Antioxidants*. Journal of Natural Products, 2000. **63**(7): p. 1035-1042.
78. Agati, G., et al., *Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance*. Plant Science, 2012. **196**(0): p. 67-76.
79. Soares, S., N. Mateus, and V. de Freitas, *Carbohydrates Inhibit Salivary Proteins Precipitation by Condensed Tannins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(15): p. 3966-3972.
80. Khanbabaee, K. and T. van Ree, *Tannins: classification and definition*. Natural Product Reports, 2001. **18**(6): p. 641-649.
81. Schofield, P., D.M. Mbugua, and A.N. Pell, *Analysis of condensed tannins: a review*. Animal Feed Science and Technology, 2001. **91**(1-2): p. 21-40.
82. Chung, K.-T., C.-I. Wei, and M.G. Johnson, *Are tannins a double-edged sword in biology and health?* Trends in Food Science & Technology, 1998. **9**(4): p. 168-175.
83. Amarowicz, R., *Tannins: the new natural antioxidants?* European Journal of Lipid Science and Technology, 2007. **109**(6): p. 549-551.
84. Gámiz-Gracia, L., et al., *Chemiluminescence detection in liquid chromatography: Applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis—A review*. Analytica Chimica Acta, 2009. **640**(1-2): p. 7-28.
85. Ye, J. and R.P. Baldwin, *Determination of Amino Acids and Peptides by Capillary Electrophoresis and Electrochemical Detection at a Copper Electrode*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(17): p. 2669-2674.

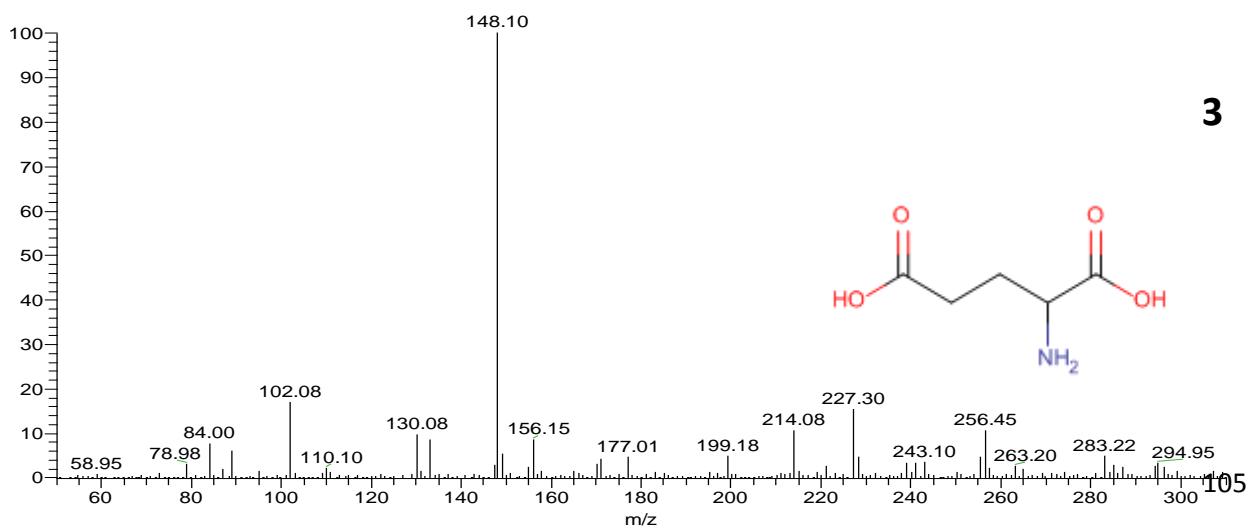
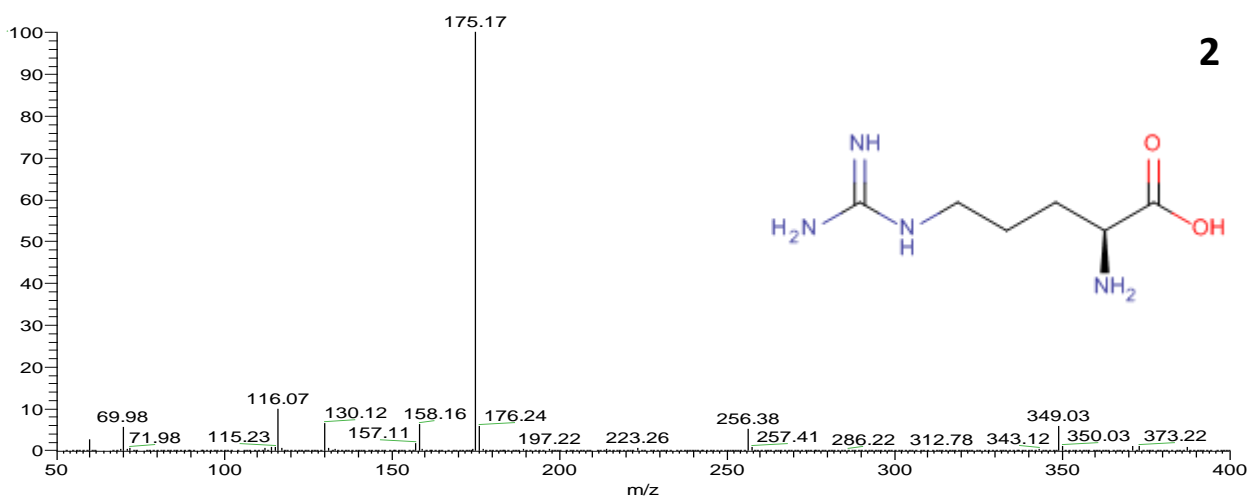
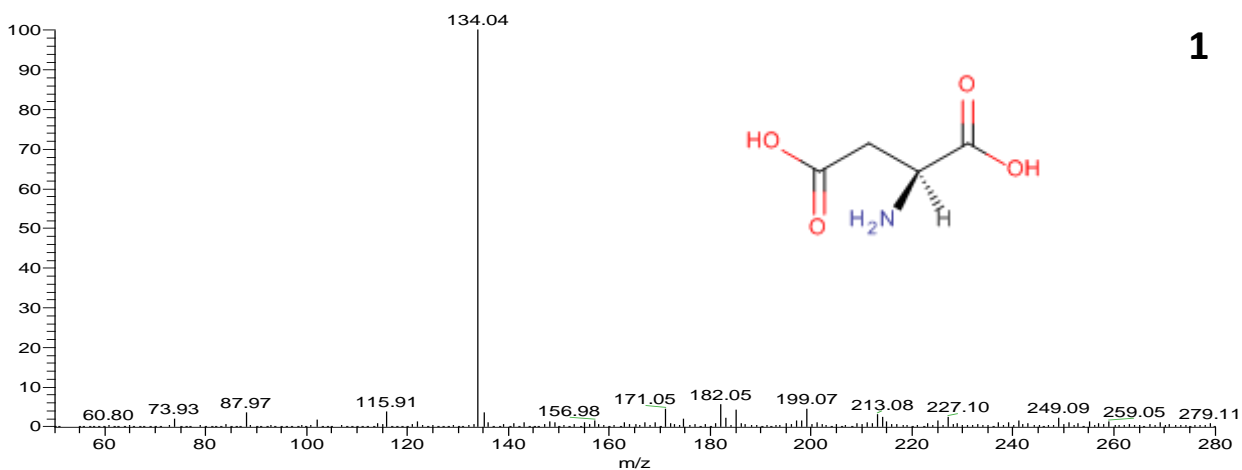
86. das Neves, H.J.C. and Z.B. Morais, *HPLC assay of underivatized free amino acids with column switching and evaporative light-scattering detection*. Journal of High Resolution Chromatography, 1997. **20**(2): p. 115-118.
87. Yan, D., et al., *Direct determination of fourteen underivatized amino acids from *Whitmania pigra* by using liquid chromatography-evaporative light scattering detection*. Journal of Chromatography A, 2007. **1138**(1–2): p. 301-304.
88. Sari, F. and Y.S. Velioglu, *Effects of particle size, extraction time and temperature, and derivatization time on determination of theanine in tea*. Journal of Food Composition and Analysis, 2011. **24**(8): p. 1130-1135.
89. Agrafiotou, P., S. Sotiropoulos, and A. Pappa-Louisi, *Direct RP-HPLC determination of underivatized amino acids with online dual UV absorbance, fluorescence, and multiple electrochemical detection*. Journal of separation science, 2009. **32**(7): p. 949-954.
90. Cahill, J.D., et al., *Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2004. **1041**(1–2): p. 171-180.
91. Herrero, M., A. Cifuentes, and E. Ibañez, *Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review*. Food Chemistry, 2006. **98**(1): p. 136-148.
92. Mahugo Santana, C., et al., *Methodologies for the Extraction of Phenolic Compounds from Environmental Samples: New Approaches*. Molecules, 2009. **14**(1): p. 298-320.
93. Swadesh, J.K., *HPLC: practical and industrial applications* 2002: CRC Press.
94. Özcan, S. and H.Z. Şenyuva, *Improved and simplified liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized free amino acids in various foods*. Journal of Chromatography A, 2006. **1135**(2): p. 179-185.
95. Turnell, D. and J. Cooper, *Rapid assay for amino acids in serum or urine by pre-column derivatization and reversed-phase liquid chromatography*. Clinical Chemistry, 1982. **28**(3): p. 527-531.
96. Kupiec, T., *Quality-control analytical methods: High-performance liquid chromatography*. International journal of pharmaceutical compounding, 2004. **8**: p. 223-227.
97. Heinrikson, R.L. and S.C. Meredith, *Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate*. Analytical Biochemistry, 1984. **136**(1): p. 65-74.
98. Artursson, P., K. Palm, and K. Luthman, *Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport* 1. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **46**(1–3): p. 27-43.
99. Artursson, P., *Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa*. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, 1990. **8**(4): p. 305-330.
100. Bailey, C.A., P. Bryla, and A.W. Malick, *The use of the intestinal epithelial cell culture model, Caco-2, in pharmaceutical development*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1996. **22**(1): p. 85-103.
101. Meunier, V., et al., *The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications*. Cell biology and toxicology, 1995. **11**(3-4): p. 187-194.
102. Atoui, A.K., et al., *Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile*. Food Chemistry, 2005. **89**(1): p. 27-36.
103. Almajano, M.P., et al., *Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions*. Food Chemistry, 2008. **108**(1): p. 55-63.
104. Wojdyło, A., J. Oszmiański, and R. Czemerys, *Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs*. Food Chemistry, 2007. **105**(3): p. 940-949.

105. Porfírio, S., et al., *Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of Plectranthus barbatus tea, after in vitro gastrointestinal metabolism*. Food Chemistry, 2010. **122**(1): p. 179-187.
106. Tepe, B., et al., *Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae)*. Food Chemistry, 2005. **90**(3): p. 333-340.
107. Huang, D., B. Ou, and R.L. Prior, *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(6): p. 1841-1856.
108. MacDonald-Wicks, L.K., L.G. Wood, and M.L. Garg, *Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006. **86**(13): p. 2046-2056.
109. Singleton, V.L. and J.A. Rossi, *Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents*. American Journal of Enology and Viticulture, 1965. **16**(3): p. 144-158.
110. Everette, J.D., et al., *Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(14): p. 8139-8144.
111. Magalhães, L.M., et al., *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties*. Analytica Chimica Acta, 2008. **613**(1): p. 1-19.
112. Oktay, M., İ. Gülçin, and Ö.İ. Küfrevioğlu, *Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (Foeniculum vulgare) seed extracts*. LWT - Food Science and Technology, 2003. **36**(2): p. 263-271.
113. Riss, T., et al., *Cell viability assays*. 2004.
114. Fekkes, D., *State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1996. **682**(1): p. 3-22.
115. Domingues, D.S., et al., *Detection of roasted and ground coffee adulteration by HPLC by amperometric and by post-column derivatization UV-Vis detection*. Food Chemistry, 2014. **146**(0): p. 353-362.
116. Jámbor, A. and I. Molnár-Perl, *Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride: Literature overview and further study*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(15): p. 3064-3077.
117. Zhang, X., et al., *Rapid resolution liquid chromatography (RRLC) analysis of amino acids using pre-column derivatization*. Journal of Chromatography B, 2012. **906**(0): p. 91-95.
118. Oravec, P. and D. Podhradský, *High-performance liquid chromatography of amino acids after derivatization with 9-isothiocyanatoacridine*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1995. **30**(2-3): p. 145-152.
119. Lavilla, I., et al., *Greener derivatization in analytical chemistry*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014. **61**(0): p. 1-10.
120. Gatti, R., et al., *2,5-Dimethyl-1H-pyrrole-3,4-dicarbaldehyde as a precolumn derivatization reagent for HPLC/UV detection of amino acids*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. **53**(2): p. 207-211.
121. González-Castro, M.J., et al., *Determination of Amino Acids in Green Beans by Derivatization with Phenylisothiocyanate and High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection*. Journal of Chromatographic Science, 1997. **35**(4): p. 181-185.
122. Elkin, R.G. and A.M. Wasynczuk, *Amino acid analysis of feedstuff hydrolysates by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate and reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Cereal Chem, 1987. **64**(4): p. 226-229.
123. Santos Neto, Á.J., *Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida*. Scientia Chromatographica, 2010. **2**(1): p. 71-81.

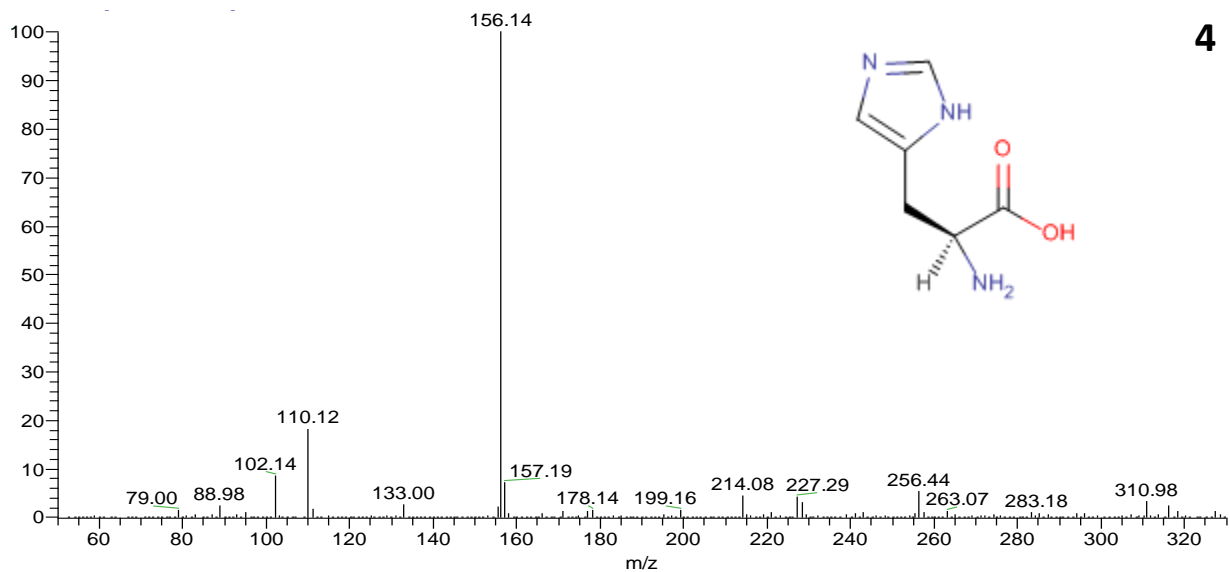
124. Borges, E.M., K. Goraieb, and C.H. Collins, *O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações*. Química Nova, 2012. **35**: p. 993-1003.
125. Lanças, F.M., *Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)*. Scientia Chromatographica, 2012. **4**(1): p. 13-19.
126. Souza, J., Z.M.F. Freitas, and S. Storpirtis, *Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **43**(4): p. 515-527.
127. Falé, P.L., Ferreira, C., Rodrigues, A. M., Frazão, F. N. and Serralheiro, M. L. M., *Studies on the molecular mechanism of cholesterol reduction by Fraxinus angustifolia, Peumus boldus, Cynara cardunculus and Pterospartum tridentatum infusions*. Medicinal Plants Research 2014. **8**: p. pp. 9-17.
128. Falé, P.L., et al., *Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of Annona cherimola leaves*. Journal of Ethnopharmacology, 2013. **150**(2): p. 718-723.
129. Tsuji, A. and I. Tamai, *Carrier-Mediated Intestinal Transport of Drugs*. Pharmaceutical Research, 1996. **13**(7): p. 963-977.
130. HAGIHIRA, H., et al., *Intestinal absorption of amino acids*. The Journal of Biochemistry, 1960. **47**(1): p. 139-143.
131. Mailliard, M.E., B.R. Stevens, and G.E. Mann, *Amino acid transport by small intestinal, hepatic, and pancreatic epithelia*. Gastroenterology, 1995. **108**(3): p. 888-910.
132. Ribeiro, M.J.d.S., *Estudo da atividade antioxidante, inibição do enzima AChE e interação com sinvastatina (fármaco inibidor da biossíntese do colesterol)*. 2014.
133. Loizzo, M.R., et al., *Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of Annona cherimola Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents*. Journal of Food Composition and Analysis, 2012. **25**(2): p. 179-184.
134. Fu, L., et al., *Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits*. Food Chemistry, 2011. **129**(2): p. 345-350.
135. Moure, A., et al., *Natural antioxidants from residual sources*. Food Chemistry, 2001. **72**(2): p. 145-171.
136. Chung, K.-T., et al., *Tannins and Human Health: A Review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1998. **38**(6): p. 421-464.
137. Sengul, M., et al., *Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants*. Pak J Pharm Sci, 2009. **22**(1): p. 102-106.
138. Bajpai, M., et al., *Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants*. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2005. **56**(4): p. 287-291.
139. Melo, E.d.A., et al., *Capacidade antioxidante de frutas*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2008. **44**: p. 193-201.
140. Gupta-Elera, G., et al., *The antioxidant properties of the cherimoya (Annona cherimola) fruit*. Food Research International, 2011. **44**(7): p. 2205-2209.

VIII. ANEXOS

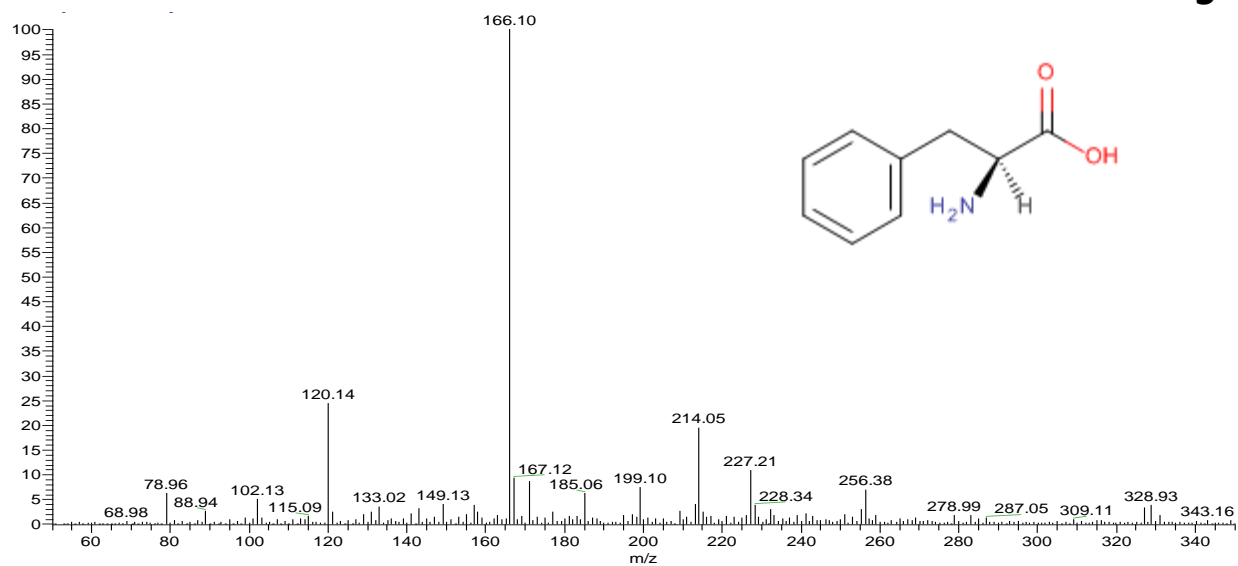
ANEXO A- Espectros resultantes da análise por injeção direta no MS e MS/MS dos aminoácidos individuais e da mistura padrão utilizada Ácido aspártico (1), Arginina (2), Ácido glutâmico (3), Histidina (4), Fenilalanina (5), Glicina (6), Metionina (7), Lisina (8), Leucina (9), Prolina (10), Tirosina (11), Alanina (12), Mistura padrão (13)



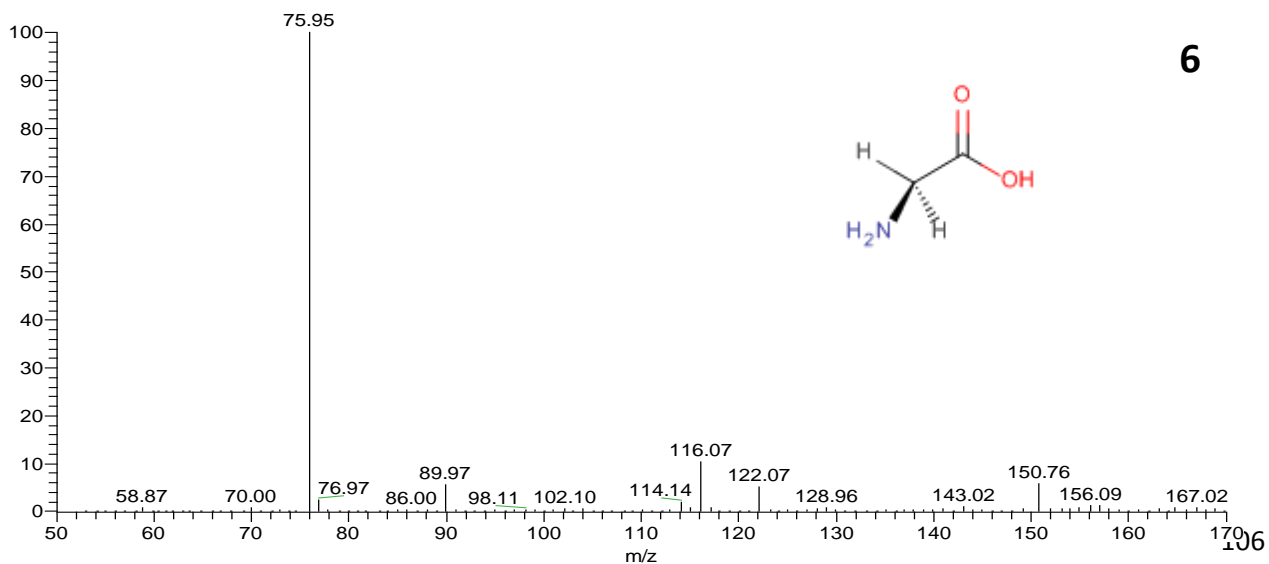
4



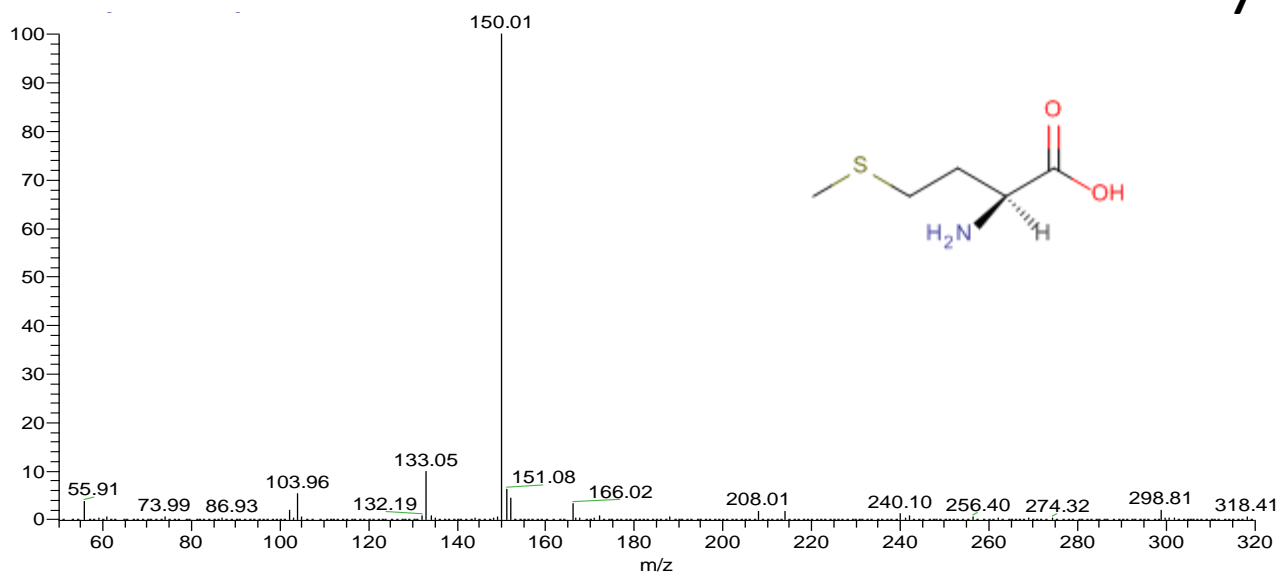
5



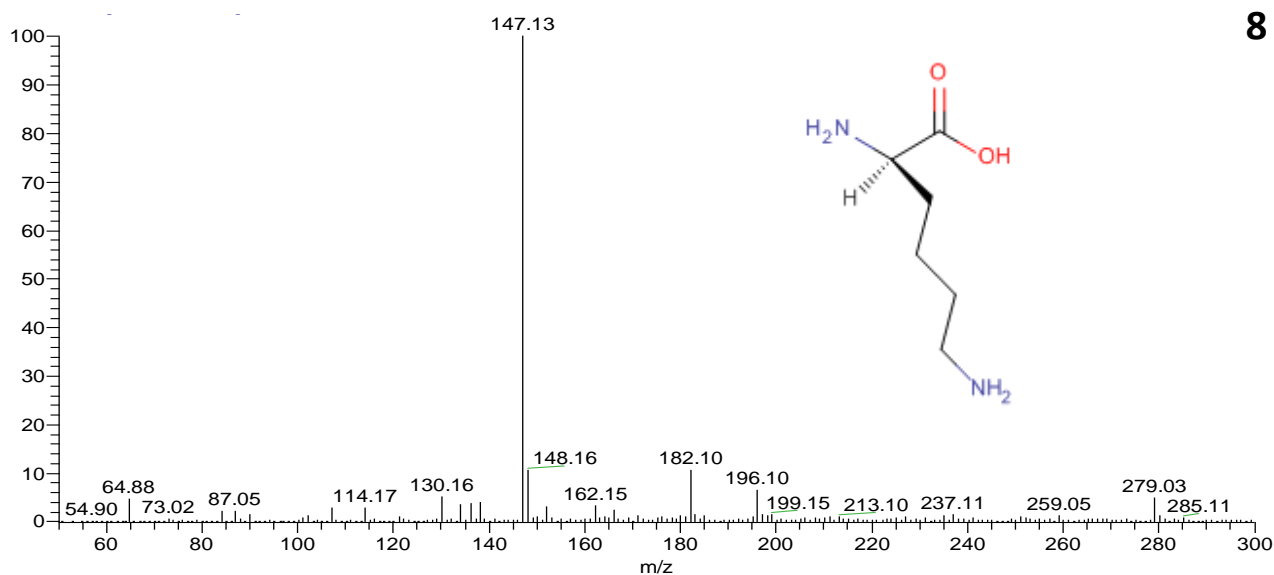
6



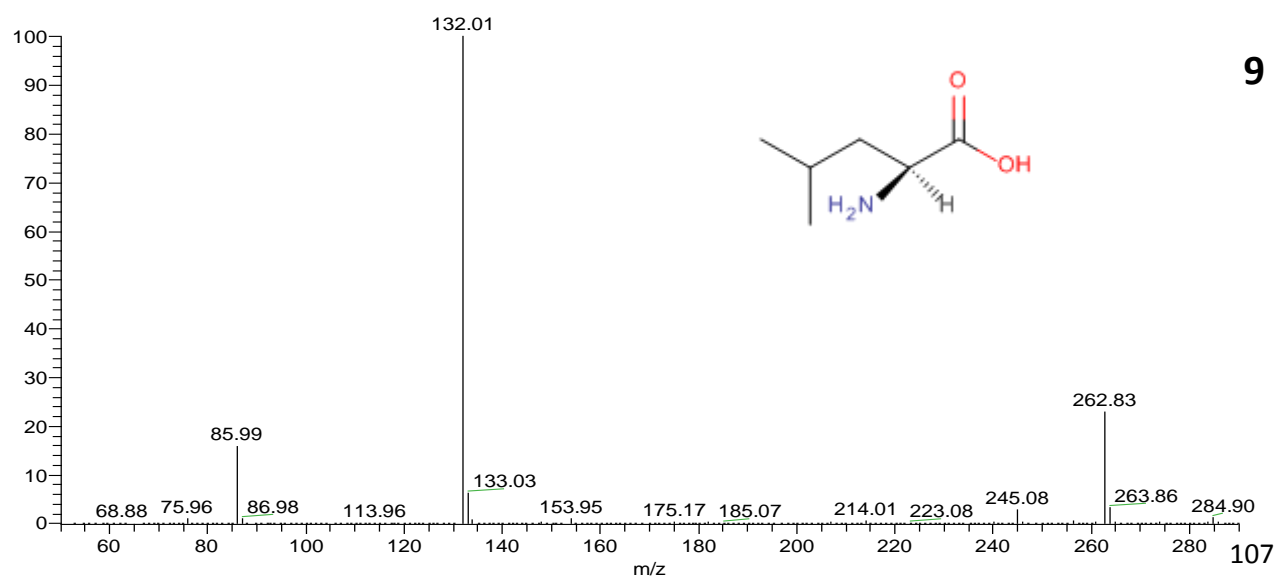
7



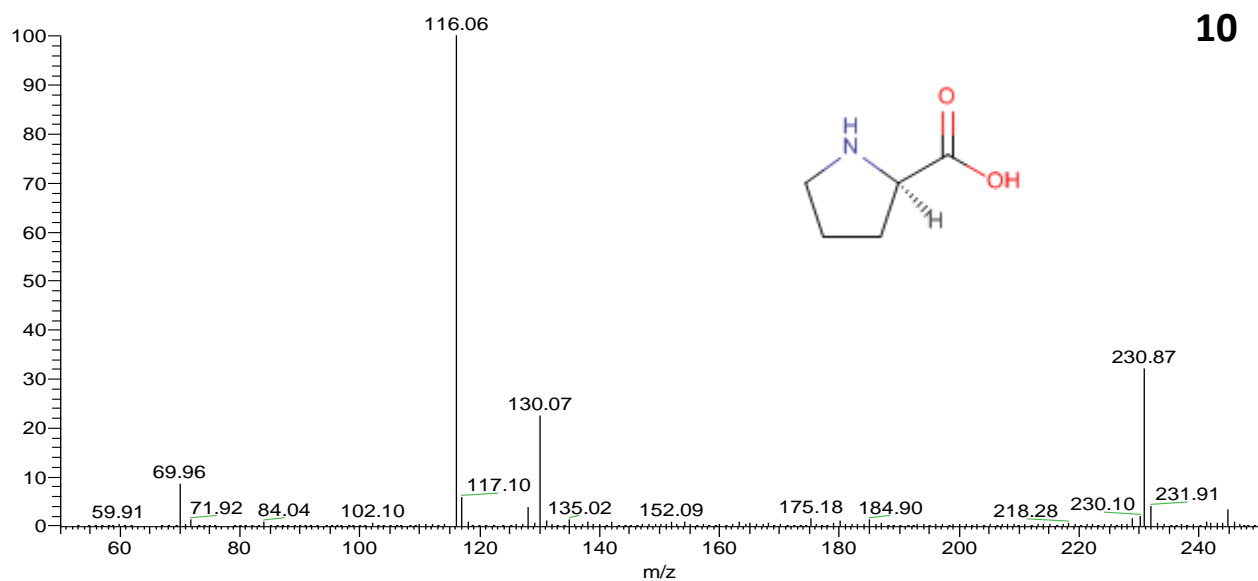
8



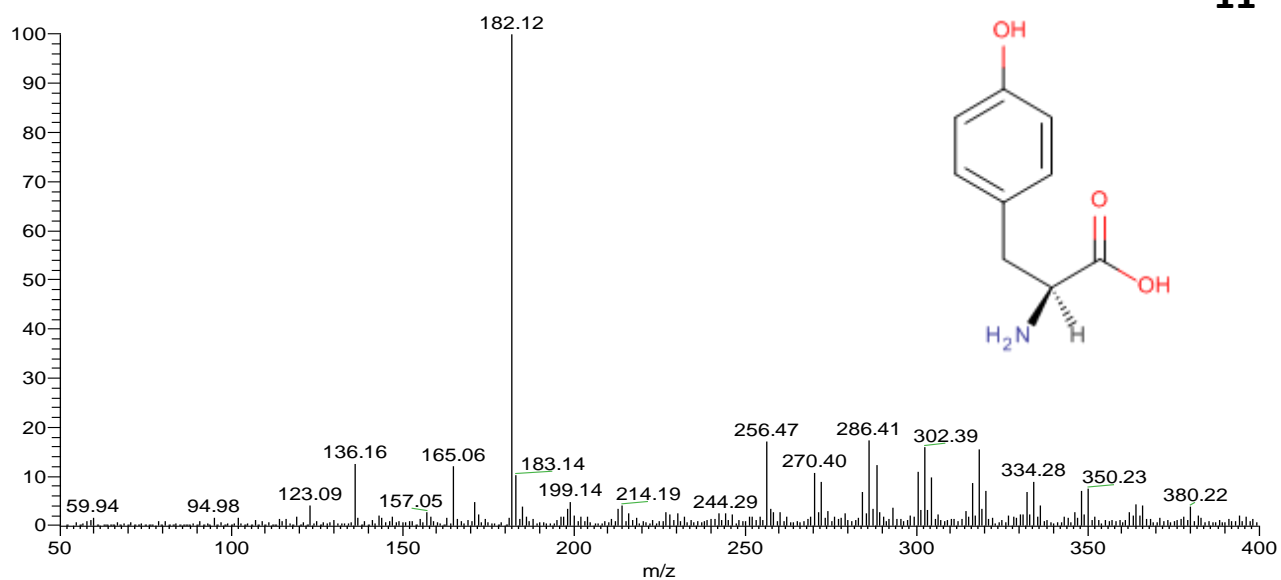
9



10



11



12

