



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
GRUPO DE PESQUISAS EM QUÍMICA ANALÍTICA E EDUCAÇÃO**



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**“Extração, Purificação e Isolamento de Antocianinas
de Jambolão (*Syzygium cuminii*) e Avaliação dos seus
Efeitos Biológicos”**

**AUTORA: DANIELLA DIAS PALOMBINO DE CAMPOS
ORIENTADORA: PROFa. DRa. ADRIANA VITORINO ROSSI
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. HIROSHI AYOAMA**

JULHO/2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

C15e Campos, Daniella Dias Palombino de.
Extração, purificação e isolamento de antocianinas
de jambolão e avaliação dos seus efeitos biológicos
(*Syzygium cuminii*) / Daniella Dias Palombino de
Campos. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.

Orientadora: Adriana Vitorino Rossi.

Co-orientador: Hiroshi Aoyama.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Antocianinas. 2. *Syzygium cuminii*. 3. Jambolão.
4. Efeitos biológicos. I. Rossi, Adriana Vitorino.
II. Aoyama, Hiroshi. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Título em inglês: Extraction, purification and isolation of anthocyanins from *Syzygium cuminii* and evaluation of their biological activities

Palavras-chaves em inglês: Anthocyanins, *Syzygium cuminii*, Biological activities, Jambolão

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na Área de Química Analítica

Banca examinadora: Adriana Vitorino Rossi (orientadora), Hiroshi Aoyama (co-orientador), Susanne Rath, Yassuco Iamamoto, Nivaldo Bacchan e Éder Tadeu Gomes Cavalheiro

Data de defesa: 31/07/2006

"O Senhor te abrirá o seu bom tesouro, o céu, para dar chuva à tua terra no seu tempo, e para abençoar toda a obra das tuas mãos; e emprestarás a muitas gentes..."

Deuteronômio 28:12

Aos meus pais Maria José e José Carlos
por todo apoio e carinho.

Ao meu esposo Eliseu,
por toda compreensão e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de vida e sabedoria.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais Maria José e José Carlos, aos meus irmãos Adriana, André e Carlos Vinícius, à Nina e ao meu esposo Eliseu, por todo o incentivo e apoio em todos os momentos que precisei.

Agradeço a todos os professores que muito contribuíram para a minha formação. Em especial, à professora Dra. Susanne Rath que me ensinou os primeiros passos no desenvolvimento de pesquisas científicas. Ao professor Dr. Hiroshi Aoyama por toda sabedoria e amizade que demonstrou ao me orientar durante minha iniciação científica e na co-orientação desta dissertação. À professora Dra. Adriana Vitorino Rossi pela orientação cuidadosa e exigente desta dissertação, por todos os seus ensinamentos e pela sua amizade.

Às professoras Dra. Carla B. G. Bottoli e Dra. Raquel M. Braga pela avaliação cuidadosa deste trabalho e pelas sugestões apresentadas para seu aprimoramento por ocasião do exame de qualificação. Às professoras doutoras Susanne Rath e Yassuco Yamamoto pelas correções e valiosas sugestões dadas por ocasião da defesa desta dissertação.

Agradeço com muito carinho à professora Dra. Carmen Veríssima Ferreira por todo o auxílio durante os testes biológicos em cultura de células. À Daniele Araújo e Maria Eleonora Picoli pelo auxílio nos testes biológicos *in vivo*.

À todos os amigos do laboratório de Enzimologia, em especial à Erika, Luciana, William, Roberta e Camila, pela amizade e companheirismo, e aos amigos do GPQUAE, em especial à Acácia, pelo apoio e amizade. Agradeço ao Márcio André Miranda e à Daniela Brotto Lopes Terzi por todas as sugestões para o desenvolvimento deste trabalho e pela valiosa atenção.

Aos amigos de graduação Talitha, Viviane, Sérgio e Maurício, pelos “ombros-amigos”, incentivo e amizade. Em especial, agradeço ao Rodolfo que muito me ajudou na análise fatorial, além de ser um grande amigo.

Agradeço ao suporte técnico de Paulo Baldasso e Ricardo Pereira pela colaboração nas análises cromatográficas e a Wilson Floriano pela exsicata do jambolão.

A toda a direção e aos funcionários dos Institutos de Química e de Biologia da UNICAMP pelo apoio acadêmico e técnico.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro deste projeto.

CURRÍCULO DA AUTORA

A autora desta Dissertação de Mestrado formou-se em Química na modalidade Bacharelado em 2003 e na modalidade Licenciatura em 2005, pela Universidade Estadual de Campinas. Durante a graduação, realizou dois projetos de Iniciação Científica. O primeiro, na área de Química Analítica, desenvolvendo métodos para quantificação dos antibióticos amoxicilina e ampicilina em fármacos. Este projeto, intitulado “Controle de Qualidade de Antibióticos β -lactâmicos: Amoxicilina e Ampicilina” foi desenvolvido no período de 01/05/2000 à 01/05/2001 e contemplado com bolsa de estudos da FAPESP (processo 00/00781-2), sob orientação da Profa. Dra. Susanne Rath. O segundo projeto foi na área de bioquímica, intitulado “Identificação e Caracterização Cinética de Fosfatase Ácida de Membrana de Linfócitos Humanos e Efeito de Flavonóides sobre a Atividade Fosfatásica”, desenvolvido no período de 01/01/2002 à 01/01/2003, também contemplado com bolsa FAPESP, processo 01/11886-2, sob orientação do Prof. Dr. Hiroshi Aoyama. Em março de 2003, foi aprovada no Programa de Mestrado do Instituto de Química da UNICAMP, onde desenvolveu o projeto “Extração, Purificação e Isolamento de Antocianinas de Jambolão (*Syzygium cumini*) e Avaliação dos seus Efeitos Biológicos”, com bolsa do CNPq sob orientação da Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi. cursou 42 créditos, tendo sido aprovada com o conceito máximo em todas as disciplinas, sendo estas: Métodos Analíticos Aplicados à Determinação de Traços, ministrada pelos professores doutores Luiz Manoel Aleixo (*in memoriam*), Solange Cadore e Nivaldo Baccan; Bioanalítica: Química Farmacêutica e Clínica, ministrada pelos professores doutores Lauro Kubota e Susanne Rath; Química de Proteínas, ministrada pelo professor doutor Sérgio Marangoni; e Enzimologia, ministrada pelo Prof. Dr. Hiroshi Aoyama. Realizou ainda 3 cursos extracurriculares com duração de 6 horas cada: “Mecanismos de Reações Enzimáticas” ministrado pela professora doutora Kaethy Bisan Alves, “Bioquímica do Câncer” e “Bioquímica da Cozinha”, ambos supervisionados pelo Prof. Dr. Bayardo B. Torres. Durante seu trabalho acadêmico

participou de 8 congressos científicos, tendo apresentado 10 trabalhos na forma de painéis.

Além das atividades acadêmicas e de pesquisa, atualmente a autora ministra aulas de Química e Física na Escola Estadual Culto à Ciência em Campinas e foi aprovada no concurso público de prova e títulos para provimento de cargo de professor de Química Educação Básica II em nível de Estado, com homologação publicada no DOE de 28/04/2004.

Para maior detalhes, consultar Currículo Lattes.

RESUMO

“Extração, Purificação e Isolamento de Antocianinas de Jambolão (*Syzygium cuminii*) e Avaliação dos Seus Efeitos Biológicos”

Autora: Daniella Dias Palombino de Campos

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi

Co-orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Antocianinas são os principais pigmentos naturais responsáveis pelas colorações vermelha, azul e púrpura de uma grande variedade de flores e frutos e vêm sendo empregadas como corantes alimentícios e indicadores de pH. As antocianinas pertencem à família dos flavonóides, compostos polifenólicos cujas propriedades biológicas vem sendo extensamente descritas na literatura. Apesar da abundância de antocianinas na natureza, padrões comerciais apresentam custo elevado e disponibilidade escassa. Este trabalho teve como objetivo otimizar procedimentos de extração, identificação (por cromatografia líquida de alta eficiência), purificação (emprego de extração em fase sólida) e isolamento (cromatografia líquida de alta eficiência) de antocianinas extraídas de jambolão (*Syzygium cuminii*), fruto tipicamente encontrado no Brasil, para a realização de testes biológicos. Os extratos com concentração de antocianinas totais igual a $0,8 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ ($1,7 \pm 0,4 \text{ mmol L}^{-1}$), foram obtidos por imersão das cascas de jambolão em água na proporção 1:3 (m/v), identificando-se delphinifina-3-glicosídeo, cianidina-3-galactosídeo, petunidina-3-galactosídeo e pelargonidina-3-arabinosídeo. Nos ensaios *in vitro*, extrato purificado de antocianinas $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ promoveu cerca de 90% de morte celular em cultura de células da linhagem da leucemia mielóide humana (HL60) e apenas 20% de morte de células saudáveis. Nos ensaios *in vivo*, camundongos foram injetados com extrato antociânico purificado 20 mmol L^{-1} (cada animal recebeu o equivalente a 10 mg de antocianina por kg corpóreo). Testou-se a influência das antocianinas na atividade de enzimas fosfatases de plasma sanguíneo, rim e fígado destes animais, verificando-se alteração nas atividades destas enzimas. As alterações mais significativas foram observadas no plasma sanguíneo, onde as fosfatases ácida total (FAT) e de baixa massa molecular relativa (FABMr) foram inibidas em 50 % e 70 % respectivamente.

ABSTRACT

“Extraction, Purification and Isolation of Anthocyanins from *Syzygium cuminii* and Evaluation of their Biological Effects”

Author: Daniella Dias Palombino de Campos

Adviser: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi

Co-adviser: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Anthocyanins, the natural pigments chiefly responsible for red, blue and purple hues in a great range of flowers and fruit, are used as food dye and pH indicators. Anthocyanins are a member of the family of flavonoids, polyphenolic compounds whose biological properties have been extensively described in literature. Even though anthocyanins are plentiful in nature, standard commercial anthocyanin have high cost and are produced by very few industries. This work was aimed at optimizing extraction procedures and identification (by High Performance Liquid Chromatography - HPLC and paper chromatography methods), purification (by solid phase extraction) and isolation (by HPLC) methods of anthocyanins extracted from *Syzygium cuminii* (a fruit readily found in Brazil), so as to conduct biological tests. Anthocyanin extracts with total concentrations of $0.8 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ ($1.7 \pm 0.4 \text{ mmol L}^{-1}$), were obtained by immersion of *Syzygium cuminii* skin in water, at the proportion (1:3, w/v). Delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-galactoside, petunidin-3-galactoside and pelargonidin-3-arabinoside were identified. In *in vitro* tests, the purified anthocyanin extract ($400 \mu\text{mol L}^{-1}$) killed around 90% of the human myleoid leukemia cells (HL60) in a culture, whereas it only killed 20% of the cells from a healthy culture. As for *in vivo* tests, mice received injections of purified anthocyanin extract 20 mmol L^{-1} (each animal received a dose equivalent to 10 mg of anthocyanin extract per kg of body weight). Tests were conducted to assess the influence of anthocyanins over the activity of phosphatase enzymes in plasma, kidney and liver of the animals. Enzyme activity was effectively altered by anthocyanin extract injections, and the most significant alterations were observed in plasma, where enzymatic activity of total acid phosphatase (TAP) and low relative molecular weight phosphatase (LMW-PTP) were inhibited by 50% and 70%, respectively.

SUMÁRIO

Capítulo 1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
--	----------

Capítulo 2. OBJETIVOS GERAIS.....	5
--	----------

PARTE 1: ASPECTOS ANALÍTICOS

Capítulo 3. INTRODUÇÃO.....	11
------------------------------------	-----------

3.1. Compostos Polifenólicos.....	13
-----------------------------------	----

3.2. Antocianinas.....	14
------------------------	----

3.3. Obtenção de Antocianinas a partir de Vegetais	17
--	----

3.3.1. Extração.....	17
----------------------	----

3.3.2. Purificação	18
--------------------------	----

3.3.3. Separação ou Isolamento	19
--------------------------------------	----

3.4. Métodos de Identificação de Antocianinas.....	20
--	----

3.5. Métodos de Quantificação das Antocianinas	22
--	----

Capítulo 4. OBJETIVOS.....	25
-----------------------------------	-----------

Capítulo 5. PARTE EXPERIMENTAL.....	29
--	-----------

5.1. Considerações Gerais.....	31
--------------------------------	----

5.2. Equipamentos, Materiais e Reagentes.....	31
---	----

5.3. Procedimentos Experimentais.....	33
---------------------------------------	----

5.3.1. Quantificação das Antocianinas	33
---	----

5.3.2. Otimização da Extração de Antocianinas.....	33
--	----

5.3.2.1. Estudo de Temperatura x Rendimento de Extração.	33
--	----

5.3.2.2. Avaliação do Melhor Rendimento de Extração	34
---	----

5.3.3. Identificação das Antocianinas.....	35
--	----

5.3.3.1. Cromatografia em Papel (PC).....	35
---	----

5.3.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	35
---	----

5.3.4. Purificação do Extrato de Antocianinas.....	36
--	----

5.3.4.1. Detecção de Açúcares.....	36
5.3.4.2. Detecção de Ácidos Orgânicos.....	37
5.3.5. Isolamento das Antocianinas.....	37
Capítulo 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
6.1. Quantificação das Antocianinas	41
6.2. Otimização da Extração de Antocianinas de Jambolão.....	42
6.2.1. Espectro de Absorção das Antocianinas.....	42
6.2.2. Efeito do Tempo e Temperatura na Extração	43
6.2.3. Avaliação do Melhor Sistema de Extração.....	44
6.3. Identificação das Antocianinas.....	50
6.3.1. Cromatografia em Papel.....	50
6.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	51
6.4. Purificação do Extrato de Antocianinas.....	54
6.4.1. Detecção de Açúcares.....	54
6.4.2. Detecção de Ácidos Orgânicos.....	55
6.4.3. Avaliação da Purificação do Extrato.....	56
6.5. Isolamento das Antocianinas.....	59
Capítulo 7. CONCLUSÕES	61
PARTE 2: ASPECTOS BIOLÓGICOS	
Capítulo 8. INTRODUÇÃO.....	67
8.1. Propriedades Biológicas dos Flavonóides.....	69
8.2. Enzimas Fosfatases.....	71
8.3. Bioensaios.....	73
8.4. Linfócitos Humanos.....	75
8.5. Linhagem Celular da Leucemia Mielóide Humana (HL60).....	76
Capítulo 9. OBJETIVOS.....	77

Capítulo 10. PARTE EXPERIMENTAL.....	81
10.1. Reagentes, Materiais e Equipamentos.....	83
10.2. Procedimentos Experimentais	83
10.2.1. Ensaio <i>in vitro</i>	83
10.2.2. Ensaio <i>in vivo</i>	85
Capítulo 11. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	89
11.1. Ensaio <i>in vitro</i> : Avaliação do Efeito de Antocianinas em Cultura de Linfócitos Sadios e Células Tumorais – Linhagem HL60.....	91
11.2. Ensaio <i>in vivo</i> : Avaliação do Efeito de Antocianinas em Fosfatases de Camundongos.....	92
11.2.1. Efeito das Antocianinas na Concentração de Proteínas	93
11.2.2. Efeito das Antocianinas em Fosfatases	94
Capítulo 12. CONCLUSÕES.....	101
Capítulo 13: CONCLUSÕES GERAIS.....	105
Capítulo 14: PERSPECTIVAS FUTURAS.....	109
Capítulo 15: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

ABREVIATURAS

AE – atividade enzimática específica

AREs – extratos ricos em antocianinas (do inglês anthocyanins rich extract)

Cy-3-glu – cianidina-3-glicosídeo

FABMr – fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa

FAlc – fosfatase alcalina

FAT – fosfatase ácida total

FATR – fosfatase ácida resistente ao tartarato

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês high performance liquid chromatography)

Mr – massa molecular relativa

MS – espectrometria de massas (do inglês mass spectroscopy)

MTT - brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)

m/v – razão entre massa e volume

NMR – ressonância magnética nuclear (do inglês nuclear magnetic resonance)

PC – cromatografia em papel (do inglês paper chromatography)

pHMB – p-hidroximercuribenzoato

pNP – p-nitrofenol

pNPP – p-nitrofenilfosfato

PVP – polivinilpirrolidona

R_F – fator de retardamento

rpm – rotações por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SPE – extração em fase sólida (do inglês solid phase extraction)

T_R – tempo de retardamento

UE – atividade enzimática

UV-Vis –ultravioleta-visível

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Fatores escolhidos para o planejamento fatorial e seus níveis.....	45
Tabela 2. Experimentos de otimização da extração das antocianinas de jambolão	46
Tabela 3. Efeitos principais calculados para cada fator.....	47
Tabela 4. Efeitos de interação entre os fatores.....	47
Tabela 5. Valores de variância e erro dos efeitos.....	49
Tabela 6. Tempos de retardamento das antocianinas	52
Tabela 7. Dados da purificação das antocianinas por SPE.....	58
Tabela 8. Dados da purificação das antocianinas por SPE.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química genérica dos flavonóides.....	13
Figura 2. Estrutura genérica das antocianinas.....	14
Figura 3. Variação nas estruturas das antocianinas em função do pH.....	16
Figura 4. Espectros eletrônicos UV-VIS das antocianinas em diferentes solventes....	42
Figura 5. Estudo da influência do tempo de extração das antocianinas a 25 °C.....	43
Figura 6. Estudo da influência do tempo de extração das antocianinas a 46 °C.....	43
Figura 7. Cromatograma do extrato antociânico de jambolão obtido por PC.....	50
Figura 8. Cromatograma para o extrato de jambolão por HPLC	51
Figura 9. Teste de detecção de açúcares.....	54
Figura 10. Teste de detecção de ácidos orgânicos.....	55
Figura 11. Comparação de padrões de ácidos orgânicos por PC.....	56
Figura 12. Detecção de açúcares durante a purificação dos extratos antociânicos.....	56
Figura 13. Detecção de ácidos orgânicos na purificação dos extratos por SPE.....	57
Figura 14. Cromatograma referente ao isolamento das antocianinas.....	60
Figura 15. Efeito citotóxico de antocianinas em cultura de células sadias e HL60.....	92
Figura 16. Efeito de antocianinas no conteúdo total de proteínas de camundongos....	94
Figura 17. Mecanismo catalítico das Proteínas Tirosinas Fosfatases.....	95
Figura 18. Efeito de antocianinas nas fosfatases de fígado de camundongos.....	96
Figura 19. Efeito de antocianinas nas fosfatases de rim de camundongos.....	98
Figura 20. Efeito de antocianinas em fosfatases plasmáticas de camundongos.....	99

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

As porfirinas, os carotenóides e os flavonóides correspondem às principais classes de pigmentos responsáveis pela coloração de flores, frutos e folhas (Alkema e Seager, 1982). As antocianinas são polifenóis pertencentes à família dos flavonóides que se responsabilizam pelas colorações vermelha, azul e púrpura de flores e frutos (Brouillard e Harborne, 1988). A função primária das antocianinas nas plantas é, sem dúvidas, atrair insetos e pássaros com o objetivo de promover a polinização e dispersão das sementes (Harborne, 1967).

Apesar da abundância das antocianinas na natureza, o isolamento destes compostos, do ponto de vista químico, pode ser considerado um desafio, visto que são instáveis quando expostos à luz e quando estão em meios alcalinos (Harborne, 1967). Além disso, seu isolamento requer grandes quantidades de material de partida e sua secagem é muito difícil, sendo facilmente hidrolisáveis. Talvez estes motivos aliados à baixa demanda comercial das antocianinas, expliquem porque padrões comerciais de antocianinas apresentam preço elevado e nem sempre são comercialmente disponíveis.

Apesar dessa aparente dificuldade comercial, as antocianinas, como outros flavonóides, têm despertado um interesse crescente em vários segmentos industriais como, por exemplo, pelas indústrias farmacêuticas que as comercializam na forma de fitoterápicos (Scharrer e Ober, 1981), na área cosmética, fazendo parte de formulações na forma de extratos naturais (Arct. *et. al.*, 2002) e na indústria alimentícia que as utiliza como corantes naturais em alimentos processados (Stringueta, 2000). Tais aplicações ilustram a importância dos estudos analíticos envolvendo a extração, a purificação e o isolamento de antocianinas.

No que diz respeito às suas atividades biológicas, muitas propriedades importantes foram descritas para os flavonóides, principalmente aquelas relacionadas com propriedades antioxidantes e seu papel inibitório na proliferação de células de câncer em cultura e em vários estágios de desenvolvimento tumoral estudados em animais (Miranda, 2000). Especificamente com relação às antocianinas, vários estudos vem sendo realizados recentemente para avaliação

dos possíveis efeitos biológicos destas moléculas. Embora já se saiba que as antocianinas são excelentes agentes anti-oxidante e anti-inflamatório (Wang *et. al.*, 1999), uma outra característica vem despertando mais interesse: seus efeitos antitumorais. Zhao e colaboradores (2004) atribuíram atividade anti-tumoral para as antocianinas em células tumorais do cólon e isto estimulou outros estudos que podem ser realizados com antocianinas para a verificação de suas propriedades biológicas, visto que estas apresentam muitas similaridades estruturais com outras classes de flavonóides.

Na tentativa de avaliação de outras propriedades biológicas das antocianinas, neste trabalho verificou-se o efeito anti-tumoral de antocianinas de jambolão em linhagem de células leucêmicas (HL-60) bem como a atividade destes pigmentos em enzimas fosfatases provenientes de camundongos, num estudo paralelo com flavonóides comerciais, cujas estruturas são semelhantes às das antocianinas.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS GERAIS

Há muitos estudos sobre a atividade biológica de flavonóides e em relação às antocianinas, em particular, apenas as atividades anti-oxidante e anti-inflamatória têm sido descritas com mais detalhes. Só recentemente, alguns estudos indicaram a atividade anti-tumoral desta classe de moléculas. Provavelmente, o motivo da pequena quantidade de estudos biológicos publicados utilizando-se as antocianinas esteja relacionado à dificuldade de obtenção de padrões destes pigmentos.

Visando obter quantidade suficiente de antocianinas para a realização de estudos biológicos, este trabalho apresentou como objetivos principais:

1. - desenvolver um método otimizado para extração de antocianinas de jambolão (*Syzygium cumini*), que é uma fruta muito comum no Brasil, mas pouco utilizada para consumo humano;
2. - promover a eliminação de açúcares e ácidos orgânicos para obter extratos de antocianinas purificados;
3. - isolar as antocianinas;
4. - identificar e quantificar as antocianinas extraídas;
5. - realizar testes biológicos *in vitro* para avaliar a sua atividade anti-tumoral
6. - realizar testes biológicos *in vivo* com as antocianinas obtidas para verificar sua atividade em enzimas fosfatases;

Para melhor organizar todo o material e facilitar a leitura, o trabalho é apresentado em 2 partes.

Parte 1 – Aspectos Analíticos, que trata dos objetivos 1 a 4.

Parte 2 – Aspectos Biológicos, envolvendo os objetivos 5 e 6.

PARTE 1

ASPECTOS ANALÍTICOS

CAPÍTULO 3

INTRODUÇÃO

3.1. Compostos Polifenólicos

Polifenóis são os agentes antioxidantes mais abundantes da dieta humana e encontram-se divididos em classes, sendo que as principais são os ácidos fenólicos e os flavonóides. Os polifenóis, junto com outros compostos redutores presentes na dieta humana, tais como vitamina C, vitamina E e carotenóides, protegem os tecidos do corpo contra estresse oxidativo e patologias associadas como cânceres, doenças coronarianas e inflamações (Tapiero *et al.*, 2002).

O consumo humano diário de flavonóides varia de 6 a 64 mg, podendo chegar até 1 g por dia. Estes compostos, exclusivamente produzidos por vegetais, são bastante encontrados em chás verdes, frutas, verduras, plantas medicinais, vinhos tintos e fitoterápicos. Mais de 4000 flavonóides já foram estudados, sendo conhecidas suas estruturas e atividades biológicas. São divididos em diferentes classes: antocianinas, flavanas, flavononas, flavonas, flavonóis e isoflavonóides (Miranda, 2000). Nas plantas, os flavonóides são encontrados ligados a açúcares como glicosídeos e são bastante estáveis. A Figura 1 apresenta a estrutura genérica comum a grande maioria dos flavonóides, sendo constituída pelo esqueleto carbônico C₆-C₃-C₆ (anéis A, B e C) comum a todos flavonóides, os quais são diferenciados apenas por insaturações, hidroxilações e substituições (Hertog *et al.*, 1993; Peterson e Dwyer, 1998).

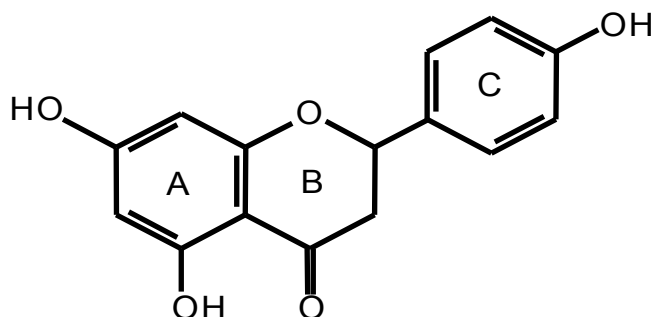


Figura 1. Estrutura química genérica dos flavonóides. Os anéis A e C são aromáticos e o anel B é um heterociclo contendo oxigênio vizinho a um carbono ligado ao anel C.

3.2. Antocianinas

O termo antocianina tem origem grega, sendo que “antho” significa flor e “kiano”, azul. Este termo foi primeiramente utilizado por Marquat em 1835 para designar os pigmentos azuis de flores. Atualmente, sabe-se que as antocianinas são responsáveis também pelas colorações violeta, vermelha e púrpura de uma grande variedade de espécies do reino vegetal. Dois contra-exemplos notáveis são os tomates e beterrabas cujas colorações vermelho-laranja e vermelho-púrpura são devidas à presença de licopeno e betaninas, respectivamente (Jackman *et. al.*, 1987).

Estruturalmente, as antocianinas são derivados glicosilados do cátion 2-fenil benzopirilium, também denominado de cátion flavílico, cuja estrutura encontra-se ilustrada na Figura 2 (Jackman *et. al.*, 1987).

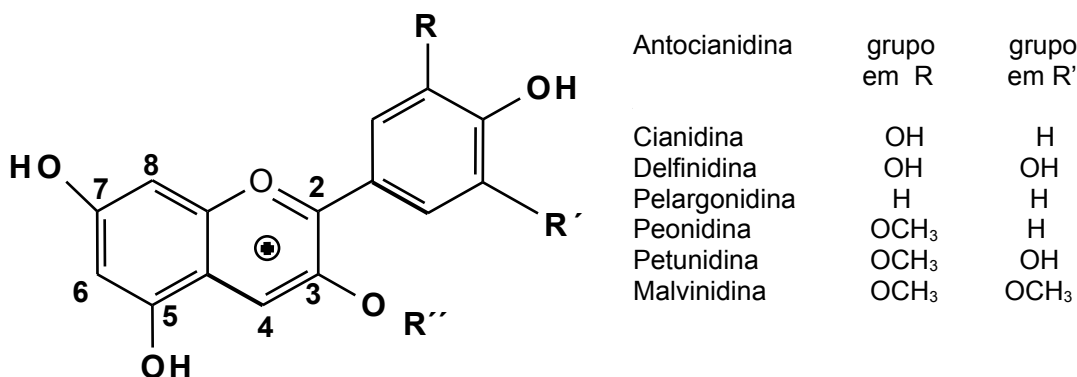


Figura 2. Estrutura genérica das antocianinas a partir do esqueleto das antocianidinas (agliconas). A substituição de R'' por uma ou mais unidades de açúcar na antocianidina resulta numa antocianina. Outras unidades de açúcares também podem ser ligadas pelos grupos OH nas posições 3, 5 e 7.

Os açúcares mais comumente ligados à estrutura molecular central, em geral nas hidroxilas das posições 3, 5 e 7, são monossacarídeos como glicose, galactose, arabinose, raminose, porém, podem apresentar-se também na forma de di e trissacarídeos. As variações estruturais das antocianinas denotam diferentes açúcares ligados, polimerização e nos modos ou posições de hidroxilação e metilação. Em alguns casos, os açúcares apresentam-se acilados

pelos ácidos p-coumárico, cafeico, fenílico e vanílico. A molécula de antocianina não glicosilada (aglicona) é denominada *antocianidina* e raramente ocorre na natureza, em geral, é resultante do processo de isolamento das antocianinas. O açúcar presente na estrutura das antocianinas confere maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos quando comparados com suas agliconas (Harborne, 1975; Jackman *et al.*, 1987; Lee e Hong, 1992; Terci e Rossi, 2002; Okumura *et al.*, 2002).

As antocianinas possuem a interessante propriedade de apresentarem cores diferentes dependendo do pH do meio em que se encontram, o que as torna de interesse para uso como indicadores de pH. As mudanças estruturais das moléculas ocorridas mediante a variação do pH, permitem a obtenção de soluções incolores ou coloridas, podendo ser vermelha, violeta, azul ou amarela como pode ser visto pela Figura 3 (Terci e Rossi, 2002).

As antocianinas estão presentes na alimentação humana sendo encontradas em diversos vegetais como: uva, maçã, feijão preto, morango, amora, jabuticaba, cerejas, jambolão, chicória, cenouras púrpuras, dentre outros, estando presente também em alimentos derivados de frutas como sucos, geléias, licores e vinhos (Jain e Seshadri, 1975; Goiffon *et al.*, 1991; Lee e Hong, 1992; Goiffon *et al.*, 1999; Chandra *et al.*, 2001; Lazcano *et al.*, 2001; Mataix e Castro, 2001; Okumura *et al.*, 2002; Terci e Rossi, 2002).

O crescente interesse na utilização de antocianinas como corantes alimentícios e em formulações de drogas e cosméticos tem gerado uma necessidade de desenvolver e/ou aprimorar métodos analíticos para a extração, purificação, identificação e quantificação destes pigmentos a partir de espécies vegetais, fato que justifica uma discussão sucinta dos métodos analíticos mais utilizados na realização de cada uma destas etapas.

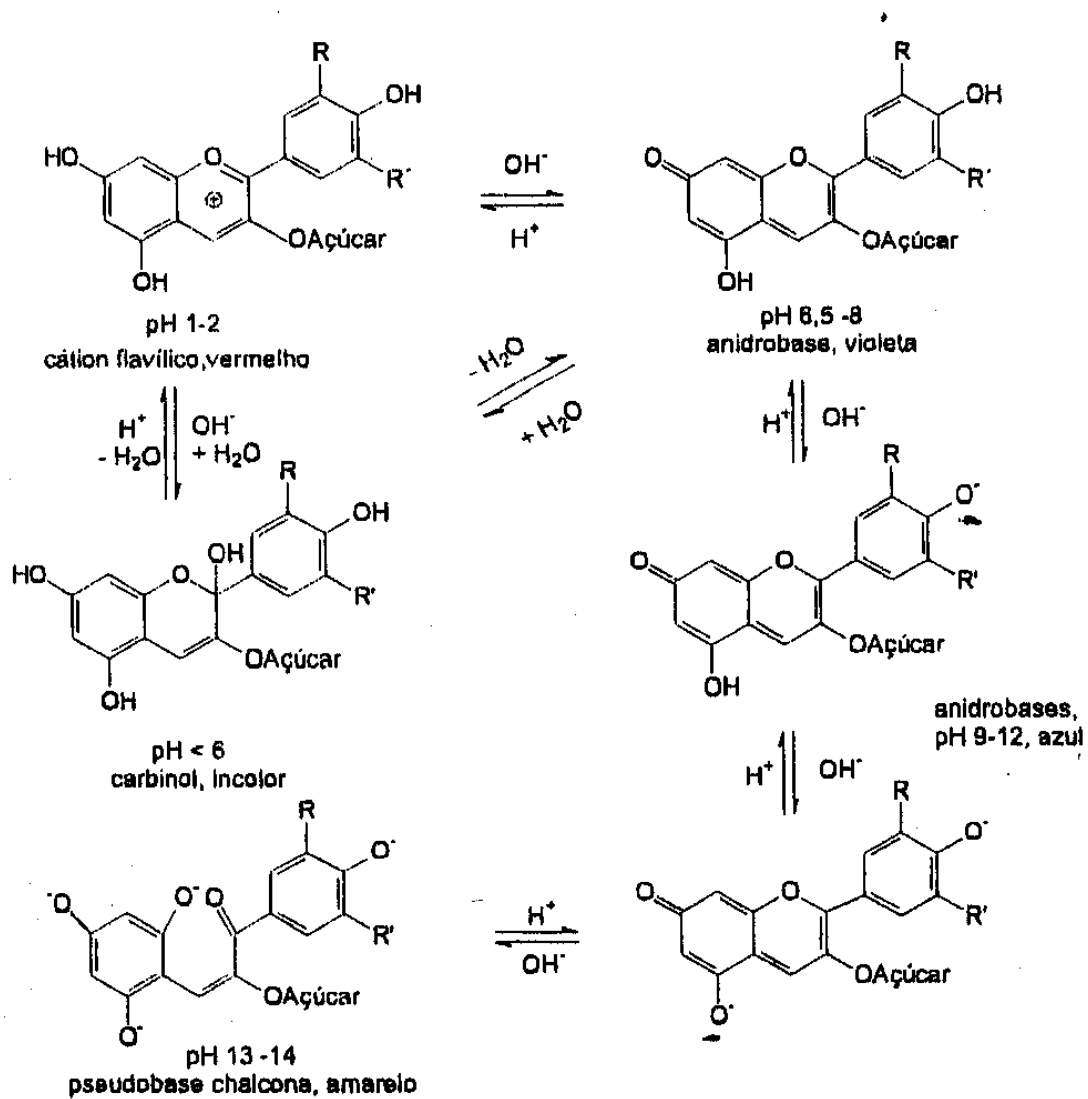


Figura 3. Variações nas estruturas das antocianinas em função do pH e conseqüente alteração da coloração das soluções em que se encontram (Terci e Rossi, 2002).

3.3. Obtenção de Antocianinas a partir de Vegetais

3.3.1 Extração

Muitos autores preocuparam-se em propor métodos de extração, separação e identificação de antocianinas provenientes de diversas fontes. Em extenso trabalho de revisão da literatura, Lee e Hong (1992) bem como Jackman e colaboradores (1987) descreveram os métodos utilizados por diferentes pesquisadores desde 1956. Mais atualmente tais métodos foram revistos por Terci (2004).

As antocianinas, muito solúveis em água, são facilmente extraídas de plantas utilizando-se soluções polares. O solvente mais utilizado na extração de antocianinas é o metanol, apesar da toxicidade. Entretanto, para algumas aplicações onde o aspecto quantitativo não é prioritário, etanol e água também têm sido utilizados. A limitação do uso de etanol e água está relacionada com a menor eficiência na extração de antocianinas. Metanol é 20% mais eficiente que etanol e 73% mais efetivo que a água (Terci, 2004).

Muitos pesquisadores empregaram solventes alcoólicos acidificados, por exemplo, HCl (1% v/v) em metanol, visto que o ácido previne a oxidação das antocianinas. Porém, Jackman e colaboradores (1987) advertiram que a concentração do ácido clorídrico em metanol não deve ser superior a 0,05%. Na tentativa de estabilizar a antocianina, o ácido modifica a forma nativa do pigmento, devido ao rompimento das associações com metais e co-pigmentos, podendo levar à decomposição de pigmentos acilados.

A temperatura é outro fator importante na extração de antocianinas. Segundo Okumura *et al.* (2002), a hidrólise completa dos açúcares ligados a antocianinas ocorre em 1 hora a 60°C na presença de etanol acidificado com 1% de HCl, ou quando o extrato etanólico é evaporado sob aquecimento para eliminação do solvente. Desta forma, segundo os autores, para que a extração seja realizada em sistemas aquecidos deve-se trabalhar com temperaturas inferiores a 60°C e a evaporação do solvente deve ser realizada à temperatura ambiente, ou inferior à 40°C, com evaporadores a vácuo.

Segundo revisão realizada por Terci 2004, os autores Revilla e colaboradores (1998) compararam diversos métodos descritos na literatura para extração de antocianinas de uvas e, pelos resultados obtidos, concluíram que a quantidade total de antocianinas extraídas é influenciada pelo tempo de extração e pela acidificação do solvente extrator. Os resultados mostraram que em 48 h de extração obteve-se um acréscimo de 20% na quantidade de antocianinas obtidas quando comparado a uma extração realizada em 20 h. Em relação ao solvente extrator, a acidificação deste com 1% (v/v) de ácido mineral repercutiu em um acréscimo de 7% na quantidade de antocianinas extraídas.

Geralmente, após a extração das antocianinas, os extratos brutos são concentrados utilizando-se evaporadores rotativos a vácuo com temperaturas inferiores a 40°C até massa constante, o que resulta em um resíduo viscoso (Pazminõ-Durán et al., 2001; Soares e Cavalheiro, 2001).

O extrato bruto antociânico contém, além dos pigmentos de interesse, outros compostos fenólicos, e ainda açúcares e ácidos orgânicos. Portanto, estes extratos devem ser previamente purificados para as aplicações biológicas.

3.3.2 Purificação

Após a extração, geralmente os extratos antociânicos são purificados com o objetivo de serem obtidas as antocianinas totais, eliminando-se compostos como açúcares, ácidos orgânicos, polissacarídeos solúveis, proteínas e cátions. Vários métodos têm sido utilizados com sucesso para a purificação de antocianinas, destacando-se entre estes a precipitação com acetato de chumbo, extração líquido-líquido, extração com resina de troca iônica e extração em fase sólida (Terci, 2004).

Jackman e colaboradores (1987) relataram o emprego de polivinilpirrolidona insolúvel (PVP) e poliamida como adsorventes com a técnica de cromatografia em coluna. Estes materiais possuem oxigênios ligados a um carbono de ligação peptídica, o que tende a formar ligações de hidrogênio fortes com as hidroxilas das antocianinas, mantendo tais moléculas retidas no material. As antocianinas também podem ser purificadas pela técnica de extração em fase sólida (do inglês:

Solid Phase Extraction - SPE), K-Schafhalter e colaboradores (1998) avaliaram o uso de 16 diferentes materiais para purificar antocianinas provenientes de *Aronia melanocarpa var Nero*, (conhecida como *black chokeberry*) utilizando-se esta técnica. Foram testados materiais apolares em fase reversa, adsorventes poliméricos não iônicos e resinas de troca iônica fortes e fracas. Em todos os casos, as impurezas orgânicas e inorgânicas hidrossolúveis foram removidas com percolação de água e as antocianinas foram eluídas posteriormente com etanol acidificado. Os autores encontraram melhores resultados utilizando como fase sólida, Sílica Gel C₁₈ fase reversa e Amberlite XAD-7, um adsorvente acrílico polimérico e não iônico.

A purificação de extratos antociânicos brutos por SPE é possível devido à eluição dos componentes individuais do extrato em solventes apropriados. O procedimento fundamental para a purificação de antocianinas por SPE consiste na aplicação do extrato antociânico bruto em um cartucho contendo material sorvente. As antocianinas são sorvidas fortemente neste material (fase estacionária) por suas hidroxilas não substituídas; desta forma, as substâncias mais polares que as antocianinas, como açúcares e ácidos orgânicos são eluídas primeiramente, com a percolação de água. Na seqüência, os pigmentos antociânicos podem ser eluídos mediante percolação de solventes menos polares (Terci, 2004).

3.3.3 Separação ou Isolamento

Em relação aos diferentes métodos de separação existentes, destacam-se aqueles baseados em técnicas cromatográficas por compreenderem um conjunto de propostas que envolvem desde simples procedimentos clássicos de via úmida até sofisticados procedimentos com técnica instrumental (Okumura *et al.*, 2002).

A cromatografia em papel é uma técnica muito adequada para a separação e caracterização de quantidades limitadas de antocianinas (Harborne *et al.*, 1975). Há muitas informações disponíveis na literatura, em relação aos valores de fator de retardamento (R_F) para diferentes sistemas de solventes empregados. Estes valores permitem a identificação das antocianinas, visto que são característicos

para cada molécula (Lee e Hong, 1992). Com cromatografia de camada delgada, os valores de R_f variam muito devido às diferentes espessuras das placas e são necessários compostos de referência, tais como padrões certificados. Para a obtenção das antocianinas individualmente após a separação (isolamento), Jackman e colaboradores (1987) descreveram que alguns autores raspam placas de cromatografia de camada delgada ou recortaram o papel, no caso da PC, e dissolveram as antocianinas previamente separadas em solventes adequados. Porém, segundo Harborne e colaboradores (1975), quando se deseja obter antocianinas isoladas em quantidades maiores, é preferível o emprego da técnica de cromatografia de baixo fluxo, utilizando colunas de adsorventes como alumina e PVP e deve-se coletar as frações individualmente.

Outras técnicas como cromatografia contra-corrente, eletroforese, cromatografia de coluna aberta e cromatografia gasosa também já foram empregadas, porém, para a separação de antocianinas, prevalece a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (ou do inglês: *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC), especialmente de fase reversa, por oferecer excelentes separações, alta detectabilidade, tempo de análise relativamente curto e não necessidade de extratos com elevada pureza (K-Schafhalter *et al.*, 1998).

3.4. Métodos de Identificação de Antocianinas

As antocianinas podem ser identificadas por várias técnicas, sendo que as mais utilizadas são espectroscopia ultravioleta e visível (UV-Vis), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (ou do inglês: *Nuclear Magnetic Resonance* NMR), espectrometria de massas (do inglês, MS – Mass Spectrometer) e HPLC (Terci, 2004). É importante distinguir procedimentos que identificam a classe das antocianinas e os procedimentos que identificam cada antocianina presente.

O espectro eletrônico de absorção das antocianinas e suas agliconas tem sido muito útil para a identificação desta classe de pigmentos. Em meio ácido, estes compostos apresentam uma absorção máxima característica entre 465 e 550 nm e uma absorção menos intensa próxima a 275 nm (Harborne, 1967).

A identificação individual das antocianinas é possível com o uso de técnicas cromatográficas, fatores de retardamento (R_F) - obtidos por cromatografia em placa ou papel - ou tempos de retardamento (T_R), quando se utiliza cromatografia em coluna - obtidos experimentalmente são comparados com os reportados na literatura, guardadas as devidas limitações deste procedimento. Há uma relação direta entre a estrutura da antocianina e sua mobilidade cromatográfica, sendo que a quantidade de grupos hidroxilas, bem como o grau de metilação, acilação e o número de unidades de açúcar ligadas à molécula, influenciam diretamente nos valores de retardamento (Jackman *et al.*, 1987). Segundo Goiffon e colaboradores (1999), a mobilidade cromatográfica representada pelo valor de R_F ou T_R é a característica mais importante para identificar uma antocianina.

Para a identificação de antocianinas em alimentos e plantas, dois procedimentos podem ser utilizados: comparação direta, quando há disponibilidade de material padrão, ou comparação indireta, se não houver material padrão. Neste caso, segundo Harborne, uma comparação cuidadosa com os dados da literatura é aceitável. A comparação indireta, embora seja um método sujeito a erros, é justificada pela falta de padrões e pelo trabalhoso procedimento para a identificação (Harborne, 1984).

Devido à dificuldade de obtenção e ao elevado preço de padrões de antocianinas, Goiffon e colaboradores, em 1999, descreveram um método utilizando HPLC para identificar estes pigmentos. Tal método consiste na comparação de fatores de retardamento das antocianinas que se deseja identificar com àquele referente a cianidina 3-glicosídeo, pigmento presente em praticamente todas as frutas vermelhas. Assim, os autores sugerem a determinação de um **fator α** para cada antocianina, o qual é calculado através da razão dos tempos de retardamento da antocianina que se deseja identificar e da cianidina 3-glicosídeo. Apesar da mesma simbologia, não se trata do mesmo fator α , definido como fator de separação que sempre relaciona os tempos de retardamento de picos adjacentes (Collins *et. al.* 1997).

Nesta dissertação, as antocianinas presentes no jambolão foram identificadas utilizando-se o método de Goiffon e colaboradores para HPLC em complementação à cromatografia em papel.

3.5. Métodos de Quantificação das Antocianinas

Geralmente, os extratos antociânicos contêm, além dos pigmentos de interesse, outros compostos polares como açúcares e ácidos orgânicos, além disso, os extratos purificados podem conter antocianidinas como consequência da degradação das antocianinas. Brouillard em 1982 descreveu diferentes métodos para a quantificação de antocianinas. Estes métodos dividem-se em três grupos: àqueles relacionados a extratos que contêm pouco ou nenhum interferente, àqueles contendo produtos de degradação como interferentes e àqueles que visam à quantificação de cada pigmento individualmente. Cabe ressaltar que o termo “interferente” refere-se a outros compostos polifenólicos, açúcares, ácidos ou mesmo às antocianidinas (Jackman *et al.*, 1987).

Para a quantificação de antocianinas em extratos de frutas ou vegetais frescos onde, geralmente, há poucos componentes interferentes, realiza-se a leitura da absorvância do extrato diluído em álcool acidificado em um único comprimento de onda situado na região do visível, entre 465 e 550 nm. Para a determinação do conteúdo total de antocianinas em um extrato contendo dois ou mais tipos de antocianinas diferentes, não havendo substâncias interferentes, realiza-se o mesmo procedimento, porém, deve-se conhecer previamente a proporção de cada antocianina na mistura bem como suas absorvidades molares (Jackman *et al.*, 1987). Porém, vale destacar que dados de composição de extratos antociânicos de frutas não são triviais, já que, para uma mesma espécie vegetal, os tipos e proporções de antocianinas presentes podem variar em função de vários fatores como clima, época da colheita e características do solo. Neste contexto, o método do pH diferencial para a quantificação de antocianinas totais representa uma opção vantajosa e o procedimento é descrito a seguir.

Nos extratos em que os produtos de degradação (antocianidinas e açúcares) podem estar presentes, as antocianinas devem ser quantificadas pelo método do pH Diferencial ou pelo método Subtrativo. Este último está relacionado com a leitura da absorbância do extrato no comprimento de onda na região do visível onde há absorção máxima. Posteriormente, adiciona-se um agente branqueador ao extrato, geralmente sulfito de sódio ou peróxido de hidrogênio, e realiza-se novamente a leitura no mesmo comprimento de onda, a qual se refere à leitura “do branco”. Este método tem sofrido críticas, já que os agentes branqueadores não são específicos para as antocianinas e também causam um decréscimo na absorção dos produtos de degradação (Jackman *et al.*, 1987).

O método do pH Diferencial tem sido amplamente utilizado para a quantificação de antocianinas. A proposta de Fuleki e Francis (1968) que fundamenta o método do pH diferencial está baseada na obtenção de espectros das soluções em 2 valores de pH, visto que com a alteração do pH, observam-se transformações nas estruturas das antocianinas e, conseqüentemente, nas cores das soluções onde estão contidas (Jackman *et al.*, 1987). São utilizadas soluções de pH 1,0 e 4,5 para a diluição do extrato que se deseja quantificar e 2 comprimentos de onda são escolhidos para a leitura da absorbância, um correspondente ao comprimento de onda de máxima absorção (próximo a 510 nm) e outro em 700 nm, onde não ocorre absorção. Em pH 1,0, a solução contendo as antocianinas torna-se vermelha e em pH 4,5, incolor. Assim, a absorbância das soluções em 517 nm (no caso dos extratos de jambolão) em pH 1,0 é proporcional à concentração das antocianinas presentes no extrato. A absorbância lida para a solução de pH 4,5 em 517 nm refere-se aos produtos de degradação das antocianinas, as antocianidinas, que não possuem a propriedade de alterarem a coloração da solução em que se encontram em função do pH. Segundo o método de Fuleki e Francis (1968), as leituras a 700 nm devem servir para corrigir eventuais espalhamentos de luz causados por partículas em suspensão, que de acordo com os autores, podem estar presentes em extratos de frutas.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

Nesta parte do trabalho o objetivo foi obter antocianinas de jambolão com o máximo rendimento possível e utilizando procedimentos simples, visando possibilidade de aplicação em larga escala. Para tanto, foram priorizadas as seguintes etapas:

- Otimização do procedimento de extração de antocianinas de jambolão;
- Purificação dos extratos de antocianinas;
- Isolamento das antocianinas;
- Identificação e quantificação das antocianinas presentes no extrato;

CAPÍTULO 5

PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Considerações Gerais

Optou-se por trabalhar com o jambolão, pois experiências anteriores do nosso grupo de pesquisa apontaram que esta fruta apresenta outros compostos fenólicos em menor quantidade quando comparada a outras frutas comuns como, uva, amora e jabuticaba. Isto facilita a etapa de purificação. Além disso, trata-se de uma fruta comumente encontrada no Brasil e ainda pouco aproveitada.

Todas as frutas utilizadas para a realização dos experimentos desta dissertação foram coletadas de espécimes localizados na Faculdade de Educação Física da UNICAMP em fevereiro de 2003 e identificadas como *Syzygium cuminii*, família *myrtacea*, com registro de excicata número 132.456, no Herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP. As frutas foram lavadas em água corrente, secas ao ar à temperatura ambiente e mantidas a - 4 °C até a sua utilização.

Os extratos foram feitos imergindo-se as cascas das frutas (previamente removidas com uma faca comum) em solvente apropriado, sempre na proporção 1:3, de massa de cascas e volume de solvente, respectivamente.

Todos os experimentos foram realizados com reagentes de pureza descrita na lista da seqüência, seguindo-se as necessárias padronizações e procedimentos recomendados pela literatura (Baccan *et. al.*, 2001; Vogel, 1991).

5.2. Equipamentos, Materiais e Reagentes

Os materiais, reagentes e equipamentos utilizados durante a execução deste trabalho estão descritos a seguir:

Materiais :

- cartucho C₁₈ 500 mg para SPE, Varian;
- coluna cromatográfica bondesil C₁₈ Varian 5 µm, (4,6 mm x 25 cm);
- filme de PVC (magipack);
- micropipetas Sci Tech de 50-200 µL e de 200-1000 µL;
- papel cromatográfico Whatman 1 Chr;
- papel de filtro qualitativo Qualy.

Reagentes:

- acetato de sódio Fisher; acetonitrila grau cromatográfico J.T. Baker; ácido acético glacial Merck; ácido ascórbico Merck; ácido cítrico Vetec; ácido clorídrico PA Vetec; ácido fórmico PA Nuclear; ácido fumárico PA Synth; ácido málico PA Synth; ácido oxálico 99,5 % Lafan; ácido succínico PA Vetec; ácido sulfúrico PA Synth; ácido tartárico 99,5 % Carlo Erba; azul de bromofenol Merck; arabinose Synth, biftalato de potássio PA Vetec; butanol PA Synth; carbonato de cálcio Vimitec; citrato de sódio; cloreto de sódio PA Sigma; etanol absoluto Merck; fluoreto de sódio Merck; fosfato sódico monobásico Merck; frutose Synth; glicose Synth; hidróxido de sódio Synth; lactose Synth; manose Synth; metanol PA Synth; molibdato de amônio Synth; p-nitrofenil fosfato Merck; raminose Synth; sacarose Synth.

Para a quantificação das antocianinas pelo método do pH diferencial, utilizaram-se soluções de pH 1,0 e 4,5. A solução de pH 1,0 foi preparada por diluição em água destilada de uma solução de ácido clorídrico 0,2 mol L⁻¹. A solução de pH 4,5 foi preparada utilizando-se uma mistura de uma solução de biftalato de potássio 0,1 mol L⁻¹ e hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹; o pH foi ajustado para 4,5 com hidróxido de sódio. Todos os valores de pH foram verificados em pHmetro com eletrodo de vidro combinado.

Equipamentos

- balança analítica Mettler AE 200;
- cromatógrafo líquido analítico Waters 600E com detector espectrofotométrico UV-VIS Waters 484 e integrador Waters 746;
- cromatógrafo líquido Waters 510, com detector de arranjo de diodos UV Waters 991 e coletor de frações Fox;
- evaporador Speed Vac SC110A-Savant;
- espectrofotômetro Pharmacia Biotech Ultrospec 2000;
- pHmetro Analyser 300 com eletrodo de vidro combinado;
- secador de cabelos Phillips Compact 1100 HP 4814.

- sistema de Purificação de Água Milli-Q;
- sistema de Filtração de Solvente Millipore.

5.3. Procedimentos Experimentais

5.3.1 Quantificação das Antocianinas

Os extratos obtidos conforme mencionado em Considerações Gerais (item 5.1) foram quantificados pelo método do pH diferencial descrito por Fuleki e Francis (Terci, 2004). Neste procedimento, alíquotas de 50 μ L de extrato aquoso ou alcoólico contendo antocianinas foram diluídas em balões volumétricos de 10 mL contendo soluções de pH 1,0 e pH 4,5. A seguir, foram feitas medidas espectrofotométricas a 510 e 700 nm.

5.3.2. Otimização da Extração de Antocianinas

5.3.2.1. Estudo de Temperatura x Rendimento de Extração

Inicialmente, foram obtidos espectros eletrônicos de extratos antociânicos preparados a partir de cascas de jambolão tendo-se água, metanol e etanol como solventes, na proporção entre massa de casca e o volume do solvente 1:3 m/v, escolhida de acordo com os estudos anteriores (Terci e Rossi, 2002). Os espectros foram obtidos para avaliação dos comprimentos de onda de absorção máxima dos extratos, a serem usados na posterior quantificação das antocianinas.

Para se verificar a influência da temperatura no rendimento de extração de antocianinas de jambolão, foram colocadas cerca de 15 g de cascas de jambolão em um balão de fundo redondo de duas bocas de 250 mL e foram adicionados 50 mL do solvente de extração (água deionizada, etanol ou metanol). O balão foi conectado a um condensador de bolas e mantido em banho termostatizado previamente ajustado para a temperatura desejada. Durante as 10 horas iniciais, alíquotas de 50 μ L da solução eram retiradas com uma micro-pipeta a cada hora e diluídas em 10 mL da solução de pH 1,0 para as medidas espectrofotométricas em 517 nm, comprimento de onda de máxima absorção das antocianinas de jambolão

neste pH. Sempre foram retiradas 3 alíquotas para as medidas e o experimento foi realizado a 25 ± 2 °C e a 46 ± 2 °C. Nos experimentos realizados a 25 °C, foram retiradas alíquotas referentes a 24 horas de extração, para se avaliar uma possível “tendência” no rendimento de extração de antocianinas. Este procedimento não foi realizado a 46°C, pois posteriormente foi realizado um planejamento fatorial, detalhado na seqüência, visando-se avaliar melhor as influências do tipo de solvente, meio acidificado, tempo e temperatura de extração.

5.3.2.2. Avaliação do Melhor Sistema de Extração

A otimização do procedimento de extração de antocianinas foi realizada mediante um planejamento fatorial 2^4 , tendo-se como fatores: solvente de extração, acidificação do solvente, temperatura e tempo de extração, em dois níveis (+ e -) conforme listado a seguir:

1. solvente de extração: metanol (-) e etanol (+);
2. acidificação do solvente: não acidificado (-) e acidificado com HCl 0,05% (+);
3. temperatura de extração: 25°C (-) e 46°C (+);
4. tempo de extração: 12 horas (-) e 24 horas (+)

Os sinais (-) referem-se aos níveis inferiores e os sinais (+) aos superiores.

Para a realização dos experimentos referentes ao planejamento fatorial foram utilizados 32 frascos escuros, visto que as antocianinas são fotossensíveis. Para a extração das antocianinas, 1,0 g de cascas de jambolão e 3,0 mL de solvente foram colocados em cada frasco, sendo que todos foram submetidos às temperaturas de trabalho nos períodos indicados, seguindo-se o planejamento pré-estabelecido com a alternância dos níveis inferiores e superiores de cada fator. Cabe ressaltar que os experimentos foram realizados aleatoriamente e em duplicata conforme sugerido por Neto e colaboradores, 2002.

Alíquotas de 100 µL dos extratos obtidos eram colocadas em balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume com a solução de pH= 1,0 (HCl/KCl) para medida da absorbância das soluções em 517 nm.

5.3.3. Identificação das Antocianinas

Antocianinas foram identificadas aplicando-se Cromatografia em Papel e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

5.3.3.1. Cromatografia em Papel (PC)

Para a identificação das antocianinas do jambolão por PC, utilizou-se um extrato aquoso de cascas da fruta na proporção 1:3 m/v. Empregou-se papel cromatográfico recortado em retângulos de 19 x 9 cm como suporte da fase estacionária e uma mistura de solventes butanol, ácido acético e água (BAW), nas proporções 4:1:5 v/v/v como fase móvel (Harborne, 1967). Um béquer coberto com filme de PVC foi saturado com o vapor da fase móvel e utilizado como cuba cromatográfica. Os papéis foram retirados da cuba e secos ao ar livre após a fase móvel percorrer 12,5 cm do papel. As manchas de antocianinas apresentaram coloração magenta, que se tornavam azuis na presença de vapores de NH₃, todas facilmente observáveis e úteis para identificação da presença de antocianinas. Os fatores de retardamento (R_F) das antocianinas foram calculados pela razão entre a distância do centro da mancha do pigmento em relação à origem da corrida cromatográfica e a distância total percorrida pela fase móvel (Braga e Collins, 1987).

5.3.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A identificação das antocianinas por HPLC foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Goiffon *et. al.* (1999). Nas análises, o volume de amostra injetado na coluna era de 50 µL. Como sistema de detecção utilizou-se um espectrofotômetro UV-VIS e como fase móvel uma mistura de água, acetonitrila e ácido fórmico na proporção 81:9:10 v/v/v. Empregou-se um sistema isocrático, sendo a vazão da fase móvel 1 mL min⁻¹.

As amostras injetadas foram extratos alcoólicos de jambolão previamente filtrados em filtros de membrana de 0,45 µm.

5.3.4. Purificação do Extrato de Antocianinas

A purificação do extrato antociânico foi realizada por extração em fase sólida (SPE) utilizando-se cartuchos C₁₈ de 500 mg da Varian. De acordo com as recomendações do fabricante do cartucho, a quantidade de massa de material a ser eluído deve ser da ordem de 1% da massa de sorvente contida no cartucho. Sendo assim, apenas foram percolados extratos antociânicos contendo quantidade de antocianinas inferior a 5 mg. A eficiência do processo foi verificada a partir de testes de detecção de açúcares e ácidos orgânicos, descritos na seqüência, bem como pela avaliação da quantidade de antocianinas recuperada, conforme descrito por Terci, 2004.

Inicialmente, o cartucho foi condicionado com a percolação de 5 mL de metanol, seguidos por 5 mL de solução aquosa de HCl 0,01% m/v. Então o extrato aquoso de jambolão era percolado e depois o cartucho era lavado com 10 mL da solução aquosa de HCl 0,01% v/v. Ao todo, 5 frações de 2 mL foram coletadas e nelas foram realizados os testes de detecção de açúcares e de ácidos orgânicos. Após a lavagem do cartucho, as antocianinas foram eluídas com 5 mL de HCl 0,01% v/v em metanol e coletadas em um balão volumétrico de 5 mL para quantificação pelo método do pH diferencial. Para avaliação do rendimento de purificação, diferentes massas de antocianinas foram percoladas pelo cartucho separadamente.

5.3.4.1 Detecção de Açúcares

A detecção de açúcares foi feita baseando-se no método colorimétrico descrito por Terci, 2004, o qual corresponde a uma adaptação do método descrito por Dubois (1956). Para tanto, soluções aquosas de concentração 1 g L⁻¹ foram preparadas com os padrões de açúcar disponíveis (arabinose, frutose, glicose, lactose, manose, raminose e sacarose). Em tubos de ensaio, foram adicionados 300 µL das soluções de açúcar, 300 µL de solução aquosa de fenol 5% m/v, 1 mL de H₂SO₄ concentrado e 400 µL de água destilada. Os tubos foram termostatizados a 37 °C por 10 minutos. Este é um teste colorimétrico pelo qual as soluções contendo açúcar apresentam coloração variável entre amarelo e marrom.

5.3.4.2 Detecção de Ácidos Orgânicos

A detecção de ácidos orgânicos foi realizada por cromatografia de papel, seguindo procedimento do Manual Técnico de Análise Química de Alimentos do Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas (1990). Utilizou-se papel cromatográfico (19 x 9 cm), sendo a água adsorvida neste a fase estacionária e uma mistura de butanol, ácido acético e água, na proporção 4:1:1 v/v/v como fase móvel. Adicionaram-se 0,02 g de azul de bromofenol à cuba cromatográfica (béquer coberto com filme PVC), quantidade suficiente para obter solução 1 g L⁻¹ deste corante. Antes da corrida, a cuba foi saturada com a fase móvel. O papel era retirado após a ascensão de 10 cm da fase móvel e seco com ar quente.

Soluções aquosas de ácidos ascórbico, cítrico, fumárico, oxálico, succínico, tartárico e málico com concentração de 5 g L⁻¹ foram os padrões de ácidos orgânicos testados. Realizou-se ainda uma corrida cromatográfica com os padrões cujos R_F se aproximaram daquele referente ao ácido orgânico presente no extrato de antocianinas de jambolão.

Cabe ressaltar que para a avaliação do rendimento de purificação, diferentes volumes do extrato aquoso de jambolão foram percolados: 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mL, respectivamente, e que as antocianinas foram quantificadas prévia e posteriormente à percolação (purificação) através do método do pH diferencial .

5.3.5 Isolamento das Antocianinas

As antocianinas presentes no extrato purificado (etapa anterior) foram isoladas em procedimento de HPLC a partir da injeção de 200 µL do extrato, utilizando-se uma mistura de água, acetonitrila e ácido fórmico, na proporção 81:9:10 v/v/v como fase móvel. Empregou-se um sistema isocrático de eluição, com vazão de fase móvel de 1 mL min⁻¹. Para a construção dos cromatogramas, as frações foram coletadas em tubos de ensaio e as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro em 517 nm.

As frações contendo as antocianinas coletadas após este procedimento foram mantidas por aproximadamente 4 horas em evaporador a vácuo (temperatura ambiente) para eliminação do solvente.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Quantificação das Antocianinas

A concentração dos extratos antociânicos foi determinada pelo método do pH diferencial, que é fundamentado nas transformações estruturais das antocianinas em função do pH gerando soluções coloridas (vide Figura 3, página 11). O cátion flavílico, de coloração vermelha, é a forma predominante em pH 1,0 enquanto que o carbinol, incolor, predomina em pH 4,5. Por isso, seguindo-se este método são feitas medidas espectrofotométricas de antocianinas em soluções de pH 1,0 e 4,5, em 517 nm (máximo de absorção das antocianinas) e 700 nm, para corrigir eventuais erros referentes ao espalhamento da luz, já que extratos de frutas podem apresentar suspensões coloidais (Terci, 2004). Para seguir exatamente a proposta de Fuleki e Francis (1968), realizou-se a medida da absorbância dos extratos em 700 nm, embora todos os valores obtidos tenham sido nulos como era esperado já que não se observava material em suspensão.

Inicialmente, determina-se a absorbância “resultante” das leituras das soluções pela equação I para o cálculo da concentração das antocianinas nos extratos de acordo com a equação II.

A quantificação de extratos contendo antocianinas diferentes também pode ser feita pela equação II, embora os valores de absorvidade molar e massa molar sejam referentes a cianidina 3-glicosídeo (cy-3-glu). Neste caso, o resultado expressa a quantidade total de antocianinas. A utilização da cianidina 3- glicosídeo como uma espécie de padrão de antocianinas, em diversos procedimentos experimentais é bastante comum na literatura e isto se deve à abundância desta antocianina em frutas vermelhas (Terci, 2004).

$$A = (A_{517nm} - A_{700nm})_{pH=1,0} - (A_{517nm} - A_{700nm})_{pH=4,5} \quad \text{Equação I}$$

$$C = \frac{A \times M_M}{\epsilon \times b} \quad \text{Equação II}$$

onde: C é a concentração de antocianinas em g/L;
A é a absorbância calculada pela equação I;
M_M é a massa molar da cy-3glu (449,2 g.mol⁻¹);
ε é o coeficiente de absorvidade molar da cy-3glu (26900 mol.L.cm⁻¹)
b é o caminho óptico (1,0 cm).

6.2. Otimização da Extração de Antocianinas de Jambolão

6.2.1. Espectro de Absorção das Antocianinas

Os estudos com as antocianinas iniciaram-se com a obtenção de espectros eletrônicos dos extratos brutos de jambolão, visando observar os comprimentos de onda de máxima absorção. Para tanto, foram utilizados extratos em meio aquoso, metanólico e etanólico, todos levemente acidificados com ácido clorídrico (HCl 0,01 % m/v). Os espectros obtidos encontram-se na Figura 4.

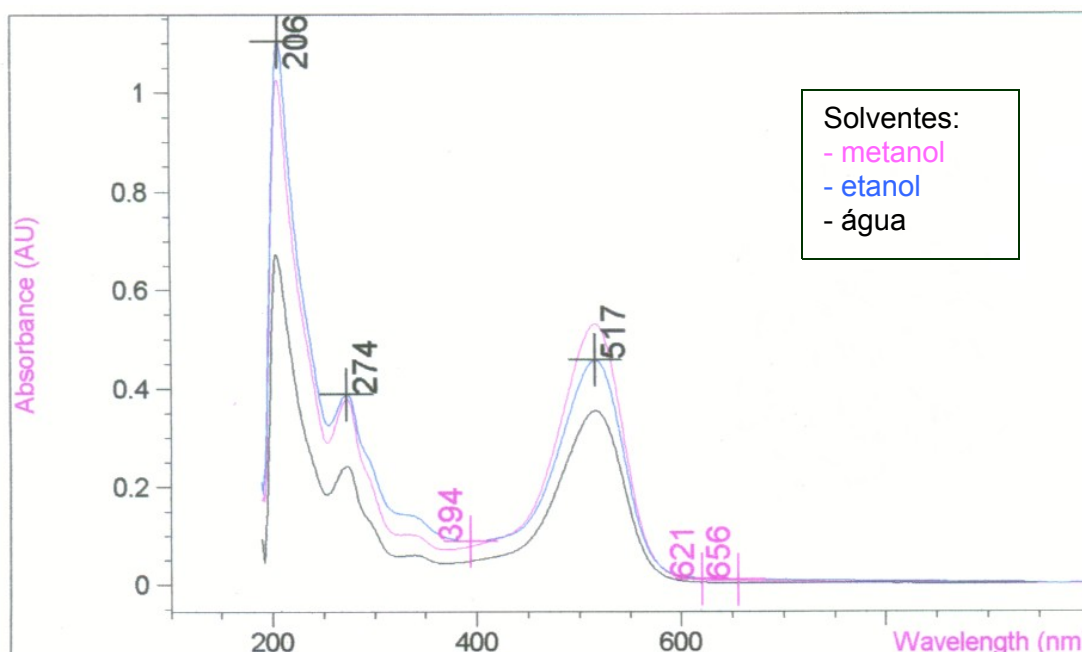


Figura 4. Espectros eletrônicos UV-VIS dos extratos antociânicos preparados com diferentes solventes respeitando a proporção 1:3 massa de casca por volume de solvente.

Os espectros apresentados na Figura 4 indicam que, independente do solvente utilizado, há 3 bandas de absorção máxima para os extratos, as quais encontram-se em 206, 274 e 517 nm, respectivamente. Este dado é condizente com a literatura, segundo Harborne (1967), as antocianinas simples em soluções ácidas apresentam duas absorções máximas, uma na região visível entre 465 e 550 nm e outra, menos intensa, na região UV, em torno de 275 nm. A banda de absorção em 206 nm, visualizada na Figura 4, provavelmente refere-se à presença de açúcares livres, ácidos orgânicos e outros polifenóis contidos no extrato bruto.

6.2.2. Efeito de tempo e temperatura no rendimento de extração

A temperatura é um fator importante na extração das antocianinas, pois estes pigmentos podem sofrer hidrólise quando submetidos ao aquecimento (Okumura *et. al.*, 2002). Este estudo teve como objetivo verificar o efeito do tempo de extração a diferentes temperaturas no rendimento de extração de antocianinas de jambolão, utilizando-se para tanto diferentes solventes. As Figuras 5 e 6 apresentam as curvas obtidas, onde as barras verticais correspondem aos desvios da média obtida a partir de triplicatas.

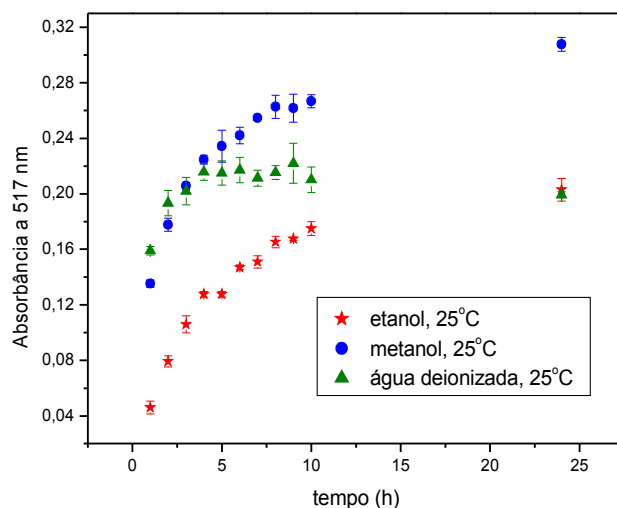


Figura 5. Estudo da influência do tempo de extração das antocianinas de jambolão a 25 °C.

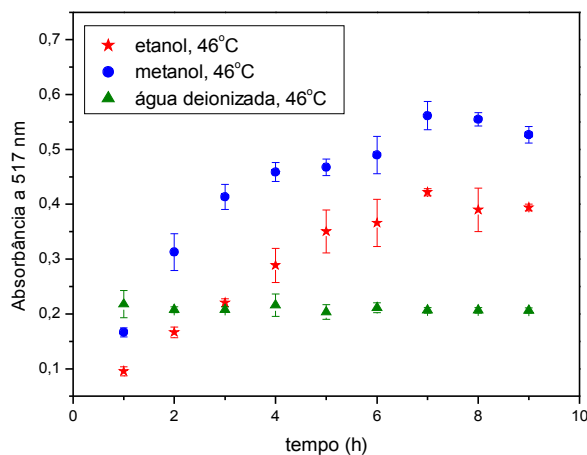


Figura 6. Estudo da influência do tempo de extração das antocianinas de jambolão a 46 °C.

É possível observar pelas Figuras 5 e 6 que os solventes metanol e etanol apresentaram um comportamento semelhante em relação à extração de antocianinas, de forma que o metanol sempre se sobressaía como melhor solvente, por possibilitar a extração de uma quantidade maior de antocianinas em ambas temperaturas analisadas. Por outro lado, a água desionizada apresentou um comportamento distinto, em geral, extraindo uma quantidade menor de antocianinas em relação aos outros solventes.

Os resultados obtidos nos experimentos realizados a 25 °C, Figura 5, indicaram que a quantidade de antocianinas extraídas aumenta com a duração da extração. Porém, um fato interessante é que nas primeiras 5 horas de extração, o metanol apresentou um comportamento de extração semelhante ao da água, podendo esta última ser preferida nestas condições. Pela Figura 5 é possível concluir ainda que extrações de antocianinas em meio aquoso devem durar até 5 horas, visto que após este período não se observa ganho significativo na quantidade de antocianinas extraídas.

Os resultados dos experimentos de extração realizados a 46 °C, Figura 6, sugerem que as antocianinas não tenham sido degradadas devido ao aquecimento.

Neste contexto, foi conduzido o estudo cujos resultados são detalhados na seqüência, visando encontrar as condições que permitam chegar à máxima extração das antocianinas.

6.2.3. Avaliação do Melhor Sistema de Extração

As antocianinas, muito solúveis em água, são facilmente extraídas de plantas utilizando-se soluções polares, assim, muitos pesquisadores empregaram apenas água para a extração enquanto outros trabalhos descrevem a utilização de solventes alcoólicos acidificados ou não (Jackman *et al.*, 1987). O objetivo desta etapa foi avaliar o melhor sistema de extração das antocianinas, ou seja, a combinação entre solvente, temperatura e tempo de extração responsável pelo maior rendimento de extração de antocianinas. Para tanto, foi realizado um Planejamento Fatorial 2⁴, com a descrição dos fatores apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Fatores escolhidos para o planejamento fatorial e seus níveis.

Níveis		
Fatores	Inferior (-)	Superior (+)
1. Solvente	metanol	etanol
2. Acidificação	não acidificado	HCl 0,05 % v/v
3. Temperatura	25°C	46°C
4. Tempo	12 h	24 h

Os experimentos foram realizados aleatoriamente, alternando-se os níveis superiores e inferiores de cada fator e, juntamente com os resultados, estão descritos na Tabela 2. Os ensaios assinalados com (') referem-se às duplicatas.

Os resultados obtidos foram expressos pela razão (**R**) entre a absorbância das soluções (**A**) (lida em 517 nm) e a massa das cascas de jambolão (**m**) na tentativa de normalização dos valores, já se espera que quanto maior quantidade de cascas de jambolão, maior a quantidade de antocianinas. Por este motivo, torna-se inviável avaliar o rendimento de extração apenas pela absorbância sem se considerar a massa e, portanto, optou-se por avaliar a razão entre estes dados.

Os resultados descritos na Tabela 2 foram avaliados estatisticamente conforme sugerido por Neto e colaboradores, 2002. Inicialmente, foi realizado um planejamento 2^4 , isto é, um planejamento experimental com 4 fatores e 2 níveis. Entende-se por fator, a variável que se deseja avaliar sua influência e que se tem o controle sobre ela, enquanto os níveis são as possibilidades de variação qualitativa ou quantitativa dos fatores. Neste trabalho, por exemplo, um dos fatores analisados foi o solvente extrator para o qual havia dois níveis: metanol e etanol. O objetivo do planejamento realizado foi investigar o efeito da variação dos fatores na resposta do sistema, ou seja, o rendimento de extração das antocianinas. Num primeiro momento, foram calculados os **efeitos principais** e os **efeitos de interação** para cada fator. O efeito principal para cada fator relaciona-se com a variação da resposta do sistema quando o nível do fator é alterado. Para determiná-lo, leva-se em consideração as contribuições das médias dos experimentos realizados para cada nível do fator. Os efeitos de interação ocorrem quando o efeito de uma variável depende do nível de outra variável, se os fatores interagem, pode-se dizer que são interdependentes (Neto *et. al.*, 2002).

Tabela 2. Experimentos de otimização da extração das antocianinas de jambolão.

Ensaio	S	H ⁺	T (°C)	t (min)	m (g)	A em 517 nm	R _{médio} ± estimativa desvio padrão (g ⁻¹)
1	-	-	-	-	0,9569	0,238	0,249 ± 0,001
1'	-	-	-	-	0,9639	0,240	
2	+	-	-	-	1,0383	0,228	0,23 ± 0,01
2'					1,0822	0,256	
3	-	+	-	-	0,9826	0,217	0,23 ± 0,01
3'					0,9834	0,234	
4	+	+	-	-	0,8001	0,222	0,25 ± 0,04
4'					0,8456	0,188	
5	.	-	+	-	1,0271	0,312	0,27 ± 0,05
5'					1,0729	0,253	
6	+	-	+	-	1,3812	0,275	0,199 ± 0,001
6'					1,1372	0,225	
7	.	+	+	-	0,8942	0,288	0,29 ± 0,05
7'					0,8585	0,213	
8	+	+	+	-	0,8998	0,189	0,23 ± 0,02
8'					0,9028	0,217	
9	.	-	-	+	0,9104	0,234	0,24 ± 0,02
9'					0,9123	0,208	
10	+	-	-	+	0,8551	0,259	0,27 ± 0,05
10'					1,0340	0,248	
11	.	+	-	+	0,9660	0,280	0,27 ± 0,03
11'					0,9165	0,231	
12	+	+	-	+	0,9615	0,248	0,24 ± 0,02
12'					0,8069	0,184	
13	.	-	+	+	1,2716	0,252	0,24 ± 0,06
13'					1,1063	0,308	
14	+	-	+	+	0,9695	0,221	0,222 ± 0,008
14'					1,0036	0,217	
15	.	+	+	+	1,1493	0,281	0,246 ± 0,003
15'					0,9875	0,245	
16	+	+	+	+	1,0306	0,178	0,22 ± 0,07
16'					0,9431	0,254	

onde S refere-se ao tipo de solvente, H⁺ à presença de HCl 0,05% v/v, T à temperatura e t ao tempo de extração.

Os cálculos dos efeitos principais e dos efeitos de interação são realizados de acordo com as equações (III) e (IV), respectivamente:

$$E_x = m_{x(+)} - m_{x(-)} \quad \text{Equação III}$$

$$I_{x,y} = m_{x(-)y(-)} + m_{x(+)y(+)} - [m_{x(-)y(+)} + m_{x(+)y(-)}] \quad \text{Equação IV}$$

onde: E corresponde ao efeito principal, I corresponde ao efeito de interação,
m corresponde à média dos efeitos, x e y correspondem aos fatores
os sinais (+) e (-) correspondem aos níveis.

Os resultados referentes aos cálculos dos efeitos principais estão demonstrados na Tabela 3 e àqueles que se referem aos efeitos de interação estão contidos na Tabela 4.

Tabela 3. Efeitos Principais calculados para cada fator.

Fator	Efeito
1	- 0,0221
2	0,0073
3	-0,0076
4	0,0003

Tabela 4. Efeitos de Interação entre os fatores.

Interações	Efeitos
12	- 0,002
13	- 0,0218
23	- 0,0066
14	0,0111
24	- 0,063
34	- 0,0155
123	0,0028
124	-0,0151
134	0,0108
234	-0,0055
1234	0,0102

Para avaliar se os efeitos principais ou as interações entre efeitos são estatisticamente significativos, deve-se comparar seus valores absolutos com θ , que é o produto do erro padrão do efeito (E_{efeito}) pelo valor da Distribuição de Student (t) correspondente, no intervalo de confiança desejado (neste caso, 95%). O Efeito será estatisticamente significativo caso seja numericamente maior à θ .

No planejamento fatorial realizado, os ensaios foram feitos em duplicatas visando estimar o erro experimental, e a partir daí, avaliar a significância estatística dos efeitos. Neste caso o termo “duplicata” refere-se à realização de todas as etapas do procedimento novamente, desde a lavagem das vidrarias. A importância desta repetição é incluir a variabilidade total do processo para se determinar o erro experimental mais corretamente. Com esta mesma finalidade, todos os experimentos foram realizados aleatoriamente.

A partir das repetições feitas numa dada combinação de níveis pode-se obter uma estimativa do erro experimental nesta combinação. Primeiramente obtém-se a variância para cada par de valores (V_{ensaio}) que pode ser considerada uma estimativa da variância típica do procedimento experimental. A variância é calculada de acordo com a equação V.

$$V_{\text{ensaio}} = (X_n - X_M)^2 + (X'_n - X_M)^2 \quad \text{Equação V}$$

onde: x_n é o valor da razão $R = A / m$ (vide Tabela 2),
 x'_n corresponde à duplicata x_M é a média aritmética entre x_n e x'_n .

Cada um dos ensaios foi realizado 2 vezes, o que gerou uma estimativa da variância com 1 grau de liberdade. Para se obter uma estimativa da variância conjunta (V_{conjunta}), que se refere a todos os ensaios realizados, deve-se calcular a média de todas as estimativas (V_{ensaio}), ponderadas pelos respectivos graus de liberdade (GL). No experimento realizado, foram obtidos 16 experimentos independentes e, portanto, 16 graus de liberdade.

$$V_{\text{conjunta}} = \frac{\sum V_{\text{ensaios}}}{\sum GL} \quad \text{Equação VI}$$

A partir da variância conjunta determina-se a variância de um efeito (V_{efeito}) a qual leva em consideração a contribuição de cada efeito para a variância conjunta. Nota-se pelas equações III e IV que cada efeito é calculado pela diferença de duas médias, em que metade dos experimentos contribui para uma das médias, enquanto a metade restante aparece na outra média. Assim, no planejamento realizado, contendo 16 experimentos, sempre 8 experimentos contribuíram para cada uma das médias. Desta forma, a contribuição de cada efeito é 1/8. Logo,

$$V_{\text{efeito}} = V_{\text{conjunta}} \times \frac{1}{8} \quad \text{Equação VII}$$

O erro padrão do efeito (E_{efeito}) é numericamente igual à raiz quadrada da variância do efeito e, desta maneira, pode ser calculado pela equação VIII.

$$E_{\text{efeito}} = \sqrt{V_{\text{efeito}}}$$

Equação VIII

Os valores de variâncias e erro do efeito estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de variâncias e erro dos efeitos.

V_{conjunta}	0,0006
V_{efeito}	0,00007
E_{efeito}	0,009

Multiplicando-se o erro do efeito (0,009) pelo valor da distribuição de Student para um intervalo de 95% de confiança (2,042) tem-se **0,018**, valor que chamamos anteriormente de **θ**. Voltando-se aos dados das Tabelas 3 e 4, pode-se notar que apenas o efeito principal 1, correspondente ao tipo de solvente, e a interação 13, correspondente à interação solvente e temperatura, são estatisticamente significativos por serem numericamente maiores que 0,018, num intervalo de 95% de confiança, sendo ambos valores (em módulo) iguais a **0,022**. Isto implica que para se obter maior rendimento na extração de antocianinas prefere-se o uso de metanol e o aquecimento do sistema de extração a 46 °C. Trabalhando-se a temperatura 25 °C, os rendimentos de extração foram menores quando comparados aos sistemas a 46 °C, ainda assim, o metanol se sobressaiu como melhor solvente. Em relação ao tempo de extração e à presença de ácido, pode-se dizer que estes fatores não influenciaram significativamente o rendimento de extração de antocianinas, portanto, estes fatores devem ser selecionados de acordo com os objetivos específicos de cada extração.

Cabe ressaltar que, nesta dissertação, optou-se por trabalhar com extratos aquosos de antocianinas, visto que não é possível purificar extratos antociânicos alcoólicos por SPE, já que se utiliza justamente o metanol como eluente. Para tornar a purificação de extratos alcoólicos possível, uma etapa prévia de evaporação do solvente é requerida, acrescentando mais uma etapa ao processo, cuja realização deve ser considerada em função dos objetivos pretendidos. Neste trabalho, os extratos foram obtidos utilizando-se água como solvente à temperatura ambiente, encontrando-se em média $2,7 \pm 0,9$ mg de antocianinas por grama de casca de jambolão.

6.3. Identificação das Antocianinas

6.3.1. Cromatografia em Papel (PC)

Os testes com cromatografia em papel permitiram verificar visualmente 3 manchas com coloração violeta intensa, referentes às antocianinas presentes no extrato de jambolão. O cromatograma obtido e os fatores de retardamento calculados, juntamente com os respectivos desvios estão ilustrados na Figura 7.

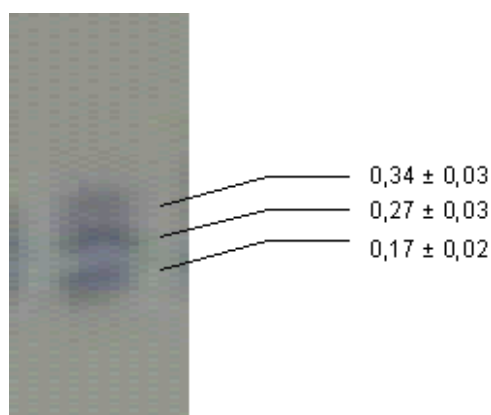


Figura 7. Cromatograma do extrato antociânico de jambolão, com fatores de retardamento.

No total, 12 corridas cromatográficas foram realizadas e os fatores de retardamento (R_F) para cada mancha correspondem à média aritmética dos valores obtidos em cada corrida. A importância das replicatas está associada ao fato de que as antocianinas apresentam estruturas moleculares bastantes semelhantes, muitas vezes distintas apenas na quantidade e posições de hidroxilas, no grau de metilação e acilação, bem como no número de unidades de açúcar ligado à molécula (Jackman *et al.*, 1987). Isto resulta em valores de R_F muito próximos. Neste contexto, pequenas diferenças no valor de R_F podem ser bastante significativas para a avaliação dos resultados.

Apesar da identificação de compostos por cromatografia sem padrões não ser recomendável, este procedimento vem sendo aceito na literatura para identificação de antocianinas em virtude da dificuldade da obtenção de padrões de antocianinas e ao elevado preço destes padrões. Seguindo dados e valores de referência descritos por Harborne (1967) para a primeira mancha há 5

possibilidades de antocianinas, para a segunda mancha 19 e para a terceira 26, considerando-se os valores de R_F tabelados dentro do intervalo de média e estimativa de desvio padrão determinados com os dados experimentais. Já que há mais de uma possibilidade de antocianina para cada mancha, optou-se por utilizar um procedimento de HPLC.

6.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência HPLC

O cromatograma obtido pela técnica de HPLC para o extrato de jambolão apresentou 4 picos, como mostra a Figura 8.

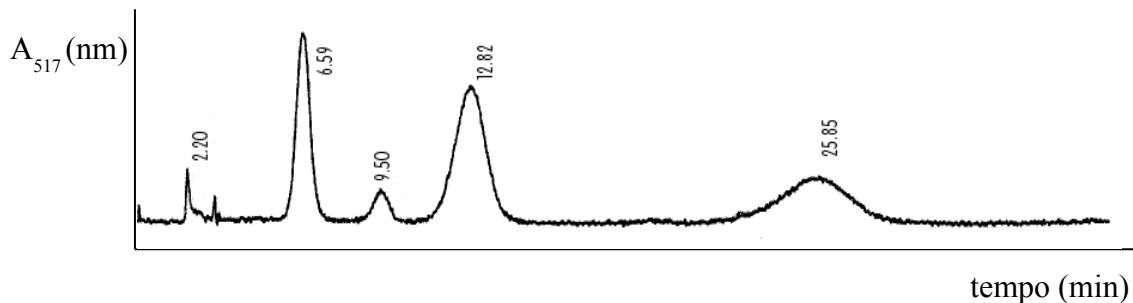


Figura 8. Cromatograma obtido para o extrato de jambolão por HPLC.

A Figura 8 mostra que no extrato de jambolão estão presentes, no mínimo, 4 antocianinas diferentes.

Goiffon e colaboradores (1999) desenvolveram um método para identificar antocianinas por HPLC tomando como referência o tempo de retardamento da cianidina 3-glicosídeo, que é a antocianina mais comumente encontrada nas frutas. Apesar de todas as implicações em erros, assume-se como válida esta metodologia para o caso de antocianinas, visto que seus padrões apresentam um custo muito elevado e a diversidade de compostos presentes em extratos naturais é muito ampla. Neste método, estabelece-se um fator de correlação (α) que corresponde à razão entre o tempo de retardamento (ou tempo de retenção) da antocianina que se deseja identificar e o tempo de retardamento da cianidina 3-glicosídeo (cy 3-glu). Segundo Goiffon e colaboradores, o termo α pode ser calculado pela equação IX.

$$\alpha = \frac{t_r}{t_r(\text{cy} - 3\text{glu})} \quad \text{Equação IX}$$

onde: t_r é o tempo de retardamento da antocianina que se quer identificar
 t_r (cy-3glu) é o tempo de retardamento da cianidina 3-glicosídeo, tomada como padrão.

Como a princípio não se sabia se o jambolão possui a cy-3glu, tomou-se como referência o extrato de uva, que contém esta antocianina e vem sendo utilizado em estudos de nosso grupo. O tempo de retardamento do extrato de uva da cy 3-glu, injetado na coluna nas mesmas condições de análise do jambolão, foi de 11,78 minutos. A Tabela 6 indica os tempos de retardamento das antocianinas de jambolão, os valores α calculados e aqueles encontrados na literatura (Goiffon *et al.*, 1999).

Tabela 6. Tempos de retardamento (t_r) e respectivos α para as antocianinas de jambolão.

t_R	$\alpha_{\text{calculado}}$	$\alpha_{\text{literatura}}^*$	Antocianina
6,59	0,56	0,58	Delfinidina 3-glicosídeo
9,5	0,81	0,77	Cianidina 3-galactosídeo
12,82	1,09	1,17	Petunidina 3-galactosídeo
25,95	2,20	2,27	Pelargonidina 3-arabinosídeo

*Goiffon *et. al.*, 1999

Estes resultados de HPLC levam à identificação de 4 antocianinas, enquanto que apenas 3 foram identificadas por PC, confirmando a esperada maior eficiência da separação na coluna cromatográfica.

Os dados da Tabela 6 sugerem a identificação das 4 antocianinas presentes no extrato de jambolão, o que pode ser reforçado pela comparação com os resultados obtidos por cromatografia em papel. Segundo Harborne (1967) os tempos de retardamento por PC da delfinidina 3-glicosídeo, petunidina 3-galactosídeo e cianidina 3-galactosídeo são respectivamente 26, 33 e 37. Retornando-se à Figura 7, pode-se dizer que elas correspondem às segunda e terceira manchas, porém, por cromatografia em papel não foi possível separar estes três pigmentos adequadamente. O tempo de retardamento para a pelargonidina 3-arabinosídeo por PC não é citado na literatura. A comparação

entre os resultados obtidos por ambas técnicas leva a concluir que a HPLC permite uma maior eficiência de separação e maior facilidade de identificação, porém a técnica de PC pode ser utilizada previamente e apresenta a vantagem de ter baixo custo a maior acessibilidade.

A Figura 8 ainda mostra um pico em 2,20 minutos. Este pico não corresponde a uma antocianina, pois sua área não é proporcional à concentração do extrato. Isto foi verificado pela injeção do mesmo extrato, porém diluído. Verificou-se que no extrato diluído houve uma diminuição proporcional de todas as áreas, exceto a referente ao pico de 2,20 minutos. Muito provavelmente, este pico refere-se a eluição de um componente que não interage com a fase estacionária, como por exemplo, a fase móvel (Collins *et.al.*, 1997).

Foram encontrados 2 artigos que trazem a identificação de antocianinas de jambolão. No primeiro artigo, publicado em 1974, os autores identificaram três antocianinas por cromatografia em papel e hidrólise alcalina: delphinidina 3-gentibiosídeo, petunidina 3-gentibiosídeo e malvinidina 3-laminaribiosídeo. Cabe ressaltar que gentibiosídeo e laminaribiosídeo correspondem a duas glicoses ligadas entre si pelos carbonos 1-5 e 1-3, respectivamente (Jain and Seshadri, 1974). Já no segundo artigo, publicado por pesquisadores da Unicamp em 1982, a única antocianina encontrada foi a cianidina 3- glicosídeo (Bobbio and Scamparini, 1982). Em trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa, foram identificadas 3 antocianinas presentes no extrato de jambolão: cianidina 3,5-diglicosídeo, peonidina 3-glicosídeo e delphinidina 3-glicosídeo (Terci, 2004). Embora cada autor tenha identificado diferentes antocianinas para o jambolão, estes dados reforçam a idéia de que diferentes culturas, origens geográficas, maturidade das plantas e condições ambientais como intensidade de luz e temperatura, geram frutos contendo diferentes antocianinas. Esta é uma característica tão interessante que vem servindo de base de estudos para comprovar a autenticidade de vinhos comparando a “impressão digital” de suas antocianinas com àquela da uva que o originou. Para isso, houve a necessidade de construir extensos bancos de dados de diferentes uvas provenientes de diversas culturas e origens enológicas (Revilla *et al.*, 2001).

6.4. Purificação do Extrato de Antocianinas

Uma vez identificadas as antocianinas do extrato de jambolão, o próximo passo foi promover sua purificação através da eliminação de açúcares e ácidos orgânicos. Portanto, inicialmente, foram feitos ensaios de detecção de açúcares e ácidos com padrões comerciais disponíveis para posteriormente avaliar a purificação do extrato antociânico mediante a detecção destes compostos nas frações de lavagem.

6.4.1. Detecção de Açúcares

A detecção de açúcares foi feita baseando-se no método colorimétrico descrito por Dubois (1956) e adaptado por Terzi (2004). Neste método, soluções contendo açúcar apresentam coloração amarelo-alaranjada ao reagirem com fenol e ácido sulfúrico concentrado. A Figura 9 demonstra que o teste pode ser aplicado para os diferentes tipos de açúcar gerando soluções com a coloração prevista.

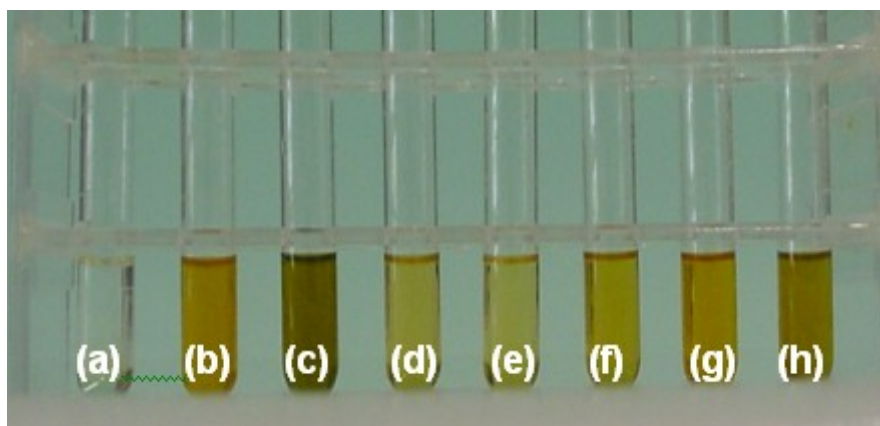


Figura 9. Escala de cores para detecção de padrões de açúcares de concentração 1 g L^{-1} (a) ausência de açúcar; (b) arabinose; (c) frutose; (d) glicose; (e) lactose; (f) manose; (g) raminose e (h) sacarose.

Embora, a coloração das soluções resultantes deste teste seja ligeiramente diferente para diferentes padrões, todas as colorações são bastante distintas daquela correspondente à solução sem açúcar que é incolor. Isto sugere que o teste seja adequado para a detecção de açúcares presentes em extratos de frutas.

A coloração das soluções pode ser visualizada a olho nu quando a concentração de açúcar no tubo for superior a 7 µg/mL.

6.4.2. Detecção de Ácidos Orgânicos

A detecção de ácidos orgânicos foi realizada por cromatografia em papel, utilizando-se os padrões disponíveis, seguindo procedimento descrito na literatura (ITAL, 1990). A Figura 10 apresenta cromatogramas obtidos para estes padrões e também para o extrato de jambolão não purificado.

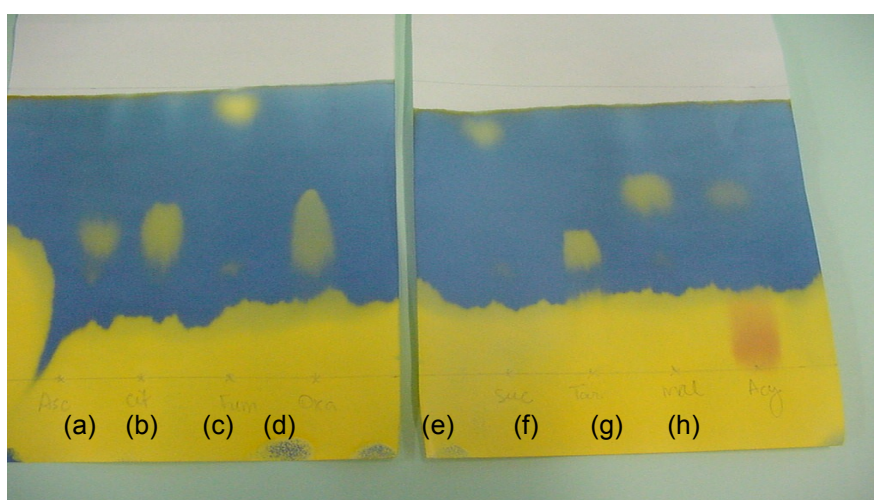


Figura 10. Detecção de ácidos orgânicos: (a) ascórbico; (b) cítrico; (c) fumárico; (d) oxálico; (e) succínico; (f) tartárico; (g) málico e (h) extrato aquoso de jambolão. A partir de padrões nas concentrações 5 g L⁻¹.

O azul de bromofenol é um indicador ácido-base, portanto, como pode ser observado na Figura 10, os ácidos foram visualizados como manchas amarelas. A parte da fase móvel por conter ácido acético também apresentou coloração amarela que se observa no início da ascensão cromatográfica (ainda na Figura 10). Os ácidos orgânicos que apresentaram fator de retenção mais próximo ao daquele contido no extrato de jambolão foram aplicados juntamente em outro papel numa tentativa sem sucesso de identificação, como pode ser visto na Figura 11. Como identificar os ácidos presentes no extrato não era um dos objetivos deste trabalho, este aspecto não foi explorado.

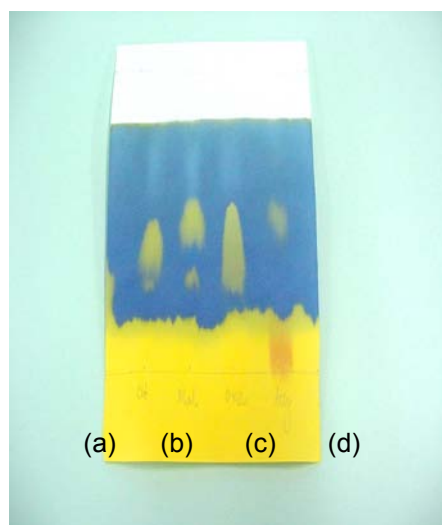


Figura 11. Comparação de padrões de ácidos orgânicos: (a) cítrico; (b) málico; (c) oxálico com (d) extrato aquoso de jambolão. A mancha laranja à direita corresponde às antocianinas.

6.4.3 Avaliação da Purificação do Extrato

Após a injeção do extrato no cartucho, este era lavado com 10 mL de uma solução aquosa de HCl 0,01%. Foram coletadas 3 frações, nas quais foram realizados os testes de detecção de açúcares e ácidos orgânicos, apresentados a seguir:



Figura 12. Detecção de açúcares nas frações coletadas da purificação do extrato por SPE.

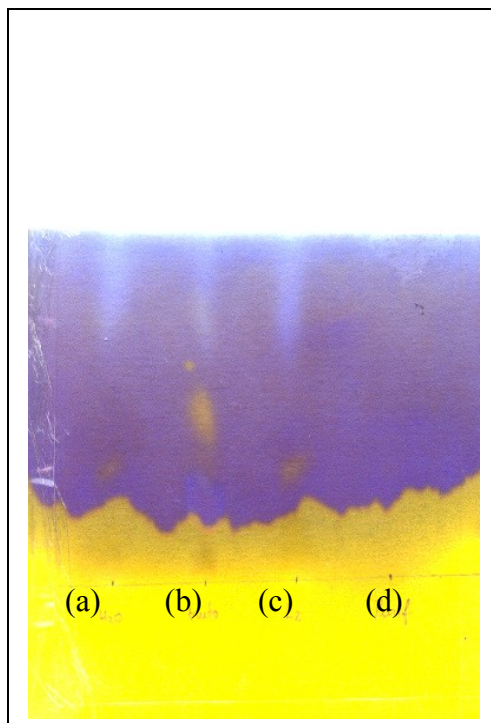


Figura 13. Detecção de ácidos orgânicos na purificação do extrato por SPE (a) água milli-Q, (b) extrato bruto de jambolão, (c) segunda fração de lavagem e (d) extrato purificado de jambolão.

A Figura 12 indica grande quantidade de açúcar na primeira fração de lavagem (coloração intensa). Percebe-se que a concentração de açúcar diminui progressivamente nas frações subseqüentes, indicando a adequação do procedimento de purificação para a eliminação de açúcares do extrato. De acordo com estes resultados, recomenda-se lavar o cartucho com um volume máximo de água igual a 15 mL, o que é suficiente para a purificação e não promove a perda das antocianinas durante o processo.

Pela Figura 13 observa-se a presença de ácidos orgânicos apenas no extrato bruto de jambolão, letra (b). Na segunda fração de lavagem, letra (c), a quantidade de ácidos orgânicos presentes é desprezível. No extrato purificado, letra (d), não é possível visualizar manchas relativas à presença de ácidos, o que confirma a purificação do extrato.

Os testes de detecção de açúcares e ácidos orgânicos foram coerentes para indicar que o procedimento de purificação foi adequado e que não houve necessidade de lavar exaustivamente o cartucho para a purificação; ao contrário,

com apenas 10 mL de água acidificada foi possível “limpar” o cartucho, sem que houvesse perda de antocianinas.

Após os resultados negativos do teste de detecção de açúcar, a lavagem do cartucho era suspensa e as antocianinas eram eluídas com uma solução metanólica de HCl 0,01% m/v e coletadas em um balão volumétrico de 5 mL. Para a quantificação das antocianinas presentes no extrato, 2 alíquotas de 100 μ L eram retiradas e diluídas separadamente em 10 mL de solução de pH 1,0 e 10 mL de solução de pH 4,5, seguindo-se o método do pH diferencial, descrito por Fuleki e Francis (1968).

Segundo as especificações do fabricante, a quantidade de analito a percolar o cartucho não deve exceder 1% em massa da quantidade do sorvente. Assim, como os cartuchos contêm 500 mg de fase ligada C₁₈, o volume de extrato a ser percolado foi calculado de forma a conter uma quantidade máxima de 5 mg de antocianinas e foi expresso como “volume relativo”, ou seja o volume de extrato contendo 5 mg de antocianinas equivale a 100%. A Tabela 7 contém o volume de extrato percolado (**V**), o volume relativo (**V_{rel}**) e a percentagem em massa de antocianina recuperada, calculada segundo o método do pH diferencial.

Tabela 7. Dados da purificação das antocianinas por SPE.

V (mL)	V_{rel} (%)	m_p (g)	m_R (g)	% recuperação
6,0	95	4,78	3,94	82
5,0	79	3,98	3,54	89
4,0	63	3,19	2,91	91
3,0	48	2,39	2,25	94

* o volume de 6,3 mL equivale a 5 mg de antocianinas.

É possível observar pela Tabela 7 que a porcentagem de recuperação em massa das antocianinas é maior quando o volume de extrato percolado pelo cartucho é menor. Isto pode estar relacionado ao fato de que o extrato bruto contém outros componentes, como outros polifenóis e compostos orgânicos, que ocupam os sítios ativos da fase C₁₈ não permitindo a partição das antocianinas, as quais não ficam retidas no cartucho.

Segundo K-Schafhalter e colaboradores (1998) os cartuchos de SPE podem ser re-utilizados até 7 vezes, sem que haja perda da eficiência na purificação, os dados experimentais obtidos no presente trabalho, comprovam esta observação. Os dados, relativos a re-utilização do cartucho, encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Dados da purificação das antocianinas por SPE.

percolação	m_p (g)	m_R (g)	% recuperação
1 ^a	2,87	2,87	100
2 ^a	2,87	2,90	101
3 ^a	2,87	2,79	97
4 ^a	2,87	2,85	99
5 ^a	2,87	2,87	100
6 ^a	2,87	2,87	100
7 ^a	2,87	2,91	101
8 ^a	2,87	2,69	94

m_p corresponde à massa de antocianinas percolada e m_R à massa recuperada.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, pode-se afirmar que é possível utilizar cada cartucho pelo menos 7 vezes consecutivas sem que tenha sido observada perda na eficiência de purificação. Na oitava tentativa de purificação, verificou-se uma diminuição de cerca de 6% no rendimento. Porém, dependendo dos objetivos pretendidos, esta perda pode ser considerada desprezível.

As antocianinas totais obtidas por este método de purificação foram levadas à evaporação do solvente à temperatura ambiente para uso nos ensaios biológicos.

6.5. Isolamento das Antocianinas

O isolamento das antocianinas também realizado seguindo-se a metodologia de Goiffon e colaboradores (1999). Alíquotas de 0,5 mL foram coletadas e a absorbância foi registrada para a montagem do cromatograma representado na Figura 14. Este procedimento foi adotado para contornar

problemas de ordem instrumental que impediram a obtenção dos cromatogramas e deve ser considerado ao se notar sua aparente baixa resolução.

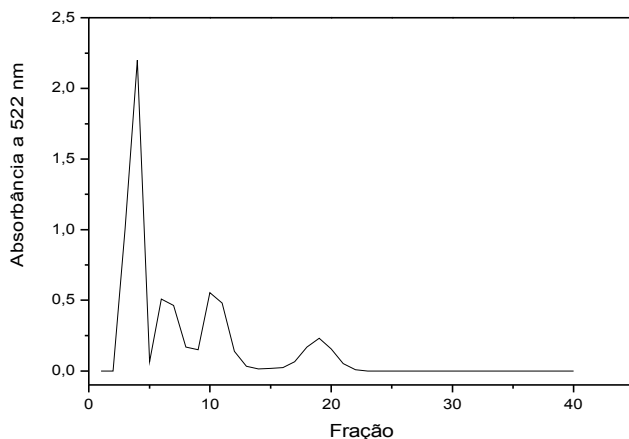


Figura 14. Cromatograma da separação das antocianinas, construído a partir das frações coletadas. As frações (eixo x) correspondem às soluções contidas nos tubos de ensaio que foram coletadas após a passagem da amostra pela coluna cromatográfica.

No desenvolvimento deste trabalho, foi cogitado o emprego da técnica de ressonância magnética nuclear de prótons para a identificação das antocianinas isoladas. A quantidade máxima de material isolado, cerca de 0,4 mg, não foi suficiente para este teste, sendo necessária uma quantidade mínima de antocianinas em torno de 10 mg. Esta massa de antocianina foi obtida a partir de 3 corridas cromatográficas da mistura de 3 extratos purificados por SPE, cada um contendo em média 3 mg de antocianinas totais. Eventualmente, o uso de cromatografia em coluna aberta para o isolamento das antocianinas possa representar uma alternativa mais adequada para isola-las em maior quantidade.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

As antocianinas podem ser extraídas em meio aquoso ou alcoólico. O planejamento fatorial indicou que o tipo de solvente e a temperatura são fatores que influenciam o rendimento de extração de antocianinas. Para se extrair antocianinas com o maior rendimento deve-se utilizar metanol a 46 °C. Porém, as condições do extrato devem ser adequadas às características compatíveis com aplicações pretendidas. Por exemplo, para posterior purificação por SPE em cartucho C₁₈ ou mesmo para aplicações biológicas diretas, o extrato deve ser aquoso. Assim, neste trabalho, trabalhou-se com extratos aquosos visando a posterior purificação das antocianinas por SPE.

As técnicas de PC e HPLC propuseram a identificação das antocianinas presentes no extrato de jambolão como sendo delphinidina 3-glicosídeo, cianidina 3-galactosídeo, pelargonidina 3-glicosídeo e pelargonidina 3-arabinosídeo.

A técnica de extração em fase sólida com cartucho C₁₈ demonstrou ser adequada para a purificação do extrato aquoso de jambolão, pois permitiu a eliminação de açúcares e ácidos orgânicos do extrato, além de possibilitar a recuperação de antocianinas com grande eficiência. Os cartuchos podem ser utilizados, no mínimo, 7 vezes, sem que haja perda da eficiência de purificação. Em geral, ao se percolar uma quantidade de antocianinas em massa inferior a 3 mg (cerca de 60% da capacidade do cartucho) obtém-se rendimento de purificação em torno de 100%, aumentando-se a massa de antocianinas para 5 mg, capacidade máxima do cartucho, tem-se rendimento em torno de 82%.

As antocianinas purificadas foram adequadamente separadas por HPLC e coletadas em frações de 0,5 mL para a realização dos testes biológicos. Porém, inicialmente, avaliou-se o efeito biológico das antocianinas totais contidas no extrato purificado, os quais apresentaram em média a concentração de $0,8 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$, equivalente a $1,7 \pm 0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de antocianinas totais (expressa como cianidina 3-glicosídeo). Para a realização dos testes biológicos *in vivo*, vários extratos purificados foram agrupados, o solvente evaporado e as antocianinas novamente dissolvidas em um volume menor de água, visando-se aumentar as concentrações.

PARTE 2

ASPECTOS BIOLÓGICOS

CAPÍTULO 8

INTRODUÇÃO

8.1. Propriedades Biológicas dos Flavonóides

Inicialmente, os flavonóides foram reconhecidos por sua importância na manutenção da integridade das paredes e da resistência dos capilares sanguíneos. Posteriormente, outras propriedades foram descritas para esta família de moléculas, incluindo: atividades anti-hipertensiva, antiarrítmica, anti-colesterolêmica, hepatotóxica, anti-hemorrágica, anti-tumoral, anti-trombótica, antiinflamatória e antialérgica, além de atuarem como estabilizantes de plaquetas e mastócitos. Os flavonóides possuem também potencial função protetora contra doenças cardiovasculares e coronarianas, podendo atuar ainda contra várias formas de câncer (Gryglewski *et al.*, 1987; Hertog *et al.*, 1993; Formica e Regelson, 1995; Hertog, 1996; Rice-Evans *et al.*, 1996).

A variedade dos efeitos biológicos dos flavonóides em inúmeros sistemas celulares *in vitro*, bem como *in vivo*, tem sido descrita por vários autores. Flavonóides podem inibir muitas enzimas importantes nos sistemas celulares como: ATPase, fosfolipase, ciclooxigenase, lipoxigenase, aldose redutase, hexoquinase, NADH oxidase, succinoxidase, xantina oxidase e proteína quinase (Bohmont *et al.*, 1987; Hille e Sprecher, 1987, Ferriola *et al.*, 1989; Formica e Regelson, 1995). Podem, ainda, induzir várias enzimas como aril hidroxilase e epóxido hidroxilase (Das, 1994) e atuar na diminuição da peroxidação lipídica (Das e Ray, 1988). A capacidade antioxidante dos flavonóides pode inibir a produção de radicais livres nas células (Haenen *et al.*, 1997; Metodiewa *et al.* 1999).

De maneira geral, os flavonóides parecem possuir muitas propriedades que os tornam excelentes agentes naturais modificadores da resposta biológica. Atualmente, muita ênfase tem sido dada as suas propriedades antioxidantes e seu papel inibitório na proliferação de células de câncer em cultura e em vários estágios de desenvolvimento tumoral estudados em animais. As atividades antioxidante e quelante dos flavonóides são, provavelmente, os fatores mais importantes na sua ação de proteção contra degradação em tecidos e células por radicais livres (Miranda, 2000).

Com relação às antocianinas em particular, Milbury e colaboradores (2002) examinaram sua biodisponibilidade e farmacocinética em 4 mulheres com idade

média de 67 anos em bom estado de saúde. Os autores investigaram a presença de antocianidinas glicosiladas (antocianinas) na urina e no plasma sanguíneo após a ingestão de um suco de fruta contendo 720 mg destas substâncias. Os autores perceberam que as antocianinas na forma glicosilada são absorvidas no plasma sanguíneo e sua eliminação do plasma seguiu uma cinética de primeira ordem, sendo que a maior parte dos compostos foi excretada na urina em 4 horas.

Vários autores estudaram a atividade antioxidante de antocianinas (Nielsen *et. al.*, 2003, Cho *et. al.*, 2003; Bagchi *et. al.*, 2004). Wang e colaboradores (1999) atribuíram atividade antioxidante e anti-inflamatória à cianidina extraída de cerejas em estudos realizados *in vitro*. O efeito antioxidante observado para a cianidina, em concentração 2 mmol L⁻¹ foi superior ao da vitamina E. A propriedade anti-inflamatória desta molécula foi observada por sua capacidade de inibir as enzimas prostaglandina H endoperóxido sintase-1 e prostaglandina H endoperóxido sintase-2 com IC₅₀ (concentração do composto que promove a inibição de 50% da atividade enzimática) de 90 e 60 mmol L⁻¹, respectivamente. Amorini e colaboradores (2003) descreveram a capacidade da cianidina 3-glicosídeo de proteger o miocárdio e eritrócitos de ratos de danos mediados por espécies reativas de oxigênio, propriedade que está associada ao efeito antioxidante das antocianinas.

Mais recentemente, a atividade anti-tumoral de extratos ricos em antocianinas (AREs) foi avaliada por Zhao e colaboradores (2004). Os autores testaram três AREs contendo entre 10 e 75 µg de antocianinas/mL em células tumorais da linhagem HT-29 (câncer de cólon) e em células de cólon não tumorais NCM460. Verificaram que todos os extratos inibiram aproximadamente 50% da proliferação de células HT-29 quando estas células foram submetidas a 25 µg de antocianinas/mL durante 48 horas, o que não foi observado para as células de cólon não tumorais cuja proliferação praticamente não foi afetada na presença de antocianinas.

Estudos recentes têm demonstrado a importância das antocianinas em diversos eventos biológicos (Chang, *et. al.*, 2005; Chen *et. al.*, 2005; Duthie *et. al.*, 2005; Heo and Lee, 2005; Talavéra *et.al.*, 2005; Fleschhut, *et.al.*, 2006). Entretanto, não há dados sobre efeitos destes flavonóides em fosfatases, enzimas

essenciais em diversos mecanismos de controle biológico no organismo. Uma breve discussão sobre esta família de enzimas está descrita a seguir.

8.2. Enzimas Fosfatases

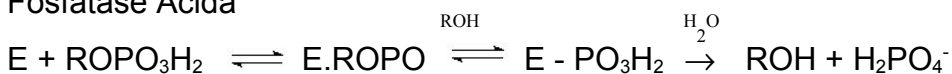
Conforme mencionado, os flavonóides possuem importantes atividades biológicas, muitas das quais são resultantes da capacidade destes compostos inibir ou ativar a atividade de enzimas específicas. Aoyama e colaboradores tem estudado sistematicamente as enzimas fosfatases sobre o âmbito de purificação, caracterização e regulação destas frente a inibidores específicos. Há também estudos sobre o efeito de flavonóides (disponíveis comercialmente) na atividade das fosfatases, o que originou parte desta dissertação (Taga *et.al.*, 1997; Ferreira *et.al.*, 1998 a-b; Ferreira *et.al.*, 1999; Aoyama *et. al.*, 2001; Silva, 2002; Miranda, 2000; Aoyama *et. al.*, 2003; Freire *et. al.* 2003 a-b; Miranda, 2005).

As fosfatases são hidrolases que utilizam como substratos fosfatomonoésteres. Tais enzimas estão amplamente distribuídas na natureza, tendo sido encontradas em animais, vegetais e em microorganismos e são divididas em três grupos principais: fosfatases ácidas, fosfatases alcalinas e proteínas fosfatases. Enquanto as fosfatases ácidas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 5,0, as alcalinas apresentam o pH ótimo ao redor de 9,0. Ambas atuam em substratos de baixa massa molecular, como por exemplo, açúcares fosforilados, entretanto, elas possuem diferentes mecanismos de reação e somente as fosfatases alcalinas necessitam de íons bivalentes, tais como magnésio, cobalto ou manganês para a catálise. Os mecanismos das reações podem ser observados a seguir e foram propostos por Vicent e colaboradores em 1992 e citados pelo grupo de Aoyama (Aoyama *et.al.*, 2003).

Fosfatase Alcalina



Fosfatase Ácida



Em organismos eucarióticos, as fosfatases ácidas são classificadas, de acordo com a massa molecular relativa (Mr) e pelos padrões de inibição, em 3 grandes grupos (Silva, 2002):

- i. fosfatases ácidas de alta Mr ou tartarato-resistentes, enzimas que possuem massa molecular superior a 100 kDa e não são inibidas pelo tartarato;
- ii. fosfatases de Mr intermediária, enzimas que possuem massa molecular entre 20 e 100 kDa e são inibidas pelo fluoreto;
- iii. fosfatases de baixa Mr, enzimas com massa molecular inferior a 20 kDa e são inibidas pelo p-hidroximercuribenzoato.

As fosfatases ácidas de alta e intermediária Mr podem conter ferro, zinco ou magnésio e, algumas vezes, carboidratos. Elas estão presentes em diversos tecidos animais e possuem distribuição extremamente variada, podendo ser encontradas em secreções como saliva, sêmen, e em diversos tecidos e órgãos como: próstata, placenta, cérebro, fígado, coração, baço, rim, glândulas salivares, ossos, gengiva, nervos e glânglios nervosos. Estudos citoquímicos revelaram a presença destas enzimas em diferentes locais da célula: núcleo, mitocôndrias, membranas, lisossomo, complexo de golgi e retículo endoplasmático. No sangue, as fosfatases podem ser detectadas tanto nos eritrócitos, leucócitos, plaquetas, como no plasma, onde algumas vezes são utilizadas como meio de diagnóstico para algumas doenças. A atividade alterada da fosfatase ácida plasmática é útil nos prognósticos dos cânceres de próstata e ovário (Silva, 2002).

As fosfatases ácidas de baixa Mr são classificadas como proteínas tirosina fosfatases e correspondem a uma classe de enzimas essencial ao organismo, visto que o balanço entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores (ou reguladores) extracelulares, como hormônios, mitógenos, carcinógenos, citocinas, neurotransmissores, substâncias ou metabólitos tóxicos (Miranda, 2005). Em consequência à ação destes efetores ocorre regulação da divisão, diferenciação e desenvolvimento celular, regulação do metabolismo e

expressão gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória (Trowbridge, 1991; Cohen, 1992; Johnson & Barford, 1993; Denu *et. al.*, 1996). Cabe ressaltar que antagonicamente à ação das enzimas fosfatases atuam as enzimas quinases, responsáveis por adicionar grupamentos fosfato em seus substratos, de forma que a fosforilação reversível de proteínas é catalisada pela ação oposta e dinâmica de proteínas quinases e fosfatases (Aoyama *et.al.*, 2003).

Os ensaios biológicos utilizados para verificar a ação de diferentes substâncias em organismos vivos são denominados bioensaios, sendo alguns descritos na seqüência. Neste trabalho, foram realizados diferentes experimentos procurando avaliar o efeito das antocianinas em fosfatases de camundongos e em cultura de células.

8.3. Bioensaios

O bioensaio é definido como a estimativa da concentração ou da potência de determinada substância através da medida da resposta biológica por ela produzida. Assim, o bioensaio é utilizado com a finalidade de medir a atividade farmacológica de substâncias novas ou quimicamente não definidas, investigar a função dos mediadores endógenos e medir a toxicidade das drogas e seus efeitos indesejáveis. Atualmente, um dos principais objetivos do bioensaio é fornecer informações que irão prever o efeito da droga em situações clínicas. A escolha dos sistemas de testes laboratoriais (“modelos” *in vivo* e *in vitro*) que proporcionam este elo previsível tem sido alvo de muita atenção (Rang *et.al.*, 2001).

Os ensaios *in vitro* apresentam grande aceitação no meio científico, não apenas devido à contribuição nas investigações do mecanismo de toxicidade de diversas drogas, mas também devido às suas vantagens em relação aos sistemas *in vivo*, tais como: melhor reprodutibilidade dos ensaios e resultados, simplicidade, rapidez, diminuição do custo e redução do número de animais utilizados em experimentos (Chu, 1995). O termo *in vitro* refere-se primariamente ao manuseio de células e tecido retirados do organismo sob condições que permitem sua estabilidade, crescimento e diferenciação. As técnicas de cultura de células são fundamentais para a compreensão e melhorias de procedimentos em biologia

celular e molecular e têm sido empregadas com crescente freqüência na química medicinal, farmacologia, genética, biologia reprodutiva e oncologia (Barile, 1994).

Através dos estudos de citotoxicidade é possível determinar o potencial de um agente causar dano celular. Os efeitos citotóxicos podem comprometer a viabilidade das células de diversas maneiras, como, por exemplo, alterando integridade estrutural, metabólica e reprodutiva, podendo levar à inibição da divisão ou à morte celular (Repetto & Sanz, 1993).

Existem 3 tipos de citotoxicidade: basal, órgão-específica e organizacional. A citotoxicidade basal engloba processos celulares fundamentais que envolvem estruturas e funções comuns a todas as células do organismo (membrana celular, mitocôndrias, ribossomos, núcleo e lisossomos). Na órgão-específica, ocorre o efeito de um composto ou droga em uma função especializada. A citotoxicidade do tipo organizacional é causada por drogas que interferem com produtos do metabolismo ou secreção celular, interferindo em funções órgão-específica ou funções organizacionais (Barile, 1994).

Um dos testes de viabilidade celular muito utilizado para avaliar danos celulares baseia-se na redução do corante MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] a formazano. Este teste envolve a absorção do sal MTT pelas células e sua redução no interior da mitocôndria a um produto chamado formazano, o qual é acumulado no interior da célula e extraído através da adição de um solvente apropriado, no caso, o etanol. O formazano pode ser quantificado pela sua absorção a 570 nm em um espectrofotômetro e sua quantidade é proporcional ao número de células viáveis, que são as únicas que metabolizam o MTT. Entre outros métodos utilizados na avaliação da viabilidade celular, destacam-se:

- Incorporação do Vermelho Neutro (cloridrato de 2-amino-3-metil-7-dimetil-amino fenanzina): avalia a integridade da membrana lisossomal (Renzi *et. al.*, 1993);
- Conteúdo de ácidos nucléicos e dosagem de proteínas: oferece um indicativo do número de células, porém, não evidencia morte ou diferenciação celular (Cingi *et. al.*, 1991);

- Exclusão do azul de tripan: avalia a integridade de membranas, pois as células viáveis excluem o corante (Renzi *et. al.*, 1993);
- Dosagem da atividade de fosfatases – fornece indicação do metabolismo celular em relação ao metabolismo do fosfato (Aoyama *et. al.*, 2000).

Nesta dissertação, os linfócitos foram escolhidos como células-alvo para os testes *in vitro*, pois em 2003, não havia trabalhos publicados na literatura avaliando-se o efeito de antocianinas neste tipo de células. Os linfócitos são células essenciais para o sistema imunológico e tem sido extensamente estudadas pelo grupo de Hiroshi Aoyama.

8.4. Linfócitos Humanos

Assim como as demais células sanguíneas, os linfócitos dos mamíferos originam-se das células tronco hematopoiéticas, através de uma série de eventos complexos de diferenciação e se tornam maduros. Estas células se congregam em tecidos especializados conhecidos como órgãos linfóides, sendo os principais tecidos linfóides: a medula óssea, o timo, o baço, as adenóides, as tonsilas, o apêndice, os linfonodos e as placas de Peyer (Abbas *et. al.*, 2000).

A função dos linfócitos é defender o organismo contra a invasão de patógenos. Eles se distinguem em duas linhagens principais, conhecidas como células T (derivadas do timo) e células B (derivadas da medula óssea). As proporções relativas de células T e B variam entre tecidos, e no sangue periférico, representam cerca de 75% e 10% de todos os linfócitos, respectivamente. Além disso, os linfócitos B e T apresentam diferentes funções. Os linfócitos B ao reconhecerem antígenos extra-celulares ou antígenos em superfícies de células se diferenciam em células secretoras de imunoglobulinas. Os linfócitos T reconhecem e respondem aos antígenos ligados ao complexo de histocompatibilidade (MHC) na superfície de outras células e são classificados em T *helper*, que secretam citocinas que estimulam a proliferação e diferenciação de outras células de defesa, e linfócitos T citotóxicos os quais lisam as células que

expressam antígenos. Há uma terceira classe de linfócitos, os “*Natural Killers*” (NK), a qual é responsável pela imunidade inata contra vírus e microorganismos intracelulares (Abbas *et al.*, 2000).

Os linfócitos são responsáveis pela produção de diversas substâncias, entre elas, mediadores inflamatórios como citocinas, peptídeos solúveis secretados por uma variedade de células. Estas citocinas incluem os interferons, importantes na limitação da propagação de determinadas infecções virais, e as interleucinas, as quais estão envolvidas na indução de divisão e diferenciação de outras células (Abbas *et al.*, 2000).

O câncer dos leucócitos (glóbulos brancos) é denominado leucemia e muitas vezes não tem origem conhecida, mas tem como principal característica o acúmulo de células jovens (blásticas) anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais. O tipo de leucemia mais freqüente na criança é a leucemia linfóide aguda (ou linfoblástica). A leucemia mielóide aguda é mais comum no adulto. Esta última tem vários subtipos: mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritrocítica e megacariocítica (INCA,2006).

8.5 Linhagem Celular da Leucemia Mielóide Humana (HL60)

Para este trabalho, as células da leucemia promielocítica humana, HL60, foram isoladas do sangue de um paciente com leucemia promielocítica aguda e proliferam continuamente em suspensão, consistindo predominantemente de promielócitos (Newburger *et al.*, 1979; Breitman, 1990), porém, 4-5% delas mostram características morfológicas de células mielóides mais maduras, como mielócitos, metamielócitos, bastões e leucócitos polimorfonucleares (Newburger *et al.*, 1979). Estas células representam um sistema experimental para o estudo *in vitro* da diferenciação leucêmica, bem como alvo do estudo de possíveis drogas que poderão ser utilizadas no tratamento dos diferentes tipos de leucemias (Sokoloski and Sartorelli, 1997; Uzunoglu *et al.*, 1999).

CAPÍTULO 9

OBJETIVOS

Nesta parte do trabalho, visou-se realizar os testes biológicos com as antocianinas previamente extraídas e purificadas, sendo priorizadas as seguintes etapas:

- Realização dos testes *in vivo* para a avaliação do efeito de antocianinas na atividade de enzimas fosfatases de camundongos;

- Realização dos testes *in vitro* para a avaliação da citotoxicidade de antocianinas em células de linfócitos sadias e tumorais da linhagem de leucemia mielóide humana (HL-60).

CAPÍTULO 10

PARTE EXPERIMENTAL

10.1. Reagentes, Materiais e Equipamentos

Reagentes:

- Albumina de soro bovino Sigma; glicina Merck; β -mercaptoetanol Sigma; MTT – brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] Sigma; hidróxido de sódio Synth; p-hidroximercuribenzoato, pHMB, Sigma; p-nitrofenil-N-acetil- β -glicosamina; reagente de Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Bioscience); reagente de Folin Ciocalteu Merck; soro fetal bovino inativado Nutricell; sulfato de cobre Ecibra; sulfato de p-nitro catecol Sigma; tartarato de sódio Art Lab.; meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute); todos de pureza analítica.

Materiais:

- placas para cultura de células Corning;
- vidrarias de uso geral.

Equipamentos:

- câmara de Neubauer 0,0025 mm² Loptik Labor;
- centrífuga 212 Fanem;
- espectrofotômetro Ultrospec 2000, Amersham Bioscience;
- estufa de CO₂ Forma Scientifica SL Shel Lab;
- fluxo laminar Steril Gard III Advance - The Baker Company;
- triturador Omni-mixer MWDR Survall;

10.2. Procedimentos Experimentais

10.2.1. Ensaio *in vitro*

a) Obtenção e Cultura Primária de Linfócitos

Os linfócitos foram obtidos coletando-se cerca de 50 mL do sangue periférico de voluntários saudáveis não fumantes e que não estavam fazendo uso de medicamentos (conforme aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, nº 219/2000). O sangue coletado foi

diluído em meio para cultura RPMI na proporção 1:1 v/v. Este meio continha glutamina 0,200 g/L e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) para evitar proliferação bacteriana. Em tubos de centrifuga foram adicionados 3 mL do reagente de Ficoll-Paque™ Plus e 11 mL de sangue diluído. Os tubos foram centrifugados a 1500 rpm durante 30 minutos onde houve a separação dos componentes do sangue por diferença de densidade. Com uma pipeta pasteur, retirou-se a nuvem de linfócitos a qual foi centrifugada juntamente com RPMI a 1500 rpm para lavagem. Este procedimento foi repetido por duas vezes e ao seu término, os linfócitos foram re-suspensos em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e contados. Os linfócitos obtidos foram colocados em placas para cultura com 24 cavidades de forma a conter 1×10^6 células por mililitro em cada cavidade. As células foram incubadas em estufa a 37°C sob atmosfera úmida e contendo 5% de CO₂.

b) Cultura de Células Tumorais - Linhagem HL60

As células HL60 foram mantidas em cultura contínua, através de repiques periódicos (72 horas) e foram utilizadas quando atingiram uma densidade de 1×10^6 células/mL. O cultivo foi realizado em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (mesmas condições das células saudáveis). A incubação foi feita em estufa a 37°C sob atmosfera úmida e contendo 5% de CO₂.

c) Tratamento das Culturas de Linfócitos Sadios e Células HL-60 com Antocianinas

Tanto a cultura primária de linfócitos quanto a contínua (HL-60) foram mantidas em estufa a 37°C, ambas submetidas individualmente ao mesmo procedimento relatado na seqüência. Após 48 horas de incubação, 800 µL do meio contendo as células foram cuidadosamente retirados e acrescentou-se o mesmo volume de diferentes soluções estoque contendo as antocianinas totais previamente purificadas e diluídas em RPMI. As concentrações finais de antocianinas em cada cavidade da placa de cultura foram 50, 100, 200, 300 e 400 µmol L⁻¹. Cabe ressaltar que foi realizado um controle (células na ausência de

antocianinas). As placas foram mantidas em estufa por 24 horas, após este período, 800 μL do meio contendo as células foi cuidadosamente retirado e descartado e adicionaram-se 800 μL de corante MTT (dissolvido em RPMI na concentração de 1mg/mL). Após 4 horas, o meio de cultura foi retirado e 1 mL de etanol absoluto foi adicionado em cada cavidade, a seguir realizou-se a leitura da absorbância a 570 nm. Cabe ressaltar que todo o procedimento foi realizado em triplicata e no fluxo laminar de células para não haver contaminações das culturas.

10.2.2. Ensaio *in vivo*

O efeito biológico das antocianinas sobre a atividade fosfatásica de camundongos foi avaliado através da administração subcutânea do extrato aquoso purificado equivalente a 10 mg de antocianinas totais por kg de massa corpórea do animal. Esta quantidade de antocianinas foi estimada tendo-se como parâmetro trabalhos realizados com flavonóides comerciais disponíveis na literatura. Ao todo foram utilizados para o experimento 10 camundongos albinos machos da linhagem Swiss pesando entre 25 e 35 g cada. Estes animais foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*, temperatura ambiente monitorada entre 22°C, alojados coletivamente (5 animais por gaiola) e aclimatados ao local de experimentação por pelo menos 7 dias. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo um deles chamado “controle”, injetado com 100 μL de uma solução de NaCl 0,9 % m/v e o outro que foi injetado com 100 μL do extrato antociânico purificado 20 mmol L⁻¹, de forma que cada animal recebeu o equivalente a 10 mg de antocianinas por kg de massa corpórea. O extrato de antocianinas injetado foi previamente purificado por extração em fase sólida e o metanol evaporado em evaporador à temperatura ambiente. As antocianinas foram dissolvidas em água deionizada.

Após 24 horas da aplicação, teste agudo, os animais foram sacrificados e os órgãos de interesse (rim e fígado) foram retirados e congelados em nitrogênio líquido. Após 24 horas, os órgãos foram descongelados, pesados e triturados por 2 minutos em tubo contendo 10 mL de tampão acetato 100 mmol L⁻¹, pH 5,0 com 0,05% de β -mercaptoetanol v/v e NaCl 50 mmol L⁻¹. O extrato foi centrifugado a

20000 rpm (47807 g) durante 30 minutos para a precipitação do tecido não lisado, o qual foi descartado. A seguir, dosou-se a atividade fosfatásica nestes extratos, conforme descrito no item b a seguir.

O plasma coletado foi diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9 % m/v) na proporção 1:1 v/v e centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. O precipitado foi descartado e a atividade de fosfatases foi determinada (vide item b) bem como a quantidade de proteínas no sobrenadante.

a) Dosagem de Proteínas

A quantidade de proteína em cada animal foi quantificada para verificar se as antocianinas influenciaram o conteúdo destas substâncias nos organismos. Este dado é importante, pois variações no conteúdo protéico podem estar relacionadas à síntese de DNA e divisão celular. Além disso, a atividade específica enzimática leva em consideração a quantidade de proteína presente no meio. As proteínas foram quantificadas pelo Método de Lowry (Hartree, 1972). Em tubos de ensaio, foram adicionados 50 μ L do extrato protéico e 150 μ L de água Milli-Q e 2 mL de um reagente previamente preparado, sendo constituído de uma mistura das seguintes soluções:

- 4,9 mL de CaCO_3 2% m/v dissolvido em uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e
- 0,1 mL de CuSO_4 0,5% m/v e tartarato de sódio 1% m/v dissolvidos em água.

Após 10 minutos, foram adicionados 200 μ L do reagente de Folin Ciocalteu diluído 1:1 v/v em água. A absorbância das soluções foi lida a 660 nm, após 30 minutos de reação.

b) Avaliação da Atividade Fosfatásica

I) Fosfatase Ácida Total (FAT)

A atividade das enzimas fosfatases foi determinada em tubos de ensaio colocando-se 50 μ L do extrato enzimático, 5 mmol.L⁻¹ p-nitrofenilfosfato (pNPP) como substrato, completando-se o volume de 1 mL com tampão acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0. Os tubos foram mantidos a 37°C durante 10 minutos e a reação

foi paralisada com 1 mL de NaOH 1 mol L⁻¹. Nos tubos controles, o extrato enzimático foi adicionado após a adição da solução de NaOH (Taga e Van Etten, 1982).

A formação do p-nitrofenol (pNP), produto da reação enzimática, foi determinada pela leitura da absorbância em 405 nm, considerando-se o valor de 18.000 L Mol⁻¹cm⁻¹ como absorvidade molar da forma do pNP (Chaimovich e None, 1970).

II) Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (FATR)

O ensaio foi realizado como descrito anteriormente, porém com a adição de pHMB e tartarato de sódio. O pHMB inibe toda a atividade de FABMr e o tartarato inibe a atividade de outras fosfatases. A atividade residual corresponde à atividade das fosfatases resistentes ao tartarato.

III) Fosfatase Ácida de Baixa Massa Molecular Relativa (FABMr)

O ensaio foi realizado como descrito para a determinação de fosfatase ácida total (FAT), porém com adição de tartarato e fluoreto, pois estes são inibidores de fosfatases de alta e média massa molecular relativa, respectivamente.

IV) Fosfatase Alcalina de Membrana (FAlc)

A atividade enzimática das fosfatases alcalinas foi realizada adicionando-se 50 µL de extrato enzimático em meio contendo 25 mmol L⁻¹ de glicina (pH 9,4), 2 mmol L⁻¹ de MgCl₂ e 1 mmol L⁻¹ de pNPP para um volume reacional final de 1,0 mL, a 37 °C, de acordo com os procedimentos descritos por Ciancaglini e colaboradores (1992). A adição da solução de Mg²⁺ é necessária porque as fosfatases alcalinas necessitam de íons divalentes para a catálise.

Em todos os ensaios, uma unidade de atividade enzimática (UE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de produto por minuto. A atividade enzimática específica (AE) foi expressa como unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína (AE= UE mg⁻¹).

CAPÍTULO 11

RESULTADOS E DISCUSSÕES

11.1 Ensaios *in vitro*: Avaliação do Efeito de Antocianinas em Cultura de Linfócitos Sadios e Células Tumorais – linhagem HL60

Vários compostos naturais originários de plantas (fitoquímicos) são potenciais quimiopreventivos e quimioterápicos. Como agentes terapêuticos, os fitoquímicos podem induzir a morte de células cancerosas ou evitar seu crescimento promovendo a remissão do câncer em modelos animais (Pezutto, 1997). Os alcalóides da vinca, taxanos e campotecinas são exemplos de derivados vegetais usados na quimioterapia do câncer (Rang *et. al.*, 2001).

A citotoxicidade de uma substância pode ser avaliada através de vários parâmetros, os quais analisam a integridade da membrana celular, metabolismo e funcionamento de organelas. Neste trabalho, avaliou-se a citotoxicidade de antocianinas em cultura de células utilizando-se a redução de MTT como parâmetro de viabilidade celular. MTT é um corante amarelo que ao ser reduzido para formazano torna-se azul e sua concentração pode ser determinada por medidas espectrofotométricas em 570 nm.

O teste da redução de MTT avalia a viabilidade celular pela função mitocondrial, pois o corante é reduzido na presença de NADH, que é liberado por atividade de enzimas como succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias celulares (Mosmann, 1983). A Figura 15 mostra os resultados obtidos.

Pela Figura 15 pode-se notar que a citotoxicidade das antocianinas é maior em células da linhagem HL-60. A concentração de 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de antocianinas totais em meio aquoso é suficiente para induzir a morte celular em cerca de 90% das células HL-60 e esta mesma concentração induz a morte de apenas cerca de 20% de linfócitos normais. Estes resultados indicam que as antocianinas apresentam efeito citotóxico às células da leucemia mielóide humana, apresentando grande seletividade a estas células, o que sugere a propriedade anti-tumoral destes pigmentos. Cabe ressaltar que mais estudos devem ser realizados visando confirmar a atribuição efetiva da propriedade anti-tumoral às antocianinas em relação às células HL-60, principalmente sob o aspecto de proposta dos mecanismos de ação desta classe de pigmentos.

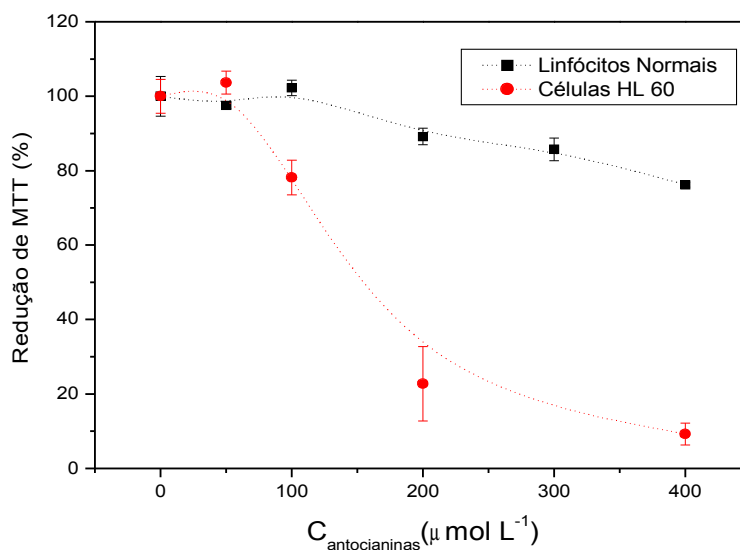


Figura 15. Efeito citotóxico de antocianinas em culturas de linfócitos e células HL-60. Os ensaios foram feitos em triplicata e as barras verticais indicam a estimativa de desvio-padrão.

11.2 Ensaios *in vivo*: Avaliação do Efeito de Antocianinas em Fostatases de Camundongos.

As antocianinas apresentam diversas atividades biológicas, porém, não foi encontrado material disponível na literatura sobre a atividade destas substâncias em enzimas fosfatases que, conforme mencionado, são enzimas que participam de diversos eventos celulares essenciais ao organismo e representam, portanto, um promissor alvo de estudos. Um dos objetivos deste trabalho consistiu na avaliação do efeito de antocianinas em proteínas e em algumas fosfatases presentes no plasma sanguíneo, nos rins e no fígado de camundongos. Para tanto, foram realizados estudos *in vivo*, que permitem compreender a dispersão das antocianinas no organismo e sua possível ação nos diversos órgãos. Num primeiro momento, foi feito um ensaio agudo para avaliar a atividade biológica de antocianinas em um curto período de tempo. Estes resultados indicariam a relevância de prosseguir a avaliação das propriedades biológicas de antocianinas.

Todas as enzimas fosfatases reconhecem o substrato sintético *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) e o convertem a *p*-nitro fenol (pNP) e fosfato inorgânico.

Na presença de hidróxido de sódio, pNP apresenta coloração amarela e pode ser quantificado espectrofotometricamente a 405 nm.

Não foi possível a avaliação direta do efeito das antocianinas em enzimas fosfatases isoladas de rim bovino. As antocianinas interferem na quantificação do produto da reação catalisada pelas fosfatases, pNP, já que neste meio sua forma amarelada absorvem no mesmo comprimento de onda. Além disso, tanto pNP quanto antocianinas apresentam absorção em 276 nm, o que inviabiliza opção alternativa de leitura neste comprimento de onda. Para contornar esta dificuldade, foram realizados os estudos *in vivo* que permitiram estudar a influência das antocianinas em fosfatases dos órgãos de interesse de camundongo.

Todos os resultados obtidos estão apresentados na forma de gráficos (Figuras 16, 18-20), em termos de porcentagem relativa, ou seja, tomou-se a atividade das enzimas fosfatases do grupo de camundongos controle como sendo 100% para comparação com os resultados obtidos com o grupo teste. Cabe ressaltar que cada barra representada nas figuras corresponde a uma média de resultados para grupos com 5 de camundongos e as retas verticais indicam as estimativas de desvio padrão. Além disso, em todos os gráficos, a primeira barra corresponde à média obtida para o grupo controle (camundongos que foram injetados com solução salina) e a barra adjacente corresponde ao grupo teste (camundongos injetados com o extrato antociânico na concentração 20 mmol L⁻¹).

Para verificar se os resultados obtidos eram estatisticamente significativos, ou seja, se as médias calculadas para os camundongos do grupo controle e do grupo teste diferiam entre si a um nível de 95% de confiança, realizou-se um teste t-não pareado de Student, usando-se o Programa Prisma, o que também permitiu verificar se os dados em questão seguiam uma distribuição normal. Os resultados obtidos estão apresentados e discutidos a seguir.

11.2.1 Efeito das Antocianinas na Concentração de Proteínas

Através do método de Lowry foi possível quantificar o conteúdo total de proteínas contido nos extratos de plasma, rim e fígado dos camundongos. Os resultados obtidos estão representados na Figura 16.

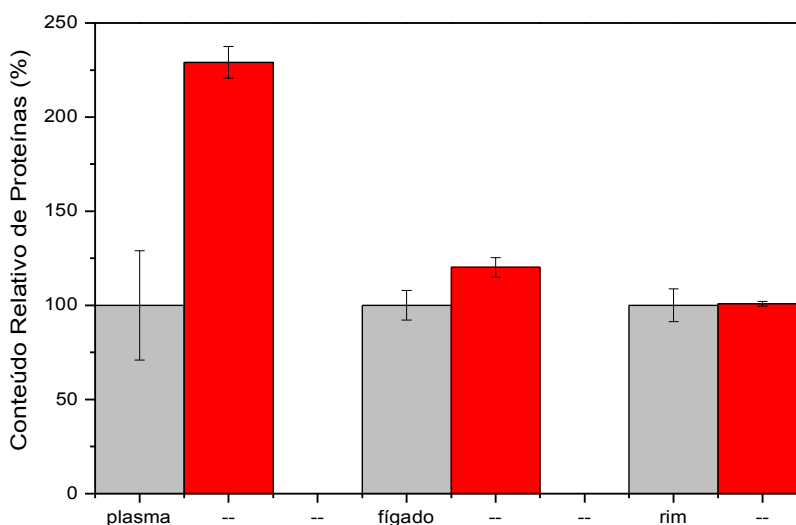


Figura 16. Efeito de antocianinas sobre o conteúdo total de proteínas. O extrato de antocianinas foi administrado a camundongos como descrito em materiais e métodos (item 10.2.2). Após o sacrifício dos animais, determinou-se o teor de proteínas no plasma, rim e fígado. As barras na cor cinza correspondem ao grupo controle e as vermelhas ao grupo teste.

A Figura 16 indica que o conteúdo total de proteínas presentes no rim e fígado de camundongos não foi alterado significativamente a um nível de 95% de confiança, ao contrário do que foi observado no plasma, onde houve um aumento de cerca de 130% na quantidade total de proteínas. O aumento na quantidade de proteínas pode sugerir proliferação celular, visto que num primeiro momento as células produzem proteínas para depois se dividirem. Entretanto, no plasma não ocorre divisão celular e, portanto, seria conveniente a realização de mais estudos para mapear as causas deste aumento protéico bem como as suas reais conseqüências.

11.2.2 Efeito das Antocianinas em Fosfatases

Assim como os flavonóides, as antocianinas apresentam atividade antioxidante e podem atuar na atividade das enzimas fosfatases, que possuem resíduo sulfidríla (-SH) em seu sítio ativo, o qual é essencial para a catálise por se ligar ao grupo fosfato do substrato (Figura 17).

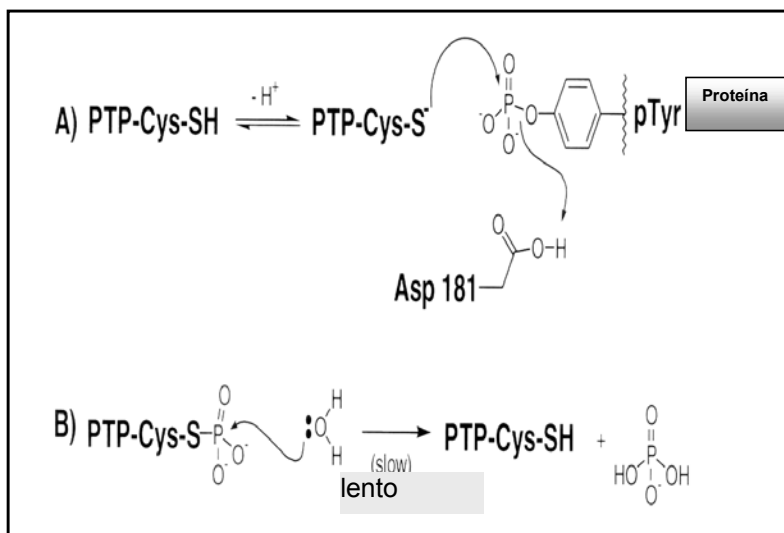


Figura 17. Mecanismo catalítico das Proteínas Tirosina Fosfatases.

A Figura 17 mostra a desprotonação do resíduo de cisteína (Cys-215) essencial para catálise e ataque nucleofílico ao fósforo da proteína fosforilada (Reação A). Na seqüência, ocorre hidrólise do intermediário cisteinil-fosfato por adição de uma molécula de água nucleofílica, completando o ciclo catalítico pela regeneração da enzima ativa (Reação B).

Na presença de agentes oxidantes, o resíduo SH é oxidado e as enzimas fosfatases tendem a perder suas atividades. Assim, os flavonóides podem alterar a atividade das fosfatases modulando-as de três maneiras: aumentando a atividade das enzimas antioxidantes e níveis de glutathiona reduzida; atuando diretamente sobre aminoácidos importantes para a catálise enzimática (por exemplo, resíduos de SH); ou ainda, como seqüestradores diretos de espécies reativas de oxigênio. Em um estudo realizado previamente com os flavonóides comerciais morina e quercetina em fosfatases de camundongos, a morina inibiu a atividade de fosfatases ácidas e alcalinas, enquanto que a quercetina aumentou as atividades destas mesmas enzimas. A diferença entre estes flavonóides está apenas nas posições dos grupos hidroxilas (3' e 4' para a quercetina e 2' e 4' para a morina – vide Figura 1 desta dissertação, página 08), o que sugere uma importante relação estrutura-atividade para estas moléculas (Miranda, 2005).

Avaliou-se, no presente trabalho, a influência das antocianinas sobre as fosfatases de rim, fígado e plasma de camundongos. O fígado é o principal órgão responsável pela metabolização de xenobióticos e, com isto, possui uma elevada taxa metabólica e está sujeito a muitos problemas causados pelo estresse oxidativo. Conseqüentemente, uma manutenção correta do sistema de defesa antioxidante hepático é de grande importância para a manutenção da saúde. O fígado é, também, o órgão principal envolvido no metabolismo de polifenóis junto com a mucosa intestinal e os rins, aos quais chegam, através da corrente sanguínea após a absorção ao longo do trato gastrointestinal ou por outra via de administração (Aliá *et.al.*, 2003). Assim, foi avaliado o efeito do extrato de jambolão purificado contendo as 4 antocianinas na atividade das fosfatases ácidas totais (**FAT**), tartarato-resistente (**TRAP**), baixa massa molecular relativa (**FABr**) e fosfatases alcalinas (**FAlc**) em rim, fígado e plasma.

a) Efeito de Antocianinas em Fosfatases de Fígado

A Figura 18 mostra os resultados obtidos no estudo do efeito de antocianinas nas fosfatases de fígado.

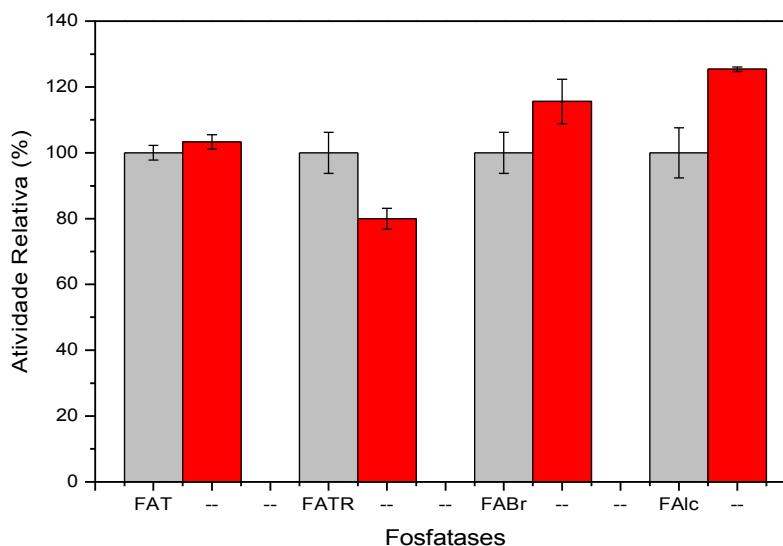


Figura 18. Efeito de antocianinas nas fosfatases de fígado de camundongos. O extrato de antocianinas foi administrado a camundongos e o fígado foi extraído após sacrifício dos animais, como descrito em materiais e métodos (item 10.2.2). As barras na cor cinza correspondem ao grupo controle e as vermelhas ao grupo teste.

De acordo com a Figura 18, pode-se dizer as antocianinas foram responsáveis pela inibição de cerca de 20% da atividade da FATR, enquanto promoveram um aumento de 30% na atividade da Falc. Estas alterações foram estatisticamente significativas a um nível de 95% de confiança, ao contrário dos resultados obtidos para FAT e FABr, que não se mostraram estatisticamente significativos neste intervalo de confiança.

Pelos dados apresentados na Figura 18, nota-se que as antocianinas podem alterar as atividades das fosfatases ativando-as (Falc) ou inibindo-as (FATR). Estes efeitos aparentemente antagônicos podem ser explicados pela presença de diferentes antocianinas no extrato. Também é interessante ressaltar que, no fígado, pode ocorrer a metabolização das antocianinas, não sendo possível atribuir o efeito biológico observado à antocianina intacta ou ao seu metabólito. De fato, Talavéra e colaboradores (2005) realizaram estudos farmacocinéticos de antocianinas em camundongos (alimentados durante 15 dias com uma dieta enriquecida em antocianinas) e verificaram que algumas antocianinas eram metiladas no fígado. Os autores ainda concluíram que a alta quantidade de antocianinas metiladas no fígado e a baixa quantidade destes derivados no plasma podem estar relacionados ao fato de que estes metabólitos foram eliminados diretamente do fígado para a bile.

b) Efeito das Antocianinas nas Fosfatases de Rim

De acordo com Talavéra e colaboradores (2005), o rim é o último órgão pelo qual as antocianinas passam antes de serem eliminadas pela urina e, depois do fígado, é um dos principais órgãos de metilação. Os resultados da avaliação do efeito das antocianinas em fosfatases de rim foram tratados de maneira semelhante ao descrito para as fosfatases de fígado e estão representados na Figura 19.

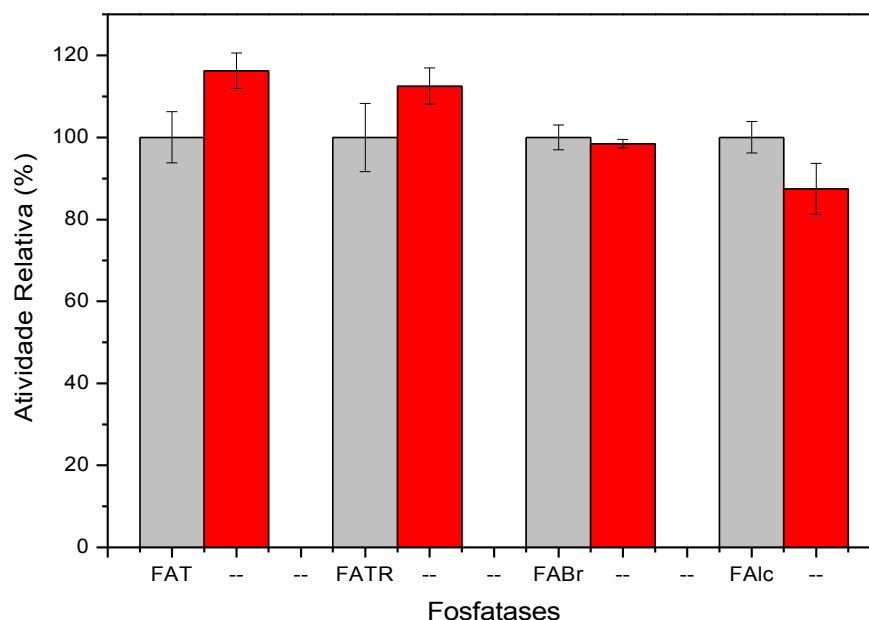


Figura 19. Efeito de antocianinas nas fosfatases de rim de camundongos. O extrato de antocianinas foi administrado a camundongos e as atividades de atividades determinadas nos rins após sacrifício dos animais, como descrito em materiais e métodos (item 10.2.2). As barras na cor cinza correspondem ao grupo controle e as vermelhas ao grupo teste.

Os dados obtidos e representados na Figura 19 indicaram que houve aumento de 20% nas atividades da FAT e de 10% para FATR e uma diminuição de 10% na atividade da Falc, porém, as alterações observadas em todas as atividades enzimáticas não foram estatisticamente significativas em um nível de 95% de confiança. Estes dados indicam que as antocianinas não alteram a atividade de fosfatases de rim.

c) Efeito das Antocianinas nas Fosfatases de Plasma

Os dados obtidos para avaliar o efeito de antocianinas em fosfatases plasmáticas foram tratados semelhantemente aos descritos para as fosfatases de fígado e rim. Os resultados encontram-se na Figura 20.

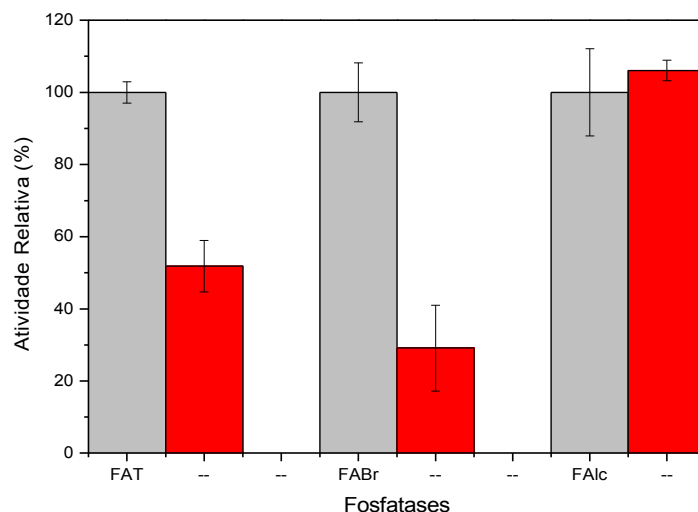


Figura 20. Efeito de antocianinas em fosfatases plasmáticas de camundongos. O extrato de antocianinas foi administrado a camundongos e a atividade fosfatásica determinada no plasma após sacrifício dos animais, como descrito em materiais e métodos (item 10.2.2) As barras na cor cinza correspondem ao grupo controle e as vermelhas ao grupo teste.

Pode-se verificar, pela Figura 20, que a ação das antocianinas nas enzimas FAT e FABr foi estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança. As antocianinas inibiram cerca de 50% e 70% as atividades das enzimas FAT e FABr, respectivamente, não alterando a atividade das fosfatases alcalinas. Análogo aos resultados das fosfatases de fígado, não se pode afirmar se foram as antocianinas intactas ou seus metabólitos que causaram este efeito. Talavéra e colaboradores (2005) encontraram antocianinas metiladas e conjugadas ao ácido glucônico no sangue de camundongos e atribuíram a existência de metabolização e absorção de antocianinas no intestino delgado dos animais.

CAPÍTULO 12

CONCLUSÕES

Muitos trabalhos vem sendo publicados recentemente atribuindo inúmeras propriedades biológicas às antocianinas, principalmente, no que diz respeito às atividades anti-tumorais. Os resultados dos testes realizados *in vitro* permitiram verificar que as antocianinas induziram morte celular em cerca de 90% de células da linhagem de leucemia mielocítica humana (HL60) ao passo que esta mesma concentração de antocianinas ($400 \mu\text{mol L}^{-1}$) induziu à morte cerca de 25% das células sadias. Isto indica que as antocianinas são interessantes potenciais agentes quimioterápicos e estudos sobre o mecanismo de ação destas moléculas devem ser realizados em etapas futuras.

Em relação aos ensaios *in vivo*, as antocianinas promoveram alteração significativa na quantidade de proteínas presentes no plasma (aumento de 130%) e não alteraram significativamente os níveis protéicos relativos ao rim e fígado. Estudos adicionais devem ser realizados com o objetivo de se averiguar as causas deste aumento protéico e suas conseqüências.

Em relação às enzimas fosfatases de fígado, as antocianinas foram responsáveis pela inibição de cerca de 20% da atividade da FATR, enquanto promoveram um aumento de 20% e 30% nas atividades da FABr e Falc, respectivamente. Já em relação as fosfatases plasmáticas, houve uma inibição de 50% e 70% das atividades das enzimas FAT e FABr, respectivamente. As alterações nas atividades enzimáticas renais foram desprezíveis. Estes dados mostram que diferentes enzimas foram inibidas ou ativadas, não sendo possível prever um comportamento comum em relação à inibição ou ativação de fosfatases por antocianinas. Seria interessante realizar estudos futuros com antocianinas isoladas para identificar a atividade de cada antocianina e, se possível, traçar o mecanismo de ação.

Trabalhos publicados recentemente mostraram que as antocianinas são metabolizadas em diferentes órgãos de camundongos (Aliá, *et. al.*, 2003; Talavéra *et.al.*, 2005). Os presentes resultados indicam que as antocianinas intactas ou seus metabólitos foram capazes de alterar diferentemente a atividade de enzimas fosfatases ora inibindo, ora ativando a atividade destas enzimas.

CAPÍTULO 13

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados mostrados nesta dissertação permitem concluir que:

As antocianinas podem ser extraídas de jambolão utilizando-se solventes polares como água e álcoois. Foram encontrados em média $2,7 \pm 0,9$ mg de antocianinas por g de casca de jambolão. Para aumentar a quantidade de antocianinas extraídas, é conveniente a utilização do solvente metanol, na proporção 1:3 (massa de cascas de frutas: volume de solvente) a 46°C . Para aplicações biológicas, a extração com água na mesma proporção, a temperatura ambiente forneceu extratos com concentração total de antocianinas igual a $0,8 \pm 0,2$ g L^{-1} ($1,70 \pm 0,04$ mmol L^{-1}).

Os extratos antociânicos podem ser purificados pela técnica de extração em fase sólida utilizando-se cartuchos C_{18} oferecendo altos rendimentos de purificação (em torno de 100%).

As técnicas de cromatografia em papel e cromatografia líquida de alta eficiência permitem identificar e isolar as antocianinas rapidamente. Nos extratos de jambolão foram identificadas as seguintes antocianinas: delphinifina-3-glicosídeo, cianidina-3-galactosídeo, petunidina-3-galactosídeo e pelargonidina-3-arabinosídeo.

Os experimentos com extrato purificado de antocianinas $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ promoveu cerca de 90% de morte celular em cultura de linfócitos da linhagem da leucemia mielóide humana (HL60) e apenas 20% de morte celular de células saudáveis. Isto indica que as antocianinas são potenciais agentes quimioterápicos e que estudos mais detalhados devem ser feitos visando uma aplicação medicinal para as antocianinas.

Os experimentos em camundongos mostraram que as antocianinas alteram a atividade de enzimas fosfatases, sendo que as mais significativas foram observadas no plasma sanguíneo, onde as enzimas FAT e FABr foram inibidas em 50 % e 70 %, respectivamente. Será interessante prosseguir os estudos com estas moléculas a fim de detalhar suas ações no organismo.

CAPÍTULO 14

PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista as diversas aplicações das antocianinas e sua importância biológica, muitos trabalhos ainda podem ser realizados a partir das idéias desenvolvidas nesta dissertação, sugerindo-se entre eles:

1 – Isolamento de antocianinas em maior quantidade, o que pode ser conseguido muito provavelmente usando-se cromatografia em coluna aberta (escala preparativa).

2 – Identificação das antocianinas por ressonância nuclear magnética que representa um método muito adequado para a identificação de pigmentos naturais, em complementação às identificações feitas por HPLC e PC.

3 – Estudar o mecanismo de ação das antocianinas em células HL-60, visando a sua utilização como agentes antitumorais.

4 – Estudar o mecanismo de ação das antocianinas em enzimas fosfatases e suas conseqüências para o organismo. Sugere-se, neste caso, a aplicação de antocianinas isoladas em fosfatases.

5 – Verificar uma possível proteção oferecida pelas antocianinas às enzimas fosfatases frente ao estresse oxidativo, dado o caráter antioxidante das antocianinas e a presença de um sítio de cisteína (-SH) no sítio ativo das fosfatases, imprescindível para a catálise.

CAPÍTULO 15

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K.; Lichtman, H.A.; Pober, J.S. *Cellular and molecular immunology*, 4th edition, W.B. Saunders Company library. Philadelphia, 2000.

Aliá, M.; Horcajo, C.; Bravo, L.; Goya, L. "Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats" *Nutr. Res.* **23**, 1251-1267; 2003.

Alkema, S.; Seager, S. "The chemical pigments of plants" *J. Chem. Educ.* **59**, 183- 186; 1982.

Amorini, A.M.; Lazarino, G.; Galvano, F.; Fazzina, G.; Tavazzi, B.; Galvano, G. "Cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside protects myocardium and erythrocytes from oxygen radical-mediated damages" *Free Rad. Res.* **37**, 453-460; 2003.

Aoyama, H.; Melo, P.S.; Granjeiro, P.A.; Haun, M.; Ferreira, C.V. "Citotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts" *Pharm. Pharmacol. Commun.* **6**, 331-334; 2000.

Aoyama, H.; Cavagis, A.D.M.; Taga, E.M.; Ferreira, C.V. "Endogenous lectin as a possible regulator of the hydrolysis of physiological substrates by soybean seed acid phosphatase" *Phytochemistry.* **58**, 221-225; 2001.

Aoyama, H.; Silva, T.M.A.; Miranda, M.A.; Ferreira, C.V. "Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas" *Quim. Nova.* **26**, 896-900; 2003.

Arct. J.; Oborska, M.; Mojski, A.; Binkowska, B.; Swidzikowska, B. "Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids" *Int. J. Cosm. Sci.* **24**, 357-360; 2002.

Baccan, N.; Andrade, J.C.; Godinho, O.E.S.; Barone, J.S.; *Química Analítica Quantitativa Elementar*, 3^a edição, Edgard Blücher Ltda, Campinas, 2001.

Bagchi, D.; Sen, C.K.; Bagchi, M.; Atalay, M. "Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula" *Bioch. Moscow.* **69**, 75-80; 2004.

Barile, F. A.; *Introduction to in vitro cytotoxicology: Mechanisms and Methods*, CRC Press, Florida, 1994.

Bobbio, F.; Scamparini, A.R.P. "Carbohydrates, organic acids and anthocyanin of *Eugenia jambolana* Lamarck" *Indust. Aliment.* **21**, 296-298; 1982.

Bohmont, G.; Aaronson, L.M.; Mann, K.; Pardini, R.S. "Inhibition of mitochondrial NADH oxidase, succinoxidase, and ATPase by naturally occurring flavonoids" *J. Nat. Prod.* **50**, 427-433; 1987.

Breitman, T.R. "Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL60" *Method. Enzymol.* **190**, 118-130; 1990.

Brouillard, R.; *Anthocyanins as Food Colors*, Academic Press, New York, 1982.

Chandra, A.; Rana, J.; Li, Y. "Separation, identification, quantification and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS" *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3515-3521; 2001.

Chang, Y.C.; Huang, H.P.; Hsu, J.D.; Yang, S.F.; Wang, C.J.; "Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells" *Toxicol. App. Pharmacol.* **205**, 201-212; 2005.

Chen, P.N.; Chu, S.C.; Chiou, H.L.; Chiang, C.L.; Yang, S.F.; Hsieh, Y.S. "Cyanidin-3-glucoside and peonidin-3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis *in vitro* and suppress tumor growth *in vivo*" *Nutr. Cancer.* **53**, 232-243; 2005.

Cho, J.; Kang, J.S.; Long, P.H.; Jing, J.; Back, Y.; Chung, K.S. "Antioxidant and memory enhancing effects of purple sweet potato anthocyanin and Cordyceps mushroom extract" *Arch. Pharmac. Res.* **26**, 821-825; 2003.

Chu, I. "Alternative methods to animal testing: A Canadian health protection branch perspective" *ATLA*, **23**, 257-261; 1995.

Cingi, M.R.; De Angelis, I.; Fortunati, E.; Reggiani, D.; Bianchi, V.; Tiozzo, R.; Zucco, F. "Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach" *Toxicol. In vitro.* **5**, 119-125; 1991.

Cohen, P. "Signal integration at the level of proteins kinases, protein phosphatases and their substrates" *Trends Biochem. Sci.* **17**, 408-413; 1992.

Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S.; *Introdução a métodos cromatográficos*, Editora da Unicamp, Campinas, 1997.

Das, M.; Ray, P.K. "Lipid oxidant properties of quercetin *in vitro*" *Biochemistry.* **17**, 203-209; 1988.

Das, D.K. "Naturally occurring flavonoids: structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterization" *Meth. Enzymol.* **234**, 410-420; 1994.

Denu, J.M.; Stuckey, J.A.; Saper, M.A.; Dixon, J.E. "Form and function in protein dephosphorylation" *Cell.* **47**, 361-364; 1996.

Duthie, S.J.; Gardner, P.T.; Morrice, P.C.; Wood, S.G.; Pirie, L.; Bestwick, C.C.; Milne, L.; Duthie, G.G. "DNA stability and lipid peroxidation in vitamin E-deficient rats *in vivo* and colon cells *in vitro*. Modulation by the dietary anthocyanin, cyanidin-3-glycoside" *Eur. J. Nutr.* **44**, 195-203; 2005.

Ferreira, C.V.; Granjeiro, J.M.; Taga, E.M.; Aoyama, H. "Soybean Seed Acid Phosphatases: Unusual Optimum Temperature and Thermal Stability Studies" *Biochem. Bioph. Res. Comm.* **242**, 282-286; 1998-a.

Ferreira, C.V.; Granjeiro, J.M.; Taga, E.M.; Aoyama, H. "Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases" *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 487-494; 1998-b.

Ferreira, C.V.; Taga, E.M.; Aoyama, H. "Glycolytic intermediates as substrates of soybean acid phosphatase isoforms" *Plant Sci.* **147**, 49-54; 1999.

Ferriola, C.P.; Cody, V.; Middleton, E.; "Protein Kinase C inhibition by plant flavonoids – Kinetic mechanisms and structure-activity relationships" *Biochem. Pharmacol.* **38**, 1617-1624; 1989.

Felschhut, J.; Kratzer, F.; Rechkemmer, G.; Kulling, S.E. "Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*" *Eur. J. Nutr.* **45**, 7-18; 2006.

Formica, J.V.; Regelson, W. "Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids" *Fd. Chem. Toxic.* **33**, 1061-1080; 1995.

Freire, A.C.G.; Assis, C.F.; Frick, A.O.; Melo, P.S.; Haun, M.; Aoyama, H.; Durán, N.; Sauer, M.M.; Kallás E.G.; Ferreira, C.V. "Influence of protein phosphatase inhibitors on HL60 cells death induction by dehydrocrotonin" *Leuk. Res.* **27**, 823-829; 2003-a.

Freire, A.C.G.; Aoyama, H.; Haun, M.; Ferreira, C.V. "Relationship between phosphatase activity and cytotoxic effect of two protein phosphatase inhibitors, okadaic acid and pervanadate, on human myeloid leukemia cell line" *J. Enz. Inh. Med. Chem.* **18**, 425-429; 2003-b.

Fuleki, T.; Francis, F.J. "Quantitative methods for anthocyanins. Determination of total anthocyanin and index degradation for cranberries juices" *J. Food Sci.* **33**, 78-8, 1968.

Goiffon, J.-P.; Brun, M.; Bourrier, M.-J. "High performance liquid chromatography of red fruits anthocyanins" *J. Chromatogr.* **537**, 101-121; 1991.

Goiffon, J.-P.; Mouly, P.P.; Gaydou, E.M. "Anthocyanin pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography" *Anal. Chim. Acta.* **382**, 39-50; 1999.

Gryglewski, R.J.; Korbut, R.; Robak, J.; Swies, J. "On the mechanism of antithrombotic action of flavonóides" *Biochem. Pharmacol.* **36**, 317-322; 1987.

Haenen, G.R.M.M.; Paquay, J.B.G.; Korthouwer, R.E.M.; Bast, A. "Peroxynitrite scavenging by flavonoids" *Biochem. Biophys. Res Commun.* **236**, 591-593; 1997.

Harborne, J.B. *Comparative biochemistry of the flavonoids*, Academic Press, London, 1967.

Harborne, J.B.; Mabry, T.J.; Mabry, H. *The Flavonoids*, Academic Press, New York, 1975.

Harborne, J.B.; *Phytochemical methods – A guide to modern techniques plant analysis*, Champman and Hall: New York, 2nd edition, 1991.

Heo, H.J.; Lee, C.Y. "Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells" *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1984-1989; 2005.

Hertog, M.G.L.; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B.; Kromhout, D. "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderlystudy" *Lancet.* **342**, 1007-1011; 1993.

Hertog, M.G.L. "Epidemiological evidence on potencial health properties of flavonóides" *Proc. Nutr. Soc.* **55**, 385-397; 1996.

Hille, R.; Sprecher, H.; "On the mechanism of action of xanthine oxidase" *J. Biol. Chem.* **262**, 10914-10917; 1987.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Página acessada pela internet em 05 de junho de 2006. http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344.

ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos. *Manual técnico de análise química de alimentos*. Campinas, 1990.

Jackman, R.L.; Yada, R.I.; Tung, M.A. "A review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis" *J. Food Biochem.* **11**, 279-308; 1987.

Jain, M.C.; Seshadri, T.R. "Anthocyanins of *Eugenia jambolana* fruits" *Indian J. of Chem.* **13**, 20-23; 1974.

Johnson, L.N.; Barford, D. "The effect of phosphorylation on the structure and function of proteins" *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 199-232; 1993.

Kraemer-Schafhalter, A.; Fuchs, H.; Pfannhauser, W. "Solid Phase Extraction (SPE) – a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa var Nero*" *J. Sci. Food Agric.* **78**, 435-440; 1998.

Lazcano, C.A.; Yoo, K.S.; Pike, L.M. "A method for measuring anthocyanins after removing carotenes in purple colored carrots" *Scientia Hort.* **90**, 321-324; 2001.

Lee, H.S.; Hong, V. "Chromatografic analysis of anthocyanins" *Chromatogr.* **624**, 221-234; 1992.

Mataix, E.; Castro, M.D. "Determination of anthocyanins in wine based on flow-injection, liquid-solid extraction, continuous evaporation and high-performance liquid chromatography-photometric detection" *J. Chromatogr. A.* **910**, 225-263; 2001.

Metodiewa, D.; Jaiswal, A.K.; Cenas, N.; Dickancaité, E.; Aguilar, J.S. "Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product" *Free Radical Biol. & Med.* **26**, 107-116; 1999.

Milbury, P.E.; Guohua, C.; Prior, R.L.; Blumberg, J. "Bioavailability of elderberry anthocyanins" *J. Mech. Ageing Develop* **123**, 997-1006; 2002.

Miranda, M.A. *Efeito de flavonóides na fosfoproteína tirosina fosfatase. Mecanismos cinéticos e relações estrutura atividade*, Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, 2000.

Miranda, M.A. *Efeito de flavonóides sobre a atividade enzimática de fosfatases in vitro e in vivo*, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, UNICAMP, 2005.

Mosmann, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays" *J. Immunol. Meth.* **65**, 55-63; 1983.

Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E.; *Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, Editora da Unicamp, Campinas, 2002.

Newburguer, P.E.; Chovoniec, M.E.; Greenberger, J.S.; Cohen, H.J. "Functional changes in human leukemic cell line HL-60." *J. Cell. Biol.* **82**, 315-322; 1979.

Nielsen, I.L.F.; Haren, G.R.; Magnussen, E.L.; Dragsted, L.O.; Rasmussen, S.E. "Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and oxidative potency" *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5861-5866; 2003.

Ogata, J.; Sakamoto, T.; Yamaguchi, M.; Kawanobu, S.; Yoshitama, K. "Isolation and Characterization of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase from flowers of *Dahlia variabilis*" *J. Plant. Phisiol.* **158**, 709-714; 2001.

Okumura, F.; Soares, M.H.F.B.; Cavalheiro, E.T.G. "Identificação de pigmentos naturais de espécies vegetais utilizando-se cromatografia em papel" *Quím. Nova.* **25**, 680-683; 2002.

Pazminõ-Duran, E.A.; Giusti, M.M.; Wrolstad, R.E.; Gória, M.A.B. "Anthocyanins from banana bracts (*Musa* x *Paradisiaca*) as potencial food colorants" *Food. Chem.* **73**, 327-332; 2001.

Peterson, J.; Dwyer, J. "Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity" *Nutr.Res.* **18**, 1995-2018; 1998.

Pezutto, J.M. "Plant-derived anticancer agents" *Biochem. Pharmacol.* **53**, 121-133; 1997.

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. *Farmacologia*, 4ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2001.

Renzi, D.; Valtonila, M.; Foster, R. "The evaluation of a multi-endpoint citotoxicity assay system" *ATLA.* **21**, 89-96; 1993.

Reppetto, G. Sanz, P. "Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: *in vitro* effects of 24 hours" *ATLA.* **21**, 501-207; 1993.

Revilla, E.; Ryan, J.-M.; Martín-Ortega, G. "Comparison of several procedures used for extraction of anthocyanins from red grapes" *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4592-4597; 1988.

Revilla, E.; Garcia-Beneytez, E.; Cabello, F.; Martín-Ortega, G.; Ryan, J.M. "Value of high-performance liquid chromatographic analyses of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them" *J. Chromatogr. A.* **915**, 53-60; 2001.

Rice-Evans, C.; Miller, N.J.; Paganga, G. "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids" *Free Radical Bio. Med.* **20**, 933-956, 1996.

Scharrer, A.; Ober, M. "Beta blocking treatment" *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* **179**, 362-363; 1981.

Silva, T.M.A. *Relação entre o efeito citotóxico de biocompostos sobre linfócitos T e a atividade de fosfatases*, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, UNICAMP, 2002.

Soares, M.H.F.B.; Cavalheiro, E.T.G. "Aplicação de extratos brutos de quaresmeira e azaléia e da casca de feijão preto em volumetria ácido-base. Um experimento para cursos de análise quantitativa" *Quím. Nova.* **24**, 408-411; 2001.

Sokoloski, J.A.; Sortorelli, A.C. "Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by nonsteroidal anti-inflammatory agents in combination with low levels of vitamin D₃" *Leukemia. Res.* **22**, 153-161; 1997.

Taga E.M., Cavagis, A.D.M., Ferreira, C.V., Aoyama, H. "Characterization of cytoplasmic soybean seeds acid phosphatases using inorganic pyrophosphate as substrate" *Faseb J.* **11**, 1709; 1997.

Talavéra, S.; Felgines, C.; Texier, O.; Besson, C.; Gil-Izquierdo, ^a; Lamaison, J.-L.; Révész, C. "Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney and brain" *J. Agric. Food. Chem.* **53**, 3902-3908; 2005.

Tapiero, H.; Tew, K.D.; Ba N.; Mathé, G. "Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies?" *Biomed. Pharmacother.* **56**, 200-207; 2002.

Terci, D.B.L.; Rossi, A.V. "Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?" *Quim. Nova.* **25**, 684-688; 2002.

Terci, D.B.L. *Aspectos analíticos e didáticos de antocianinas extraídas de frutas*, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, 2004.

Trowbridge, I.S. "CD 45. A prototype for transmembrane protein tyrosine phosphatases" *J. Biol. Chem.* **266**, 23517-23520; 1991.

Uzunoglu, S.; Uslu, R.; Tobu, M.; Saydam, G.; Terzioglu, E.; Buyukkececi, F.; Omay, S.B. "Augmentation of methylprednisolone-induced differentiation of

myeloid leukemia cells by serine/threonine protein phosphatase inhibitors” *Leukemia Res.* **23**, 507-512; 1999.

Wang, H.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M.; Chang, Y.C.; Booren, A.M.; Gray, J.I.; DeWitt, D.L. “Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglicon, cyaniding, from tart cherries” *J. Nat. Prod.* **62**, 294-296; 1999.

Zhao, C.; Giusti, M.M.; Malik, M.; Moyer, M.P.; Magnuson, B.A. “Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth” *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6122-6128; 2004.