



FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Mestrado em Tecnologias do Medicamento

Efeito protector das antocianinas na oxidação de LDL humanas; relação estrutura-actividade

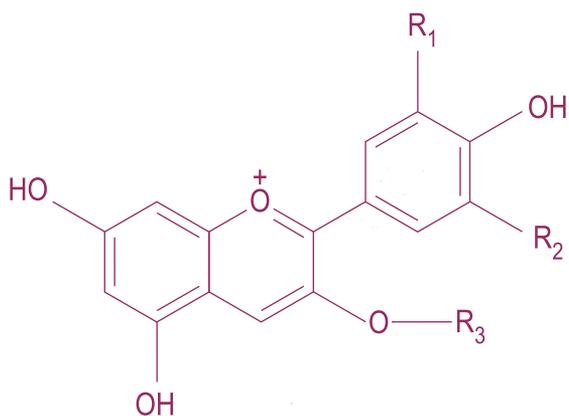




FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Mestrado em Tecnologias do Medicamento

Efeito protector das antocianinas na oxidação de LDL humanas; relação estrutura-actividade



Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para prestação de provas no Mestrado em Tecnologias do Medicamento.

Trabalho realizado no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (Projectos POCTI/AGR/35019/2000 e POCI/AGR/59919/2004).

“Wine is a biochemical challenge. It is a daunting task to probe the alchemy of this elixir and to determine what lies “at the heart of the matter”.”

Goldberg et al., 1995

Agradecimentos

O limitado número de caracteres dedicado aos agradecimentos não é, de todo, proporcional à quantidade de pessoas que os merecem.

Destaco no departamento de bioquímica da faculdade de farmácia todo o apoio dado pela Doutora Leonor Almeida, mais que uma orientadora foi a minha especial "madrinha" do laboratório. Sempre presente e muito dedicada, a Doutora Teresa Dinis foi, também, um dos elementos de destaque e igualmente pilar basal deste trabalho. A estas duas excelentes profissionais um sincero obrigado.

Agradeço também a todos os amigos da Irmandade da Bioquímica, agradecimento extensível a dois atenciosos professores deste laboratório: Doutor Laranjinha e Doutor Custódio.

Um especial obrigado à minha unida tríade familiar e a todos os meus leais amigos.

Graças a todos, os dois anos de trabalho laboratorial foram inesquecíveis e por isso vos dedico um profundo e sincero sorriso de obrigado!

Abreviaturas

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ApoB-100	apolipoproteína B 100
Asc	ascorbato
Caf	ácido cafeico
Cian	cianidina
HDL	lipoproteínas de alta densidade
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
LDLmm	lipoproteínas de baixa densidade minimamente oxidadas
LDLox	lipoproteínas de baixa densidade oxidadas
Malv	malvidina
Malv-gluc	malvidina-3-glucósido
PBS	tampão fosfato
Pel	pelargonidina
<i>cis</i> -PnA	ácido <i>cis</i> -parinárico (ácido 9,11,13,15-octadecatetraenóico)
PUFAs	ácidos gordos polinsaturados
REM	mobilidade electroforética relativa
ROS	espécies reactivas de oxigénio
RPE	ressonância paramagnética de electrões
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecilsulfato de sódio
UV	ultravioleta
α -TOH	α -tocoferol
α -TO \cdot	radical α -tocoferoxilo

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1 INTRODUÇÃO	5
1.1 Aterosclerose e a sua relação com a doença arterial coronária.....	5
1.2 Hipótese da modificação oxidativa da aterosclerose.....	8
1.3 Oxidação das LDL.....	11
1.4 Papel dos antioxidantes da dieta na prevenção da aterosclerose	16
1.5 Actividade antioxidante dos flavonóides do vinho tinto na oxidação das LDL.....	19
1.6 Antocianinas – ocorrência, estrutura química e efeitos biológicos	24
1.8 Objectivos e plano geral da tese	34
2 MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1 Compostos químicos	37
2.2 Isolamento de LDL humanas	38
2.3 Avaliação da oxidação lipídica de LDL induzida pelo azocomposto AAPH e pela ferrilmioglobina	39
2.3.1 Ensaio de fluorescência do ácido <i>cis</i> -parinárico	39
2.3.2 Formação de dienos conjugados	40

2.4 Avaliação da oxidação proteica de LDL induzida pelo peroxinitrito	41
2.4.1 Alteração da mobilidade electroforética	41
2.4.2 Formação de grupos carbonilos	42
2.5 Interação das antocianinas com o radical α-tocoferoxilo	43
2.6 Análise estatística	45
3 RESULTADOS	46
3.1 Efeitos protectores das antocianinas na oxidação de LDL mediada pelo azocomposto AAPH	46
3.1.1 Ensaio de fluorescência do ácido <i>cis</i> -parinárico	46
3.1.2 Formação de dienos conjugados	48
3.2 Efeitos protectores das antocianinas na oxidação de LDL mediada pela ferrilmioglobina	51
3.2.1 Ensaio de fluorescência do ácido <i>cis</i> -parinárico	51
3.2.2 Formação de dienos conjugados	53
3.3 Efeitos protectores das antocianinas na oxidação de LDL mediada pelo peroxinitrito	56
3.3.1 Alteração da mobilidade electroforética	56
3.3.2 Formação de grupos carbonilo	58
3.4 Interação das antocianinas com o radical α-tocoferoxilo	60
4 DISCUSSÃO	64
4.1 Protecção da oxidação dos lípidos das LDL	65
4.2 Protecção da oxidação proteica das LDL	68
4.3 Regeneração do α-tocoferol	71

5 CONCLUSÕES GERAIS	73
BIBLIOGRAFIA	77

Resumo

As antocianinas constituem um grupo de pigmentos naturais pertencentes à família dos flavonóides, as quais estão largamente distribuídas nos frutos, nos vegetais e no vinho tinto. Como potentes antioxidantes, as antocianinas parecem ser pelo menos parcialmente responsáveis pelos efeitos protectores do consumo regular e moderado de vinho tinto no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, provavelmente devido à prevenção do dano oxidativo das lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade (LDL). O presente estudo teve como objectivo avaliar e comparar as propriedades antioxidantes de quatro antocianinas estruturalmente relacionadas - a pelargonidina, a cianidina, a malvidina e a malvidina-3-glucósido - contra a oxidação de LDL humanas promovida quer pelo azocomposto AAPH quer por dois oxidantes fisiologicamente relevantes no contexto da aterogénese, a ferrilmioglobina e o peroxinitrito. A sua capacidade para reciclar o α -tocoferol (α -TOH), o principal antioxidante lipofílico presente nas LDL, foi igualmente estudada. Quando a oxidação foi iniciada quer pelos radicais peroxilo gerados pelo AAPH quer pela ferrilmioglobina e avaliada pelo decaimento da fluorescência do ácido *cis*-parinárico (*cis*-PnA) incorporado nas LDL e pela formação dos dienos conjugados, todas as antocianinas indicadas, em concentrações relativamente baixas, inibiram fortemente o dano oxidativo das LDL. No entanto, a cianidina e a malvidina revelaram-se bastante mais eficientes do que a pelargonidina, e a malvidina-3-glucósido exibiu uma maior actividade antioxidante do que o homólogo não glicosilado, a malvidina. Quando a oxidação foi iniciada pelo peroxinitrito e avaliada pelas alterações na carga da superfície da apoB, a pré-incubação das lipoproteínas com a cianidina, a malvidina ou a malvidina-3-glucósido levou à eficiente inibição das modificações oxidativas da apoproteína das LDL, em contraste com a pelargonidina que não mostrou nenhum efeito significativo. Por outro lado, todas as antocianinas em estudo diminuíram significativamente a formação de grupos carbonilo nas LDL mediada também pelo peroxinitrito. A medição

directa, por EPR, do radical α -tocoferoxilo, num modelo experimental de micelas de SDS contendo α -TOH, evidenciou que as antocianinas reduzem fortemente a intensidade do sinal desse radical, revelando deste modo uma potente capacidade para regenerar o α -TOH, quando comparado com o ácido cafeico, um composto de referência conhecido por esta particularidade. Curiosamente, a malvidina-3-glucósido mostrou ser a antocianina menos eficiente. Face aos resultados obtidos, a relação entre as estruturas químicas das antocianinas e as suas actividades antioxidantes foi discutida.

Em conclusão, os resultados aqui apresentados sugerem que a forte capacidade das antocianinas para protegerem as LDL do dano oxidativo e para regenerarem o α -TOH pode contribuir, de modo significativo, para os efeitos benéficos atribuídos aos compostos polifenólicos da dieta, e em particular aos contidos no vinho tinto, na prevenção e desenvolvimento das doenças cardiovasculares.

Abstract

Anthocyanins are a group of naturally pigments belonging to the flavonoid family that are widely distributed among flowers, fruits, vegetables and red wine. As potent antioxidants, anthocyanins are thought to be partially responsible for the protective effects of regular and moderate consumption of red wine against cardiovascular diseases, probably by preventing low density lipoproteins (LDL) from oxidative damage. In this regard, the present study was designed to evaluate and compare the antioxidative properties of four structurally related anthocyanins - pelargonidin, cyanidin, malvidin and malvidin-3-glucoside - against human LDL oxidation promoted either by the azocompound AAPH, or two physiologically relevant oxidants in the context of atherogenesis, ferrylmyoglobin and peroxynitrite. Their ability to recycle α -tocopherol (α -TOH), the most abundant lipophilic antioxidant present in LDL, was also studied. When LDL oxidation was initiated either by AAPH-generated peroxy radicals or ferrylmyoglobin, as determined by the fluorescence decay of incorporated *cis*-parinaric acid (*cis*-PnA) and conjugated dienes formation, those anthocyanins, in relatively low concentrations, strongly inhibit LDL oxidative damage, being cyanidin and malvidin far more efficient as compared with pelargonidin. Also, malvidin-3-glucoside exhibited a stronger antioxidant activity than malvidin, the non glycosilated derivative. On the other hand, and as evaluated by alterations in the apoB net surface charge, LDL apoprotein modifications promoted by peroxynitrite were efficiently inhibited by pre-incubation of lipoproteins with cyanidin, malvidin or malvidin-3-glucoside, while almost no effects were observed with pelargonidin. Moreover, all the anthocyanins under study significantly decreased peroxynitrite-mediated carbonyl groups formation in LDL. On the other hand, direct EPR measurements of α -tocoperoxy radical, in the experimental model of UV irradiated α -TOH-containing SDS micelles, showed that the anthocyanins strongly reduce the signal intensity of that radical pointing to their highest abilities to

recycle α -TOH although malvidin-3-glucoside was far less effective. The relationship between anthocyanins structures and antioxidant activities is also discussed. Our data suggest that the strong ability of anthocyanins to protect LDL against oxidative damage promoted by relevant physiological oxidants, in the context of atherogenesis, and to recycle α -TOH, may strongly contribute to the beneficial effects of natural dietary polyphenolic compounds, including those contained in red wine, against the risk of cardiovascular disease.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aterosclerose e a sua relação com a doença arterial coronária

A principal causa de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos é a doença cardiovascular, a qual inclui a doença arterial coronária, a insuficiência cardíaca congestiva e o enfarte do miocárdio. A aterosclerose é a principal causa subjacente a estas doenças, sendo responsável por mais mortes do que as provocadas pelo somatório de todos os tipos de cancro.

Embora esta patologia seja maioritariamente um problema dos países desenvolvidos, que envolve elevados custos económicos, a Organização Mundial de Saúde prevê que a prosperidade económica possa conduzir a uma epidemia da aterosclerose e que em 2010 esta doença constitua a principal causa de morbidade a nível mundial (Chapman et al., 2003). Esta previsão tem como base os hábitos alimentares ocidentais e o estilo de vida sedentário que os países desenvolvidos e/ou em vias de desenvolvimento têm vindo a adquirir. A compreensão da fisiopatologia da aterosclerose torna-se, assim, essencial para a sua detecção precoce, bem como para o desenvolvimento de terapêuticas de prevenção e tratamento desta doença.

Genericamente, a aterosclerose é uma doença inflamatória crónica caracterizada pela formação de ateromas nas artérias de médio a grande calibre. Os ateromas são placas, compostas essencialmente por lípidos e tecido fibroso, que se vão formando no endotélio arterial o que conduz gradualmente a uma diminuição do lúmen do vaso sanguíneo podendo originar a obstrução total do mesmo. Este processo pode ser bastante insidioso podendo durar décadas até que a redução do fluxo sanguíneo conduza a uma perda da função cerebral ou cardíaca e, assim, a um possível acidente vascular cerebral ou a um enfarte do miocárdio,

respectivamente. Estas manifestações clínicas da aterosclerose são muitas vezes referidas como doença vascular cerebral e doença arterial coronária.

Estudos epidemiológicos têm indicado que a aterosclerose é uma doença multifactorial, para a qual contribuem múltiplos factores, tanto genéticos como ambientais. A idade, o sexo, a obesidade, o tabagismo, a hipertensão e a diabetes são alguns dos factores de risco mais importantes para a ocorrência de acidentes cardiovasculares. Outro dos factores mais relevantes é a concentração de colesterol no plasma. Atendendo a que 70 % deste colesterol é transportado pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), não será de estranhar que uma concentração de LDL plasmática elevada seja um factor de risco primário para o desenvolvimento da aterosclerose e da doença arterial coronária (Inkeles et al., 1981). Em concordância com estas observações, vários estudos prospectivos têm fundamentado o papel crítico das LDL na etiologia da aterosclerose (Gardner et al., 1996; Lamarche et al., 1997). Pelo contrário, vários estudos têm demonstrado a existência de uma relação inversa entre o colesterol contido nas lipoproteínas de elevada densidade (HDL) e a aterosclerose (Mertens et al., 2001).

Atendendo às implicações clínicas desta doença, tem sido dado grande destaque ao estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na aterosclerose e, em particular, à contribuição do stress oxidativo na sua patogénese (Figura 1). Durante o desenvolvimento da aterosclerose na íntima arterial, a integridade do endotélio fica comprometida conduzindo, não só a um aumento da permeabilidade, a qual facilita a penetração das lipoproteínas aterogénicas na íntima, como também a um aumento da adesão, a qual facilita a migração dos monócitos para o subendotélio e, ainda, a uma diminuição da vasodilatação, a qual compromete o controlo hemodinâmico (Figura 1.1). A penetração dos monócitos na íntima conduz à sua transformação em macrófagos e eventualmente em células esponjosas ricas em colesterol. Estes macrófagos activados fagocitam as lipoproteínas de baixa densidade oxidadas no espaço subendotelial (Figura 1.2).

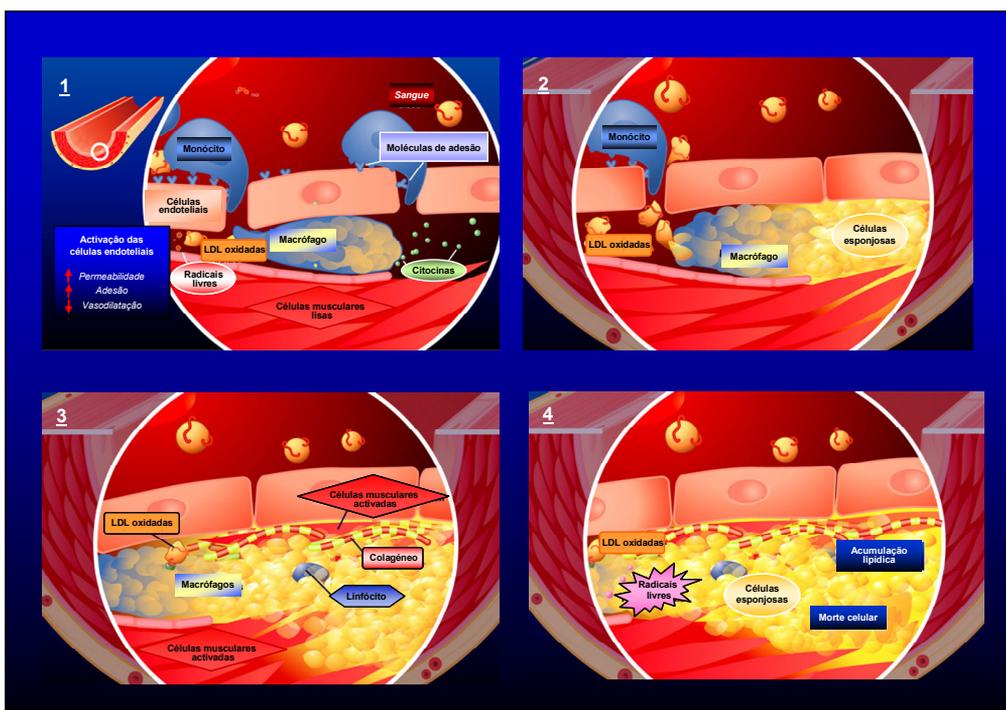


Figura 1. As diferentes etapas do desenvolvimento da aterosclerose. Durante a aterogénese, a integridade do endotélio fica comprometida, donde resulta um aumento da permeabilidade, a qual facilita a penetração das lipoproteínas aterogénicas na íntima, uma diminuição da vasodilatação e um aumento da adesão, a qual facilita a migração dos monócitos para o subendotélio (1). Estes monócitos são posteriormente transformados em macrófagos e, eventualmente, em células esponjosas (2). A progressiva acumulação de lípidos no espaço subendotelial conduz à formação de estrias gordas envolvidas por uma capa fibrosa que contém, nomeadamente, colagénio e células musculares lisas activadas (3). A posterior acumulação lipídica na lesão resulta na morte celular e numa eventual ruptura da placa (4). Adaptado de Fruchart, 2003.

A progressiva acumulação de lípidos (intra e extracelular) conduz à formação de estrias gordas. O crescimento destas estrias leva à formação de um núcleo lipídico, o qual se torna progressivamente isolado pela formação de uma capa fibrosa. Esta capa contém colagénio, proteoglicanos e células musculares lisas activadas (Figura 1.3). A sucessiva acumulação de lípidos no referido núcleo resulta na morte celular (apoptose) (Figura 1.4). O evento crucial na transformação de uma placa estável numa placa instável é a sua ruptura, a qual resulta numa trombose oclusiva parcial ou completa.

1.2 Hipótese da modificação oxidativa da aterosclerose

Durante as últimas décadas e conforme referido anteriormente, têm sido feitos enormes esforços para explicar os eventos associados ao desenvolvimento da aterosclerose. Neste contexto, três hipóteses distintas estão em investigação activa: a hipótese de resposta a um dano, a hipótese de resposta à retenção e a hipótese da modificação oxidativa. De salientar que estas hipóteses não são mutuamente exclusivas mas pelo contrário enfatizam diferentes conceitos sobre o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas (Stocker et al., 2004).

Em suma, na hipótese de resposta a um dano proposta por Ross (1999), a aterosclerose inicia-se com um dano ou disfunção endotelial que é caracterizada pelo aumento da permeabilidade endotelial e pela deposição de LDL no espaço subendotelial. A hipótese de resposta à retenção tem por base a retenção das lipoproteínas como evento iniciador da aterosclerose. Por sua vez, a hipótese da modificação oxidativa, proposta em 1989 por Steinberg e colaboradores (1989), baseia-se no conceito de que as LDL no seu estado nativo não são aterogénicas, embora as LDL modificadas quimicamente o sejam, uma vez que são rapidamente internalizadas pelos macrófagos pela denominada via do receptor "scavenger".

Embora cada uma das hipóteses da aterosclerose tenha o seu evento iniciador crítico, elas possuem vários pontos em comum. Para além de todas envolverem uma componente inflamatória significativa, uma característica da aterosclerose largamente reconhecida, cada hipótese inclui também as LDL como o elemento central na aterogénese, sendo particularmente importante a sua concentração, o seu tamanho e a sua modificação química (Libby, 2002). Provavelmente, a hipótese de destaque é a hipótese da modificação oxidativa, uma vez que ela salienta os eventos oxidativos na génese da doença vascular, os quais são suportados pela evidência de que a oxidação das LDL ocorre *in vivo* e que contribui para a manifestação clínica da aterosclerose (Herttuala et al., 1998). Aliás, uma indicação indirecta desta

oxidação *in vivo* é o aumento de auto-anticorpos contra as novas epítopes das LDL oxidadas (Salonen et al., 1992). Neste contexto, surgiram recentemente ensaios de elevada sensibilidade para determinar a concentração das LDL oxidadas em circulação no plasma humano usando anticorpos monoclonais anti-LDLox como os E46 e os FOH1a/DLH3 (Itabe et al., 1996; Toshima et al., 2000).

Segundo a hipótese da modificação oxidativa, um dos mecanismos cruciais para o reconhecimento das LDL pelo receptor "scavenger" é a via da oxidação dos lípidos e/ou da apoB-100 (Figura 2). Estas observações constituem a base desta hipótese segundo a qual as LDL atravessam o espaço subendotelial para locais arteriais com predisposição para o desenvolvimento de lesões (Diaz et al., 1997). Durante este processo, os lípidos das LDL são sujeitos a oxidação, podendo também a apoB-100 ser modificada, nomeadamente os resíduos de lisina, de modo que a carga negativa da partícula lipoproteica aumenta. Esta modificação da apoB-100 torna as LDL susceptíveis à captação pelos macrófagos através do receptor "scavenger" (Figura 2).

Assim, as LDL oxidadas contribuem para a aterogénese através de vários mecanismos, nomeadamente: i) indução do recrutamento de monócitos circulantes para o espaço da íntima; ii) inibição da capacidade dos macrófagos residentes de abandonarem a íntima; iii) aumento da velocidade de captação das lipoproteínas pelos macrófagos que conduzirão à formação das células esponjosas; iv) citotoxicidade das LDL oxidadas para o endotélio e conseqüente perda da sua integridade. É a acumulação de células esponjosas e a disfunção endotelial que constituem a base para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica. O processo da oxidação das LDL está associado a uma série de outros eventos potencialmente pro-aterogénicos. Aliás, durante os estados iniciais da oxidação das LDL, a modificação dos lípidos das LDL pode ocorrer na ausência de quaisquer alterações da apoB-100. Tais LDL modificadas, normalmente denominadas LDL minimamente modificadas (LDL-mm), induzem, *in vitro*, a síntese da proteína quimiotáctica dos monócitos em ambas as células endoteliais e

musculares lisas, resultando no recrutamento de células inflamatórias (Cushing et al, 1990).

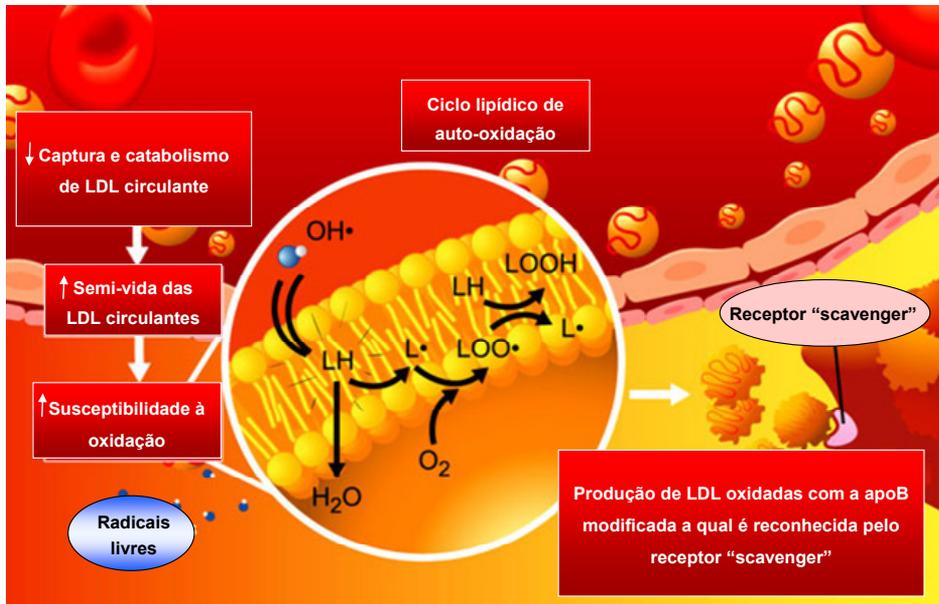


Figura 2. Hipótese da modificação oxidativa das LDL. As LDL ao penetrarem na íntima arterial tornam-se susceptíveis à oxidação, iniciando-se assim o ciclo lipídico de auto-oxidação. A resultante produção de LDL oxidadas contendo a apoB modificada não permite o seu reconhecimento pelos receptores normais mas antes pelos receptores "scavenger" nos macrófagos activados. Adaptado de Fruchart, 2003.

Por sua vez, as LDL extensivamente oxidadas (LDL_{ox}), são quimiotácticas para os monócitos e linfócitos T. As LDL oxidadas parecem também estimular a proliferação das células musculares lisas e ser imunogénicas por indução da produção de auto-anticorpos, cuja formação facilita a internalização das LDL pelos macrófagos (Salonen et al., 1992). O recrutamento das células inflamatórias pode resultar numa oxidação continuada das LDL e assim conduzir a uma expansão catalítica da lesão aterosclerótica.

Em suma, a oxidação das LDL desempenha um papel activo e decisivo no desenvolvimento das doenças cardiovasculares (Toshima et al., 2000; Holvoet et al., 2001).

1.3 Oxidação das LDL

Conforme referido anteriormente, cerca de 70 % do colesterol plasmático total é transportado pelas LDL, lipoproteínas de baixa densidade cujo diâmetro é de aproximadamente 26-27 nm (Figura 3).

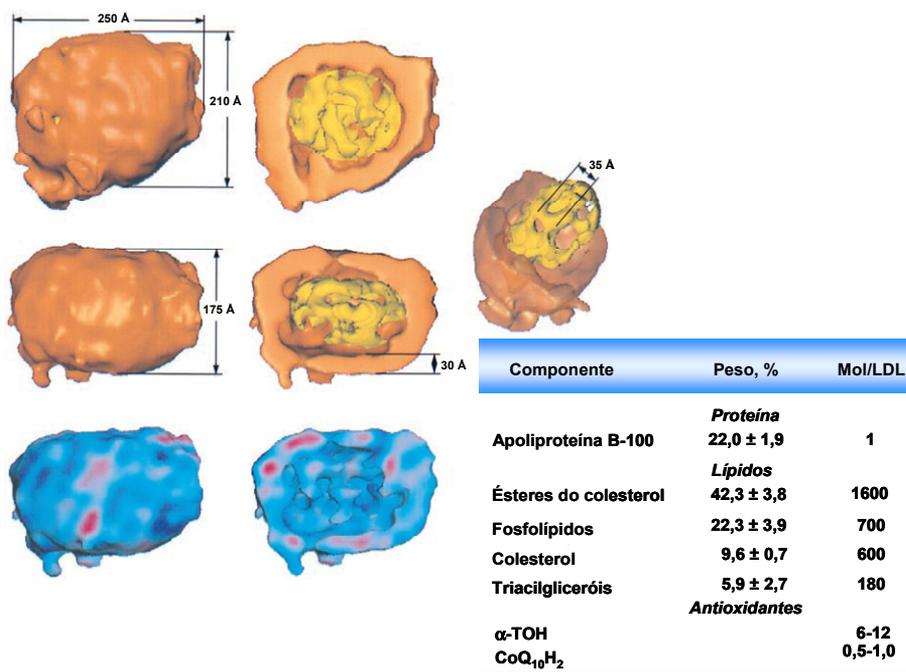


Figura 3. Estrutura tridimensional de LDL obtida por criomicroscopia electrónica. A cobertura laranja corresponde à monocamada superficial contendo fosfolípidos, colesterol livre e apoB-100. O núcleo amarelo corresponde às camadas concêntricas de ésteres de colesterol e triacilgliceróis. A composição química das LDL está descrita à direita da estrutura da lipoproteína. Adaptado de Esterbauer et al., 1992 e Orlova et al., 1999.

O núcleo central das partículas de LDL contém cerca de 1600 moléculas de colesterol esterificado e 170 moléculas de triacilgliceróis. Este núcleo está rodeado não só por uma monocamada de 700 moléculas fosfolípídicas mas também por 600 moléculas de colesterol livre. Embebida na camada exterior está uma molécula de apoB-100. Em suma, as LDL contêm aproximadamente 22 % de apoB-100, 22 % de fosfolípidos, 9 % de

colesterol, 42 % de ésteres de colesterol e 5 % de triacilglicéris (*m/m*) (Esterbauer et al., 1992; Orlova et al., 1999).

Cerca de metade dos ácidos gordos na lipoproteína são ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), principalmente ácido linoleico (C18:2) com quantidades minoritárias de ácido araquidónico (C20:4) e ácido docosaheptaenóico (C22:6). Estes PUFAs estão protegidos contra a oxidação e o ataque de radicais livres através de vários antioxidantes, principalmente o α -tocoferol (aproximadamente 6 moléculas por partícula de LDL) e quantidades minoritárias de γ -tocoferol, carotenóides, criptoxantina e ubiquinol-10. As quantidades de PUFAs e de antioxidantes variam significativamente de indivíduo para indivíduo, sendo influenciadas pela dieta, donde resulta uma enorme variabilidade na susceptibilidade das LDL à oxidação (Mertens et al., 2001).

Muitos oxidantes são capazes de oxidar as LDL a partículas reconhecidas pelos receptores "scavenger" expressos pelos macrófagos e pelas células musculares lisas, e não reconhecidas pelos receptores apoB das LDL. Conforme indicado anteriormente, o processo de oxidação das LDL parece ocorrer dentro da parede arterial, onde as principais células, incluindo as células endoteliais, as células musculares lisas e os macrófagos derivados dos monócitos, produzem espécies reactivas capazes de oxidar as LDL. Uma lista de possíveis oxidantes destas lipoproteínas está sumariada na Figura 4 e inclui os iões metálicos, as lipoxigenases, a mieloperoxidase e as espécies reactivas de nitrogénio.

A oxidação *in vitro* das LDL pelos iões metálicos (como o Cu^{2+}) ocorre em três fases: uma fase inicial de latência (consumo de antioxidantes endógenos), uma fase de propagação (oxidação rápida dos ácidos gordos insaturados a hidroperóxidos lipídicos) e uma fase de decomposição (os hidroperóxidos são convertidos em aldeídos reactivos, como o aldeído malónico e o 4-hidroxinonenal) (Figura 4). A interacção destes aldeídos com os grupos ϵ -amina dos resíduos de lisina da apoB carregados positivamente tornam a partícula de LDL mais electronegativa, resultando por um lado numa diminuição da sua afinidade para o receptor de LDL e por outro num

aumento da afinidade para os receptores "scavenger". É improvável que estes iões metálicos livres sejam responsáveis pela oxidação *in vivo* das LDL. De facto, embora não existam evidências da ocorrência de iões metálicos livres no plasma ou na parede arterial, a oxidação das LDL, nomeadamente, pelo cobre é vulgarmente usada como modelo de oxidação *in vitro*.

Relativamente às lipoxigenases e mais concretamente à 15-lipoxigenase sintetizada pelas células endoteliais e pelos monócitos/macrófagos, é sabido que esta enzima converte os ácidos gordos polinsaturados em hidroperóxidos lipídicos e por isso oxida as LDL (Figura 4). Vários estudos têm demonstrado que a expressão aumentada da 15-lipoxigenase no endotélio vascular acelera a iniciação da aterosclerose em ratos deficientes em receptores para as LDL (Harats et al., 2000).

Por sua vez, os fagócitos activados ou macrófagos segregam mieloperoxidase, uma enzima inflamatória que gera espécies reactivas incluindo o ácido hipocloroso (HOCl), as cloraminas, os radicais tirosilo e o dióxido de nitrogénio (NO₂). Estas espécies reactivas oxidam os lípidos, os antioxidantes e a proteína das LDL (Mertens et al. 2001). As espécies reactivas de nitrogénio geradas pelo sistema mieloperoxidase- H₂O₂- NO₂ dos monócitos convertem as LDL numa forma aterogénica, a qual é avidamente captada e degradada pelos receptores "scavenger" dos macrófagos, conduzindo à formação das células esponjosas (Figura 4).

No âmbito das espécies reactivas de nitrogénio, o óxido nítrico ([•]NO) é um radical livre libertado por várias células vasculares nomeadamente pelas células endoteliais. Este radical difunde-se e pode concentrar-se no núcleo hidrofóbico das LDL podendo actuar como um potente antioxidante (Rubbo et al., 2005).

De facto, o [•]NO inibe a oxidação das LDL mediada não só pelo cobre como também pelas células (Figura 4). O [•]NO é convertido em condições aeróbicas em nitrito, o qual em baixas concentrações (12 µM comparada com as concentrações fisiológicas de 200 µM) inibe a oxidação das LDL mediada pela mieloperoxidase (Figura 4).

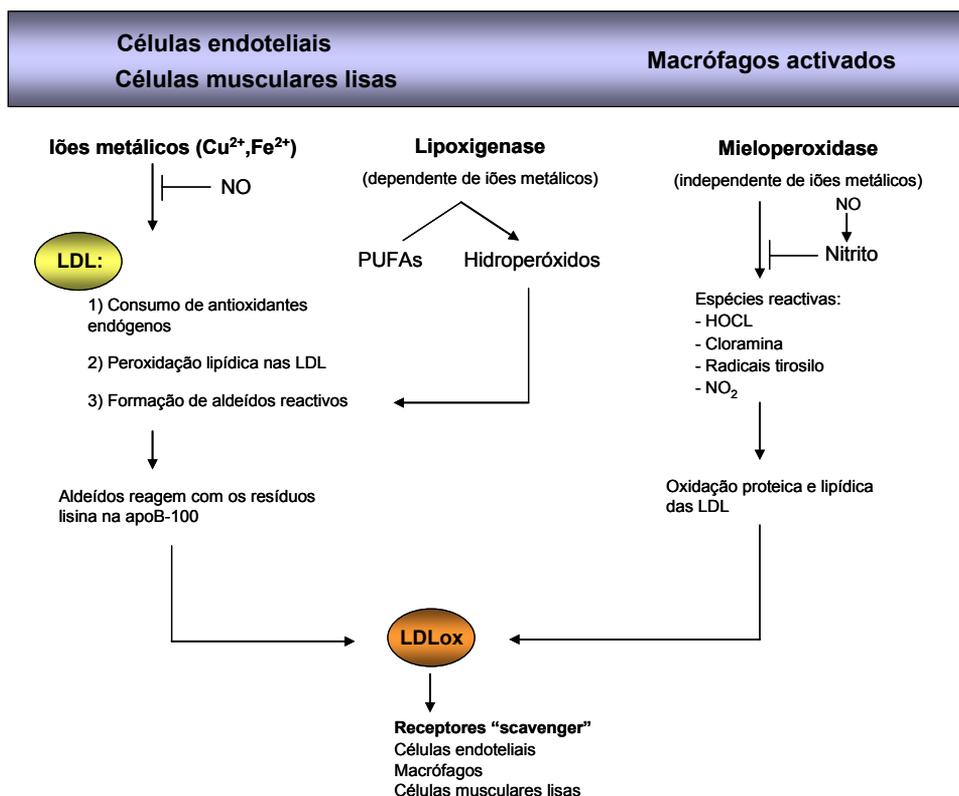


Figura 4. Mecanismos de oxidação das LDL. As partículas de LDL sofrem uma oxidação progressiva na presença das espécies reactivas de oxigénio e/ou nitrogénio produzidas pelas células endoteliais, musculares lisas ou pelos macrófagos. Os íons metálicos, as lipoxigenases, a mieloperoxidase e as espécies reactivas de nitrogénio constituem alguns dos principais oxidantes das LDL. Uma vez oxidadas, estas lipoproteínas são captadas pelos receptores "scavenger" das células endoteliais, dos macrófagos e das células musculares lisas. Adaptado de Mertens et al., 2001.

O $\cdot\text{NO}$ pode também actuar como um antioxidante através da captação de radicais peróxido e alcóxido sendo igualmente um potente agente vasodilatador. Em suma, o $\cdot\text{NO}$ possui propriedades anti-hipertensivas, anti-trombóticas, anti-aterogénicas e anti-proliferativas das células musculares lisas.

Contudo, o $\cdot\text{NO}$ reage com o anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) formando o anião peroxinitrito (ONOO^-), ocorrendo esta reacção a uma velocidade apenas limitada pela velocidade de difusão, $k \sim 10^{10} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Radi et al., 2000). Este anião é uma espécie reactiva de oxigénio e nitrogénio com fortes

propriedades oxidantes e nitrantes sendo por isso um importante mediador das modificações oxidativas das LDL. De facto, na parede vascular facilmente ocorre a formação do peroxinitrito devido por um lado à produção de $\cdot\text{NO}$ pela sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) e por outro às conhecidas fontes de $\text{O}_2\cdot^-$ na doença vascular, as células endoteliais e musculares lisas. Uma vez produzida, esta espécie reactiva induz quer a oxidação e/ou nitração da apoB-100, quer a oxidação lipídica e do α -tocoferol nas LDL (Rubbo et al., 2005). O radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) resultante da decomposição do peroxinitrito também é responsável pela oxidação destas lipoproteínas.

Embora vários oxidantes possam contribuir *in vivo* para a oxidação das LDL, esta pode também ser classificada quanto ao mecanismo envolvido em radicalar ou não radicalar (Niki et al., 2002). A oxidação induzida pelos iões metálicos e pelo peroxinitrito derivado do óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) pressupõe um mecanismo de radicais livres. Já o hipoclorito, por exemplo, formado a partir do peróxido de hidrogénio e o do ião cloreto numa reacção catalizada pela mieloperoxidase, podem oxidar a apoB-100 por um mecanismo não radicalar, embora também possa induzir a peroxidação lipídica por um mecanismo radicalar via radical tirosilo. De referir que o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é capaz de oxidar a metamioglobina dando origem à ferrilmioglobina, um outro oxidante que ocorre *in vivo* e que é também capaz de iniciar a peroxidação lipídica das LDL sendo por estes motivos biologicamente relevante no contexto da aterogénese (Dee et al., 1991).

Em termos globais, a oxidação das LDL implica, em primeiro lugar, um consumo dos seus antioxidantes e uma perda substancial dos PUFAs e do colesterol, os quais são oxidados a PUFAs oxidados e a oxisteróis, respectivamente. De facto, as LDL oxidadas, isoladas do plasma de indivíduos com doença arterial coronária, são caracterizadas por uma mobilidade electroforética em gel de agarose cerca de 1,3 vezes superior à da fracção de LDL nativas isoladas de indivíduos saudáveis, bem como por uma redução em 75 % dos níveis de araquidonato e em 80 % dos níveis de

ácido linoleico. Cerca de 60 a 90 % dos resíduos de lisina na apoB-100 das LDL oxidadas sofrem derivatização com aldeídos resultantes da peroxidação lipídica. Estas características sugerem que a oxidação *in vivo* das LDL não resulta de uma oxidação extensiva das LDL pelos iões metálicos mas antes pela oxidação mediada pela actividade celular enzimática na parede arterial (Mertens et al., 2001).

Assim, apesar de vários marcadores específicos para diferentes oxidantes terem sido identificados e observados em lesões ateroscleróticas humanas, evidenciando a sua participação na aterogénese, a complexidade dos mecanismos subjacentes à oxidação das LDL tem justificado uma profunda investigação acerca da identificação desses oxidantes, da extensão da oxidação bem como dos potenciais inibidores dessa oxidação.

1.4 Papel dos antioxidantes da dieta na prevenção da aterosclerose

O organismo humano dispõe, naturalmente, de mecanismos de defesa antioxidante endógenos, os quais podem ser genericamente agrupados em sistemas enzimáticos, tais como as superóxido dismutases (SOD), as peroxidases e a catalase, e não enzimáticos, como o glutatião, a albumina, a transferrina, a ceruloplasmina e a lactoferrina. Embora ambos os sistemas sejam capazes de captar os radicais livres e reparar o dano oxidativo de lípidos, proteínas e DNA, é reconhecido que a abundância de antioxidantes no plasma parece contribuir fortemente para esta defesa. Em particular, está demonstrado que os antioxidantes de baixo peso molecular hidrossolúveis e presentes no plasma, como por exemplo o ácido úrico, o ácido ascórbico (vitamina C), os tióis e a bilirrubina apresentam efeitos benéficos ao nível da prevenção da oxidação das LDL (Halliwell, 1996). Além disso, os antioxidantes lipossolúveis associados às LDL, como a vitamina E (α - e

β -tocoferóis), os carotenóides (principalmente o β -caroteno e o licopeno) e o ubiquinol-10 apresentam também elevada actividade na protecção das LDL contra a oxidação.

Atendendo a que o equilíbrio entre os pro-oxidantes e os antioxidantes determina a extensão de oxidação das LDL, o consumo de dietas ricas em antioxidantes será decisivo na prevenção deste processo oxidativo bem como da consequente aterogénese. De facto, vários estudos epidemiológicos que relacionam o consumo de antioxidantes da dieta com a redução na incidência de doenças cardiovasculares, têm evidenciado uma associação inversa entre a ingestão de vários frutos ou vegetais e a mortalidade normalmente associada a estas doenças (Marchioli et al., 1999; Cherubini et al., 2005). Aliás, vários estudos em humanos têm indicado que o consumo de antioxidantes, e em particular de vitamina E, está associado a uma redução do risco coronário (Diaz et al., 1997).

As principais categorias de antioxidantes da dieta protectores das LDL incluem vários nutrientes antioxidantes, nomeadamente o α -tocoferol (a forma activa da vitamina E), o ácido ascórbico, os carotenóides (como o licopeno e o β -caroteno), o coenzima Q10 e os polifenóis. Como é sabido, estes antioxidantes estão naturalmente presentes em elevadas concentrações, individualmente ou associados, em vários alimentos, tais como os frutos, os vegetais, o azeite, o vinho tinto, o peixe e o chá (Kaliora et al., 2006). Está também demonstrado que as dietas contendo elevadas quantidades destes compostos antioxidantes, nomeadamente a dieta mediterrânica e asiática, exibem características protectoras contra a oxidação das LDL, possivelmente através de uma interacção sinérgica entre os vários antioxidantes (Galassetti, et al., 2006).

Dos compostos apontados, os polifenóis têm sido um alvo particular de inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo* no contexto do seu papel potencialmente protector na prevenção da aterosclerose e doenças relacionadas. Alguns destes compostos atenuam o processo aterogénico em diversos modelos animais através de mecanismos que modulam a extensão da oxidação das LDL (Lapointe et al., 2006). Mas, para além dos efeitos protectores dos

polifenóis na oxidação das LDL, estes compostos possuem funções cardioprotectoras adicionais, incluindo a redução da absorção hepática do colesterol, a alteração do metabolismo lipoproteico com diminuição das concentrações plasmáticas dos triacilgliceróis e da apoB, e o efeito benéfico na inflamação por redução da produção de citocinas envolvidas na adesão celular, nomeadamente do factor de necrose tumoral (TNF- α) e da interleucina (IL-6) (Zern et al., 2005).

Actualmente, são conhecidas mais de 8000 estruturas polifenólicas. Os polifenóis são genericamente agrupados em flavonóides e não flavonóides. Os flavonóides podem ser divididos em 8 classes baseadas nas suas diferenças estruturais específicas: os flavonóis (quercetina, miricetina), os flavanóis (catequina, epicatequina), as flavonas (apigenina), as isoflavonas, as flavanonas (naringenina), os taninos, as antocianinas (cianidina, malvidina, pelargonidina) e as proantocianidinas (taninos condensados). Os não flavonóides incluem os estilbenos (resveratrol) e os ácidos fenólicos, os quais estão subdivididos em ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeico, cumárico, ferúlico) e em ácidos benzóicos (ácido vanílico, protocatecuico). Moléculas mais complexas derivadas dos estilbenos como os elagitaninos e os galhotaninos estão também incluídas no grupo dos não flavonóides (Cheynier et al., 2005).

O número total estimado de flavonóides conhecidos excede os 6400 compostos. O consumo de flavonóides na dieta tem estado associado a uma redução do risco de doença cardiovascular (Hertog et al., 1995; Peluso et al., 2006). De facto, diferentes flavonóides, presentes em diversos frutos, vegetais e bebidas, como o chá e o vinho, podem prevenir a doença cardiovascular por inibição da oxidação das LDL, da formação de células esponjosas e da própria aterosclerose (Fuhrman et al., 2001; Aviram et al., 2002). Os flavonóides podem reduzir a peroxidação lipídica das LDL ao actuarem como "scavengers" de radicais livres de oxigénio e nitrogénio, como quelantes de iões metálicos, tais como o cobre e o ferro, ou ainda por protegerem os antioxidantes associados às LDL (vitamina E, licopeno e β -caroteno) ou por preservarem ou aumentarem a actividade da paroxonase

(PON) sérica, uma esterase associada às HDL, a qual promove directamente a hidrólise dos peróxidos lipídicos nas LDL e nas células arteriais (Aviram et al., 2005; Kaliora et al., 2006). Os flavonóides podem também reduzir o stress oxidativo nos macrófagos por inibição das oxigenases celulares tais como a NADPH oxidase e também por activação dos antioxidantes celulares tal como o sistema do glutatião (GSH). O efeito dos flavonóides na oxidação das LDL mediada pelas células é determinado, por um lado, pela sua acumulação na lipoproteína e por outro pela sua acumulação nas células arteriais (Aviram et al., 1998). De salientar que a actividade antioxidante dos flavonóides está intimamente relacionada com a sua localização na partícula de LDL bem como com a sua estrutura química (Rice-Evans, et al. 1996; Fuhrman et al., 2001).

1.5 Actividade antioxidante dos flavonóides do vinho tinto na oxidação das LDL

O vinho faz parte da cultura humana há cerca de 6000 anos tendo funções não só dietéticas como sócio-religiosas. Ao seu consumo moderado tem sido putativamente associado uma redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Aliás, o conhecido paradoxo francês baseia-se neste pressuposto. De facto, no sul de França foi detectada uma baixa incidência de acidentes cardiovasculares apesar de uma dieta rica em gorduras saturadas, a qual foi atribuída aos consumos regulares de vinho tinto nesta região francesa (Renaud et al., 1992). Vários estudos epidemiológicos têm confirmado uma associação entre o consumo moderado de vinho tinto e a redução do risco de doença cardiovascular nas populações (Szmítka et al., 2005).

O efeito benéfico do consumo de vinho tinto tem sido atribuído particularmente à actividade antioxidante dos seus polifenóis. O vinho contém, para além do etanol, uma variedade enorme de polifenóis derivados

da uva tais como as antocianinas, também denominadas antocianósidos, as catequinas, as proantocianidinas, também denominadas taninos condensados, os estilbenos e outros fenóis (Soleas et al., 1997; Dell'Agli et al., 2004). A composição polifenólica varia entre os diferentes vinhos dependendo do tipo de uva, da área de cultivo, dos métodos de vinificação usados bem como do tipo de fungos que participam na fermentação. Em geral, os vinhos tintos contêm entre 1000 e 4000 mg/l de fenóis, dos quais os flavonóides, e em particular as antocianinas e as proantocianidinas, representam a maior fracção fenólica presente nestes vinhos (Tsang et al., 2005).

O mecanismo exacto pelo qual o vinho tinto exhibe propriedades protectoras cardiovasculares ainda não foi totalmente elucidado, mas têm sido postuladas um conjunto de vias pelas quais é possível a redução do risco de doença aterosclerótica (Figura 5). Estas incluem para além da actividade antioxidante/antiradicalar, a promoção da função endotelial através do aumento da expressão e actividade da NOS endotelial (eNOS) e subsequente libertação do NO pelas células endoteliais, o qual promove a vasorelaxação; a inibição da síntese da endotelina-1 (ET-1), um potente vasoconstrictor fundamental na aterogénese e o aumento da síntese da apoA-1 bem como da actividade da lipoproteína lipase que conduzem a um aumento da formação de HDL (Figura 5).

O vinho tinto impede também a iniciação e a progressão da placa aterosclerótica através da inibição da oxidação das LDL; da inibição da activação do factor nuclear κB (NF- κB) nas células endoteliais o que resulta numa diminuição da expressão das moléculas de adesão tais como da molécula de adesão das células vasculares-1 (VCAM-1) e da inibição da expressão da proteína quimiotáctica dos monócitos-1 (MCP-1) (Figura 5). Os polifenóis do vinho impedem também a progressão da placa por inibição da proliferação e da migração das células musculares lisas vasculares para a íntima (Dell'Agli et al., 2004; Szmitko et al., 2005).

Em adição a estas acções anti-inflamatórias mediadas pelos polifenóis, o álcool pode também atenuar a aterosclerose em parte através de um

mecanismo anti-inflamatório por redução dos níveis plasmáticos de proteína C-reactiva (CRP).

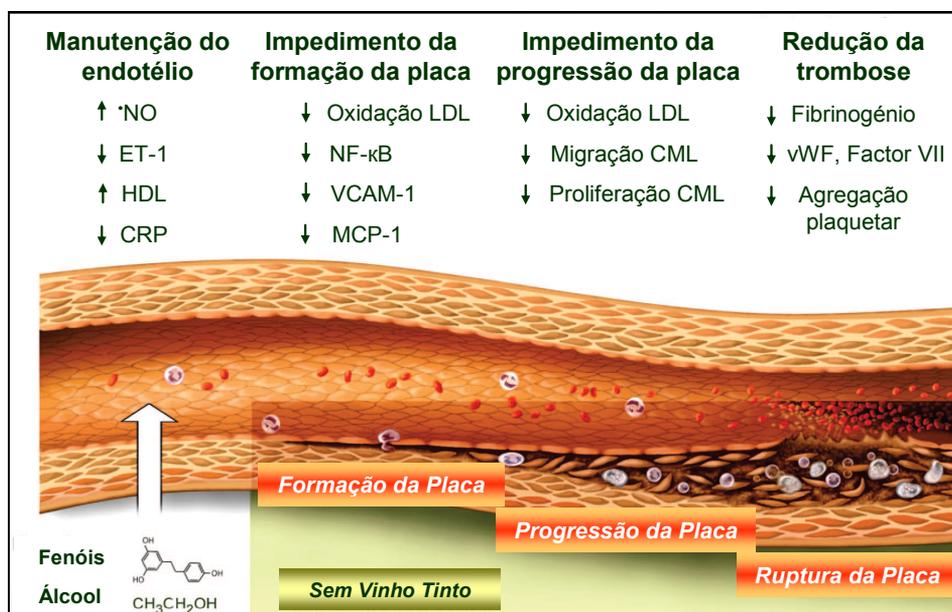


Figura 5. Mecanismos prováveis de redução do risco de doença aterosclerótica induzida pelo vinho tinto. O vinho tinto promove não só a função endotelial mas também inibe a formação, a progressão e a ruptura da placa aterosclerótica (ET-1, endotelina-1; CRP, proteína C-reactiva; NF-κB, factor nuclear-κB; VCAM-1, molécula de adesão das células vasculares-1; MCP-1, proteína quimiotáctica dos monócitos-1; CML, células musculares lisas; vWF, factor von Willebrand). Adaptado de Szmítko et al., 2005.

O vinho possui igualmente uma acção antitrombótica resultado da diminuição dos níveis de fibrinogénio, do factor de von Willebrand (vWF) e do factor VII que conduzem a uma redução na hemostase (Figura 5). A inibição da agregação plaquetar, possivelmente por interferência com a síntese das prostaglandinas, pode também contribuir para o aparente efeito antitrombótico atribuído ao vinho tinto (Szmítko et al., 2005).

Apesar de todas estas actividades, a principal acção postulada para os polifenóis na inibição da oxidação das LDL continua a ser motivo de realização da maior parte dos estudos acerca destes compostos largamente presentes no vinho tinto. De facto, vários estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que o consumo moderado e regular de vinho tinto reduz a

susceptibilidade das LDL à oxidação e que essa redução pode ser atribuída ao seu conteúdo polifenólico e em particular à classe dos flavonóides (Frankel et al, 1995; Fuhrman et al., 1995; Chopra et al., 2000; Tsang et al., 2005; Lapointe et al., 2006). As discrepâncias encontradas em alguns estudos em humanos relativamente à inibição da oxidação das LDL podem estar relacionadas precisamente com variações na composição polifenólica dos vinhos usados (Caccettea et al., 2000).

Independentemente deste facto, vários estudos *in vivo* têm evidenciado que os efeitos do consumo de vinho tinto na oxidação das LDL podem estar relacionados com o aumento do conteúdo polifenólico total no plasma e na própria partícula de LDL. Na verdade, Fuhrman e colaboradores (1995) demonstraram que os compostos polifenólicos presentes no vinho tinto são absorvidos, podendo ligar-se às LDL plasmáticas por interacção com alguns dos componentes superficiais das lipoproteínas, tais como os ácidos gordos (ligações éster) ou os resíduos de açúcar (ligações éter), protegendo assim estas lipoproteínas da oxidação. Este facto constitui um dos mecanismos possíveis para o efeito antioxidativo dos flavonóides contra a oxidação das LDL, tal como demonstrado na Figura 6. Aliás tais ligações à superfície da lipoproteína podem igualmente reduzir a susceptibilidade das LDL para a agregação. Outro dos mecanismos possíveis é o dos polifenóis se associarem a algumas células arteriais como os monócitos/macrófagos, resultando numa inibição da oxidação das LDL mediada pelos macrófagos. A inibição da oxidação das LDL está também relacionada com a diminuição do estado oxidativo das lipoproteínas o qual é essencialmente devido às conhecidas actividades "scavenger" de radicais livres, quelante de iões metálicos e de preservação de antioxidantes (vitamina E e carotenóides) atribuída aos flavonóides contidos no vinho tinto (Fuhrman et al., 2001). Estes flavonóides podem ainda preservar ou aumentar a actividade da enzima paroxonase, uma esterase fisicamente associada às HDL e distribuída em tecidos, tais como o fígado, o rim e o intestino, que tem estado implicada na protecção das lipoproteínas (LDL e HDL) contra a

oxidação, por catalizar a hidrólise dos peróxidos lipídicos (Figura 6) (Aviram et al., 2005).

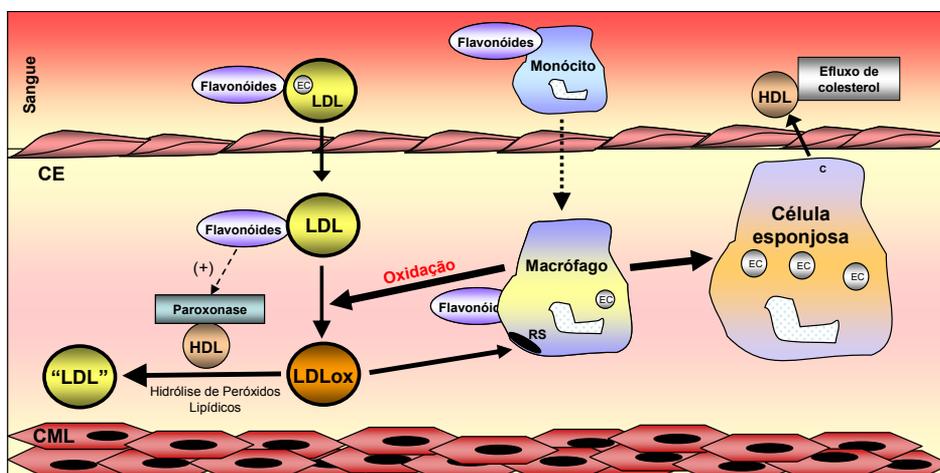


Figura 6. Efeito potencial dos flavonóides do vinho na oxidação das LDL e na formação de células esponjosas. Os flavonóides podem associar-se quer directamente às LDL, resultando numa inibição da oxidação das LDL, quer às células arteriais, tais como os monócitos/macrófagos, resultando numa inibição da oxidação das LDL mediada pelo macrófago. Além disso, os flavonóides preservam a actividade da enzima paroxonase, a qual protege as lipoproteínas da oxidação. Todos estes efeitos conduzem a uma redução da formação de células esponjosas, atenuando assim o desenvolvimento da lesão aterosclerótica. (CE, células endoteliais; CML, células musculares lisas; EC, ésteres do colesterol; RS, receptor "scavenger"). Adaptado de Aviram et al., 2002.

Todos estes efeitos atribuídos aos flavonóides do vinho tinto conduzem a uma inibição da oxidação das LDL, com redução da formação das células esponjosas e com consequente limitação do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (Aviram et al., 2002). Contudo, e conforme referido anteriormente, não é apenas a quantidade de flavonóides no vinho tinto a principal determinante da capacidade antioxidante do vinho. A diversidade de classes de flavonóides desempenha também um importante papel.

De facto, embora as propriedades biológicas de muitos flavonóides do vinho tinto tenham vindo a ser extensivamente estudadas, menor destaque tem sido dado às antocianinas, uma das classes de flavonóides maioritariamente presentes no vinho tinto (Dell'Agli et al., 2004; Tsang et al., 2005). Atendendo, a esta elevada disponibilidade das antocianinas, e em

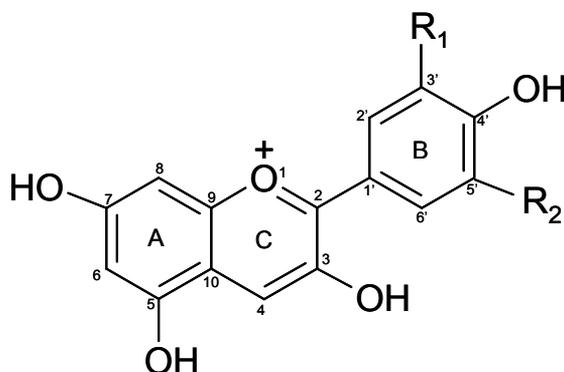
particular da malvidina-3-glucósido, será dada uma maior relevância às potenciais actividades exibidas por estes flavonóides.

1.6 Antocianinas – ocorrência, estrutura química e efeitos biológicos

As antocianinas (do Grego *ánthos*, flor e *kýanos*, azul) constituem uma das principais classes de flavonóides e enquanto pigmentos hidrossolúveis estão largamente distribuídas em várias flores, vegetais, frutos e bebidas, tais como os sumos e principalmente os vinhos tintos, sendo responsáveis pelas suas intensas colorações de vermelho, violeta ou azul (Kong et al., 2003). Estes compostos estão aprovados pela Food and Drug Administration para serem usados como corantes alimentares com a designação de E163 (Timberlake et al., 1988; Stinzing et al., 2004). Com rigor, estes compostos deveriam ser designados por antocianas, o que englobaria os derivados glicosídicos, as antocianinas, e as suas agliconas, as antocianidinas. Para simplificar, no presente trabalho todos estes flavonóides serão por vezes designados por antocianinas.

São conhecidas aproximadamente 600 antocianinas. A estrutura química básica é a de um difenilpropanóide [C_6 (anel A)- C_3 (anel C)- C_6 (anel B)] baseado numa estrutura em anel polifenólica (Figura 7). Em contraste com outros flavonóides, as antocianinas formam em solução acídica os chamados catiões flavílio (2-fenilbenzopirílio) e por esse motivo são espécies altamente reactivas. As diferenças estruturais entre as antocianinas estão, essencialmente, relacionadas com o número e posição dos grupos hidroxilo e metoxilo, com a natureza, o número e a posição dos açúcares ligados à estrutura básica da antocianidina e, ainda, com a extensão da acilação desses açúcares e a natureza dos agentes acilantes (Kong et al., 2003). Em suma, as antocianinas são glicósidos das antocianidinas, possuindo glucose,

galactose, ramnose, xilose ou arabinose ligada ao núcleo aglicão. De referir que a glicosilação aumenta a estabilidade destes pigmentos.



Nome	R ₁	R ₂
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	H
Cianidina	OH	H
Pelargonidina	H	H
Peonidina	OCH ₃	H
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 7. Estrutura química básica das principais antocianidinas.

Existem cerca de 17 antocianidinas distribuídas na natureza, embora apenas 6 se encontrem nas plantas superiores, a cianidina, a delfinidina, a malvidina, a pelargonidina, a peonidina e a petunidina (Figura 7). A malvidina bem como a respectiva antocianina malvidina-3-O-glucósido predominam largamente nas uvas e em particular no vinho tinto.

A estabilidade das antocianinas é largamente influenciada pelo pH da solução, pelo que as antocianinas existem num equilíbrio dependente do pH em 4 formas estruturais diferentes com colorações variáveis, das quais o catião flavílio vermelho presente a um pH compreendido entre 1 e 3 é a forma mais estável como exemplificado para a malvidina-3-glucósido na

Figura 8. Em meio aquoso e com o aumento do pH para 4-5, as reacções de hidratação geram uma pseudo-base incolor, o carbinol, o qual pode sofrer uma abertura do anel dando origem a chalconas amarelas.

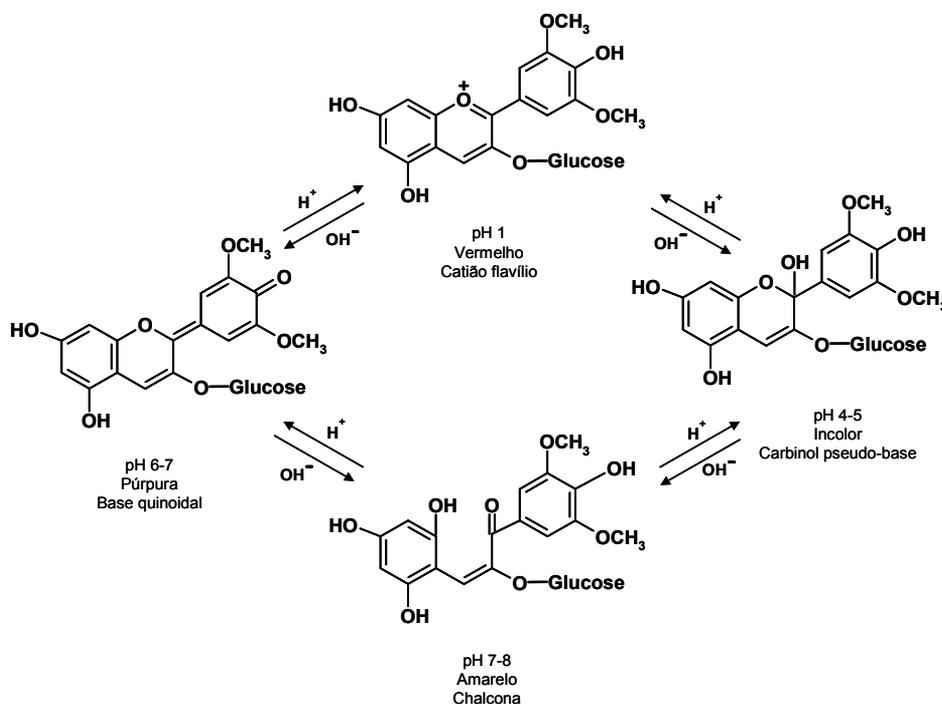


Figura 8. Transformação estrutural da malvidina-3-glucosídeo em função do pH. A antocianina ocorre como uma chalcona, com o anel C aberto, quando o pH é neutro. Em condições minimamente ácidas fecha-se para formar uma pseudo-base carbinol. Num meio fortemente ácido (pH 1), o anel C adquire aromaticidade obtendo-se o catião flavílio, o qual confere intensa coloração à molécula. A pH 6-7, a oxidação do anel B gera uma estrutura quinóide com eliminação da carga positiva, sendo esta estrutura igualmente corada. Adaptado de Lapidot et al. 1999.

O catião pode alternativamente transformar-se em bases quinoidais, a valores de pH compreendidos entre 6 e 7. Embora a estabilidade do catião esteja comprometida pelo aumento de pH, as implicações das diferentes formas estruturais das antocianinas para a actividade farmacológica são ainda desconhecidas (Cooke et al., 2005).

As antocianinas são particularmente interessantes, do ponto de vista científico, uma vez que ocorrem na dieta em concentrações consideravelmente elevadas quando comparadas com outros flavonóides. A

ingestão diária das antocianinas em humanos é bastante variável dependendo sobretudo dos hábitos alimentares. Nos EUA, esta ingestão foi inicialmente estimada em 180-215 mg/dia, enquanto que o consumo diário da maior parte dos restantes flavonóides, incluindo a genisteína, a quercetina e a apigenina, está estimado em apenas 20-25 mg/dia. Contudo, um estudo muito recente estimou o consumo diário total de antocianinas nos EUA em apenas 12,5 mg/dia/pessoa embora em Portugal e em outros países europeus seja previsível uma maior ingestão diária destes compostos atendendo à chamada dieta mediterrânica (Wu et al., 2006).

Independentemente deste último estudo, está estabelecido que o vinho tinto e em particular as uvas podem conter um teor de antocianinas totais de cerca de 100 a 1000 mg/l e 30 a 750 mg/ 100 g, respectivamente (Glories et al., 1988; Mazza et al., 1993). Estas elevadas, embora muito variáveis, quantidades de antocianinas dependem largamente da exposição solar e do processamento das uvas bem como do envelhecimento do vinho tinto. De facto, é possível encontrar concentrações de 400 mg/l num vinho tinto com idade inferior a 6 meses e não fermentado em barris de madeira e concentrações de 90 mg/l num vinho tinto com 2 anos de idade ou fermentado em barris de madeira (Waterhouse et al., 2002). Com efeito, durante o envelhecimento, o conteúdo em polifenóis do vinho torna-se progressivamente mais complexo resultado da formação de novos pigmentos devido a reacções de condensação entre as antocianinas e os flavonóis, e à cicloadição de diferentes compostos (4-vinilfenol, ácido pirúvico, acetaldeído) no C4 e no grupo hidroxilo em posição 5. A extensão destas reacções depende de vários factores, tais como as técnicas de fabrico do próprio vinho tinto, a sua composição, o pH, o tempo, a temperatura e arejamento durante o armazenamento e também da presença e da concentração em acetaldeído bem como em outros compostos, como o ácido pirúvico e o 4-vinilfenol, acima referidos (Dugo et al., 2004). Curiosamente, Brouillard e colaboradores (2003) atribuíram a este facto a designação de paradoxo Francês II. Tal paradoxo deve-se ao facto da coloração do vinho tinto persistir durante longos períodos de tempo apesar

das antocianinas das uvas apresentarem uma enorme simplicidade estrutural, uma vez que maioritariamente englobam monoglucósidos das 5 agliconas, malvidina, peonidina, petunidina, cianidina e delphinidina.

Habitualmente, o conteúdo em antocianinas do vinho tinto é avaliado utilizando um método de desvio de pH e, onde, a um $\text{pH} < 1$, as antocianinas são detectadas sob a forma de catião flavílio. As antocianinas são depois quantificadas espectrofotometricamente como equivalentes da malvidina-3-glucósido, usando o coeficiente de extinção molar (ϵ) de 28 000. Alternativamente, as antocianinas são separadas dos outros polifenóis e directamente quantificadas pela sua absorvância máxima na zona do visível (536-542 nm) (Dell'Agli et al., 2004). De facto, as antocianinas possuem dois picos de absorvância a 270-280 nm e a 510-540 nm. A quantificação das antocianinas é também vulgarmente efectuada por HPLC (Milbury et al., 2001; Wu et al., 2006)

Após o consumo oral, as antocianinas são absorvidas na forma intacta (glicosilada), distribuídas para o sangue e rapidamente eliminadas na forma intacta ou conjugada (Cao et al., 2001; McGhie et al., 2003). Embora pouco se saiba relativamente às concentrações efectivas destes pigmentos após a sua administração oral, os últimos estudos realizados em animais e humanos sugerem que a sua biodisponibilidade é limitada, sendo referenciado um valor inferior a 1 % da dose (Tsuda et al., 1999; Bub et al., 2001; Nielsen et al., 2003; Harada et al., 2004). Esta aparentemente baixa biodisponibilidade pode estar subestimada provavelmente porque alguns metabolitos importantes podem estar a ser ignorados ou porque os métodos usados podem necessitar de ser optimizados para a análise dos metabolitos das antocianinas (Manach et al., 2005). A este nível, deverá ser tida sempre em consideração a influência do pH no equilíbrio das diferentes formas químicas das antocianinas.

Contudo, a informação acerca do metabolismo das antocianinas é também muito escassa. Segundo Cao e colaboradores (2001), a detecção das antocianinas na sua forma glicosilada não alterada poderá indicar o envolvimento de receptores de transporte de glucose na absorção destes

compostos *in vivo*. Além disso e atendendo ao facto de as antocianinas serem moléculas volumosas e polares, foi também já descrita a absorção das antocianinas a nível gástrico através de um mecanismo possivelmente mediado pela bilitranslocase, um transportador aniónico orgânico da membrana plasmática expresso na mucosa gástrica.

De facto, experiências *in vivo*, em ratos, documentaram o envolvimento do estômago na absorção de antocianinas (Passamonti et al., 2002). Outros estudos têm destacado a predominante absorção intestinal das antocianinas, em particular na região do jejuno, o que à partida sugere, mais uma vez, o envolvimento de um mecanismo de transporte activo (Matuschek et al., 2006).

Além disso, também é possível que após ingestão, as antocianidinas possam ser originadas *in vivo* a partir das respectivas antocianinas por hidrólise catalizada por enzimas sintetizadas pelas bactérias intestinais como a β -glucosidase (Tsuda et al., 1994). Aliás, dois estudos muito recentes, em ratos, confirmam a hipótese de que a hidrólise poderá ocorrer *in vivo* (Ichiyanagi et al., 2005; Talavéra et al., 2005).

De salientar também que, segundo Fleschhut e colaboradores (2006), as antocianinas são rapidamente degradadas pela microflora intestinal e que os principais produtos resultantes desta degradação são os correspondentes ácidos fenólicos derivados do anel B da antocianina. Aliás, o ácido protocatecuico foi já identificado como sendo um dos produtos de degradação da cianidina-3-O-glucósido por clivagem do anel B/C (Seeram et al., 2001). Outras vias metabólicas possíveis já reportadas em humanos para as antocianinas são a glucuronidação e a metilação (Kay et al., 2005; Prior et al., 2006).

Dada a falta de conhecimento, as propriedades farmacocinéticas das antocianinas e, em particular, as suas biodisponibilidades continuam a ser alvo e motivo de vários estudos em humanos.

A administração oral de frutos ou extractos ricos em antocianinas tem provado ter efeitos benéficos na prevenção ou supressão de vários estados de doença *in vivo*. Vários estudos sobre a administração oral de

antocianinas têm também confirmado o aumento da capacidade antioxidante do plasma (Ramirez-Tortosa et al., 2001; Mazza et al., 2002; Bitsch et al., 2004). As antocianinas possuem uma enorme variedade de propriedades biológicas conferindo protecção contra doenças oculares e possuindo também actividade antimutagénica e antiviral (Yoshimoto et al., 2001; Knox et al., 2001).

Contudo, estas não são certamente as propriedades que lhes conferem o destaque que lhes tem sido atribuído. Algumas investigações epidemiológicas têm indicado que o consumo moderado de antocianinas através da ingestão de produtos como o vinho tinto ou os extractos de vários frutos poderá estar associado a muitos efeitos benéficos em várias doenças crónicas incluindo o cancro, as doenças cardiovasculares, as doenças cerebrovasculares, a aterosclerose e a diabetes (Renaud et al., 1992; Tsuda et al., 2003; Cooke et al., 2005; Jayaprakasam et al., 2005). Tais efeitos serão provavelmente resultado das suas propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogénicas e antioxidantes.

As propriedades anti-inflamatórias têm sido atribuídas nomeadamente à sua capacidade de inibição da cicloxigenase (COX), a enzima que converte o ácido araquidónico a prostaglandina H_2 , a qual é posteriormente metabolizada a várias prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano A_2 (Seeram et al., 2001).

Relativamente às propriedades anticarcinogénicas, o mecanismo exacto envolvido na referida actividade das antocianinas não está totalmente esclarecido mas estará provavelmente relacionado com a capacidade das antocianinas para suprimir a proliferação e migração celular, a invasão celular tumoral ou a angiogénese (Martin et al., 2003; Hou et al., 2003; Cooke et al., 2005). Aliás, foi também já referido o seu papel protector contra o dano do DNA e a possibilidade de as antocianinas induzirem a apoptose de células tumorais (Katsube et al., 2003). Recentemente têm sido realizados inúmeros estudos sobre os mecanismos moleculares subjacentes a esta quimioprevenção do cancro pelas antocianinas (Hou et al., 2004; Fritz et al., 2006).

Estudos acerca da actividade antioxidante das antocianinas revelaram que estas podem actuar segundo diferentes mecanismos, nomeadamente, captação de radicais livres e/ou aniões, inibição da xantina oxidase, interacção com o sistema gerador de óxido nítrico (NO), quelatação de iões metálicos como o ferro ou o cobre, ligação a proteínas e inibição da peroxidação lipídica induzida pelo Cu^{2+} , Fe^{2+} , por H_2O_2 , doxorrubicina e pela radiação ultravioleta (Hagerman et al., 1981; Tsuda et al., 1996; Ramirez-Tortosa et al., 2001; Noda et al., 2002; Rahman et al., 2006). Esta forte actividade antioxidante é, por um lado resultado do défice de electrões na sua estrutura química e, por outro, da estrutura conjugada das antocianinas que, permitindo a deslocalização electrónica, conduz à obtenção de produtos radicalares mais estáveis.

As antocianinas demonstraram também inibir a oxidação das LDL induzida pelo cobre ou pelo radical peróxido (Teissedre et al., 1996; Kerry et al., 1997; Satué-Gracia et al., 1997; Heinonen et al., 1998; Chang et al., 2006). De salientar que até ao momento, foram apenas estes os oxidantes testados para avaliar a capacidade protectora das antocianinas face à oxidação das LDL, um evento crucial na aterogénese.

Um estudo recentemente realizado por Chang (2006) sugeriu também que as antocianinas inibem a apoptose dos macrófagos induzida pelas LDL oxidadas. Outro estudo, realizado por Youdim e colaboradores (2000), evidenciou também a capacidade das antocianinas para serem incorporadas na membrana e no citosol das células endoteliais, protegendo-as fortemente contra o dano oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogénio e pelo AAPH. Muito recentemente, um estudo elaborado por Bell e colaboradores (2006) demonstrou que extractos enriquecidos em antocianinas produzem o relaxamento do endotélio nas artérias coronárias e que menores concentrações desses extractos protegem estas artérias das espécies reactivas de oxigénio (ROS) sem alterar a resposta coronária ao óxido nítrico endógeno e exógeno. Os resultados deste estudo estão em concordância com a recente divulgação de que as antocianinas diminuem a produção da proteína vasoconstritora endotelina-1 e aumentam a actividade da eNOS em

células humanas endoteliais melhorando deste modo a função endotelial (Lazze et al., 2006).

Outro estudo recente demonstrou que as antocianinas promovem o efluxo de colesterol das células esponjosas derivadas dos macrófagos, sugerindo a potencial função destes flavonóides na regulação da distribuição do colesterol nas células (Xia et al., 2005). Aliás, os autores deste último estudo evidenciaram também que as antocianinas previnem a resposta inflamatória induzida pelo ligando do receptor CD-40 nas células endoteliais através da inibição da activação do factor nuclear- κ B (NF- κ B) induzida pelo CD-40, o que destaca a possibilidade destes compostos actuarem como reguladores da resposta inflamatória (Xia et al., 2007). As antocianinas parecem também possuir a capacidade de inibir a proliferação das células endoteliais bem como de inibir a agregação plaquetária, uma etapa de grande relevância na aterogénese (Ghiselli et al., 1998; Freedman et al., 2001; Martin et al., 2003; Rechner et al., 2005). Em conformidade com estas actividades, Xia e colaboradores (2003 e 2006) demonstraram que as antocianinas atenuam a formação da placa aterosclerótica em ratos, promovendo igualmente a sua estabilidade.

Todas estas propriedades das antocianinas têm contribuído certamente para a conhecida actividade protectora destes compostos ao nível da aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (Figura 9). Aliás tem sido sugerido que o consumo destes flavonóides no vinho tinto pode contribuir, pelo menos parcialmente, para o paradoxo francês, isto é, para uma diminuição do risco de doença cardiovascular apesar de uma dieta rica em gorduras saturadas (Clifford et al., 2000; Cooke et al., 2005). Além disso, foi recentemente demonstrado que as antocianinas do vinho tinto são estáveis no tracto gastrointestinal o que corrobora ainda mais a hipótese de que estes compostos são biodisponíveis e podem vir a representar uma nova e promissora classe terapêutica para o tratamento da aterosclerose (McDougall et al., 2005; Frolov et al., 2007).

Tal facto não será de surpreender atendendo a que está já disponível no mercado português um medicamento com o nome comercial Difrarel®

cuja substância activa é um extracto de antocianinas de *Vaccinium myrtillus*. Este extracto está particularmente indicado como venotrópico no tratamento de insuficiência venosa, uma vez que melhora o tónus venoso e aumenta a resistência capilar.

Propriedades potencialmente cardioprotectoras das antocianinas

“Scavenger” de radicais livres e/ou aniões reactivos

$O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , $ONOO^{\cdot}$ e ROO^{\cdot}

Quelante de iões metálicos

Cu^{2+} e Fe^{2+}

Inibição da oxidação das LDL induzida pelo Cu^{2+} e pelos radicais peroxilo

Inibição da apoptose dos macrófagos

Promoção do efluxo de colesterol das células esponjosas

Inibição da proliferação das células endoteliais

Inibição da agregação plaquetar

Vasorrelaxamento endotelial

Diminuição da produção de ET-1

Aumento da expressão de eNOS

Inibição da formação da placa aterosclerótica

Promoção da estabilidade da placa aterosclerótica

Figura 9. Resumo das propriedades potencialmente cardioprotectoras atribuídas às antocianinas. Destaca-se a capacidade das antocianinas para inibirem a oxidação das LDL, um evento iniciador da aterogénese e consequentemente da doença cardiovascular. Esta inibição apenas está demonstrada para o Cu^{2+} e para os radicais peroxilo.

De salientar que tem sido demonstrada uma enorme variabilidade na actividade das diferentes antocianinas, incluindo a actividade antioxidante, consequência da sua estrutura química. O grau de insaturação e polimerização, bem como o seu padrão de hidroxilação, metilação e glicosilação, parecem afectar por um lado a estabilidade, e por outro, a reactividade das antocianinas, modulando desta forma as suas actividades antioxidantes (Seeram et al., 2002; Prior et al., 2006; Rahman et al., 2006).

Assim, o conhecimento da relação estrutura-actividade das antocianinas é essencial para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao papel destes flavonóides enquanto antioxidantes *in vivo*. Aliás, são já conhecidos e amplamente utilizados vários sistemas de produção de antocianinas *in vitro*, usando sistemas de culturas celulares que favorecem esta intensa e profunda investigação acerca das antocianinas no âmbito nutricional e médico (Lila et al., 2004).

Apesar de todos os estudos realizados até ao momento, muito poucos são os que no âmbito dos efeitos protectores das antocianinas contra a oxidação das LDL têm utilizado oxidantes biologicamente relevantes. É neste contexto que surge o presente trabalho.

1.8 Objectivos e plano geral da tese

A modificação oxidativa das LDL desempenha um papel crucial na patogénese da aterosclerose. Vários agentes antioxidantes, que inibam efectivamente a oxidação das LDL, podem prevenir a aterosclerose através da inibição da fase inicial da aterogénese e/ou da sua progressão para estados mais avançados. Como demonstrado em vários estudos, a presença de quantidades relativamente grandes de antocianinas na dieta humana diária e em particular no vinho tinto, associada à sua conhecida e elevada actividade antioxidante, têm conduzido a um particular interesse no estudo das propriedades biológicas bem como farmacológicas destes flavonóides no contexto da prevenção da aterosclerose.

O objectivo do presente trabalho foi o de avaliar e comparar a acção protectora de quatro compostos estruturalmente relacionados (Figura 10), a pelargonidina, a cianidina e a malvidina, três antocianidinas, e da malvidina-3-glucósido, a antocianina maioritariamente presente no vinho tinto, face à oxidação induzida em LDL humanas.

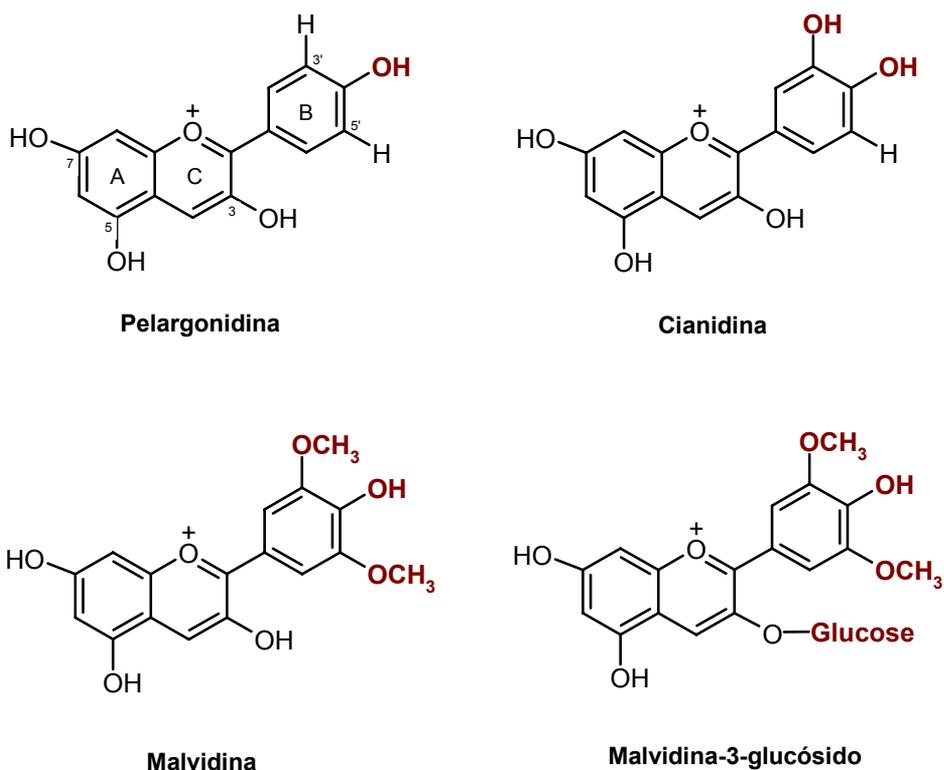


Figura 10. Estrutura química das antocianinas em estudo.

Neste âmbito, foram utilizados vários modelos de oxidação *in vitro* das LDL. A oxidação foi iniciada quer pelos radicais peróxido gerados a partir do azocomposto AAPH quer pelos oxidantes com relevância biológica, ferrilmioglobina e peroxinitrito, tendo sido investigada a capacidade das antocianinas para prevenir as modificações oxidativas lipídicas e/ou proteicas induzidas por estes oxidantes nas LDL. As modificações lipídicas foram avaliadas pelo decaimento da fluorescência do ácido *cis*-parinárico (*cis*-PnA) incorporado e pela formação dos dienos conjugados, enquanto as modificações proteicas foram examinadas através da medição da mobilidade electroforética relativa (REM) e da formação de grupos carbonilo. Neste âmbito, foram também discutidos os possíveis mecanismos de acção das diferentes antocianinas.

Além disso, foi avaliada a acção protectora das antocianinas no consumo das defesas antioxidantes endógenas das LDL sujeitas a oxidação. Em particular, foi investigada a interacção potencialmente cooperativa dos flavonóides em estudo com o α -tocoferol, o principal antioxidante das partículas de LDL. Para tal, foi utilizada a espectroscopia de ressonância paramagnética de electrões (RPE), uma ferramenta valiosa para estudar as fases dinâmicas de formação e propagação de decaimento de radicais livres.

Com base nos resultados, a relação entre as estruturas químicas das antocianinas em estudo e as suas actividades antioxidantes foi discutida.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Compostos químicos

A pelargonidina, a cianidina e a malvidina foram obtidas da Polyphenols Laboratories AS (Sandnes, Norway), enquanto a malvidina-3-glucósido foi adquirida à Aapin Chemicals Limited (Abingdon, UK). O azocomposto 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) foi obtido na Polysciences Inc. (Warrington, PA, USA) e o ácido *cis*-parinárico (*cis*-PnA) foi adquirido à Molecular Probes (Junction City, OR, USA). Os restantes compostos químicos, incluindo os utilizados na preparação da solução de metamioglobina e na síntese de peroxinitrito, foram adquiridos à Sigma Chemical Co. ou à Merck, sendo todos de pureza adequada para estudos bioquímicos. As soluções foram preparadas em água desionizada ultrapura para minimizar eventuais contaminações com metais.

As soluções stock das antocianinas (1 mM) foram preparadas numa solução ácida de metanol: água (1:1,v/v) e armazenadas em alíquotas, sob atmosfera de azoto, no escuro, a - 20 °C.

A solução de metamioglobina foi dializada, primeiramente, contra tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,1 M), pH 7,4, contendo ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) 1 mM, durante 2 horas, a 4 °C, e depois contra uma solução contendo Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 110 mM, pH 7,4, durante 8 horas, à mesma temperatura. A solução stock de metamioglobina purificada foi conservada a - 80 °C e a sua concentração, bem como, a da solução de peróxido de hidrogénio, foram calculadas com base na absorvidade molar a 632 nm ($\epsilon = 2,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e a 240 nm ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), respectivamente.

O peroxinitrito foi sintetizado a partir de nitrito e de peróxido de hidrogénio num reactor de fluxo controlado, segundo o método descrito por Beckman e colaboradores (1994). Resumidamente, uma solução ácida de

peróxido de hidrogénio (H_2O_2 0,6 M em HCl 0,7 M) foi rapidamente misturada com outra de nitrito (NaNO_2 0,6 M), e o ácido peroxinitroso (ONOOH) resultante foi rapidamente estabilizado por adição de um excesso de hidróxido de sódio (NaOH 1,2 M). A solução de anião peroxinitrito (ONOO^-) obtida foi posteriormente concentrada por um processo de congelamento fraccionado, a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante pelo menos 12 horas. Após esse período, a camada superior, intensamente corada, foi retirada, pois corresponde à maior concentração de peroxinitrito, e a concentração foi determinada com base na sua absorvidade molar a 302 nm ($\epsilon = 1670\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), após diluição em NaOH 4 mM.

2.2 Isolamento de LDL humanas

O isolamento e purificação de lipoproteínas humanas de baixa densidade (LDL) foram realizados segundo o método descrito por Vieira e colaboradores (1996).

Resumidamente, o sangue (50 ml) de um dador saudável, em jejum de 12 horas, foi recolhido em tubos contendo EDTA como anticoagulante, e foi posteriormente centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos, a $15\text{ }^\circ\text{C}$, para obtenção do plasma. Após adição de EDTA (concentração final 1 mM), a densidade do plasma foi ajustada a 1,21 g/ml com KBr sólido, recorrendo à utilização de um densitómetro digital PAAR DMA 35 (Graz, Áustria). O plasma foi posteriormente distribuído por tubos de centrífuga (2,8 ml por tubo) e para alcançar o gradiente de densidades, necessário à separação das LDL, foram cuidadosamente adicionados 6,6 ml de tampão de isolamento (Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 110 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4), de densidade 1,007 g/ml, previamente saturado com azoto. Após ultracentrifugação a 65 000 rpm, durante 3 horas, a $15\text{ }^\circ\text{C}$, numa ultracentrífuga Beckman L 80 equipada com um rotor 70,1 Ti, a fracção de LDL (densidade 1,019 – 1,063 g/ml) foi retirada e submetida a diálise por

ultrafiltração em membrana de nitrato de celulose contra uma solução contendo Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 110 mM, pH 7,4, sob atmosfera de azoto, no escuro, a 4 °C. A preparação de LDL concentrada e dialisada foi finalmente filtrada através de um filtro com poros de 0,22 μM de diâmetro (Millipore GS) e armazenada no escuro, sob atmosfera de azoto, a 4 °C, ou então diluída com uma solução de sacarose (concentração final 10 %), repartida por alíquotas e conservada a – 80 °C.

A proteína foi determinada segundo o método de Lowry, usando a albumina sérica bovina como padrão (Lowry et al., 1951).

2.3 Avaliação da oxidação lipídica de LDL induzida pelo azocomposto AAPH e pela ferrilmioglobina

2.3.1 Ensaio de fluorescência do ácido *cis*-parinário

A incorporação e oxidação do ácido *cis*-parinário (*cis*-PnA, ácido 9,11,13,15-octadecatetraenóico) foram executadas como previamente descrito por Laranjinha e colaboradores (1992). Assim, começou-se por estipular as condições de ensaio de modo a que houvesse por um lado uma relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração da sonda incorporada nas LDL e, por outro, uma concentração de LDL suficientemente elevada para incorporar a maioria das moléculas de *cis*-PnA. Estas condições permitiram assegurar que as extinções de fluorescência reflectissem a degradação da sonda.

Quando o azocomposto AAPH foi usado como oxidante, a reacção de oxidação foi iniciada aos 210 s por adição de AAPH 5 mM a 2 ml de uma solução contendo Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 110 mM, DTPA 100 μM , pH 7,4 (PBS), LDL (30 μg) e 2 nmoles de *cis*-PnA . O ensaio foi realizado na ausência (controlo) ou na presença das antocianinas ou do ascorbato, um

antioxidante de referência, os quais foram adicionados 30 s antes do AAPH e num intervalo de concentrações compreendido entre 0,5 e 1,5 μM . A diminuição da intensidade de fluorescência ao longo do tempo foi medida continuamente num espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50, mantendo a solução reaccional a 37 °C e sob agitação suave. Os comprimentos de onda de excitação e emissão usados foram 320 e 413 nm, respectivamente, e a largura de fenda foi de 5 nm. Para uma análise mais cuidada dos resultados avaliou-se a quantidade de *cis*-PnA oxidado aos 20 minutos de reacção e os resultados foram expressos como percentagem do controlo, isto é, o ensaio realizado na ausência dos antioxidantes.

Quando a oxidação foi mediada pela ferrilmioglobina, as LDL (30 $\mu\text{g/ml}$) foram incubadas em 2 ml de PBS contendo *cis*-PnA 1 μM e metamioglobina 3 μM e a reacção foi iniciada, 120 s após, por adição de peróxido de hidrogénio 4,5 μM (controlo). As antocianinas, o ascorbato ou o ácido cafeico (um ácido fenólico de referência), foram adicionados 60 s antes do H_2O_2 num intervalo de concentrações entre 0,25 e 1 μM , tal como indicado nas figuras. Para minimizar a extinção de fluorescência do *cis*-PnA devida à presença de metamioglobina, os comprimentos de onda de excitação e emissão usados foram 310 e 440 nm, respectivamente, e a largura de fenda foi de 5 nm. A quantidade de *cis*-PnA oxidado foi determinada aos 15 minutos de reacção, e os resultados foram igualmente expressos como percentagem do controlo, isto é, o ensaio realizado na ausência de antioxidante.

2.3.2 Formação de dienos conjugados

A formação de dienos conjugados consequência da peroxidação lipídica de LDL foi detectada e monitorizada a 234 nm, num espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 6, com cuvetes termostabilizadas a 37 °C.

Quando o azocomposto hidrossolúvel foi usado como iniciador da oxidação, uma solução de AAPH 5 mM em PBS foi preparada e alíquotas de

2 ml foram transferidas para cada uma das cuvetes do espectrofotómetro. Após correcção da absorvância para zero, 90 µg de LDL foram adicionadas à cuvette amostra e o espectro foi registado ao longo de 240 minutos, no escuro e sob agitação suave. Os ensaios foram realizados na ausência (controlo) ou presença das antocianinas 2 µM ou dos antioxidantes de referência, ascorbato, Trolox e ácido cafeico, os quais foram adicionados imediatamente após as LDL. Os períodos de inibição iniciais foram medidos graficamente desde o tempo zero até à projecção no eixo XX' do ponto de intersecção das tangentes à curva correspondentes à fase de iniciação e propagação da oxidação lipídica das LDL, tal como evidenciado no gráfico da Figura 12. Os resultados foram expressos em valores absolutos (minutos).

Nos ensaios em que a oxidação foi mediada por estados hipervalentes de mioglobina, 2 ml de uma solução de metamioglobina 6 µM em PBS foi transferida para cada uma das cuvetes, tendo a absorvância sido corrigida para zero. À cuvette amostra foi posteriormente adicionado 180 µg de LDL, e a oxidação lipídica foi iniciada 4 minutos após pela adição de H₂O₂ 9 µM (controlo). Nos ensaios com as antocianinas ou os antioxidantes de referência (2 µM), estes foram adicionados 2 minutos antes do H₂O₂ e o aumento da absorvância no UV foi registado em condições idênticas às descritas para o AAPH.

2.4 Avaliação da oxidação proteica de LDL induzida pelo peroxinitrito

2.4.1 Alteração da mobilidade electroforética

As alterações na densidade de carga da apoB das LDL induzidas pelo peroxinitrito foram avaliadas por electroforese em gel de agarose a 0,5 % (Beckman Paragon Lipo Gel).

As LDL (360 µg/ml) foram incubadas com peroxinitrito 500 µM (concentração final) em PBS, durante 1 hora, a 37 °C, no escuro e sob agitação suave, na ausência e na presença das antocianinas 20 µM adicionadas 3 minutos antes do oxidante. Neste ensaio, bem como no seguinte, o peroxinitrito foi adicionado em 5 fracções sucessivas de modo a atingir uma concentração no estado estacionário de 100 µM durante os primeiros 5 minutos, e portanto, uma concentração final de 500 µM. Controlos com peroxinitrito decomposto e sem peroxinitrito foram efectuados em paralelo.

Após a aplicação das amostras de LDL (4 µl) no meio de suporte (gel de agarose a 0,5 %), a electroforese decorreu a pH 8,6 e a uma voltagem constante de 100 V, durante 150 minutos. O pH 8,6 foi assegurado por uma mistura de ácido dietilbarbitúrico 10 mM e dietilbarbiturato de sódio 50 mM. O gel foi posteriormente colocado numa solução fixadora (ácido acético a 10 % em etanol a 70 %) durante 5 minutos, seco a 50 °C, corado com Sudan Black a 0,07 % em etanol:água (55:45, v/v) durante 5 minutos, e finalmente descorado em água:etanol (55:45, v/v).

Os resultados foram expressos em termos de mobilidade electroforética relativa (M.E.R.), isto é, como a razão entre as distâncias de migração das LDL oxidadas e das LDL nativas.

2.4.2 Formação de grupos carbonilos

O conteúdo em grupos carbonilo da apoB-100 foi determinado espectrofotometricamente após reacção com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em meio ácido, como descrito por Levine e colaboradores (1990) embora com algumas modificações (Yan et al., 1995).

Primeiramente, as LDL (500 µg/ml), em PBS, foram incubadas com peroxinitrito 500 µM (concentração final), durante 1 hora, a 37 °C, no escuro e sob agitação suave, na ausência ou na presença de antocianinas 20 µM,

as quais foram adicionadas 3 minutos antes do oxidante. Controlos com peroxinitrito decomposto ou sem peroxinitrito foram realizados em paralelo.

No final da reacção de oxidação, o conteúdo em grupos carbonilo das LDL foi avaliado. Para isso, cada amostra de LDL foi dividida em duas alíquotas de 0,5 ml e cada uma foi incubada com 0,1 ml de HCl 2 M (branco) ou 0,1 ml de DNPH 10 mM em HCl 2 M, durante 1 hora, no escuro, à temperatura ambiente. Seguidamente adicionou-se 0,3 ml de tampão desnaturante (Na₂HPO₄ 150 mM, SDS 3 %, pH 6,8), 0,5 ml de etanol e 0,5 ml de heptano, sendo as misturas sujeitas a agitação em vórtex e posteriormente a centrifugação a 12 000 rpm durante 3 minutos para isolar os derivados proteicos da hidrazona precipitados. O precipitado foi finalmente lavado 3 vezes com 1 ml de etanol:acetato de etilo (1:1, v/v), recuperado por centrifugação a 12 000 rpm durante 1 minuto e dissolvido em 1 ml de tampão desnaturante.

O conteúdo em grupos carbonilo foi calculado a partir da absorvância das amostras a 360 nm contra o respectivo branco sem DNPH e com base no coeficiente de absorvidade molar de 22 000 M⁻¹cm⁻¹, característico para a maioria das hidrazonas alifáticas. Os resultados foram expressos em nmol de carbonilos/mg de proteína.

2.5 Interacção das antocianinas com o radical α -tocoferoxilo

O radical α -tocoferoxilo (α -TO[•]) foi gerado por irradiação ultravioleta (UV) de α -tocoferol (α -TOH) 1 mM incorporado em micelas de dodecilsulfato de sódio (SDS) 5 %. Para tal adicionou-se 125 μ l de uma solução metanólica stock de α -TOH 80 mM a 2,5 ml de metanol num balão piriforme. Esta mistura foi seca sob atmosfera de azoto durante cerca de 20 minutos num evaporador rotatório de modo a remover o metanol e a obter um fino filme

nas paredes do balão. Posteriormente foi adicionado 10 ml de uma solução de SDS 5 % (p/v) preparada em PBS e esta mistura foi sujeita a agitação em vórtex durante 1 minuto, sob atmosfera de azoto, obtendo-se uma solução micelar homogénea. Desta solução foi retirado 1 ml, o qual foi colocado num disco de Petri sendo esta solução sujeita a irradiação por uma lâmpada UV (259 nm) colocada a 4,5 cm acima do disco, durante 3 minutos. As antocianinas, o ascorbato ou o ácido cafeico foram adicionados imediatamente após irradiação, num intervalo de concentrações compreendido entre 5 e 100 μM .

As misturas reaccionais (200 μl) foram imediatamente transferidas para pipetas Pasteur seladas na extremidade e inseridas na cavidade de um espectrómetro Bruker EMX 1144 (banda X). Os espectros de Ressonância Paramagnética de Electrões (RPE) foram obtidos 2 minutos após irradiação, à temperatura ambiente e nas seguintes condições instrumentais: frequência, 9.8 GHz; potência, 20 mW; amplitude de modulação, 3.0 G; frequência de modulação, 100.0 kHz; tempo de conversão, 81,92 ms; constante de tempo, 40,96 ms; ganho, 5×10^5 . Durante o período de experiências foram regularmente obtidos espectros apenas do $\alpha\text{-TO}^\bullet$, os quais funcionaram como controlo de modo a garantir uma reprodutibilidade do sinal de RPE característico deste radical. A concentração do radical α -tocoferoxilo foi avaliada por interpolação numa curva de calibração previamente obtida com o radical nitróxido de 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (TEMPO), usado como padrão. A curva foi construída a partir das áreas dos sinais de RPE do radical TEMPO, obtidas por dupla integração, versus a concentração respectiva.

Nos estudos cinéticos, o radical α -tocoferoxilo foi gerado como previamente descrito, na ausência ou na presença de antocianinas 10 μM , e, 1 minuto após irradiação, o decaimento do radical α -tocoferoxilo foi monitorizado ao longo do tempo, com um campo magnético fixo de 3480 G, e em idênticas condições instrumentais, excepto, constante de tempo, 81,92 ms e ganho, 1×10^6 .

2.6 Análise estatística

Os valores numéricos apresentados são o resultado de, pelo menos, 3 experiências independentes e estão expressos como o valor médio \pm erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi efectuada com um programa adequado (GraphPad Prism), através da análise de variância (ANOVA) com um factor e usando o teste de Tukey como teste de comparação múltipla de médias. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Efeitos protectores das antocianinas na oxidação de LDL mediada pelo azocomposto AAPH

3.1.1 Ensaio de fluorescência do ácido *cis*-parinárico

O ácido *cis*-parinárico (*cis*-PnA) é um ácido gordo polinsaturado com propriedades fluorescentes e por isso, tem sido utilizado *in vitro* como uma sonda muito sensível para monitorizar os estados iniciais da oxidação de LDL, bem como a sua inibição ou prevenção por vários antioxidantes (Laranjinha et al., 1992). De facto, a existência de quatro duplas ligações conjugadas na sua estrutura química tornam esta sonda não só fluorescente mas também um substracto preferencial para reacções de oxidação, e a sua degradação é, portanto, um bom indicativo da oxidação dos ácidos gordos polinsaturados intrínsecos. O azocomposto AAPH, enquanto gerador de radicais peroxilo em fase aquosa, a uma velocidade constante, por decomposição térmica, a 37 °C, constitui um adequado sistema iniciador da oxidação das LDL, o qual associado à utilização do ácido *cis*-PnA, tornam este ensaio particularmente simples, sensível e reprodutível no estudo de oxidantes e antioxidantes (Laranjinha et al., 1994).

O ácido *cis*-PnA incorporado espontaneamente nas partículas de LDL é rapidamente oxidado pelos radicais peroxilo derivados do AAPH, ocorrendo uma diminuição de fluorescência, tal como evidenciado no gráfico inserido na Figura 11 (controlo). A presença das antocianinas no meio reaccional provoca uma diminuição da velocidade de extinção de fluorescência do ácido *cis*-PnA, consequência de uma diminuição da quantidade de ácido *cis*-PnA oxidado, como exemplificado na mesma figura com a pelargonidina e a malvidina-3-glucósido.

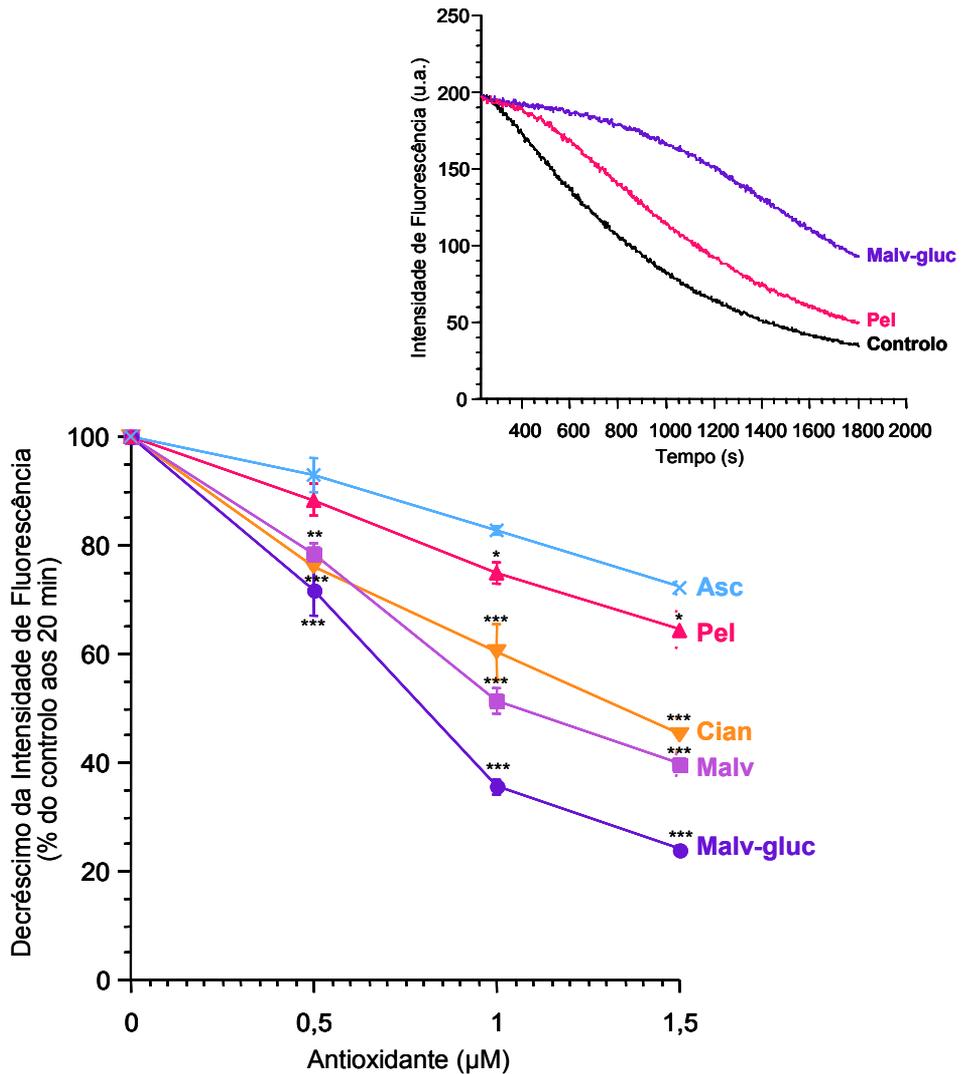


Figura 11. Efeitos protectores das antocianinas na oxidação do ácido *cis*-PnA, incorporado em LDL, induzida pelo AAPH. As LDL (15 μg/ml) foram incubadas com ácido *cis*-PnA 1 μM em PBS, a 37 °C. A reacção de oxidação foi iniciada por adição de AAPH 5 mM na ausência (controlo) ou na presença das antocianinas ou de ascorbato (Asc), usado como antioxidante de referência, os quais foram adicionados imediatamente antes do oxidante. O decréscimo na intensidade de fluorescência, correspondente à oxidação do ácido *cis*-PnA, foi avaliado ao fim de 20 min de reacção e os valores obtidos na presença dos compostos em estudo e do antioxidantes de referência foram expressos em termos de percentagem do controlo. O gráfico inserido apresenta os perfis típicos obtidos na ausência (controlo) e na presença de malvidina-3-glucósido (Malv-gluc) e pelargonidina (Pel) 1 μM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus ascorbato.

A malvidina-3-glucósido foi dos compostos em estudo o mais eficiente na protecção do ácido *cis*-PnA, incorporado nas LDL, contra a oxidação induzida pelos radicais peróxido, enquanto a pelargonidina foi a menos activa. A cianidina e a malvidina exibiram uma actividade antioxidante intermédia (Figura 11). A diminuição da velocidade de extinção de fluorescência do ácido *cis*-PnA na presença das antocianinas em estudo depende da concentração de antocianina usada sendo em qualquer dos casos significativamente superior à observada com o antioxidante de referência ascorbato (no mínimo, $p < 0,05$ para todas as concentrações testadas, excepto para a pelargonidina $0,5 \mu\text{M}$) (Figura 11).

3.1.2 Formação de dienos conjugados

Durante a oxidação das LDL, os ácidos gordos polinsaturados são convertidos em hidroperóxidos dienos conjugados, cuja absorvância característica no UV a 234 nm tem sido largamente utilizada para seguir, de forma contínua, a formação destes produtos primários da peroxidação lipídica (Puhl et al., 1994).

Na ausência das antocianinas, a cinética de formação dos dienos conjugados durante a oxidação das LDL mediada pelo AAPH apresenta uma primeira fase característica, correspondente a um período de inibição inicial (PI), durante o qual a oxidação lipídica não é mensurável ou é muito reduzida, provavelmente devido à resistência oferecida pelos antioxidantes intrínsecos das LDL; uma segunda fase de propagação da reacção de peroxidação (PP) seguida de outra de decomposição (PD) (Figura 12). Na presença de qualquer uma das antocianinas em estudo, como ilustrado com a cianidina e a pelargonidina no gráfico inserido da Figura 13, a fase de inibição inicial sofreu um aumento significativo quando comparado com o controlo. A Figura 13 apresenta os períodos de inibição da oxidação das LDL na ausência (controlo) e na presença de $2 \mu\text{M}$ dos compostos em estudo assim como dos antioxidantes de referência, Trolox (um análogo

hidrossolúvel da vitamina E), ascorbato e ácido cafeico, um ácido fenólico amplamente conhecido pelas suas propriedades antioxidantes (Laranjinha et al., 1994).

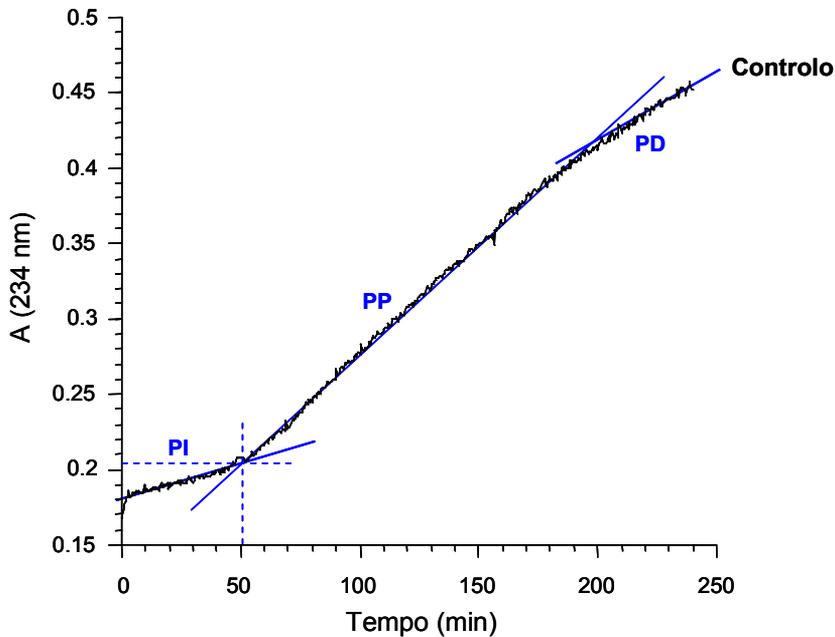


Figura 12. Ensaio típico de monitorização da formação de dienos conjugados durante a oxidação de LDL iniciada pelo AAPH. As LDL (45 $\mu\text{g/ml}$) foram incubadas com AAPH 5 mM, em PBS, a 37 °C (controlo). O tempo de inibição inicial foi determinado como descrito em Materiais e Métodos. PI, PP e PD correspondem aos períodos de inibição, propagação e decomposição, respectivamente.

A cianidina e a malvidina-3-glucósido foram as mais eficientes na inibição da iniciação da peroxidação lipídica, enquanto a pelargonidina foi a menos eficiente. A malvidina proporcionou uma protecção intermédia das LDL contra a oxidação mediada pelos radicais peróxido. Todas as antocianinas em estudo provocaram um aumento significativo do período de inibição, mesmo quando comparado com o induzido na presença de Trolox ou de ascorbato (***) $p < 0,001$ antocianinas em estudo versus Trolox ou ascorbato).

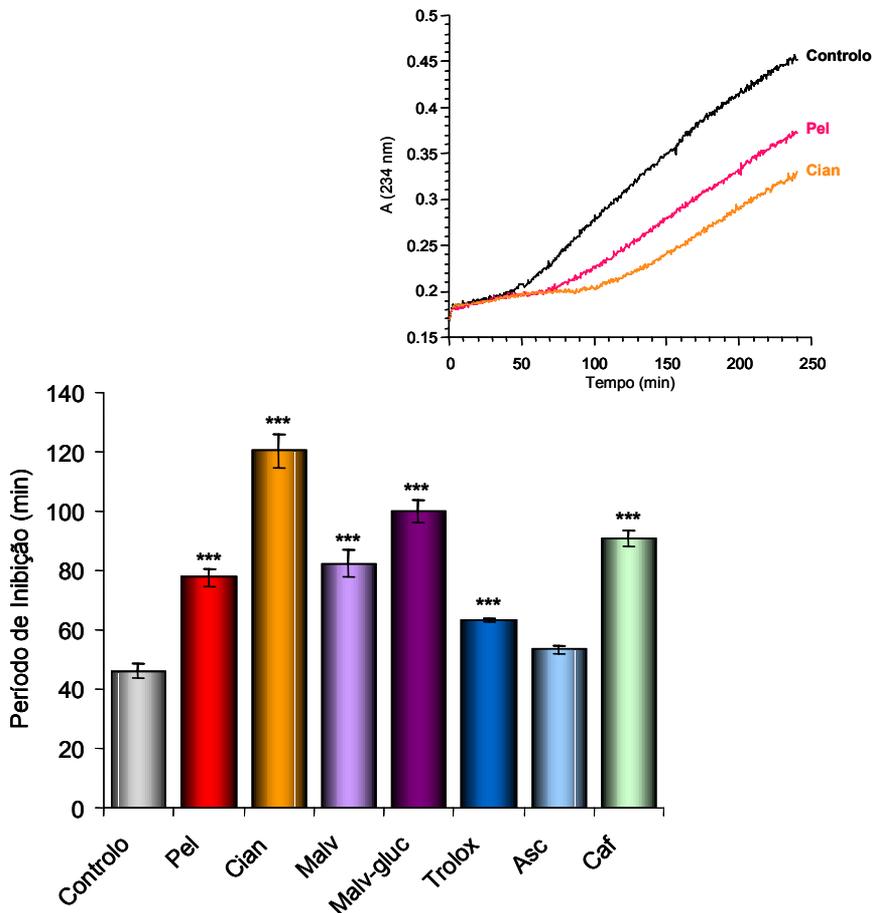


Figura 13. Efeitos das antocianinas na formação de dienos conjugados durante a oxidação de LDL induzida pelo AAPH. As LDL (45 $\mu\text{g/ml}$) foram incubadas com AAPH 5 mM, em PBS, a 37 °C, na ausência (controle) ou na presença das antocianinas 2 μM ou dos antioxidantes de referência Trolox, ascorbato (Asc) ou ácido cafeico (Caf). O gráfico inserido mostra os perfis de absorvância a 234 nm típicos obtidos na presença da pelargonidina (Pel) e da cianidina (Cian) 2 μM , em paralelo com o perfil do ensaio controle. O período de inibição inicial foi expresso em minutos. *** $p < 0.001$ versus controle.

Além disso, a cianidina e a malvidina-3-glucósido foram significativamente mais eficientes na inibição da oxidação do que o ácido cafeico (***) $p < 0,001$ cianidina versus ácido cafeico e * $p < 0,05$ malvidina-3-glucósido versus ácido cafeico).

3.2 Efeitos protectores das antocianinas na oxidação de LDL mediada pela ferrilmioglobina

3.2.1 Ensaio de fluorescência do ácido *cis*-parinárico

A ferrilmioglobina é obtida por reacção da metamioglobina com o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), sendo portanto, um produto de oxidação com o ferro hémico na forma de um complexo oxoferril estável ($Fe^{IV}=O$) e um radical transitório na componente globina da hemoproteína. Este produto de oxidação ocorre *in vivo* e é responsável pela iniciação da peroxidação lipídica das LDL (Grinshtein et al., 2003).

A grande sensibilidade do ácido *cis*-PnA à presença de oxidantes fisiológicos como a ferrilmioglobina foi também aproveitada para avaliar a actividade antioxidante das antocianinas.

O ácido *cis*-PnA incorporado nas LDL, na ausência destes compostos polifenólicos, sofre uma rápida oxidação após a adição de H_2O_2 ao meio reaccional contendo metamioglobina (Figura 14).

As antocianinas, tal como exemplificado, na Figura 14, para a malvidina-3-glucósido, diminuem acentuadamente a velocidade de oxidação do ácido *cis*-PnA e de uma forma dependente da concentração. De todas as antocianinas em estudo a mais eficiente é a malvidina-3-glucósido, seguida pela cianidina, malvidina e por fim a pelargonidina (Figura 15).

Da análise comparativa dos resultados obtidos, ressalta o facto de todas serem mais eficientes que o ascorbato na protecção da oxidação da sonda pela ferrilmioglobina em todas as concentrações usadas (Figura 15).

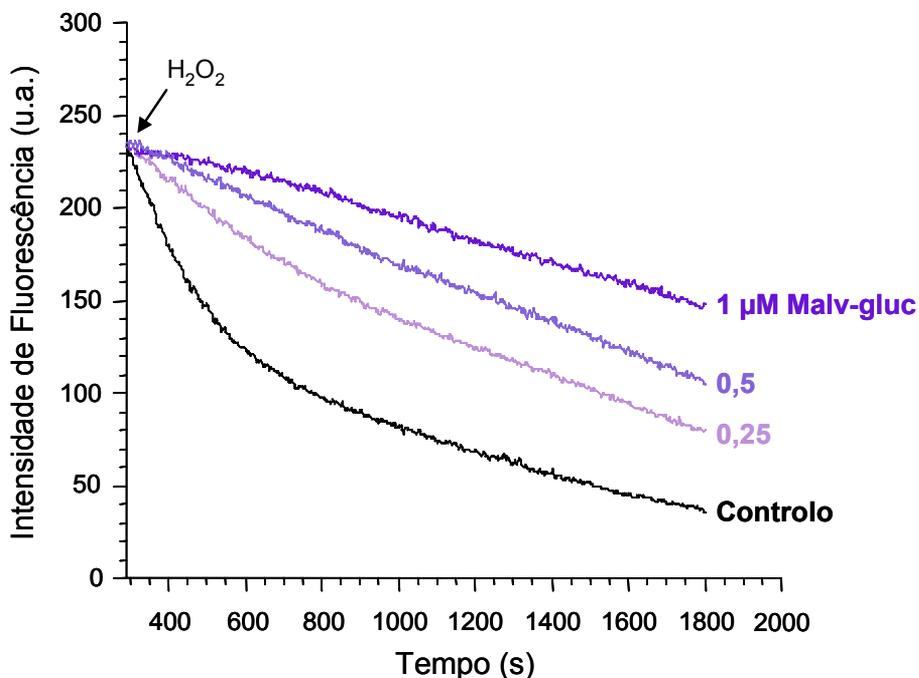


Figura 14. Ensaio típico de avaliação dos efeitos protectores das antocianinas na oxidação do ácido *cis*-PnA, incorporado em LDL, induzida pela ferrimioglobina. As LDL (30 µg/ml) foram incubadas com o ácido *cis*-PnA 1 µM e metamioglobina 3 µM, em PBS, a 37 °C. A oxidação foi iniciada por adição de H₂O₂ 4,5 µM, na ausência (controlo) ou na presença das antocianinas adicionadas 1 min antes do H₂O₂. O gráfico apresenta os perfis típicos obtidos na presença de diferentes concentrações de malvidina-3-glucósido.

Curiosamente, a cianidina e a malvidina apresentam, nas nossas condições de ensaio, uma capacidade antioxidante idêntica à do ácido cafeico sendo a malvidina-3-glucósido significativamente mais activa do que este ácido fenólico de referência ($p < 0,001$ malvidina-3-glucósido versus ácido cafeico em todas as concentrações usadas).

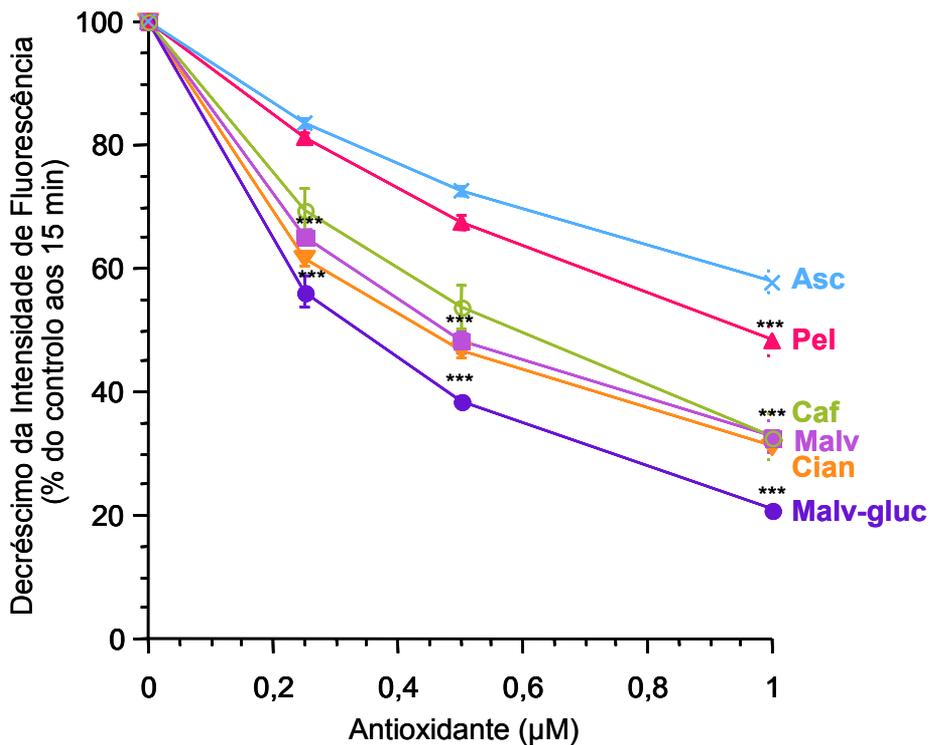


Figura 15. Efeitos protectores das antocianinas na oxidação do ácido *cis*-PnA, incorporado em LDL, induzida pela ferrilmioglobina. Os ensaios foram realizados conforme descrito na legenda da Figura 14. O decréscimo na intensidade de fluorescência, correspondente à oxidação do ácido *cis*-PnA, foi avaliado ao fim de 15 min de reacção e os valores obtidos na presença dos compostos em estudo ou dos antioxidantes de referência, ascorbato (Asc) e ácido cafeico (Caf), foram expressos em termos de percentagem do controlo. *** $p < 0,001$ antocianinas versus ascorbato.

3.2.2 Formação de dienos conjugados

A cinética de formação dos dienos conjugados em LDL sujeitas a oxidação pela ferrilmioglobina (controlo) revela um rápido incremento da absorvância a 234 nm, não se verificando um período de inibição inicial como o anteriormente descrito quando a oxidação foi iniciada pelo azocomposto AAPH (Figura 16). Na presença das diferentes antocianinas, a velocidade de formação dos dienos conjugados é, não só inferior à do controlo, mas também à do antioxidante de referência Trolox (gráfico inserido na Figura 16).

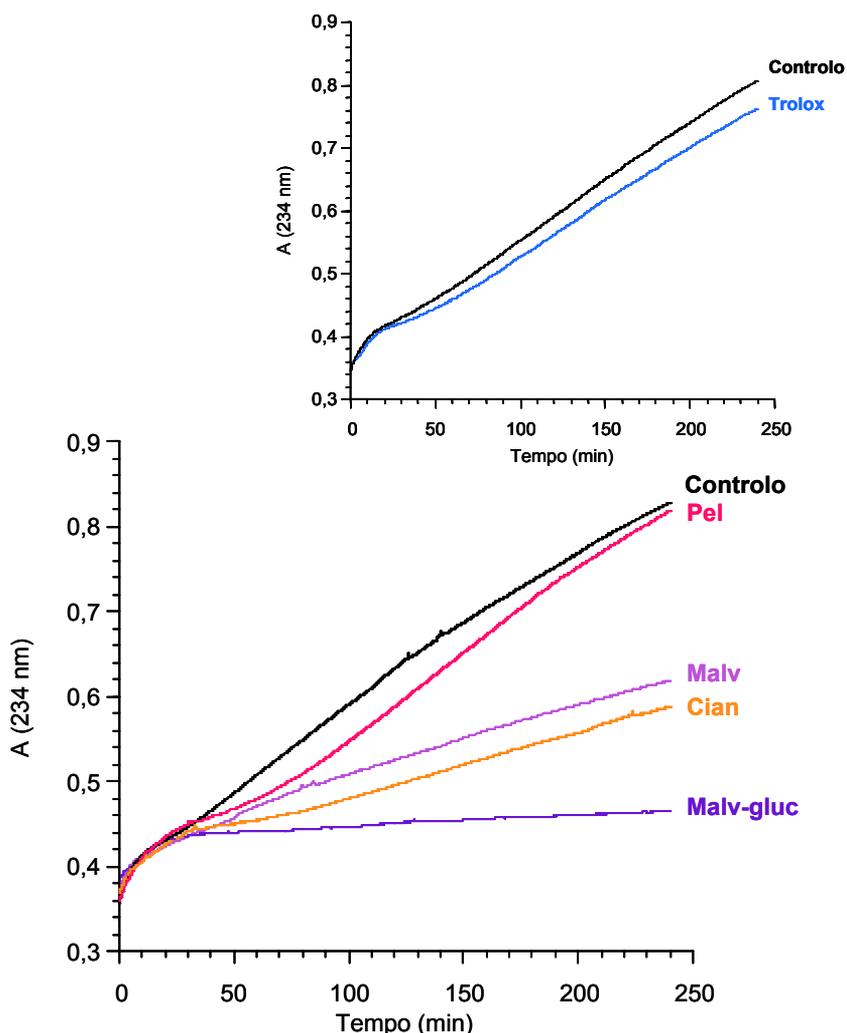


Figura 16. Efeitos das antocianinas na formação de dienos conjugados durante a oxidação de LDL induzida pela ferrilmioglobina. As LDL (90 $\mu\text{g/ml}$) foram incubadas com metamioglobina 6 μM , em PBS, a 37 $^{\circ}\text{C}$, na ausência (controlo) ou na presença das antocianinas 2 μM ou do antioxidante de referência Trolox 2 μM (gráfico inserido), os quais foram adicionados 2 min antes de H_2O_2 9 μM . Ensaio representativo de, pelo menos, 3 experiências independentes.

Aliás, embora a pelargonidina e a cianidina induzam aparentemente uma fase inicial de resistência à oxidação pela ferrilmioglobina dificilmente quantificável, a malvidina-3-glucósido 2 μM inibe quase completamente a formação de dienos conjugados durante o tempo de experiência. Comparativamente às restantes antocianinas em estudo, a pelargonidina foi mais uma vez o composto que apresentou menor actividade antioxidante,

tendo a malvidina e a cianidina exibido uma actividade intermédia (Figura 16). De salientar que o efeito protector da malvidina-3-glucósido na oxidação das LDL mediada pela ferrilmioglobina é função da sua concentração, conforme evidenciado na Figura 17, sendo também superior ao observado com o antioxidante de referência ácido cafeico (gráfico inserido).

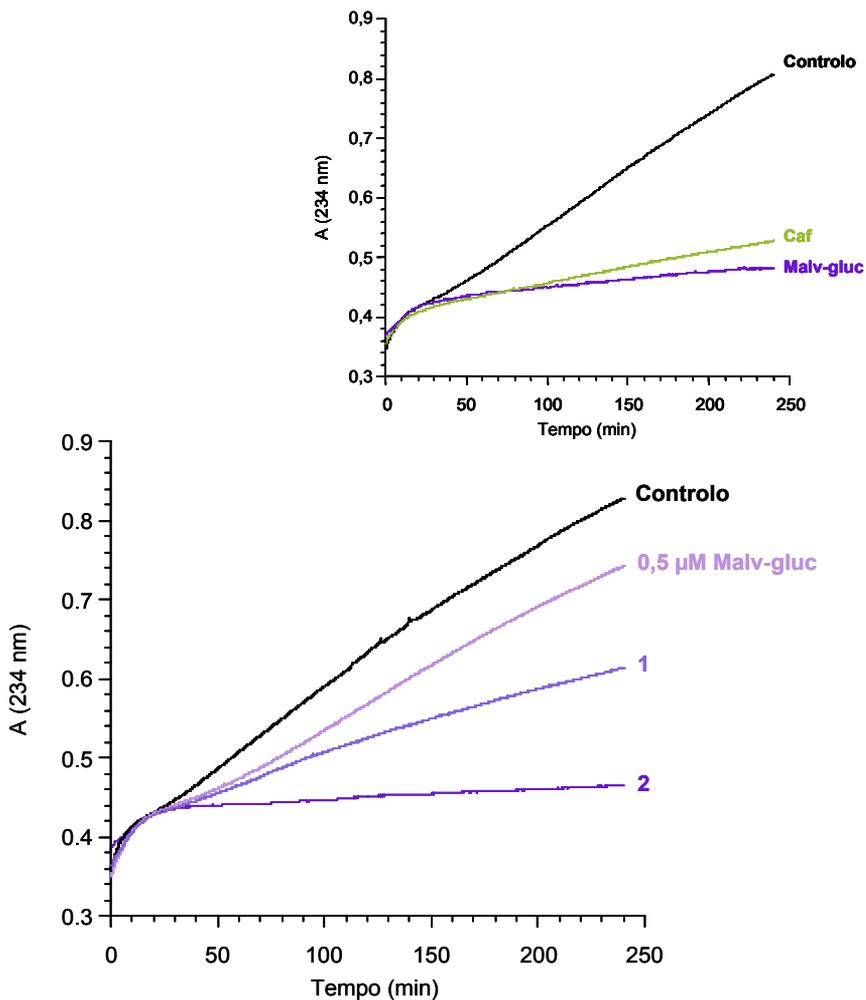


Figura 17. Efeito de diferentes concentrações de malvidina-3-glucósido na formação de dienos conjugados durante a oxidação de LDL promovida pela ferrilmioglobina. As LDL (90 $\mu\text{g/ml}$) foram incubadas como descrito na legenda da Figura 16, na ausência (controlo) ou na presença de malvidina-3-glucósido 0,5, 1 e 2 μM . O gráfico inserido apresenta os perfis obtidos com malvidina-3-glucósido 2 μM e ácido cafeico 2 μM . Ensaio representativo de, pelo menos, 3 experiências independentes.

Nas condições de ensaio referidas, o ascorbato, também utilizado como antioxidante de referência, não apresentou qualquer tipo de actividade sobre a cinética de formação dos dienos conjugados.

3.3 Efeitos protectores das antocianinas na oxidação de LDL mediada pelo peroxinitrito

3.3.1 Alteração da mobilidade electroforética

Durante a oxidação das LDL, a apolipoproteína B-100 (apoB-100) é susceptível de sofrer modificações essencialmente por 3 mecanismos. Por um lado, é muito provável a ocorrência da derivatização de resíduos de lisina com produtos da peroxidação lipídica (incluindo o aldeído malónico e o 4-hidroxinonenal), os quais neutralizam a carga positiva dos grupos ϵ -NH₂ (Steinbrecher et al., 1989; Requena et al., 1997). Por outro lado, é também possível o ataque directo por espécies reactivas geradas durante o processo de oxidação das LDL aos resíduos de aminoácidos carregados positivamente e sua conversão em resíduos de carga negativa e/ou fragmentação da própria apoB-100 (Noguchi e Niki, 1994). Estas modificações resultam num aumento da carga negativa da proteína e por isso num aumento da mobilidade electroforética das LDL. Assim, explorámos esta característica das LDL para monitorizar a sua oxidação pelo peroxinitrito e o potencial efeito protector das antocianinas.

Como evidenciado na Figura 18, na ausência das antocianinas, a mobilidade electroforética em gel de agarose das LDL sujeitas à acção do peroxinitrito é significativamente superior à das LDL nativas ($p < 0.001$). Na presença de cianidina, malvidina ou malvidina-3-glucósido, a mobilidade electroforética das lipoproteínas diminuiu significativamente quando comparada com a observada na ausência dos referidos compostos

($p < 0.001$), indicando que tais polifenóis previnem em aproximadamente 60 % as alterações na densidade de carga total negativa das LDL induzidas pelo peroxinitrito.

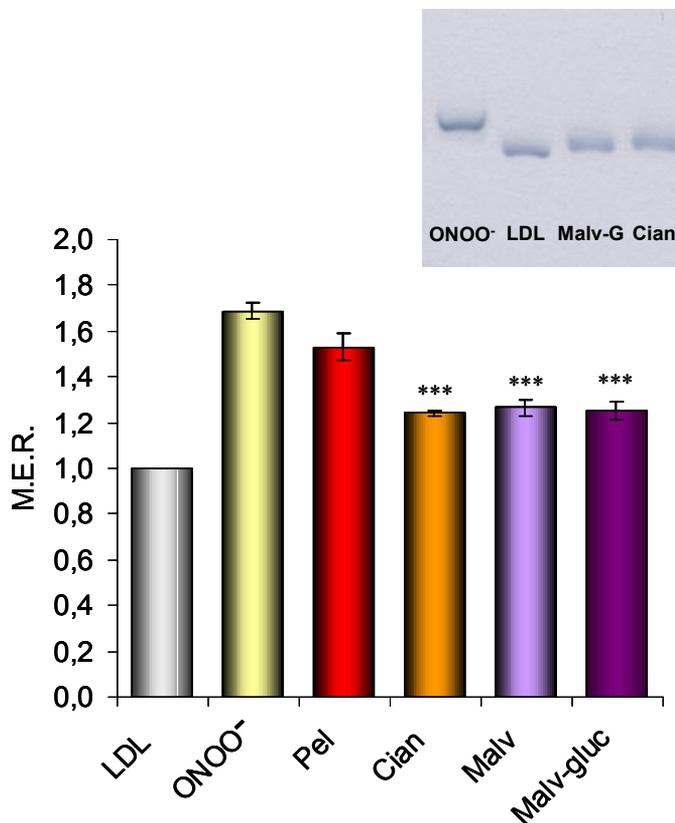


Figura 18. Efeito das antocianinas na mobilidade electroforética relativa (M.E.R.) das LDL após oxidação iniciada pelo peroxinitrito. As LDL (360 $\mu\text{g/ml}$) foram incubadas com peroxinitrito 500 μM , na ausência ou na presença de antocianinas 20 μM , em PBS, durante 1 hora, a 37 °C. As alterações na densidade de carga da apoB das amostras de LDL foram avaliadas por electroforese em gel de agarose a 0,5 % e expressas em termos de mobilidade electroforética relativa (M.E.R.), isto é, como a razão entre as distâncias percorridas pelas amostras de LDL tratadas e não tratadas (LDL nativas). *** $p < 0.001$ versus LDL tratadas com peroxinitrito. A fotografia inserida representa um gel típico depois de submetido a electroforese e contendo LDL nativas (LDL), LDL tratadas com peroxinitrito na ausência (ONOO⁻) e na presença de malvidina-3-glucósido (Malv-G) e cianidina (Cian).

De salientar que esta actividade foi idêntica para as três antocianinas anteriormente referidas. Nas mesmas condições experimentais, os efeitos

protectores exibidos pelo composto monohidroxilado no anel B, pelargonidina, não foram estatisticamente significativos.

3.3.2 Formação de grupos carbonilo

A formação de grupos carbonilo na apoB-100 tem sido usada como um marcador precoce do dano oxidativo proteico das LDL (Yan et al., 1995). De modo similar ao descrito na alteração da mobilidade electroforética, a formação de grupos carbonilo pode resultar, por um lado, da oxidação directa de alguns resíduos de aminoácidos da apoproteína, como os de lisina, cisteína e histidina e, por outro lado, da reacção dos aldeídos, formados durante a peroxidação lipídica, com os referidos resíduos. Contudo, estudos *in vitro* recentes sugerem que, na presença do peroxinitrito, é improvável a ocorrência da oxidação lipídica das LDL, pelo que a formação de grupos carbonilo nas LDL resultará, putativamente, da interacção directa do peroxinitrito, ou de outras espécies oxidantes resultantes da sua decomposição, com os aminoácidos da apoB (Dinis et al., 2002).

O conteúdo em grupos carbonilo da apoproteína das LDL é, assim, um importante biomarcador da oxidação proteica e por isso a sua quantificação espectrofotométrica, após reacção com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em meio ácido, constitui um ensaio simples e adequado para a avaliação da extensão da oxidação das lipoproteínas induzida pelo peroxinitrito bem como para a avaliação da sua protecção pelas antocianinas (Dinis et al., 2002).

A incubação das LDL com o peroxinitrito resulta num aumento significativo da formação de grupos carbonilo na apoproteína ($p < 0.001$ versus LDL nativas), como documentado na Figura 19. Quando as LDL foram incubadas com antocianinas $20 \mu\text{M}$ imediatamente antes do tratamento com peroxinitrito, o conteúdo em grupos carbonilo diminuiu significativamente, sugerindo que todos os compostos em estudo previnem eficazmente o dano oxidativo proteico das LDL mediado pelo peroxinitrito.

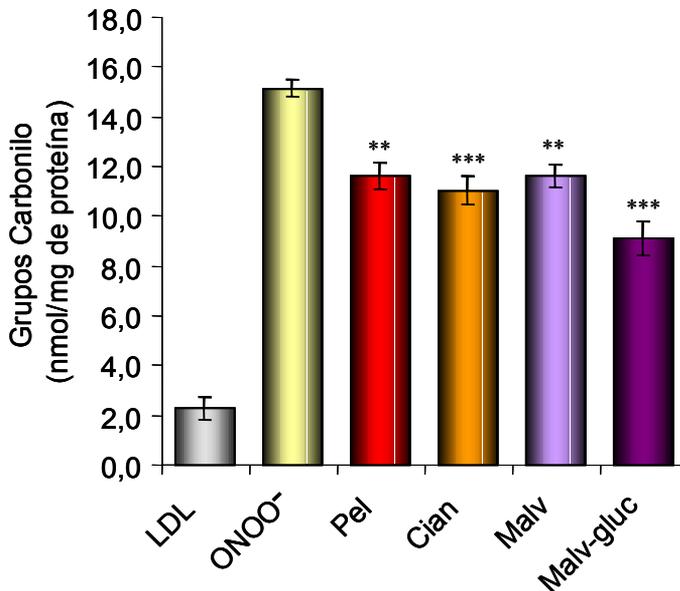


Figura 19. Efeito protector das antocianinas na formação de grupos carbonilo na apoB das LDL induzida pelo peroxinitrito. As LDL (500 $\mu\text{g/ml}$) foram incubadas com peroxinitrito 500 μM , na ausência ou na presença de antocianinas 20 μM , em PBS, durante 1 hora, a 37 $^{\circ}\text{C}$. O conteúdo em grupos carbonilo foi determinado espectrofotometricamente, após reacção com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em meio ácido, como descrito em Materiais e Métodos, e expresso em nmol de carbonilos/mg de proteína. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ versus LDL tratadas com peroxinitrito.

Aliás, a pelargonidina, a cianidina e a malvidina exibiram idêntica actividade protectora enquanto a malvidina-3-glucósido foi a mais eficiente, induzindo uma redução na formação dos grupos carbonilo de aproximadamente 45 %.

De realçar que as concentrações de antocianinas utilizadas nos ensaios de oxidação lipídica foram significativamente inferiores às utilizadas nos ensaios de oxidação proteica das LDL. Tal facto deve-se à maior sensibilidade dos métodos utilizados para avaliar a oxidação lipídica relativamente aos usados para avaliar a oxidação proteica.

3.4 Interacção das antocianinas com o radical α -tocoferoxilo

A capacidade das antocianinas para regenerarem o α -tocoferol (α -TOH), o principal antioxidante lipofílico presente nas LDL, foi avaliada e comparada recorrendo a um ensaio relativamente simples e rápido, o qual tem por base a formação do radical α -tocoferoxilo (α -TO \cdot) por irradiação de micelas de SDS contendo α -TOH e sua detecção por espectroscopia de Ressonância Paramagnética de Electrões (RPE) (Witting et al., 1996).

Como representado na Figura 20, após irradiação UV, durante 3 minutos, das micelas de SDS contendo α -TOH 1 mM, foi possível observar a formação de um espectro de sete linhas característico do α -TO \cdot .

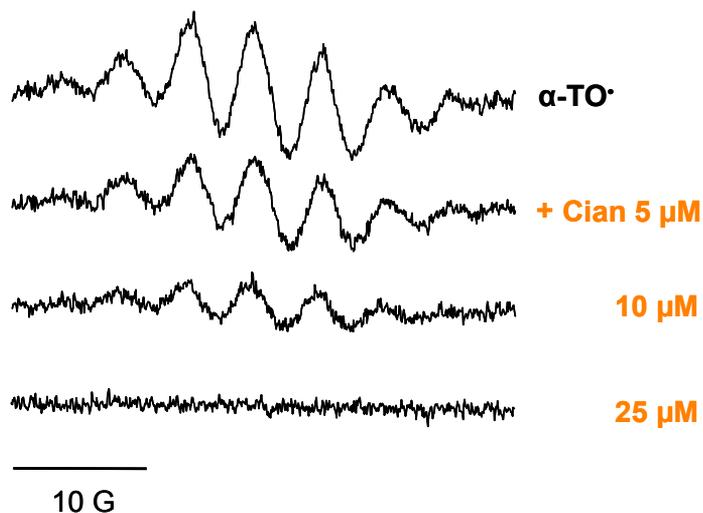


Figura 20. Efeito de uma antocianina típica, cianidina (Cian) no decaimento do radical α -tocoferoxilo (α -TO \cdot) avaliado directamente por espectroscopia de Ressonância Paramagnética de Electrões (RPE). O radical α -TO \cdot foi gerado por irradiação UV, durante 3 minutos, de micelas de SDS a 5 % contendo α -TOH 1 mM. Os espectros de RPE foram obtidos 2 minutos após irradiação na ausência ou na presença de várias concentrações da antocianina, nas condições referidas em Materiais e Métodos.

A adição de concentrações crescentes das antocianinas imediatamente após o termo da irradiação, resultou numa diminuição da intensidade do sinal do α -TO \cdot , indicativa de uma diminuição da sua concentração, como evidenciado para a cianidina (Figura 20). Nestas condições experimentais, a malvidina-3-glucósido foi a menos eficiente, embora todas as antocianinas em estudo tenham exibido capacidade de regeneração do α -TOH significativamente superior à do antioxidante de referência, ácido cafeico, em todas as concentrações testadas (Figura 21).

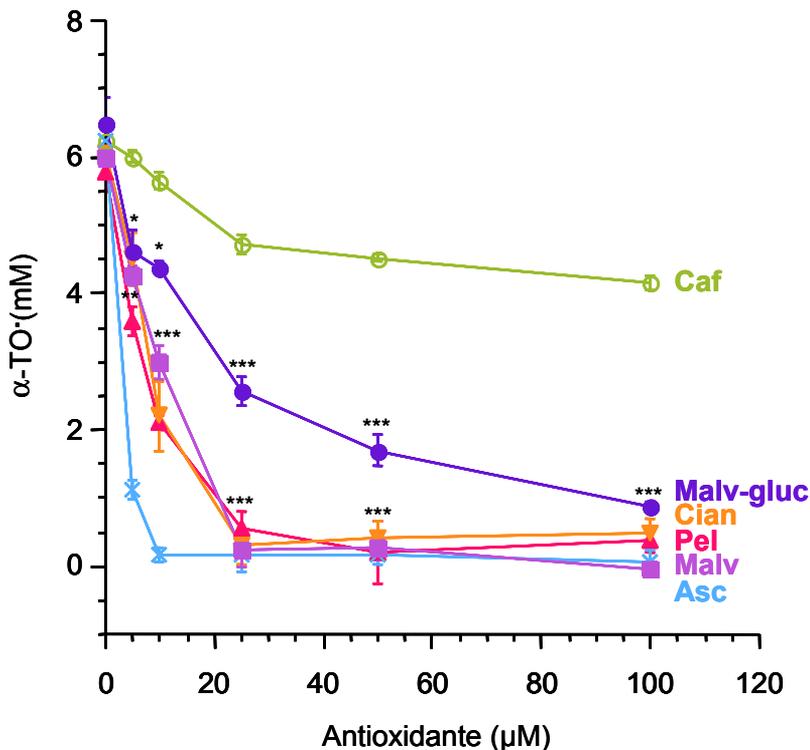


Figura 21. Efeitos de diferentes concentrações das antocianinas na concentração do radical α -tocoferoxilo, gerado nas condições experimentais indicadas na figura anterior. A concentração do radical α -TO \cdot foi determinada como previamente descrito em Materiais e Métodos. O ácido cafeico (Caf) e o ascorbato (Asc) foram utilizados como antioxidantes de referência. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ antocianinas versus ácido cafeico (Caf) em idêntica concentração.

De modo semelhante ao observado com o ascorbato, concentrações iguais e superiores a 25 μ M de pelargonidina, cianidina ou malvidina suprimiram quase totalmente o sinal de RPE do α -TO \cdot , o que sugere a

elevada eficiência das antocianinas na regeneração praticamente total do α -TOH (Figura 21). Em conformidade com estes resultados, os estudos cinéticos revelaram que as antocianinas aceleram o decaimento do α -TO \cdot de um modo dependente da concentração, como exemplificado para a malvidina-3-glucósido (gráfico inserido, Figura 22).

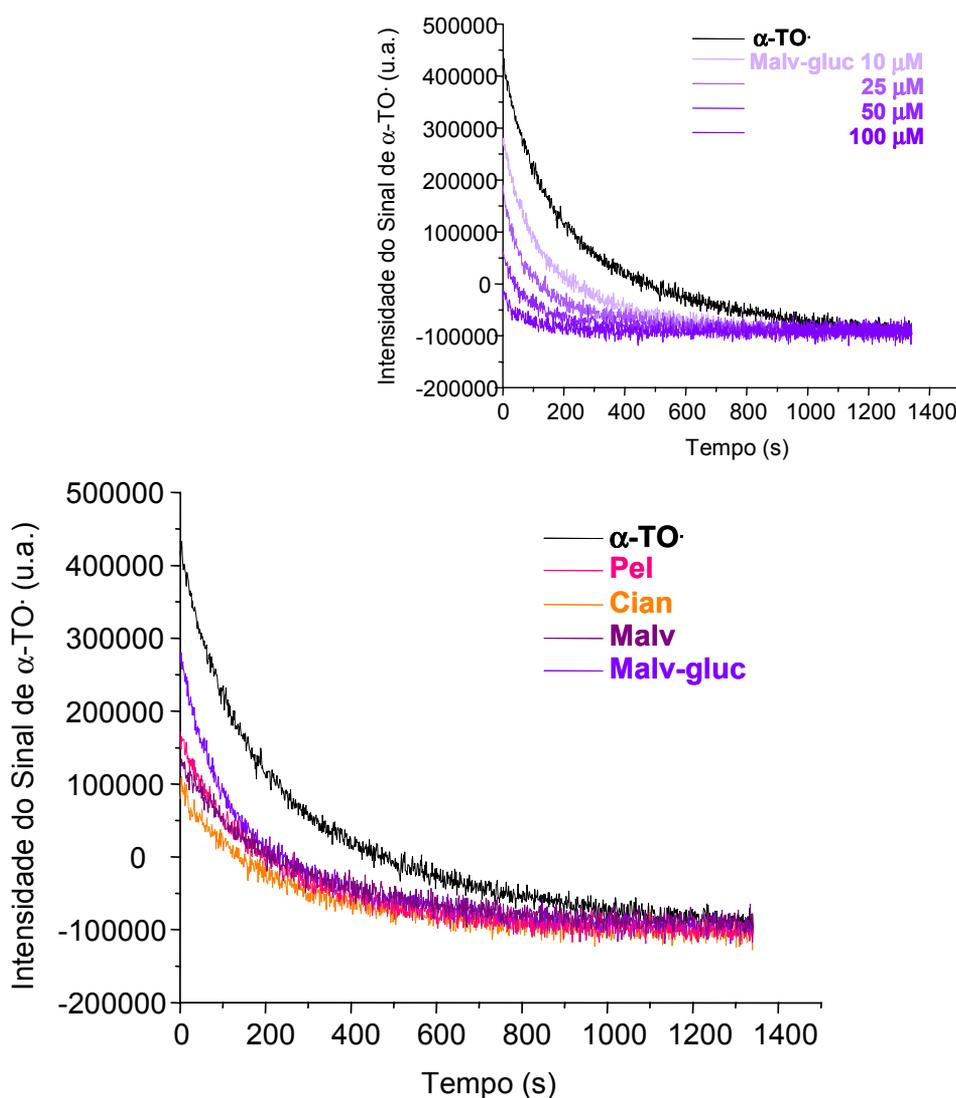


Figura 22. Efeito das antocianinas no decaimento do radical α -tocoferoxilo seguido ao longo do tempo. O α -TO \cdot foi gerado como previamente descrito e a cinética foi registada 1 minuto após irradiação na ausência ou na presença de antocianinas 10 μ M. Estes ensaios foram realizados nas condições descritas em Materiais e Métodos. Os perfis típicos inseridos foram obtidos na ausência ou na presença de diferentes concentrações de malvidina-3-glucósido.

A pelargonidina, a cianidina e a malvidina exibiram maior actividade, induzindo um decaimento mais rápido do radical quando comparado com o observado na presença de malvidina-3-glucósido em idêntica concentração (Figura 22).

4 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, tem sido dada particular atenção ao estudo da actividade antioxidante das antocianinas. De facto, vários estudos sugerem que estes compostos polifenólicos largamente distribuídos na dieta mediterrânica, e em especial no vinho tinto, parecem ser, pelo menos parcialmente, responsáveis pelos efeitos protectores do seu consumo moderado na incidência das doenças cardiovasculares (Renaud et al., 1992; Frankel et al., 1995; Teissedre et al., 1996; Kerry et al., 1997; Ghiselli et al., 1998).

Investigações recentes têm evidenciado os potenciais efeitos das antocianinas na prevenção das modificações proteica e lipídica das LDL induzidas pelo cobre ou pelos radicais peróxido gerados pelo azocomposto AAPH (Satué-Gracia et al., 1997; Kerry et al., 1997; Ghiselli et al., 1998; Heinonen et al., 1998; Kähkönen et al., 2003; Chang et al., 2006). Para estes efeitos protectores foram sugeridos mecanismos de complexação de iões metálicos e captação de radicais livres (Satué-Gracia et al., 1997; Ghiselli et al., 1998; Ichihyanagi et al., 2004).

Neste contexto, à data do início deste trabalho, era pertinente a avaliação e a comparação das actividades antioxidantes de quatro antocianinas estruturalmente relacionadas e largamente abundantes no vinho tinto, a pelargonidina, a cianidina, a malvidina e a malvidina-3-glucósido. Estruturalmente, os compostos em estudo diferem no padrão de hidroxilação ou metoxilação do anel B (pelargonidina, cianidina e malvidina) e para a malvidina-3-glucósido acresce a glicosilação em C3 (Figura 10). Neste estudo foram avaliados, entre outros aspectos, a capacidade destas antocianinas em diminuir a susceptibilidade das LDL humanas às modificações oxidativas induzidas quer pelo azocomposto AAPH, quer por dois oxidantes fisiologicamente relevantes, a ferrilmioglobina e o peroxinitrito.

4.1 Protecção da oxidação dos lípidos das LDL

Como avaliado pelo ensaio do ácido *cis*-parinárico e pela formação dos dienos conjugados, as antocianinas em estudo, em concentrações relativamente baixas, nomeadamente 0,5 μM , protegem eficientemente as LDL da oxidação lipídica mediada pelos radicais peróxido, gerados por degradação térmica do AAPH (Figuras 11 e 13), ou pela ferrilmioglobina (Figuras 14-17). Nestas condições experimentais e em todos os ensaios efectuados, as antocianinas exibiram uma forte actividade antioxidante, inclusivamente superior à do ascorbato, um antioxidante de referência muito bem conhecido. Nos ensaios de oxidação das LDL, em termos da formação de dienos conjugados, todas as antocianinas em estudo foram também mais eficientes na redução da velocidade de formação dos dienos do que o Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, também utilizado como antioxidante de referência (Figuras 13 e 16).

Os resultados obtidos da protecção das LDL contra a oxidação mediada pelo AAPH ou pela ferrilmioglobina foram dependentes não só da concentração mas também da estrutura química da antocianina em estudo.

De facto, apesar dos efeitos protectores conferidos pelas antocianinas serem afectados pelo oxidante usado como iniciador e pelos ensaios escolhidos para seguir a oxidação das LDL, a cianidina, uma antocianidina dihidroxilada nas posições 3' e 4' do anel B (estrutura catecólica), e a malvidina, dimetoxilada nas posições 3' e 5' (Figura 10), exibiram uma actividade antioxidante superior à da pelargonidina, o análogo monohidroxilado na posição 4' do mesmo anel. De facto, a título de exemplo, para uma concentração de 1,5 μM , a cianidina e a malvidina induziram um decréscimo da oxidação do *cis*-PnA, respectivamente, de cerca de 1,7 e 2 vezes superior ao da pelargonidina (Figura 11).

Por outro lado, a malvidina-3-glucósido foi mais eficiente na protecção das LDL contra a oxidação mediada pelo AAPH ou pela ferrilmioglobina do que a malvidina, o seu derivado não glicosilado (Figuras 11, 13, 15, 16). Assim, o grau e a posição de hidroxilação e metoxilação no anel B bem

como o padrão de glicosilação no anel C parecem afectar a reactividade das antocianinas modulando, deste modo, as propriedades antioxidantes destes polifenóis.

A estrutura catecólica no anel B da cianidina confere elevada estabilidade aos radicais fenoxilo por participação na deslocalização electrónica, sendo esta uma provável explicação para a maior actividade antioxidante desta antocianina relativamente à da pelargonidina, o que está de acordo com o trabalho realizado por Seeram e colaboradores (2002).

A maior actividade da malvidina, em comparação com a do composto monohidroxilado, pelargonidina, poderá resultar da presença dos substituintes metoxilo no anel B, os quais, enquanto agentes nucleofílicos, contribuirão certamente para o aumento da estabilidade da antocianina e a do radical resultante, hipótese também corroborada por Satué-Gracia (1997).

Por outro lado, a glicosilação na posição 3 do anel C da malvidina-3-glucósido estabiliza também a estrutura deste composto, maioritariamente presente no vinho tinto, o que poderá explicar a sua maior actividade antioxidante quando comparada com a da malvidina. Este factor contribuirá igualmente para justificar a maior capacidade da malvidina-3-glucósido em proteger as LDL da oxidação lipídica, induzida quer pelo azocomposto AAPH (Figura 13) quer pela ferrilmioglobina (Figuras 15 e 17), do que o ácido cafeico, um ácido fenólico também utilizado como antioxidante de referência em vários ensaios.

Em suma, estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Ichyanagi e colaboradores (2004), segundo o qual a reactividade das antocianinas com o AAPH, na ausência de LDL, está particularmente dependente da estrutura aglicona destes polifenóis bem como dos seus substituintes.

Em conformidade com estes resultados e segundo Ghiselli e colaboradores (1998), um mecanismo de captação dos radicais peroxilo gerados na fase aquosa parece estar envolvido na protecção das antocianinas face ao azocomposto. Concretamente, tem sido sugerido que os radicais gerados pela decomposição do AAPH reagem com as

antocianinas por remoção de um átomo de hidrogénio dos grupos hidroxilo presentes no anel B, tal como acontece com outros flavonóides (Ichiyanagi et al., 2004). Este mecanismo pode também contribuir para a inibição da oxidação iniciada pela ferrilmioglobina, embora esta inibição possa igualmente ser explicada pela redução deste oxidante a metamioglobina, o que estaria de acordo com o mecanismo proposto por Laranjinha e colaboradores (1995) para os ácidos fenólicos da dieta. No presente trabalho, a confirmação deste mecanismo por estudos espectrais não foi possível dada a elevada absorção das antocianinas numa gama alargada de comprimentos de onda. De facto, estes compostos têm uma absorção máxima entre 270-280 e 510-540 nm, sendo grande a sua interferência directa com os espectros quer da metamioglobina, com picos de absorção característicos a 505 e 631 nm, quer da ferrilmioglobina, com picos a 548 e 582 nm.

Vários estudos têm sugerido que as propriedades antioxidantes das antocianinas podem também estar relacionadas com a sua ligação a proteínas por ligações de hidrogénio, interações hidrofóbicas e até ligações covalentes (Teissedre et al., 1996; Satué-Gracia et al., 1997). De facto, uma vez que a apoB constitui aproximadamente 21 % da massa da partícula de LDL, é possível que diferenças na ligação das antocianinas a esta proteína possam afectar e explicar, pelo menos parcialmente, as diferenças na eficiência antioxidante destes polifenóis. Aliás, a forte interacção entre o resíduo de glucose e as proteínas poderá constituir mais uma possível explicação para a maior protecção conferida pela malvidina-3-glucósido contra a oxidação das LDL induzida quer pelo AAPH (Figuras 11 e 13) quer pela ferrilmioglobina (Figuras 15 e 16) relativamente à observada com a malvidina, o que está de acordo com o trabalho realizado por Lapidot e colaboradores (1999). Neste contexto, são necessários mais estudos sobre a interacção das antocianinas com a apoB das LDL para clarificar o verdadeiro impacto deste factor no mecanismo de inibição da oxidação das LDL.

4.2 Protecção da oxidação proteica das LDL

As antocianinas em estudo apresentaram também elevada capacidade para proteger a apoproteína das LDL das modificações oxidativas induzidas pelo peroxinitrito, um poderoso oxidante formado *in vivo* por reacção entre o anião superóxido e o óxido nítrico, como avaliado pelas alterações na mobilidade electroforética das LDL e pela formação de grupos carbonilo (Figuras 18 e 19).

Embora, estes efeitos protectores conferidos pelas antocianinas estejam dependentes da estrutura química do polifenol sendo possível estabelecer algumas relações estrutura-actividade, estas não são tão evidentes como as estabelecidas com os iniciadores AAPH e ferrilmioglobina.

A cianidina, com estrutura catecólica, e a malvidina, o composto dimetoxilado, foram significativamente mais eficientes na redução das alterações na densidade de carga das LDL induzidas pelo peroxinitrito do que a pelargonidina monohidroxilada, o que está de acordo com os resultados atrás descritos para os outros oxidantes (Figura 18). No seu conjunto, estes resultados sugerem que o grau de hidroxilação e metoxilação no anel B contribuem para a modulação da actividade antioxidante exibida por estes compostos. No entanto, nas condições experimentais usadas, face à agressão promovida pelo peroxinitrito, a malvidina e a malvidina-3-glucósido exibiram idêntica actividade antioxidante, sugerindo que a presença de glucose no anel C não contribui para um aumento da protecção conferida à apoproteína das LDL.

Relativamente à protecção na formação de grupos carbonilos na presença de peroxinitrito, a pelargonidina, a cianidina e a malvidina induziram um decréscimo semelhante, sugerindo que a estrutura química básica das antocianinas é aqui também a potencial responsável por este efeito e que adicional hidroxilação ou metoxilação não é essencial na protecção contra estas modificações oxidativas proteicas (Figura 19). Por sua vez, a malvidina-3-glucósido foi mais eficiente na redução da formação

de grupos carbonilo na apoB-100 do que a malvidina, podendo este acréscimo de actividade ser atribuído ao resíduo de glucose.

Em suma, a actividade antioxidante das antocianinas na presença do peroxinitrito é pouco sensível à diversidade estrutural destes compostos, sendo particularmente difícil estabelecer algumas relações estrutura-actividade, o que provavelmente também estará relacionado com os ensaios escolhidos para seguir a oxidação proteica das LDL. Contudo, e nas condições experimentais referidas, é possível estabelecer algumas diferenças. Assim, a cianidina apresentou uma actividade antioxidante superior à pelargonidina, sugerindo uma potencial contribuição do grau de hidroxilação no anel B quando na presença do potente oxidante peroxinitrito. Nestas condições, a malvidina-3-glucósido foi o composto que apresentou maior eficiência na protecção das LDL, reforçando a importância da glicosilação no anel C para tal eficiência.

Para tentar esclarecer os mecanismos envolvidos na protecção das antocianinas contra as modificações proteicas das LDL mediadas pelo peroxinitrito foram realizados estudos espectrais para avaliação da interacção directa do peroxinitrito com estas antocianinas (resultados não apresentados). Como desta interacção resultou um espectro totalmente desprovido de picos característicos quer das antocianinas quer do nitrofenol, presente em caso de nitração a 430 nm, estes estudos não se revelaram particularmente esclarecedores dos mecanismos envolvidos. Contudo, é provável que esta protecção conferida pelas antocianinas seja resultado da reacção directa com o anião peroxinitrito, o que está de acordo com o proposto em alguns estudos recentes (Tsuda et al., 2000; Serraino et al., 2003; Ichyanagi et al., 2004; Rahman et al., 2006).

Outro mecanismo possível para estes efeitos protectores das antocianinas estará relacionado com a captação de espécies radicalares resultantes da decomposição do peroxinitrito, nomeadamente o radical hidroxilo. Em concordância com esta hipótese, Garcia-Alonso e colaboradores (2005) demonstraram recentemente que as antocianinas, e em particular a malvidina-3-glucósido, exibem actividade "scavenger" do

radical hidroxilo. De salientar a possibilidade de captação directa não só pelas próprias antocianinas mas também pelos produtos de decomposição destes pigmentos polifenólicos, tal como sugerido por Tsuda e colaboradores (2000). Neste estudo, centrado na pelargonidina, os autores sugerem que não é só este composto mas também o ácido fenólico, *p*-hidroxibenzóico, resultante da sua degradação, que reagem com o peroxinitrito protegendo, deste modo, a tirosina da nitração através da formação do ácido 4-hidroxi-3-nitrobenzóico. Como é sobejamente sabido, vários produtos resultantes de nitração proteica têm sido detectados em lesões ateroscleróticas das artérias coronárias humanas pelo que a inibição desta reacção assume uma relevância extraordinária (Leeuwenburgh et al., 1997).

A actividade antioxidante destes compostos face ao oxidante fisiológico peroxinitrito pode também ser atribuída à possibilidade de ocorrência de diferentes interacções com a apoproteína das LDL, tal como referido para a ferrilmioglobina. Aliás, este factor deve ser particularmente importante atendendo ao facto de o alvo primário da interacção do peroxinitrito pré-sintetizado com as LDL ser a apoproteína, conforme demonstrado por Dinis e colaboradores (2002). Neste contexto, mais estudos são necessários para conhecer as referidas interacções antocianinas-apoB bem como as suas implicações no mecanismo subjacente à protecção conferida.

De qualquer maneira, os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com o estudo elaborado por Serraino e colaboradores (2003) no qual foi demonstrada a capacidade das antocianinas de inibirem múltiplos processos oxidativos induzidos pelo peroxinitrito nomeadamente a disfunção endotelial. Em contraposição, o presente estudo distingue-se claramente do realizado por Shafiee e colaboradores (2003). Neste último, pouca importância foi dada à protecção conferida pelo extracto de uvas contendo essencialmente antocianinas na oxidação de LDL iniciada pelo peroxinitrito, gerado a partir de SIN-1.

Aliás, é de salientar, que na maior parte dos trabalhos realizados até ao momento, apenas foram usados extractos de uvas ou de vinhos. Nesse sentido, o presente trabalho é, sem dúvida, uma mais valia pois utilizando antocianinas isoladamente torna-se possível identificar quais as que exibem maior actividade antioxidante no âmbito da oxidação das LDL.

4.3 Regeneração do α -tocoferol

Os estudos de ressonância paramagnética de electrões (RPE) realizados no presente trabalho sugerem também a potencial capacidade das antocianinas para regenerarem o α -tocoferol (α -TOH), o principal antioxidante presente nas LDL. De facto, os resultados apresentados evidenciam não só a elevada eficiência destas antocianinas para reduzirem a intensidade do sinal do radical α -TO \cdot como também para acelerar o decaimento desse radical gerado por irradiação UV de micelas de SDS contendo α -TOH (Figuras 20-22). Esta elevada eficiência pode ser associada às propriedades hidrofílicas das antocianinas, cuja localização na interface lípido-água das micelas facilita a interacção destes compostos polifenólicos com o α -TOH à superfície das mesmas. Esta hipótese poderá explicar a actividade idêntica exibida particularmente pelas antocianidinas em estudo, pelargonidina, cianidina e malvidina, e o ascorbato, antioxidante hidrossolúvel de referência na regeneração do α -tocoferol.

Atendendo ainda à referida possibilidade de ligação das antocianinas às proteínas, a idêntica capacidade das antocianidinas para reduzirem o α -TO \cdot a α -TOH pode estar pelo menos parcialmente relacionada com a ausência de proteína neste modelo experimental de micelas de SDS. Este factor também poderá explicar a menor actividade antioxidante da malvidina-3-glucósido relativamente à malvidina atendendo por um lado à conhecida interacção do resíduo de glucose com as proteínas e por outro ao impedimento estereoquímico associado a esse resíduo na estrutura da malvidina-3-glucósido. No sentido de esclarecer a influência da proteína na

actividade regeneradora do α -TOH pelas antocianinas seria pertinente uma futura avaliação desta actividade num modelo de LDL humanas.

A estrutura aglicona das antocianinas parece ser fundamental para explicar a destacada actividade destes polifenóis quando comparada com a exibida pelo ácido cafeico, o ácido fenólico utilizado como referência. Apenas a referida estrutura poderá justificar o facto de em todas as concentrações estudadas, as antocianinas terem exibido maior capacidade de regeneração do α -TOH do que o ácido cafeico.

Independentemente do mecanismo subjacente a esta actividade e de acordo com o conhecido efeito das antocianinas na prevenção do consumo do α -TOH (Ghiselli et al., 1998; Frank et al., 2002), os resultados apresentados sugerem que as antocianinas poderão influenciar efectivamente a resistência das LDL à oxidação por regeneração desta vitamina.

Em suma, a pelargonidina, a cianidina, a malvidina e em particular a malvidina-3-glucósido protegem efectivamente as LDL das modificações oxidativas mediadas quer pelo azocomposto AAPH, quer pelos dois oxidantes com relevância fisiológica no contexto da aterogénese, a ferrilmioglobina e o peroxinitrito. Tal actividade protectora, associada à capacidade das antocianinas para regenerarem o α -TOH, o principal antioxidante lipofílico presente nas LDL, podem contribuir para os benefícios associados à ingestão de antioxidantes na dieta e, em especial, ao consumo moderado de vinho tinto na diminuição do risco de doenças cardiovasculares.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Dada a ampla distribuição das antocianinas na dieta mediterrânica e em particular no vinho tinto, vários estudos têm sido realizados para avaliar a actividade antioxidante destes flavonóides na oxidação das LDL humanas e a sua potencial contribuição na prevenção das doenças cardiovasculares.

O presente estudo destaca o papel importante das antocianinas na protecção das LDL contra a oxidação mediada quer pelo azocomposto AAPH quer por dois oxidantes biologicamente relevantes no contexto da aterogénese, a ferrilmioglobina e o peroxinitrito.

Como sugerido pela diminuição da velocidade de extinção da fluorescência do ácido *cis*-PnA incorporado e pela redução da formação de dienos conjugados, as antocianinas em estudo preveniram eficientemente a oxidação lipídica das LDL promovida pelos radicais peroxilo ou pela ferrilmioglobina, de uma forma dependente da sua concentração e da estrutura química. A cianidina, com estrutura catecólica no anel B, bem como a malvidina, dimetoxilada nas posições 3' e 4', apresentaram uma maior eficiência protectora do que a pelargonidina, uma antocianidina com estrutura monofenólica no anel B. A malvidina-3-glucósido exibiu também maior actividade antioxidante do que a respectiva aglicona - a malvidina. Esta actividade antioxidante das antocianinas parece estar relacionada, por um lado, com a sua capacidade de captação de radicais peroxilo e, por outro, com a possibilidade de redução da ferrilmioglobina a metamioglobina.

As antocianinas em estudo preveniram também eficazmente a oxidação da apoB das LDL, em termos da alteração da sua carga eléctrica e da formação de grupos carbonilo, induzida pelo peroxinitrito. No entanto, esta protecção parece ser menos sensível à diversidade estrutural dos compostos em estudo quando comparada com a exibida na presença da ferrilmioglobina ou dos radicais peroxilo. Assim, face ao peroxinitrito, não é possível estabelecer grandes diferenças na relação estrutura-actividade das antocianinas em estudo, embora a estrutura aglicona básica destes

compostos seja certamente fundamental para justificar a intensa actividade antioxidante exibida por este grupo de flavonóides. De qualquer maneira e nos ensaios efectuados com peroxinitrito, a cianidina e a malvidina exibiram idêntica ou superior actividade antioxidante em relação à pelargonidina, sugerindo uma provável contribuição do grau de hidroxilação e metoxilação no anel B, e a malvidina-3-glucósido apresentou também igual ou superior eficiência na protecção das LDL, insinuando a potencial colaboração da glicosilação no anel C para tal eficiência. Assim, a protecção das LDL conferida pelas antocianinas contra o peroxinitrito é provavelmente o resultado da reacção directa com o próprio anião e/ou as espécies radicalares resultantes da sua decomposição, nomeadamente o radical hidroxilo.

A potencial interacção das antocianinas em estudo com a apoB das LDL poderá também explicar a elevada protecção conferida por estes compostos polifenólicos às LDL contra a oxidação induzida particularmente pela ferrilmioglobina ou pelo peroxinitrito. Neste contexto torna-se premente a realização de mais estudos no sentido de investigar quais os mecanismos moleculares subjacentes à referida protecção.

Os estudos de ressonância paramagnética de electrões num modelo de micelas de SDS contendo α -TOH evidenciaram a elevada capacidade das antocianinas em estudo para regenerarem, de uma forma dependente da concentração, este antioxidante lipofílico maioritariamente presente nas LDL. A elevada eficiência destes compostos para reduzirem o α -TO \cdot a α -TOH poderá explicar, pelo menos parcialmente, a resistência das LDL à oxidação na presença dos compostos polifenólicos em estudo.

Em suma, os efeitos protectores das antocianinas relativamente às LDL parecem estar claramente dependentes dos oxidantes usados como iniciadores bem como dos ensaios escolhidos para seguir essa oxidação, existindo por isso alguma dificuldade em estabelecer uma evidente relação estrutura-actividade para os compostos polifenólicos estudados.

Independentemente deste facto, o presente trabalho destaca a potencial relevância de todas as antocianinas em estudo na protecção das

LDL contra as modificações lipídicas ou proteicas induzidas por vários oxidantes, bem como a sua elevada capacidade de regeneração do α -TOH. Estes resultados contribuem portanto para o fortalecimento da já reportada actividade antioxidante das antocianinas. Esta actividade exibida pela pelargonidina, cianidina, malvidina e em particular pela malvidina-3-glucósido, composto maioritariamente presente no vinho tinto, poderá directa ou indirectamente explicar a conhecida cardioprotecção associada ao consumo regular e moderado do vinho.

Atendendo à distribuição destas antocianinas no vinho tinto, será pertinente a realização de estudos *in vivo* em modelos animais no sentido de avaliar a possível aplicação clínica destes flavonóides, já considerados como responsáveis pelo recentemente denominado paradoxo Francês II.

Como seria de prever e segundo vários estudos, a avaliação completa dos efeitos biológicos das antocianinas deverá ter sempre em consideração os efeitos exibidos por todos os seus metabolitos e seus produtos de degradação *in vivo*. Atendendo a que as antocianinas são metabolizadas dando origem às correspondentes antocianidinas e que os seus produtos de degradação são maioritariamente os respectivos ácidos fenólicos, sobejamente conhecidos pela sua actividade antioxidante, é previsível que o potencial antioxidante das antocianinas ingeridas na dieta seja muito maior do que o exibido *in vitro* por estes compostos polifenólicos isoladamente.

Tendo em consideração que a malvidina-3-glucósido é a antocianina mais abundante no vinho tinto e que a malvidina é o seu correspondente metabolito *in vivo*, o presente trabalho, destacando as suas elevadas capacidades em proteger as LDL humanas das modificações oxidativas lipídicas e/ou proteicas, sugere o potencial contributo que estes compostos terão na prevenção da principal causa de morbilidade e mortalidade a nível mundial, as doenças cardiovasculares.

“It is a great error to consider a heavy tax on wine as a tax on luxury. On the contrary it is a tax on the health of our citizens.”

Thomas Jefferson

BIBLIOGRAFIA

- Aviram, M. and Fuhrman, M. (1998) LDL oxidation by arterial wall macrophages depends on the antioxidative status in the lipoprotein and in the cells: role of prooxidants vs. antioxidants. *Mol. Cell. Biochem.* **188**, 149-159.
- Aviram, M. and Fuhrman, B. (2002) Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **957**, 146-161.
- Aviram, M., Kaplan, M., Rosenblat, M. and Fuhrman, B. (2005) Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. *Handb. Exp. Pharmacol.* **170**, 263-300.
- Bell, D. R. and Gochenaur, K. (2006) Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *J. Appl. Physiol.* **100**, 1164-1170.
- Bitsch, I., Janssen, M., Netzel, M., Strass, G., Frank, T. (2004) Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of elderberry extract and blackcurrant juice. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **42**, 293-300.
- Brouillard, R., Chassaing, S. and Fougèrouse, A. (2003) Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? *Phytochemistry* **64**, 1179-1186.
- Bub, A., Watzl, B., Heeb, D., Rechkemmer, G. and Briviba, K. (2001) Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *Eur. J. Nutr.* **40**, 113-120.
- Cao, G., Muccitelli, H. U., Sanchez-Moreno, C. and Prior, R. L. (2001) Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 920-926.
- Chang, Y. C., Huang, K. X., Huang, A. C., Ho, Y. C., Wang, C. J. (2006) Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* **44** (7), 1015-1023.
- Chapman, M. J. (2003) Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. *Atherosclerosis* **171**, 1-13.
- Cheyrier, V. (2005) Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 223-229.
- Cherubini, A., Vigna, G. B., Zuliani, G., Ruggiero, C., Senin, U. and Fellin, R. (2005) Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 2017-2032.

- Chopra, M., Fitzsimons, P. E. E. and Strain, J. J. (2000) Non-alcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamins and carotenoid concentrations. *Clin. Chem.* **46**, 1162-1170.
- Clifford, M. N. (2000) Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1063-1072.
- Cooke, D., Steward, W., Gescher, A. and Marczylo, T. (2005) Anthocyanins from fruits and vegetables – Does bright colour signal chemopreventive activity? *Eur. J. Cancer* **41**, 1931-1940.
- Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J. and Fogelman, A.M. (1990) Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein (MCP-1) in human endothelial and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5134–5138.
- Dee, G., Rice-Evans, C., Obeyesekera, S., Meraji, S., Jacobs, M., Bruckdorfer, K. R. (1991) The modulation of ferryl myoglobin formation and its oxidative effects on low density lipoproteins by nitric oxide. *FEBS Lett.* **294**, 38-42.
- Dell'Agli, M., Buscialà, A. and Bosisio, E. (2004) Vascular effects of wine polyphenols. *Cardio. Res.* **63**, 593-602.
- Diaz, M., Frei, B., Vita, J.A., and Keane, J.F. Jr. (1997) Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N. Engl. J. Med.* **337**, 408–416.
- Dinis, T. C. P., Santos, C. L., and Almeida, L. M. (2002) The apoprotein is the preferential target for peroxynitrite-induced LDL damage. Protection by dietary phenolic acids. *Free Radic. Res.* **36**, 531-543.
- Dugo, P., Favoino, O., Presti, M., Luppino, R., Dugo, G. and Mondello, L. (2004) Determination of anthocyanins and related components in red wines by micro- and capillary HPLC. *J. Sep. Sci.* **27**, 1458-1466.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H. and Jürgens, G. (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* **13**, 341–390.
- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G. and Kulling, S. E. (2006) Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur. J. Nutr.* **45**, 7-18.
- Frank, J., Kamal-Eldin, A., Lundh, T., Määtä, k., Törrönen, R. and Vessby, B. (2002) Effects of dietary anthocyanins on tocopherols and lipids in rats. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7226-7230.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L. and Teissedre, P.L. (1995) Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* **43** (4), 890-894.

- Freedman, J. E., Parker, III C., Li, L., Perlman, J. A., Frei, B., Ivanov, F. V., Deak, L. R., Iafrazi, M. D. and Folts, J. D. (2001) Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* **103**, 2792-2798.
- Fritz, J., Kern, M., Pahlke, G., Vatter, S. and Marko, D. (2006) Biological activities of malvidin, a red wine anthocyanidin. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**, 390-395.
- Frolov, A. And Hui, D. Y. (2007) The modern art of atherosclerosis: a picture of colorful plants, cholesterol, and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 450-452.
- Fruchart, J.-C. (2003) Dyslipidemia and atherosclerosis slide collection. Disponível em <http://www.athero.org/slidelibrary/fruchart/>. Consultado em Fevereiro 2007.
- Fuhrman, B., Lavy, A. and Aviram, M. (1995) Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and LDL to undergo lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**, 549-554.
- Fuhrman, B. and Aviram, M. (2001) Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 41-48.
- Galassetti, P. and Pontello, A. (2006) Dietary effects on oxidation of low-density lipoprotein and atherogenesis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **8**, 523-529.
- Gardner, C. D., Fortmann, S. P. and Krauss, R. M. (1996) Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *J. Am. Med. Assoc.* **276**, 875-881.
- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A. and Scaccini, C. (1998) Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *J. Agric. Food Chem.* **46** (2), 361-367.
- Glories, Y. (1988) Anthocyanins and tannins from wine: organoleptic properties. *Prog. Clin. Biol. Res.* **280**, 123-134.
- Grinshtein, N., Bamm, V. V., Tsemakhovich, V. A. and Shaklai, N. (2003) Mechanism of low-density lipoprotein oxidation by hemoglobin-derived iron. *Biochemistry* **42**, 6977-6985.
- Hagerman, A. E. and Butler, L. G. (1981) The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* **156**, 4494-4498.
- Halliwel, B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annual Review Nutrition* **16**, 33-50.
- Harada, K., Kano, M. and Takayanagi, T., Yamakawa, O., Ishikawa, F. (2004) Absorption of acylated anthocyanins in rats and humans after ingesting an extract of *Ipomoea batatas* purple sweet potato tuber. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1500-1507.

- Harats, D., Shaish, A., George, J., Mulkins, M., Kurihara, H., Levkovitz, H. and Sigal, E. (2000) Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2100-2105.
- Heinonen, I. M., Meyer, A. S. and Frankel, E. N. (1998) Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4107-4112.
- Hertog, M. G., Kromhout, D. and Aravanis, C. (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.* **155**, 381-386.
- Holvoet, P., Mertens, A., Verhamme, P., Bogaerts, K., Beyens, G., Verghaeghe, R., Collen, D., Muls, E. and Van de Werf, F. (2001) Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 844-848.
- Hou, D. (2003) Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Curr. Molec. Med.* **3**, 149-159.
- Hou, D., Fujii, M., Terahara, N. and Yoshimoto, M. (2004) Molecular mechanisms behind the chemopreventive effects of anthocyanidins. *J. Biomed. Biotechnol.* **5**, 321-325.
- Ichiyanagi, T., Hatano, Y., Matsugo, S. and Konishi, T. (2004) Kinetic comparisons of anthocyanin reactivities towards 2,2'-azobis(2-amidinopropane) (AAPH) radicals, hydrogen peroxide and tert-buthylhydroperoxide by capillary zone electrophoresis. *Chem. Pharm. Bull.* **52**, 434-438.
- Ichiyanagi, T., Shida, Y., Rahman, M. M., Hatano, Y., Matsumoto, H., Hirayama, M. and Konishi, T. (2005) Metabolic pathway of cyanidin 3-O-beta-D-glucopyranoside in rats. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 145-150.
- Inkeles, S. and Eisenberg, D. (1981) Hyperlipidemia and coronary atherosclerosis: a review. *Medicine* **60**, 110-123.
- Itabe, H., Yamamoto, H. and Imanaka, T. (1996) Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J. Lipid Res.* **37**, 45-53.
- Jayaprakasam, B., Vareed, S. K., Olson, L. K. and Nair, M. G. (2005) Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 28-31.
- Kaliora, A.C., Dedoussis, G. V. Z. and Schmidt, H. (2006) Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* **187**, 1-17.
- Kähkönen, M.P. and Heinonen, M. (2003) Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agric. Food Chem.* **51** (3), 628-633.

- Katsube, N., Keiko, I., Tsushida, T., Yamaki, K. and Kobori, M. (2003) Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 68-75.
- Kay, C. D., Mazza, G. J. and Holub, B. J. (2005) Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *J. Nutr.* **135**, 2582-2588.
- Kerry, N. L. and Abbey, M. (1997) Red wine and fractionated phenolics compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* **135**, 93-102.
- Knox, Y. M., Hayashi, K., Suzutani, T., Ogasawara, M. Yoshida, I., Shiina, R. Tsukui, A., Terahara, N., Azuma, M. (2001) Activity of anthocyanins from fruit extract of *Ribes nigrum* L. against influenza A and B viruses. *Acta Virol.* **45**, 209-215.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F. and Brouillard, R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**, 923-933.
- Lamarche, B., Tchernof, A., Mauriege, P., Cantin, B., Dagenais, D. R., Lupien, J. P. and Despres, J. P. (1997) Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* **95**, 69-75.
- Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, R. and Kanner, J. (1999) pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 67-70.
- Lapointe, A., Couillard, C. and Lemieux, S. (2006) Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 645-658.
- Laranjinha, J.A., Almeida, L.M. and Madeira, V.M. (1992) Lipid peroxidation and its inhibition in low density lipoproteins: quenching of cis-parinaric acid fluorescence. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 147-154.
- Laranjinha, J.A.N., Almeida, L.M., and Madeira, V.M.C. (1994) Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low-density lipoprotein oxidation. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 487-494.
- Laranjinha, J., Almeida, L. and Madeira, V. (1995) Reduction of ferrylmyoglobin by dietary phenolic acid derivatives of cinnamic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 329-337.
- Lazze, M. C., Pizzala, R., Perucca, P., Cazzalini, O., Savio, M., Forti, L., Vannini, V. and Bianchi, L. (2006) Anthocyanidins decrease endothelin-1 production and increase endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**, 44-51.
- Leeuwenburgh, C., Hardy, M., Hazen, S., Wagner, P., Ohishi, S., Steinbrecher, U. and Heinecke, J. (1997) Reactive nitrogen

- intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J. Biol. Chem.* **272**, 1433-1436.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B., Shaltiel, S. and Stadtman, E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**, 464-478.
- Libby, P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868–874.
- Lila, M. A. (2004) Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, 306-313.
- Lowry, O.H., Rosebrough, A.L., Farr, M.J. and Randall, R.S. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Manach, C. Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Remesy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 230-242.
- Marchioli, R. (1999) Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: laboratory, epidemiological and clinical trial data. *Pharmacology Research* **40**, 227-238.
- Martin, S., Favot, L., Matz, R., Lugnier, C. and Andriantsitohaina, R. (2003) Delphinidin inhibits endothelial cell proliferation and cell cycle progression through a transient activation of ERK-1/-2. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 669-675.
- Matuschek, M. C., Hendriks, W. H., McGhie, T. K. and Reynolds, G. W. (2006) The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 31-36.
- Mazza, G. and Miniati, E. (1993) Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. CRC Press Inc., Boca Raton, FL
- Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T. and Holub, B. J. (2002) Absorption of anthocyanins from Blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7731-7737.
- McDougall, G. J., Fyffe, S. Dobson, P. and Stewart, D. (2005) Anthocyanins from red wine – their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry* **66**, 2540-2548.
- McGhie, T. K., Ainge, G. D., Barnett, L. E., Cooney, J. M. and Jensen, D. J. (2003) Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4539-4548.
- Mertens, A. and Holvoet, P. (2001) Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J.* **15**, 2073-2084.

- Milbury, P. E. (2001) Analysis of complex mixtures of flavonoids and polyphenols by HPLC electrochemical detection methods. *Methods in Enzymol.* **1355**, 15-26.
- Nielsen, I. L. F., Dragsted, L. O., Ravn-Haren, G., Freese, R. and Rasmussen, S. E. (2003) Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2813-2820.
- Niki, E. and Noguchi, N. (2002) Effects of antioxidants against atherosclerosis. *Molec. and Cell. Biochem.* **234/235**, 19-25.
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A. and Packer, L. (2002) Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyaniding and pelargonidin. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 166-171.
- Noguchi, N. and Niki, E. (1994) Apolipoprotein B oxidation in low-density lipoproteins. *Meth. Enzymol.* **233**: 490-494.
- Orlova, E., Sherman, M., Chiu, W., Mowri, H., Smith, L. and Gotto, A. (1999) Three-dimensional structure of low density lipoproteins by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8420-8425.
- Passamonti, S., Urhovsek, U., Mattivi, F. (2002) The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem Biophys Res Commun* **269**, 631-636.
- Peluso, M. R. (2006) Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Exp. Biol. Med.* **231**, 1287-1299.
- Prior, R. L. and Wu, X. (2006) Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic. Res.* **40**, 1014-1028.
- Puhl, H., Waeg, G and Esterbauer, H. (1994) Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods Enzymol.* **233**, 425-441.
- Radi, R., Denicola, A., Alvarez, B., Ferrer, G. and Rubbo, H. (2000) The biological chemistry of peroxynitrite. Nitric oxide Biology and Pathobiology. Academic Press, San Diego, 57-82.
- Rahman, M. M., Ichiyanagi, T., Komiyama, T., Hatano, Y. and Konishi, T. (2006) Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Radic. Res.* **40**, 993-1002.
- Ramirez-Tortosa, C., Andersen, O. M., Gardner, P. T., Morrice, P. C., Wood, S. G., Duthie, S. J., Collins, A. R. and Duthie, G. G. (2001) Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1033-1037.

- Rechner, A. R., Kroner C. (2005) Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thromb. Res.* **116** (4), 327-334.
- Renaud, S. and de Lorgeril, M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**, 1523-1526.
- Requena, J.R., Fu, M. X., Ahmed, M. U., Jenkins, A. J., Lyons, T. J., Baynes, J. J. W. and Thorpe, S. R. (1997) Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. *Biochem. J.* **322**, 317-325.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933-956.
- Ross, R. (1999) Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115–126.
- Rubbo, H. and O'Donnell, V. (2005) Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights. *Toxicology* **208**, 305-317.
- Salonen, J. T., Yla-Herttuala, S., Yamamoto, R., Butler, S., Korpela, H., Salonen, R., Nyyssonen, K., Palinski, W., and Witztum, J. L. (1992) Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* **339**, 883-887.
- Satué-Gracia, M.T., Heinonen, M. and Frankel, E.N. (1997) Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J. Agric. Food Chem.* **45** (9), 3362-3367.
- Seeram, N. P., Bourquin, L. D. and Nair, M. G. (2001) Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4924-4929.
- Seeram, N.P. and Nair, M.G. (2002) Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity- related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5308-5312.
- Serraino, I., Dugo, L., Dugo, P., Mondello, L., Mazzon, E., Dugo, G., Caputi, A. P. and Cuzzocrea, S. (2003) Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. *Life Sci.* **73**, 1097-1114.
- Shafiee, M., Carbonneau, M. A., Urban, N., Descomps, B. and Leger, C. L. (2003) Grape and grape seed extract capacities at protecting LDL against oxidation generated by Cu²⁺, AAPH or SIN-1 and at decreasing superoxide THP-1 cell production. A comparison to other extracts or compounds. *Free Radic. Res.* **37**, 573-584.

- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Goldberg, D. M. (1997) Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal.* **11**, 287-313.
- Szmitko, P. E. and Verma, S. (2005) Antiatherogenic potential of red wine: clinician update. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, 2023-2030.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.L. (1989) Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* **320**, 915-924.
- Steinbrecher, U.P., Lougheed, M., Kwan, W.-C., and Dirks, M. (1989) Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **264**, 15216-15223.
- Stinzing, F. C. and Carle, R. (2004) Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 19-38.
- Stocker, R. and Keaney, J. F. Jr. (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **84**, 1381-1478.
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, J.-L. and Rémésy, C. (2005) Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney and brain. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3902-3908.
- Teissedre, P. L., Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Peleg, H. and German, J. B. (1996) Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolics antioxidants from grapes and wines. *J. Sci. Food Agric* **70**, 55-61.
- Timberlake, C. F. and Henry, B. S. (1988) Anthocyanins as natural food colorants. *Prog. Clin. Biol. Res.* **280**, 107-121.
- Toshima, S., Hasegawa, A., Kurabayashi, M., Itabe, H., Takano, T., Sugano, J., Shimamura, K., Kimura, J., Michishita, I., Suzuki, T., and Nagai, R. (2000) Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2243-2247.
- Tsang, C., Higgins, S., Duthie, G. G., Duthie, S. J., Howie, M., Mullen, W., Lean, M. E. J. and Crozier, A. (2005) The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. *British Journal of Nutrition* **93**, 233-240.
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi, S. W., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments, cyanidin-3-O- β -D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2407-2410.

- Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1996) Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging activity effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1033-1039.
- Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T. (1999) Absorption and metabolism of cyanidin-3-O- β -D-glucoside in rats. *FEBS Lett.* **449**, 179-182.
- Tsuda, T., Kato, Y. and Osawa, T. (2000) Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. *FEBS Lett* **484**, 207-210.
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H. and Osawa, T. (2003) Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr.* **133**, 2125-2130.
- Vieira, O.V., Laranjinha, J.A.N., Madeira, V.M.C. and Almeida, L.M. (1996) Rapid isolation of low-density lipoproteins in a concentrated fraction free from water-soluble plasma antioxidants. *J. Lipid Res.* **37**, 2715-2721.
- Waterhouse, A. L. (2002) Wine phenolics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **957**, 21-36.
- Witting, P.K., Westerlund, C. and Stocker, R. (1996) A rapid and simple screening test for potential inhibitors of tocopherol-mediated peroxidation of LDL lipids. *J. Lipid Res.* **37**, 853-867.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E. and Prior, R. L. (2006) Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4069-4075.
- Yan, L.J., Traber, M.G. and Packer, L. (1995) Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal. Biochem.* **228**, 349-351.
- Yoshimoto, M., Okuno, S., Yamaguchi, M., Yamakawa, O. (2001) Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 1652-1655.
- Youdim, K. A., Martin, A. and Joseph, J. A. (2000) Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic. Biol. & Med.* **29**, 51-60.
- Xia, M., Ling, W. H., Ma, J., Kitts, D. D. and Zawistowski, J. (2003) Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein e deficient mice. *J. Nutr.* **133**, 744-751.
- Xia, M., Hou, M., Zhu, H., Ma, J., Tang, Z., Wang, Q., Li, Y., Chi, D., Yu, X., Zhao, T., Han, P., Xia, X. and Ling, W. (2005) Anthocyanins induce cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages: the role of the peroxisome proliferator-activated receptor γ -liver X receptor α -ABCA1 pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 36792-36801.

- Xia, X., Ling, W., Ma, J., Xia, M., Hou, M., Wang, Q., Zhu, H. and Tang, Z. (2006) An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Nutr.* **136**, 2220-2225.
- Xia, M., Ling, W., Zhu, H., Wang, Q., Ma, J., Hou, M., Tang, Z., Li, L. and Ye, Q. (2007) Anthocyanin prevents CD-40-activated proinflammatory signaling in endothelial cells by regulating cholesterol distribution. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 519-524.
- Yan, L.J., Traber, M.G. and Packer, L. (1995) Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal. Biochem.* **228**, 349-351.
- Zern, T. L. and Fernandez, M. L. (2005) Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J. Nutr.* **135**, 2291-2294.