



Ana Catarina Ramalho Henriques

## Estudo dos efeitos antioxidante e anti-inflamatório do chocolate preto e da pasta de cacau

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Fernando Ramos e coorientada pela Professora Doutora Maria Eduardo Figueira, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Catarina Ramalho Henriques

Estudo dos efeitos antioxidante e anti-inflamatório  
do chocolate preto e da pasta de cacau

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Para os meus pais, Margarida e Herculano

*“O binómio de Newton é tão belo como a Vénus de Milo.*

*O que há é pouca gente para dar por isso.”*

*- Álvaro de Campos*

# Agradecimentos

Muitas foram as pessoas que permitiram e contribuíram para a realização deste trabalho. A todos manifesto o meu profundo agradecimento.

Para começar ao Professor Doutor Fernando Ramos, por sem qualquer hesitação aceitar orientar esta dissertação e por criar todos os meios e condições para que o seu desenvolvimento decorresse da melhor maneira.

À professora Doutora Maria Eduardo Figueira pela orientação, conhecimentos transmitidos, ajuda, compreensão e disponibilidade.

À professora Doutora Conceição Castilho, por toda a ajuda, simpatia e inesgotável disponibilidade.

E à Doutora Ana Sanches Silva por me ter acolhido, pelas sugestões e conhecimentos e pelo tempo dispensado.

Às pessoas com quem tive a oportunidade de me cruzar no laboratório em Coimbra, Doutor André, Doutora Liliana, Sara Leston, João Rosa e Célia Laranjeiro. E no laboratório em Lisboa, Professor João Rocha e Rosa Direito.

À Imperial<sup>®</sup>, em particular à Engenheira Sofia Vieira da Silva, que gentilmente forneceu os chocolates e a pasta de cacau utilizados para realizar o presente estudo.

Por fim, à família, amigos e colegas, em especial, ao Pedro Ramalho e à Cristina Norberto, à Cristiana Martins pelo companheirismo e entreaajuda, à Filipa Carreira pela força e pelo apoio, à Cátia Monteiro pela camaradagem, à Daniela Gens Rodrigues por toda a ajuda e paciência e à Catarina Silva, pela amizade.

# Resumo

Tradicionalmente o chocolate é consumido mais por prazer do que por razões nutricionais, uma vez que durante muito tempo, foi considerado um alimento não saudável, tendo em conta os seus elevados teores de gordura e açúcar. Contudo, nos últimos anos, as pesquisas apontam que o consumo de chocolate preto é benéfico para a saúde.

O presente estudo incidiu em dois chocolates pretos, com 70% e 85% de cacau e em pasta de cacau. E teve como objetivos determinar o seu teor em compostos fenólicos e flavonóides, e avaliar as suas atividades antioxidante e anti-inflamatória. A atividade antioxidante foi determinada através de dois ensaios, sistema de inibição do radical livre DPPH e teste do branqueamento do  $\beta$ -Caroteno. A atividade anti-inflamatória foi estudada num modelo animal de inflamação crónica de colite ulcerativa, em que é provocada uma inflamação crónica no cólon de murganhos.

Os resultados obtidos demonstraram que todos os extratos fenólicos em estudo possuem atividade antioxidante. O extrato da pasta de cacau foi o que apresentou maior capacidade antioxidante em ambos os métodos, assim como maiores teores de compostos fenólicos e flavonóides. Quanto ao chocolate, os melhores resultados, tanto a nível da atividade antioxidante como dos teores de compostos fenólicos e flavonóides, foram obtidos no extrato do chocolate com 85% de cacau e por fim do chocolate com 70% de cacau.

A atividade anti-inflamatória foi estudada apenas para o chocolate com 70% de cacau e para a pasta de cacau. Observou-se que ambos possuem efeitos benéficos, uma vez que se verificou que os extratos atenuavam e reduziam os danos no cólon dos animais observando-se uma diminuição significativa da extensão e violência dos sinais da inflamação crónica. Estes resultados podem estar, uma vez mais, relacionados com os seus teores em compostos fenólicos e flavonóides e poderão dever-se ao seu poder antioxidante e/ou a outro mecanismo envolvido na inflamação.

Em conclusão, os resultados obtidos indicam que a pasta de cacau e o chocolate preto são boas fontes de compostos bioativos e que estes estão interligados com as atividades antioxidante e anti-inflamatória destes alimentos.

**Palavras-Chave:** chocolate preto, pasta de cacau, compostos fenólicos, flavonóides, atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória

# Abstract

Traditionally chocolate is consumed more for pleasure than for nutritional reasons since for a long time it has been considered an unhealthy food given its high fat and sugar content. However in recent years research has shown that consumption of dark chocolate is beneficial to health.

This study focused on two dark chocolates with 70% and 85% cocoa and cocoa liquor. Had as aim to determine its content in phenolic compounds and flavonoids and evaluate its antioxidant and anti-inflammatory activities. The antioxidant activity was determined through two assays, DPPH<sup>•</sup> scavenging and  $\beta$ -carotene bleaching. The anti-inflammatory activity was studied in an animal template of chronic inflammation of ulcerative colitis in which chronic inflammation is induced in the colon of mice.

The results showed that all the phenolic extracts studied have antioxidant activity. The extract of the cocoa liquor presented the highest antioxidant capacity in both methods, as well as higher levels of phenolic compounds and flavonoids. As for chocolate, the best results both in the antioxidant activity and in the contents of phenolic compounds and flavonoids were verified in the extract of chocolate with 85% of cocoa and finally in the chocolate with 70% of cocoa.

The anti-inflammatory activity was studied only for chocolate with 70% cocoa and for cocoa liquor. It was observed that both have beneficial effects since the extracts were verified to attenuate and reduce the damage in the colon of the animals observing a significant reduction in the extent and violence of the signs of the chronic inflammation. These results may be once again associated to their content of phenolic compounds as well as flavonoids and may be due to their antioxidant power and/or to another mechanism involved in inflammation.

In conclusion, the results show that the cocoa liquor and the dark chocolate are good sources of bioactive compounds and that these are linked with the antioxidant and anti-inflammatory activities of these foods.

**Keywords:** dark chocolate, cocoa liquor, phenolic compounds, flavanoids, antioxidant activity, anti-inflammatory activity

# Abreviaturas

AAC – Coeficiente de atividade antioxidante (do inglês, *Antioxidant Activity Coefficient*)

Abs – Absorvância

ADI – ingestão diária aceitável (do inglês, *Acceptable Daily Intake*)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ATP – Adenosina trifosfato

BHA – Butil-hidroxianilose

BHT – Butil-hidroxitolueno

CUPRAC – Capacidade Antioxidante de Redução dos Ião Cobre (do inglês, *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*)

DPPH· – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

ECE – Equivalentes de Epicatequina (do inglês, *EpiCatechin Equivalents*)

EC<sub>50</sub> – 50% da Concentração Máxima Inibitória / concentração capaz inibir 50% a amostra

EFSA – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (do inglês, *European Food Safety Authority*)

EtOH – Etanol

FRAP – Poder antioxidante por redução do Ião Férrico (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Power*)

GAE – Equivalentes de Ácido Gálico (do inglês, *Gallic Acid Equivalents*)

HAT – Transferência de átomos de hidrogênio (do inglês, *Hydrogen Atom Transfer*)

HDL – lipoproteína de alta densidade (do inglês, *High Density Lipoproteins*)

IL – Interleucina

kcal – quilocaloria

kJ – quilojoule

LDL – lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *Low Density Lipoprotein*)

min – minutos

NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF-κB – Fator nuclear-κB

ORAC – Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (do inglês, *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive oxygen species*)

RNS – Espécies reativas de azoto (do inglês, *Reactive nitrogen species*)

rpm – rotações por minuto

SET - Transferência de elétron único (do inglês, *Single Electron Transfer*)



TBHQ – terc-Butil-hidroquinona

TEAC – Capacidade Antioxidante em Equivalente Trolox (do inglês, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

TNBS - ácido 2,4,6 – trinitrobenzeno sulfônico

TRAP – Parâmetro antioxidante de radicais totais (do inglês, *Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*)

% PI – Percentagem de Inibição (do inglês, *percentage of inhibition*)

# Índice geral

Resumo.....	V
Abstract.....	VI
Abreviaturas.....	VII
Índice geral.....	IX
Índice de figuras.....	XII
Índice de tabelas.....	XIV
<b>Capítulo I – Introdução.....</b>	<b>1</b>
I. Introdução.....	2
I.1 Cacau, descrição da planta e sua origem.....	2
I.2 Processamento do cacau e obtenção do chocolate .....	3
I.2.1 Tipos de chocolate.....	6
I.3 Cacau e chocolate preto.....	7
I.3.1 Composição nutricional e química .....	8
I.4 Cacau e chocolate preto, benefícios para a saúde .....	10
I.5 Stress Oxidativo e antioxidantes.....	13
I.5.1 Radicais livres e Espécies reativas de Oxigénio (ROS) .....	16
I.5.1.1 Outras fontes de ROS e danos oxidativos.....	19
I.5.1.2 Danos oxidativos.....	19
I.5.1.3 Mecanismos de defesa .....	20
I.5.2 Antioxidantes .....	21
I.5.2.1 Enzimáticos.....	22
I.5.2.2 Não enzimáticos.....	23
I.5.2.3 Antioxidantes sintéticos .....	25
I.5.3 Aplicação dos antioxidantes na indústria alimentar.....	26
I.5.4 Métodos para a determinação <i>in vitro</i> da capacidade antioxidante .....	26
I.5.4.1 Mecanismos de reação: Transferência de eletrão único (SET) e Transferência de átomos de hidrogénio (HAT) .....	27
I.5.4.1.1 Métodos baseados em SET .....	28
I.5.4.1.2 Métodos baseados em HAT .....	32
I.5.4.2 Determinação do conteúdo em flavonóides totais.....	34
I.6 Inflamação.....	35
I.6.1 Inflamação aguda.....	36

1.6.2 Inflamação crónica.....	37
1.6.2.1 Colite ulcerativa .....	38
1.6.2.1.1 Fisiopatologia.....	39
1.6.3 Compostos fenólicos e a sua ação anti-inflamatória .....	41
<b>Capítulo II - Objetivos.....</b>	<b>43</b>
2. Objetivos.....	44
<b>Capítulo III - Materiais e métodos.....</b>	<b>45</b>
3. Materiais e métodos .....	46
3.1 Amostragem.....	46
3.2 Materiais.....	46
3.2.1 Ensaio <i>in vitro</i> .....	46
3.2.1.1 Reagentes.....	46
3.2.2 Ensaio <i>in vivo</i> .....	46
3.2.2.1 Animais .....	46
3.2.2.2 Reagentes e soluções .....	47
3.3 Métodos.....	47
3.3.1 Desengorduramento dos chocolates e pasta de cacau.....	47
3.3.2 Preparação e extração das amostras .....	48
3.3.3 Determinação dos compostos fenólicos totais .....	49
3.3.4 Determinação dos flavonóides totais .....	50
3.3.5 Determinação da capacidade antioxidante pelo Sistema de inibição do radical livre DPPH.....	51
3.3.6 Determinação da capacidade antioxidante pelo Teste do Branqueamento do $\beta$ -Caroteno .....	53
3.3.7 Determinação da ação anti-inflamatória dos extratos no modelo da colite ulcerativa – ensaio <i>in vivo</i> .....	54
3.3.8 Análise estatística dos resultados .....	56
<b>Capítulo IV - Resultados e discussão.....</b>	<b>57</b>
4. Resultados e discussão.....	58
4.1 Determinação dos compostos fenólicos totais.....	58
4.2 Determinação dos flavonóides totais.....	59
4.3 Determinação da capacidade antioxidante pelo Sistema de inibição do radical livre DPPH.....	60

4.4 Determinação da capacidade antioxidante pelo Teste do Branqueamento do $\beta$ -Caroteno .....	62
4.5 Determinação da ação anti-inflamatória dos extratos no modelo da colite ulcerativa	63
<b>Capítulo V - Conclusão</b> .....	<b>70</b>
5. Conclusão .....	71
<b>Capítulo VI - perspectivas futuras</b> .....	<b>73</b>
6. Perspetivas futuras .....	74
<b>Capítulo VII - Referências bibliográficas</b> .....	<b>75</b>
7. Referências bibliográficas.....	76

# Índice de figuras

Figura 1 - Árvore do cacau, cacaueiro e pormenor das sementes do cacau em corte longitudinal e corte transversal. Fontes: <a href="https://www.safarigarden.com.br">https://www.safarigarden.com.br</a> e <a href="https://www.tahitiheritage.pf/cacaoyer-arbre-chocolat/">https://www.tahitiheritage.pf/cacaoyer-arbre-chocolat/</a> .....	2
Figura 2 - Produção de sementes de cacau. Fonte: <a href="http://www.confectionerynews.com/Commodities/What-is-the-future-of-cocoa-growing-in-Asia">http://www.confectionerynews.com/Commodities/What-is-the-future-of-cocoa-growing-in-Asia</a> .....	3
Figura 3 - Frutos de cacau, pormenor das sementes e amêndoas. Fonte: <a href="http://www.ecodafrik.com/livoirien-atlantique-cree-un-consortium-industriel-du-cacao-au-cameroun/">http://www.ecodafrik.com/livoirien-atlantique-cree-un-consortium-industriel-du-cacao-au-cameroun/</a> .....	3
Figura 4 - Esquema do processo de fabricação de chocolate. Fonte: Glicerina <i>et al.</i> (2014).....	6
Figura 5 - Reação em cadeia simplificada de autoxidação para um substrato RH (por exemplo, ácido linoleico) e modo de interferência por antioxidantes diretos. Fonte: Amorati e Valgimigli (2015).....	14
Figura 6 - Principais causas e consequências da ação dos radicais livres. Fonte: Ferreira e Abreu (2007).....	15
Figura 7 - Representação das principais vias de produção das ROS e RNS. Fonte: Ferreira e Abreu (2007).....	17
Figura 8 - Esquema da separação dos antioxidantes naturais por grupos. Fonte: Carochó e Ferreira (2013).....	22
Figura 9 - Formação do complexo (Fe <sup>2+</sup> - TPTZ) a partir da redução do complexo (Fe <sup>3+</sup> - TPTZ) por um antioxidante. Fonte: Moon e Shibamoto (2009).....	31
Figura 10 - Redução do Cu <sup>2+</sup> para Cu <sup>+</sup> por ação de uma molécula antioxidante (HA). Fonte: Moon e Shibamoto (2009).....	31
Figura 11 - Mecanismo de redução do ABTS <sup>•+</sup> para ABTS por ação de um antioxidante. Fonte: Amorati e Valgimigli (2015).....	32

Figura 12 - Reação de dois ácidos 2-tiobarbitúrico com malondialdeído e formação de aduto. Fonte: Amorati e Valgimigli (2015).....	34
Figura 13 - Fisiopatologia da colite ulcerativa. Fonte: Ordás <i>et al.</i> (2012).....	41
Figura 14 - Determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais. Coloração característica da presença de compostos fenólicos.....	49
Figura 15 - Realização do ensaio da determinação dos flavonóides totais.....	50
Figura 16 - Realização do ensaio da capacidade antioxidante pelo sistema de inibição do radical livre DPPH.....	52
Figura 17 - Realização do ensaio do branqueamento do $\beta$ -caroteno.....	53
Figura 18 - Observações a microscópio cirúrgico do cólon aberto transversalmente. A - Grupo Sham; B - Grupo Etanol; C - Grupo TNBS + etanol; D - Grupo TNBS + Chocolate 70%; E - Grupo TNBS + Pasta de cacau.....	63
Figura 19 - Efeito das diferentes administrações no tamanho dos intestinos dos ratinhos, em particular dos grupos TNBS + etanol, TNBS + Chocolate 70% e TNBS + Pasta de cacau (* $P < 0,01$ vs Sham, # $P < 0,001$ vs TNBS).....	64
Figura 20 - Efeito das diversas administrações no tamanho das lesões no intestino, nomeadamente nos grupos TNBS + etanol, TNBS + Chocolate 70% e TNBS + Pasta de cacau (* $P < 0,001$ vs Sham, $\Phi P < 0,01$ vs TNBS, $\theta P < 0,001$ vs TNBS).....	65
Figura 21 - Efeito das diferentes administrações na consistência das fezes, particularmente nos grupos TNBS + etanol, TNBS + Chocolate 70% e TNBS + Pasta de cacau (* $P < 0,001$ vs Sham, $\Phi P < 0,01$ vs TNBS, # $P < 0,001$ vs TNBS).....	66

# Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição nutricional dos chocolates 70 e 85% de cacau e da pasta de cacau. Fonte: Imperial® .....	8
Tabela 2. Caracterização dos vários grupos em estudo.....	54
Tabela 3 - Resultados do teor em compostos fenólicos totais.....	58
Tabela 4 - Resultados dos flavonóides totais.....	60
Tabela 5 - Resultados da determinação da capacidade antioxidante pelo radical DPPH.....	61
Tabela 6 - Valores obtidos da inibição branqueamento do $\beta$ -caroteno.....	62
Tabela 7 - Classificação da severidade da diarreia.....	66

# Capítulo I

## Introdução



# I. Introdução

## I.1 Cacau, descrição da planta e sua origem

O cacau, fruto que dá origem ao chocolate, deriva de grãos de cacau, as sementes da árvore *Theobroma cacao* L. que significa “o alimento dos deuses”. O cacauzeiro (*Theobroma cacao*) é uma árvore pertencente à família Malvaceae e originária das regiões tropicais da América do Sul e Central que pode alcançar 4 a 8 metros de altura e a copa varia de 4 a 6 metros de diâmetro (Fig. 1). O fruto era muito prestigiado entre os povos Maias e Astecas, que o utilizavam para produzir uma bebida quente de sabor amargo com as sementes torradas, moídas e misturadas com água que era grande fonte de energia. O cacau foi levado para a Europa na altura dos Descobrimentos, pelos espanhóis, onde se tornou popular, especialmente a partir dos séculos XVII e XVIII. Contudo, devido às necessidades climáticas para o cultivo deste fruto, não é possível o seu desenvolvimento na Europa sendo que são as colônias americanas com clima tropical húmido que continuam a fornecer a matéria-prima. Os maiores produtores de cacau atualmente estão na África ocidental, sendo a Costa do Marfim o maior produtor do planeta, com aproximadamente 41% da produção total (Fig. 2) (Lima et al., 2011; Zeng et al., 2011; Lippi, 2013; Farhat et al., 2014; Lippi, 2015).



Figura 1 - Árvore do cacau, cacauzeiro e pormenor das sementes do cacau em corte longitudinal e corte transversal. Fontes: <https://www.safarigarden.com.br> e <https://www.tahitiheritage.pf/cacaoyer-arbre-chocolat/>

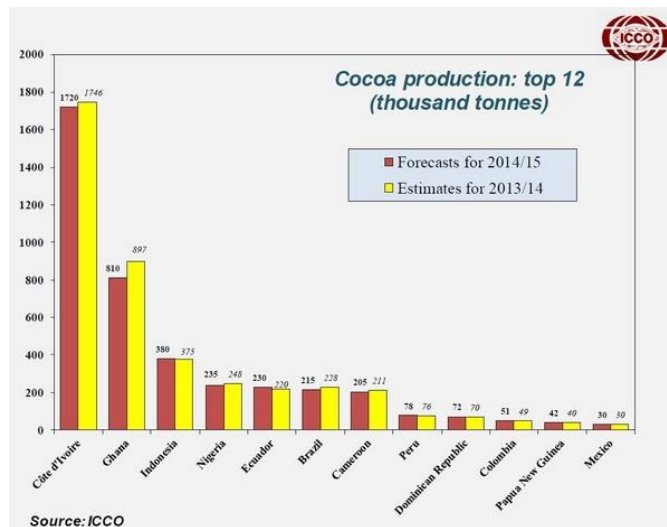


Figura 2 - Produção de sementes de cacau.

Fonte: <http://www.confectionerynews.com/Commodities/What-is-the-future-of-cocoa-growing-in-Asia>

## 1.2 Processamento do cacau e obtenção do chocolate

O processamento do cacau e transformação em chocolate é complexo. O processamento das sementes de cacau passa por três etapas: colheita e quebra dos frutos de cacau, fermentação das sementes de cacau e secagem das amêndoas de cacau (Fig. 3) (Farhat *et al.*, 2014).



Figura 3 - Frutos de cacau, pormenor das sementes e amêndoas. Fonte:

<http://www.ecodafrik.com/livoirien-atlantique-cree-un-consortium-industriel-du-cacao-au-cameroun/>

A colheita é manual, devendo ser feita cuidadosamente para evitar danos na camada externa do caule, danos esses que permitem a infiltração de pragas. Devem apenas ser colhidos frutos

maduros, pois apenas estes possuem açúcares em quantidade adequada para que se consiga uma boa fermentação, sendo o grau de maturação baseado na cor e no ruído que o cacau faz ao ser sacudido. Após a colheita os frutos são juntos em montes até se proceder à quebra que deverá ser realizada no máximo até ao quinto dia após a colheita. Na quebra os frutos são abertos e as sementes selecionadas (Neto *et al.*, 2001; Farhat *et al.*, 2014; Glicerina *et al.*, 2014).

Logo após a colheita é iniciada a fermentação das sementes de cacau. As sementes, mais precisamente os seus dois cotilédones, são constituídos por dois tipos de células: o primeiro apresenta pigmentos compostos de polifenóis (taninos, catequinas, antocianinas e proantocianidinas) e metilxantinas (teobrominas e cafeína); já o segundo tipo são células de reserva, que contêm amido, gorduras, proteínas e enzimas. A fermentação é a etapa em que as sementes, já retiradas do fruto, sofrem a ação de microrganismos presentes no meio ambiente, iniciando inúmeras reações físico-químicas e bioquímicas. Pode ser realizada em vários locais. Os mais usados são os montes, cestos, caixas de madeira e bandejas. É este processo que inicia a formação de numerosos compostos que determinam o sabor e o aroma do chocolate. As sementes transformam-se assim em amêndoas de cacau. (Lopes *et al.*, 2003; Farhat *et al.*, 2014).

Em seguida ocorre a secagem cujo objetivo principal é reduzir o teor de água, sendo que a melhor maneira de secar as amêndoas é dispô-las sob o sol, sendo esta a forma natural de realizar esta etapa, no entanto, também pode ser feita de forma artificial com a utilização de secadores. Nesta etapa elas perdem quase toda a humidade, reduzindo o peso em mais de metade. A velocidade da secagem deve ser tal que permita a migração da água e de compostos voláteis, como o ácido acético formado na fermentação, do interior dos cotilédones para a superfície da amêndoa, de modo a que sejam eliminados uniformemente. Quanto mais rápida a secagem, que ocorre usando secadores, nos quais as temperaturas atingidas são superiores a 40°C, maior é a acidez das amêndoas, pela dificuldade em se eliminar o ácido acético. Durante a secagem, deve-se evitar o contacto das amêndoas com o fumo produzido pela combustão da madeira usada como fonte de aquecimento dos secadores, uma vez que ele afeta o sabor das amêndoas de cacau, bem como dos produtos obtidos a partir delas. Uma vez secos, as amêndoas são enviados para a indústria. (Neto *et al.*, 2001; Farhat *et al.*, 2014; Glicerina *et al.*, 2014).

Estas fases iniciais decorrem nos países produtores de cacau e servem para preparar as sementes para o seu transporte às regiões produtoras de chocolate. O transporte deve ser

efetuado de modo a evitar a humidade e a absorção de aromas, para preservar as características da matéria-prima. Uma vez nas indústrias transformadoras o número de etapas é mais elevado. O processo tradicional envolve duas etapas: a primeira é o pré-processamento das amêndoas de cacau para obtenção da pasta de cacau e da manteiga de cacau, a segunda etapa envolve a mistura final com os outros ingredientes e preparação da massa de chocolate (Farhat *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2012).

Todas as amêndoas são obrigatoriamente sujeitas a controlos de qualidade assim como a uma limpeza com o objetivo de eliminar impurezas. Depois, e iniciando o processo, são torradas. As condições da torrefação dependem de vários fatores, como a origem, tipo de amêndoa, período de colheita, tratamentos anteriores, teor de água e tamanho das amêndoas ou dos nibs (fragmentos das amêndoas de cacau isentos de casca). Existem dois tipos de torrefação, o primeiro é a torra durante um curto espaço de tempo a temperaturas elevadas – produz um forte sabor a chocolate, mas elimina qualquer aroma subtil; o segundo é uma torra lenta a temperaturas mais baixas – permite a manutenção de sabores mais delicados, mas pode fazer com que não seja desenvolvido o sabor base do chocolate. Durante a torrefação a reação de Maillard é a principal responsável pela formação do sabor, cor e aroma desejáveis do chocolate (Efraim *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2012; Farhat *et al.*, 2014; Glicerina *et al.*, 2014).

A seguir à torrefação procede-se ao descasque, etapa que se faz com a ajuda de maquinaria, e de seguida é feita uma moagem, obtendo-se uma massa de partículas finas chamadas de pasta, massa ou licor de cacau. Segue-se a prensagem da pasta de cacau de onde é extraída a manteiga de cacau que deixa para trás uma massa sólida, que é pulverizada em cacau em pó. Depois da moagem, a pasta de cacau, pode ser prensada ou receber incorporação de mais manteiga de cacau. A manteiga de cacau é reservada para ser incorporada a outra pasta de cacau para a produção de chocolate. A partir desta etapa começam a haver diferenças em função do tipo de chocolate a ser fabricado (Lima *et al.*, 2012; Farhat *et al.*, 2014; Glicerina *et al.*, 2014).

Dependendo do produto final, vários ingredientes (açúcar, leite em pó e alguns aditivos) são adicionados à pasta, e as etapas subsequentes podem variar (Fig. 4). Na fabricação de chocolate preto, há uma adição de ingredientes como açúcar, manteiga de cacau e aditivos à pasta de cacau sendo que depois a mistura é homogeneizada. Segue-se a refinação, onde se realiza a redução da granulometria da mistura, e um passo de aquecimento, cujo objetivo é melhorar a textura, a viscosidade, as propriedades sensoriais e reduzir a quantidade de substâncias voláteis que influenciam negativamente o sabor. Temperar é a etapa seguinte e é responsável pela cristalização da manteiga de cacau na sua forma mais estável, forma beta ( $\beta$ ). Segue-se a

moldagem e o arrefecimento, onde o chocolate líquido é depositado em moldes e arrefecido até a fase gordurosa atingir um grau de cristalização adequado. A etapa seguinte é a desmoldagem e por fim o empacotamento. A temperagem é indispensável nestas etapas para a obtenção de um chocolate de alta qualidade (Cohen *et al.*, 2004; Torres-Moreno *et al.*, 2012; Farhat *et al.*, 2014; Glicerina *et al.*, 2014).

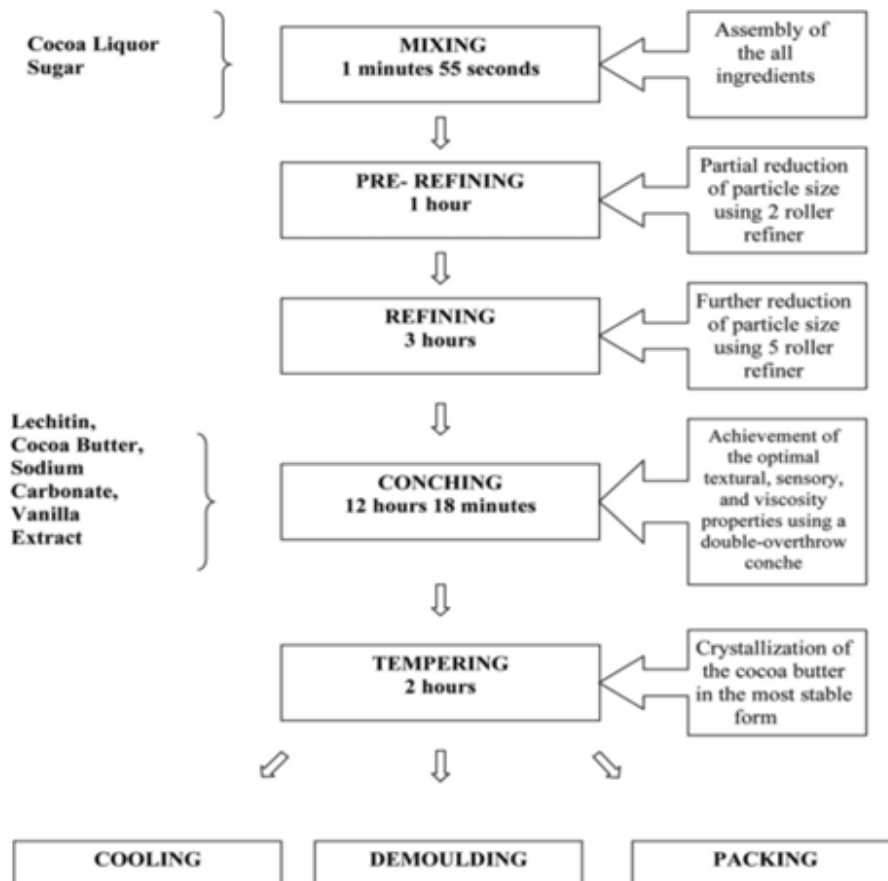


Figura 4 - Esquema do processo de fabricação de chocolate.

Fonte: Glicerina *et al.* (2014)

## 1.2.1 Tipos de chocolate

Existem vários tipos de chocolate:

- Chocolate branco que não possui cacau na sua composição, mas manteiga de cacau, sendo por isso o mais calórico. É feito com açúcar, leite e lecitina, podendo ser acrescentados aromas como o de baunilha. Tem consideráveis quantidades de gorduras hidrogenadas. Trata-se da pior opção para a saúde (Liu *et al.*, 2014; Medeiros *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015).

- Chocolate de leite que contém pelo menos 25% de cacau em pó na sua composição. Também possui leite em pó ou condensado, o que faz com que o alimento tenha colesterol e gordura saturada. Além disso, possui muito açúcar e pode ter gorduras hidrogenadas. É, contudo, uma melhor opção que o chocolate branco (Liu *et al.*, 2014; Medeiros *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015).

- Chocolate meio amargo com pelo menos 40% de cacau em pó. Possui menos leite e açúcar. As quantidades de cacau em pó ainda não são suficientes para proporcionar benefícios consideráveis à saúde (Liu *et al.*, 2014; Medeiros *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015).

- Chocolate preto que contém pelo menos 70% de cacau na sua composição. É chamado de chocolate puro uma vez que é feito com as amêndoas de cacau torradas. Não possui leite e tem menos açúcar e gorduras (Liu *et al.*, 2014; Medeiros *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015).

O Decreto-lei 229/2003 tem a definição de cacau e de todos os tipos de chocolate com exceção do chocolate preto.

### **I.3 Cacau e chocolate preto**

O chocolate tradicionalmente tem sido consumido mais por prazer do que por razões nutricionais, pois, durante muito tempo, foi considerado um alimento não saudável, devido aos seus altos teores de gordura e açúcar. No entanto, nos últimos anos, as pesquisas apontam que o consumo de chocolate preto tem potenciais benefícios para a saúde, benefícios esses que se devem principalmente aos compostos presentes no cacau, os polifenóis, em especial os flavonóides (Torres-Moreno *et al.*, 2012).

Embora os termos cacau e chocolate preto muitas vezes se sobreponham e se confundam na literatura, estes dois produtos diferem na composição de polifenóis e gordura. Geralmente, o cacau contém uma maior quantidade de polifenóis totais em comparação com o chocolate, mas o último contém uma maior quantidade de proantocianidinas (moléculas pertencentes à família dos flavonóides). Além disso, devido à prensagem, a pasta de cacau contém menos manteiga de cacau e, conseqüentemente, uma menor quantidade de gordura do que o chocolate preto. Estas diferenças tornam difícil a comparação entre cacau e chocolate preto. No entanto, apesar da diferença na proporção de gordura, o conteúdo energético da dose

diária dos dois produtos foi frequentemente semelhante em estudos de pesquisa (Natsume et al., 2000; Farhat et al., 2014).

O cacau e o chocolate são considerados importantes fontes de antioxidantes. Isto é especialmente significativo, uma vez que contêm uma quantidade superior de antioxidantes do que muitos outros alimentos e bebidas, e tendo em conta o seu amplo consumo. Assim, 40 g de chocolate preto fornece quase três vezes mais antioxidantes polifenólicos do que chocolate de leite. Os extratos de produtos de cacau contendo o maior teor de sólidos de cacau (chocolate preto) possuem o maior conteúdo de classes de polifenóis totais e individuais e apresentam a maior capacidade antioxidante (Belščak et al., 2009; Laličić-Petronijević et al., 2016).

### 1.3.1 Composição nutricional e química

Na tabela seguinte pode-se observar a composição nutricional de chocolate e cacau em pó gentilmente fornecidos por uma marca comercial.

Tabela 1 - Composição nutricional dos chocolates 70 e 85% de cacau e da pasta de cacau. Fonte: Imperial®.

Valores médios por 100g	Chocolate 70%	Chocolate 85%	Cacau puro em pó
Energia	2460 kJ/ 588 kcal	2431 kJ/ 581 kcal	1498 kJ/ 358 kcal
Lípidos	45 g	50 g	23 g
Dos quais saturados	28 g	19 g	14 g
Hidratos de carbono	31 g	20,5 g	11 g
Dos quais açúcares	26 g	14 g	0 g
Fibra	10 g	12,6 g	11 g
Proteína	10 g	11,6 g	20 g
Sal	0,02 mg	0,01 mg	0 mg

O chocolate contém ainda minerais, como: cobre, magnésio, cálcio, ferro, fósforo, potássio, zinco; fibras, proteínas e vitaminas: E e C (Aremu e Abara, 1992; Torres-Moreno *et al.*, 2012; Känel *et al.*, 2014).

Além disso, a manteiga de cacau, que é um dos ingredientes mais importantes do chocolate, contém gorduras mono-insaturadas. A gordura presente no chocolate vem da manteiga de cacau e consiste em quantidades aproximadamente iguais de ácido oleico (um ácido gordo monoinsaturado, saudável para o coração) e ácidos esteárico e palmítico (ambos ácidos gordos saturados) (Aremu e Abara, 1992; Lima *et al.*, 2011; Torres-Moreno *et al.*, 2012; Känel *et al.*, 2014).

O cacau é considerado uma alta fonte de polifenóis, compostos bioativos que consequentemente também estão presentes no chocolate preto. Estes constituem uma classe de fitoquímicos amplamente disponíveis em plantas e são subdivididos em classes: flavonóides, ácidos fenólicos, estilbenos e lignanas (Al-Gubory *et al.*, 2010; Farhat *et al.*, 2014; Oroian e Escriche, 2015).

Os flavonóides são classificados em flavonóis, flavanóis, flavonas, flavanonas, isoflavonóides e antocianinas. O cacau e os seus produtos, concretamente o chocolate preto, devido ao seu elevado teor de cacau, são particularmente ricos em flavanóis, que consistem principalmente em epicatequina e catequina (monómeros); proantocianinas (oligómeros) e procianidinas (monómeros). E contém ainda pequenas quantidades de flavonóis, como a quercetina. A epicatequina é a fração predominante equivalente a 35% do teor total de polifenóis (Lima *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2011; Farhat *et al.*, 2014; Känel *et al.*, 2014; Ellinger e Stehle, 2016; Laličić-Petronijević *et al.*, 2016).

Os produtos de cacau e chocolate preto são considerados os alimentos mais ricos em flavanóis. De acordo com Efraim *et al.* (2011) o cacau possui um teor mais alto de flavonóides por porção de consumo que chás e vinho tinto. Hong *et al.* (2013) descreve que em comparação com outras fontes alimentares de polifenóis como frutas, vegetais, chá e vinho tinto são o cacau e o chocolate preto que possuem as maiores concentrações polifenólicas, nomeadamente de flavonóides, como a catequina, a epicatequina e procianidinas. E segundo Ellinger e Stehle (2016) o chocolate preto possui o maior teor destes fitoquímicos entre os alimentos ricos em flavanóis por 100 g de alimentos.

O cacau assim como o chocolate preto contém também ácidos fenólicos, que consistem em hidroxicinâmicos, como o ácido caféico, ferúlico, cumárico e ácidos hidroxibenzóicos como o



gálico, siríngico, protocatequínico, vanilínico (Borchers *et al.*, 2000; Counet *et al.*, 2006; Hurst *et al.*, 2008; Jerkovic *et al.*, 2010).

Counet *et al.* (2006) identificaram pela primeira vez, resveratrol em extratos de chocolate preto e pasta de cacau. Embora sem uma diferença discrepante detetaram valores mais elevados de resveratrol na pasta de cacau do que no chocolate preto. No entanto, acreditam que a excepcional atividade antioxidante do chocolate deve estar mais relacionada com o seu alto teor em epicatequinas do que à presença de estilbenos.

As metilxantinas, como a cafeína e a teobromina, são compostos ativos encontrados no chocolate e conhecidas por serem substâncias incolores, inodoras, lipossolúveis e ligeiramente amargas (Hurst *et al.*, 2008).

Em geral, as características de sabor amargo e adstringência do cacau e dos produtos derivados são atribuídas aos compostos fenólicos, embora a literatura reporte outros fatores, como a presença de certos aminoácidos e a complexação de peptídeos com metilxantinas, que também contribuem para o trazo amargo e a adstringência (Efraim *et al.*, 2011).

## **1.4 Cacau e chocolate preto, benefícios para a saúde**

Quanto maior o teor de cacau do chocolate, menor será a quantidade de açúcar e maiores serão os seus benefícios para a saúde (Lippi, 2013).

Os fitoquímicos polifenólicos anteriormente descritos (1.3.1) que aparecem em quantidades elevadas no cacau e chocolate têm uma grande importância para a saúde dos consumidores destes alimentos, pois estão associados a benefícios fisiológicos pela sua elevada capacidade antioxidante, atualmente bastante estudada e largamente confirmada, mas também por outros efeitos como o efeito anti-inflamatório e cardio-protetores, por exemplo).

Hurst *et al.* (2008), Latham *et al.* (2014), Hu *et al.* (2016) entre muitos outros autores descrevem como os compostos bioativos do cacau e do chocolate preto combatem os radicais livres presentes no organismo, evitando o envelhecimento precoce das células.

Kwok (2015) sugere que o consumo de cacau tem efeitos cardio-protetores, que está associado a uma diminuição de doenças cardiovasculares, nomeadamente doenças da artéria coronária e enfartes.

É também associado ao cacau uma melhoria nos níveis de colesterol, uma vez que o seu composto biativo epicatequina estimula o aumento do colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidade), e a diminuição do colesterol LDL (lipoproteínas de baixa densidade). Impede ainda a oxidação do colesterol LDL e por consequência, que este se acumule nas artérias, evitando o entupimento das mesmas (Sarriá *et al.*, 2015).

A obesidade é já considerada um dos principais problemas de saúde pública do século XXI. Conclui-se que há evidências no papel benéfico dos polifenóis do chocolate preto em reduzir o peso corporal/gordura corporal através dos seus efeitos sobre o metabolismo (Farhat *et al.*, 2014).

Para além dos polifenóis existem outros compostos no chocolate com bioatividades. Segundo Akyol *et al.* (2014) o facto do chocolate preto conter cafeína, que é um estimulante do sistema nervoso central, melhora a concentração e energia. A cafeína possui também um efeito termogénico que contribui para a perda de peso. Lippi (2015) observou que os ácidos fenólicos presentes no cacau podem aumentar a produção da hormona leptina que aumenta a sensação de saciedade. O facto do chocolate preto conter fibras também contribui para a sensação de saciedade.

O chocolate preto consegue ainda ativar a libertação de neurotransmissores, que estão relacionados com o relaxamento e redução da ansiedade como a endorfina, a dopamina, a teobromina e a anandamida. Estas substâncias aumentam a sensação de bem-estar e reduzem o *stress*. O chocolate preto é ainda fonte de triptofano, aminoácido que é precursor da serotonina, hormona responsável pelo prazer. Enquanto a endorfina e a dopamina são responsáveis pelo relaxamento, a serotonina é um potente antidepressivo, que diminui o *stress* e a sensação de dor. Já a anandamida é conhecida pelos investigadores como a substância da felicidade, graças às suas propriedades ansiolíticas, antidepressivas e até mesmo analgésicas. Alguns dos benefícios do chocolate preto são assim prolongar as sensações de tranquilidade e bem-estar, através do aumento da concentração destas substâncias no cérebro, (Lippi, 2013; Känel *et al.*, 2014).

Contudo, uma constante nos estudos anteriormente mencionados e noutros, é a referência a um outro benefício do consumo do cacau e chocolate preto para a saúde: os seus efeitos anti-inflamatórias (Selmi *et al.*, 2008; Lippi *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2011, Castelnovo *et al.*, 2012).

Hong *et al.* (2013) descreve que resultados epidemiológicos sustentam que uma dieta rica em polifenóis pode promover saúde e pode atenuar ou atrasar o aparecimento de várias doenças, incluindo cancro de cólon, ao reduzir os danos oxidativos e a inflamação. O cacau e o chocolate preto, ao possuírem algumas das maiores concentrações polifenólicas, podem fornecer proteção contra o *stress* oxidativo através da ação dos seus compostos fenólicos, que ajudam a manter o estado antioxidante.

Lippi (2013) defende que o consumo de chocolate preto traz benefícios para a saúde não só devido à sua capacidade antioxidante mas também devido às suas propriedades anti-inflamatórias.

Cady e Durham (2010) desenvolveram um estudo cujo objetivo foi determinar o efeito de uma dieta enriquecida com cacau na expressão de proteínas inflamatórias em neurónios em condições de inflamação. O estudo foi desenvolvido em ratos e os resultados foram favoráveis. Verificaram que o cacau conseguia evitar respostas inflamatórias nos neurónios. Acrescentaram ainda que os seus dados forneciam evidências de que o cacau contém compostos biologicamente ativos que seriam benéficos para o tratamento de enxaquecas.

Castelnovo *et al.* (2012) refere que o chocolate embora antes não considerado um alimento tradicionalmente saudável, tem recebido mais atenção nos últimos anos tendo em conta que é uma fonte de flavonóides, Associam assim a sua atividade anti-inflamatória à presença destes fitoquímicos. Propõem o uso de chocolate preto como agente terapêutico, tendo ainda em consideração os estudos epidemiológicos que sugerem que o chocolate protege contra doenças cardiovasculares. Concluem, referindo que quanto mais amargo melhor (maior % de cacau) e que o consumo deve ser moderado, até 50 g por semana.

Chrysohoou e Stefanadis (2013) realçam que o chocolate preto, entre outros alimentos como o vinho tinto, nozes e abacate, pode ser considerado um alimento anti-envelhecimento devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, uma vez que as primeiras previnem doenças cardiovasculares e as segundas previnem a inflamação dos adipócitos, processo que caracteriza o envelhecimento.

Känel (2014) defende que devido ao seu elevado teor em flavonóides o cacau e o chocolate preto exercem benefícios para a saúde que incluem a vasodilatação dos vasos sanguíneos, a redução do *stress* oxidativo e atividade anti-inflamatória.

Ellinger e Stehle (2016) descreve que os flavonóides presentes no cacau têm fortes propriedades anti-inflamatórias *in vitro*. E que se tal acontecesse *in vivo* o consumo de cacau podia contribuir para prevenir ou tratar doenças mediadas por inflamação crónica. Contudo, os resultados deste estudo, que foram feitos em biomarcadores de inflamação, mostraram que poucas evidências existiam de que o consumo de alimentos ricos em cacau podia reduzir a inflamação.

Em conclusão podemos dizer que o chocolate parece ser uma boa fonte de compostos bioativos que poderão interferir de forma muito positiva com os fatores de risco associados a algumas doenças crónicas, e assim, a sua ingestão moderada contribuir para a promoção da saúde dos seus consumidores.

## **I.5 Stress Oxidativo e antioxidantes**

Todos os organismos aeróbios usam oxigénio molecular para produzir ATP (adenosina trifosfato), energia química base para a manutenção da vida. O oxigénio tem um papel central na evolução da complexidade da vida na Terra, nomeadamente devido à simetria bioquímica da fotossíntese oxigenada e respiração aeróbica ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ ) que mantém a homeostase dentro da biosfera do nosso planeta. Contudo, o oxigénio também pode ser tóxico e mutagénico, através da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS). O átomo de oxigénio simples é instável, e por isso tende a ligar-se a outro átomo de oxigénio, formando oxigénio molecular. A estabilidade desta ligação está no entanto comprometida porque apenas um par de eletrões é partilhado, havendo dois eletrões não emparelhados, o oxigénio é na verdade, um biradical livre (Buonocore *et al.*, 2010).

Os radicais livres são substâncias altamente reativas capazes de dar origem a reações em cadeia, isto é, reações que envolvem uma série de passos, cada um dos quais forma um radical livre que desencadeia o próximo passo. Existem três fases: iniciação, propagação e terminação (Fig. 5) e existem diferentes espécies de radicais livres: espécies reativas de oxigénio (ROS), espécies reativas de azoto (RNS), radicais centrados em carbono e radicais centrados em enxofre, produtos de um metabolismo celular normal (Halliwell, 2007; Valko *et al.*, 2007). ROS

e RNS são reconhecidos por desempenharem um papel duplo, tanto como espécies nocivas como benéficas, uma vez que podem ser prejudiciais ou vantajosas para os sistemas vivos, porque, por um lado, as reações dependentes de  $O_2$  e a respiração aeróbia tem vantagens significativas, mas, por outro lado, a formação de ROS tem potencial para causar danos. A baixas/moderadas concentrações ocorrem efeitos benéficos do ROS e RNS, que envolvem inúmeros processos fisiológicos como, mecanismos de regulação da proliferação celular, diferenciação celular, apoptose e expressão de genes, imunidade celular, defesa contra agentes infecciosos, sinalização celular e indução de uma resposta mitogénica (Dröge, 2002; Buonocore *et al.*, 2010; Valko *et al.*, 2007). Contudo, em concentrações mais elevadas, podem ser agentes causadores de danos a lípidos celulares, proteínas ou formar adutos de ADN, inibindo a sua função normal e que poderão promover atividade carcinogénica (Seifried *et al.*, 2007; Buonocore *et al.*, 2010).

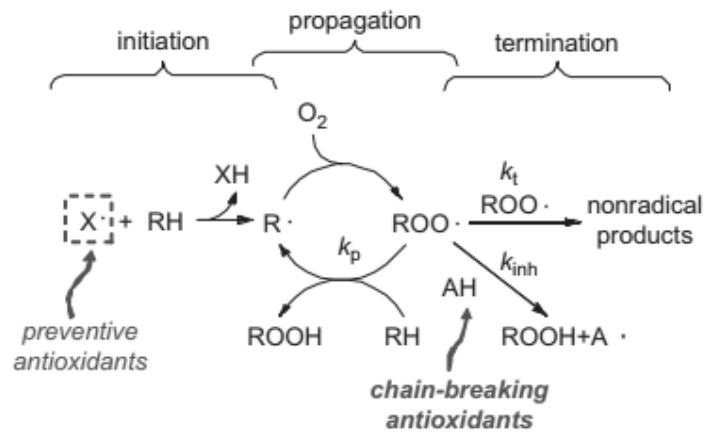


Figura 5 - Reação em cadeia simplificada de autoxidação para um substrato RH (por exemplo, ácido linoleico) e modo de interferência por antioxidantes diretos.

Fonte: Amorati e Valgimigli (2015)

Os organismos vivos desenvolveram diferentes formas de neutralizar os radicais livres: mecanismos preventivos, mecanismos de reparação, defesas físicas e defesas antioxidantes. Em sistemas biológicos, a sobreprodução de ROS/RNS e um défice de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos antioxidante resulta em *stress oxidativo* e *stress nitrosativo*. É o efeito nocivo dos radicais livres que causa potenciais danos biológicos. (Kovacic e Jacintho, 2001; Ridnour *et al.*, 2005; Valko, *et al.*, 2001). *Stress oxidativo* consiste na incapacidade do organismo em manter um equilíbrio entre a formação das ROS e o sistema de proteção antioxidante, ou seja, há um desequilíbrio entre a produção de espécies oxidativas e a sua respetiva neutralização

pelos antioxidantes. Em outras palavras, o *stress* oxidativo resulta das reações metabólicas que usam oxigénio e representa uma perturbação do organismo em manter um equilíbrio entre a formação de ROS e o sistema de proteção antioxidante nos organismos vivos, ou seja, verifica-se um desequilíbrio entre a produção de espécies oxidativas e a sua respetiva neutralização pelos antioxidantes (Valko *et al.*, 2007; Buonocore *et al.*, 2010; Pisoschi e Pop, 2015).

O *stress* oxidativo pode ter origem em causas naturais como em situações de exercício físico extremo, processos de inflamação; ou causas não naturais, como a presença de xenobióticos no organismo, poluentes ambientais, fármacos, radiação ou ainda em situações relacionadas com várias doenças (Fig. 6). Tem sido implicado na patogénese e fisiopatologia de vários problemas crónicos de saúde, tais como cancro, doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, e outras), doenças cardiovasculares (doença isquémica, e outras), desordens pulmonares, doenças associadas a bebés prematuros, autoimunes, renais, inflamatórias, gastrointestinais (úlceras pépticas, colite, e outras), diabetes. A sobreprodução de ROS tem sido inclusivamente relacionada com o processo de envelhecimento (Ferreira e Abreu, 2007; Rajendran *et al.*, 2014; Valko *et al.*, 2007; Pisoschi e Pop, 2015; Tan e Lim, 2015)

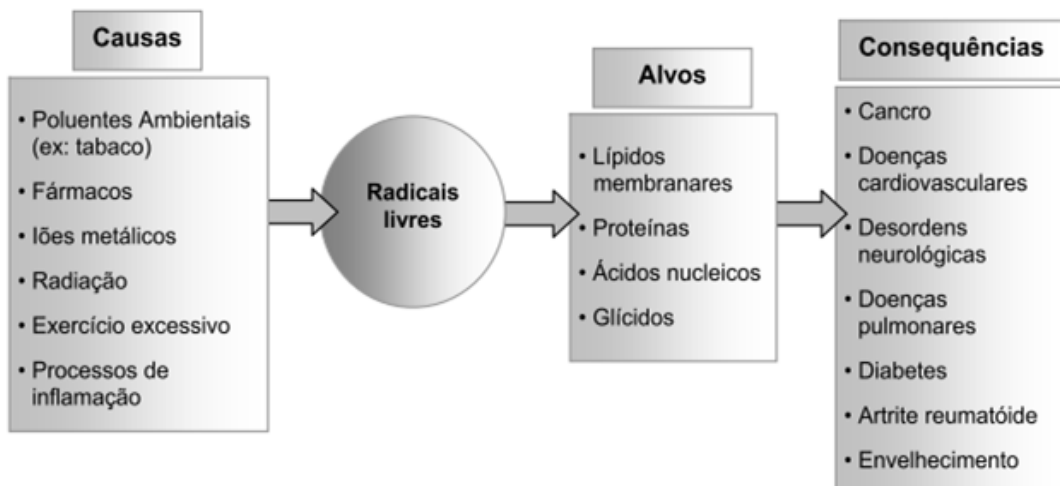


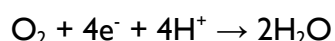
Figura 6 - Principais causas e consequências da ação dos radicais livres.

Fonte: Ferreira e Abreu (2007)

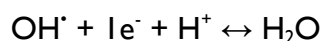
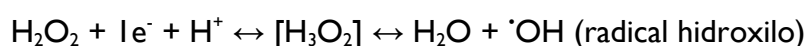
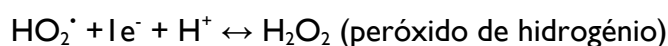
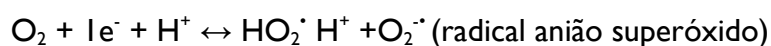
## I.5.1 Radicais livres e Espécies reativas de Oxigénio (ROS)

Gutteridge e Halliwell (2000) definiram radical livre como moléculas ou fragmentos de moléculas contendo um ou mais eletrões não emparelhados em orbitas atómicas ou moleculares. O(s) eletrão(ões) desemparelhados atribuem um considerável grau de reatividade ao radical livre. Moléculas estas que são altamente instáveis. As ROS, conhecidas como espécies reativas de oxigénio, representam a classe mais importante de radicais livres geradas nos organismos vivos. Da qual fazem parte espécies radicalares, como o radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) ou o radical peróxido ( $ROO^{\cdot}$ ), e não radicalares, como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) ou oxigénio singlete ( $^1O_2$ ). Todas as espécies tóxicas de oxigénio são ROS, mas nem todas as ROS são radicais de oxigénio. As ROS podem ser produzidos a partir de substâncias endógenas e exógenas. (Gutteridge e Halliwell, 2000; Miller *et al.*, 1990; Ferreira e Abreu, 2007; Valko *et al.*, 2007; Buonocore *et al.*, 2010).

Existem vários tipos e diversas vias de produção de ROS em sistemas vivos (Fig. 7). O anião superóxido, criado a partir do  $O_2$ , é considerado ROS primário, conseguindo gerar ROS secundários, através da sua interação com outras moléculas. A produção de superóxido ocorre principalmente na cadeia respiratória mitocondrial. A cadeia respiratória é fundamental para a produção de ATP em células de mamíferos. Durante o processo respiratório, o oxigénio é utilizado como receptor de eletrões e é completamente reduzido a água através da aquisição de quatro eletrões (Valko *et al.*, 2007; Buonocore *et al.*, 2010):



Uma vez ocorrendo a anterior reação é possível a formação de radicais, através dos subsequentes passos:



São gerados três produtos intermediários a partir de redução de oxigênio: anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ). O segundo é o mais estável e pode ser acumulado em grande quantidade (Buonocore *et al.*, 2010).

As espécies reativas de azoto (RNS) também desempenham um papel importante no organismo. A principal RNS é o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) que é produzido nos tecidos biológicos por sintases de óxido nítrico (NOS) ao metabolizar arginina e citrulina. O stress nitrosativo é originado pela produção excessiva de RNS que pode também causar a nitrosilação de proteínas, inibindo a sua função. Durante a ocorrência de processos inflamatórios, nas células do sistema imunitário são produzidos  $NO^{\cdot}$  e  $O_2^{\cdot-}$ , que ao reagirem formam peroxinitrilo ( $ONOO^{\cdot}$ ), um potente agente oxidante que pode provocar fragmentação do ADN e oxidação lipídica (Carr *et al.*, 2000).

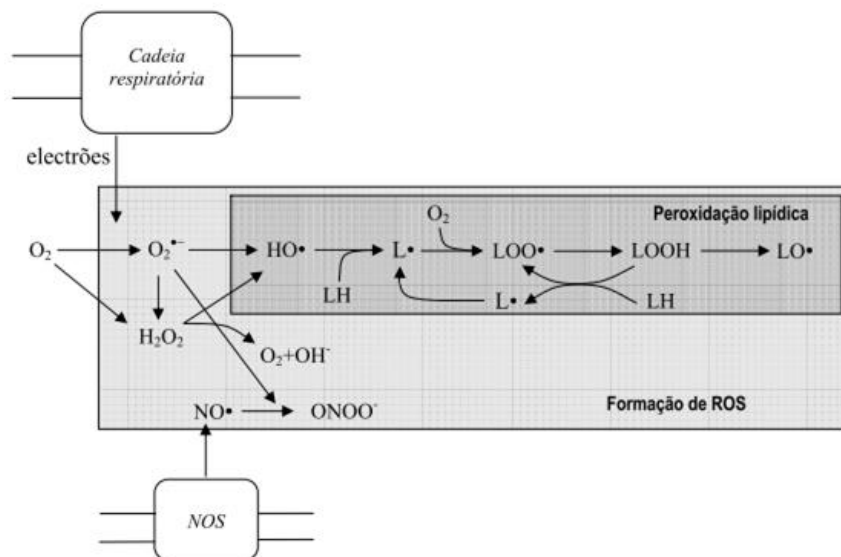
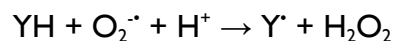
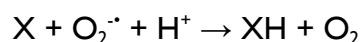


Figura 7 - Representação das principais vias de produção das ROS e RNS.

Fonte: Ferreira e Abreu (2007)

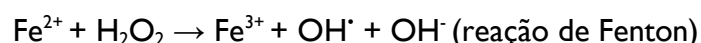
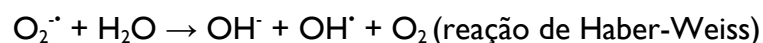
O radical anião superóxido é considerado a ROS primária uma vez que pode interagir com outras moléculas para gerar ROS secundárias e tanto pode atuar como fator de redução como oxidante; ao reduzir a reação, o oxigênio molecular é produzido, ao passo que, através da reação de oxidação, gera-se peróxido de hidrogênio (Valko *et al.*, 2005; Buonocore *et al.*, 2010):





A formação deste radical pode ocorrer por duas principais vias. A primeira sendo a fosforilação oxidativa da cadeia respiratória mitocondrial, processo alcançado com a citocromo oxidase e a segunda via é pela oxidação do heme, em que o ferro do heme é reduzido em estado ferroso (Fe II) na desoxihemoglobina. O radical pode ainda ser formado através do metabolismo do oxigénio. (Miao *et al.*, 2009; Buonocore *et al.*, 2010; Gandhi e Abramov, 2012; Pisoschi e Pop, 2015).

O radical hidroxilo tem um forte poder oxidante tornando-o num radical muito perigoso, provavelmente a ROS mais reativa. É produzido principalmente quando há um excesso de anião superóxido e peróxido de hidrogénio, através das reações de Haber-Weiss e Fenton (Valko *et al.*, 2007; Buonocore *et al.*, 2010):



O radical peroxilo tem um tempo de vida relativamente longo, assim como um considerável comprimento de caminho de difusão em sistemas biológicos. É gerado no processo de peroxidação lipídica, tendo neste um papel importante (Buonocore *et al.*, 2010).

O peróxido de hidrogénio pode ser gerado por qualquer sistema que produza anião superóxido, sendo assim uma ROS secundária, uma vez que o anião superóxido desproporciona prontamente. A presença de oxidases pode também resultar numa síntese direta deste radical por transferência de dois eletrões para oxigénio molecular. O peróxido de hidrogénio é capaz de produzir radicais extremamente reativos, como o  $OH^{\cdot}$ , devido à sua interação com iões metálicos (Gutteridge, 1994; Pisoschi e Pop, 2015).

O oxigénio singleto pode ser gerado através de uma reorganização de eletrões no oxigénio molecular provocada por uma entrada de energia. Esta ROS tem a capacidade de oxidar diretamente proteínas, ADN e lípidos (Buonocore *et al.*, 2010).

### **1.5.1.1 Outras fontes de ROS e danos oxidativos**

As mitocôndrias são consideradas uma das principais fontes endógenas de ROS, embora sejam também um dos primeiros alvos de ataque destes radicais. Isto porque a cadeia respiratória é composta por proteínas transmembranares existentes na membrana mitocondrial interna e a formação de ROS ocorre perto da membrana. Assim, as ROS facilmente oxidam lípidos da membrana, que são especialmente sensíveis a fenômenos de ataques de radicais livres. Ataque que se denomina peroxidação lipídica e que promove a formação de vários tipos de ROS (Fig. 7) (Mehrotra *et al.*, 1991; Ferreira e Abreu, 2007).

Contudo existem outras fontes endógenas celulares de radicais livres como a xantina oxidase, que catalisa a hidroxilação de purinas, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, que quando ativados iniciam um aumento do consumo de oxigênio que dá origem a uma ampla variedade de ROS. (Kohen e Nyska, 2002; Buonocore *et al.*, 2010).

As ROS também podem ser produzidos por uma série de processos exógenos, como agentes ambientais (ex. poluentes do ar), xenobióticos (ex. pesticidas, herbicidas, toxinas), radiações ionizantes e não-ionizantes, contaminantes industriais, medicamentos, drogas, e químicos (ex. álcool) (Kohen e Nyska, 2002; Sorg, 2004; Buonocore *et al.*, 2010; Carochó e Ferreira, 2013).

### **1.5.1.2 Danos oxidativos**

A produção contínua de espécies reativas de oxigênio de fontes endógenas e exógenas resulta em danos oxidativos, contínuos e acumulativos dos componentes celulares e em alterações de inúmeras funções celulares. Entre os alvos biológicos mais vulneráveis ao dano oxidativo estão as enzimas, as membranas lipídicas, e o ADN. A química dos radicais clarifica a interação entre as espécies, os locais onde são produzidos e os seus alvos. Por exemplo, os radicais hidroxilos, produzidos em compartimentos mitocondriais, são responsáveis por danos ocorridos na mitocôndria, mas não no núcleo. A sua elevada reatividade com moléculas biológicas, que leva a que tenham um tempo de vida bastante curto, não permite a sua distribuição dentro do ambiente intracelular e limita a sua capacidade de causar danos a uma longa distância do local onde foram produzidos. Por outro lado, os metabolitos de oxigênio que não são extremamente reativos podem permanecer no ambiente intracelular por longos períodos de tempo e chegar a locais distantes do seu local de formação. Por exemplo, o  $H_2O_2$

produzido nas mitocôndrias pode interagir em outras partes do citoplasma ou no nucléolo. Embora as moléculas de ADN sejam estáveis e estejam bem protegidas, as ROS conseguem interagir com o complexo orgânico provocando danos, como interferir na transcrição e a replicação de genes importantes (Kohen e Nyska, 2002; Ferreira e Abreu, 2007; Valko *et al.*, 2007; Pisoschi e Pop, 2015).

### **1.5.1.3 Mecanismos de defesa**

Os organismos vivos desenvolveram diferentes formas de neutralizar os radicais livres assim como o *stress* oxidativo através de vários mecanismos: preventivos e de reparação e defesas: físicas e antioxidantes. Estes mecanismos e defesas que têm como objetivo manter os níveis de produção e eliminação de ROS equilibrados num determinado nível, abrangem atividades indiretas e diretas (Valko *et al.*, 2007).

As abordagens indiretas podem envolver o controlo da produção endógena de ROS, por exemplo, ao alterar a atividade de enzimas, que produzem indiretamente metabolitos de oxigénio, sendo a xantina oxidase uma dessas enzimas (Kohen e Nyska, 2002).

Um dos métodos mais importantes do organismo para lidar com os danos oxidativos é um sistema de reparo eficaz que consiste em enzimas e pequenas moléculas que conseguem eficientemente reparar um local de dano oxidativo. Moléculas que conseguem doar átomos de hidrogénio a moléculas danificadas também são considerados como ferramentas de reparação. A defesa física de estruturas biológicas, como membranas, também é um mecanismo importante que permite que a célula enfrente o *stress* oxidativo. Compostos como os tocoferóis podem proporcionar uma maior estabilidade às membranas celulares, e podem impedir as ROS de se aproximarem do alvo (Kohen, 1999; Kohen e Gati, 2000; Kohen e Nyska, 2002; Valko *et al.*, 2007).

Contudo, dos vários mecanismos de defesa, o que apresenta maior relevância é o que envolve antioxidantes. Este sistema desenvolveu-se ao longo do processo evolutivo, talvez em resposta à crescente concentração de oxigénio na atmosfera. A singularidade deste sistema é a sua interação direta com as ROS de vários tipos e sua disponibilidade e contribuição para proteger alvos biológicos (Kohen e Nyska, 2002).

## I.5.2 Antioxidantes

Halliwell *et al.* (1995) definiu antioxidantes como "qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação a um substrato oxidável, atrasa significativamente ou inibe a oxidação desse substrato". Mais tarde, em 2007 Halliwell actualiza a definição de antioxidante como "qualquer substância que atrasa, evita ou remove o dano oxidativo numa molécula alvo".

Durante a evolução humana, as defesas endógenas foram melhorando gradualmente para manter um equilíbrio entre os radicais livres e o *stress* oxidativo. A atividade antioxidante pode ser eficiente através de diversos modos e processos: como inibidora de reações de oxidação de radicais livres por inibição da formação de radicais lipídicos livres; interrompendo a propagação da reação em cadeia da autooxidação; como supressores do oxigénio singleto; através de sinergismo com outros antioxidantes; como agentes redutores que convertem hidroperóxidos em compostos estáveis; como quelantes de metais que convertem os pró-oxidantes de metal em produtos estáveis; e como inibidores de enzimas pró-oxidativas (Darmanyan *et al.*, 1998; Heim *et al.*, 2002; Min e Boff, 2002; Pokorný, 2007; Kancheva, 2009; Carochó e Ferreira, 2013).

A atividade antioxidante e a capacidade antioxidante são termos frequentemente usados sem qualquer distinção, mas MacDonald-Wicks *et al.* (2006) sugere que se deve reconhecer que têm significados diferentes. O autor refere-se à atividade como a constante de velocidade de uma reação entre um antioxidante específico e um oxidante específico e à capacidade como uma medida da quantidade de um dado radical livre que é eliminado por uma amostra de compostos antioxidantes, avaliando assim misturas heterogéneas de antioxidantes e não compostos específicos (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Os antioxidantes naturais são divididos em dois grandes grupos, enzimáticos e não enzimáticos (Fig. 8) (Pisoschi e Pop, 2015).

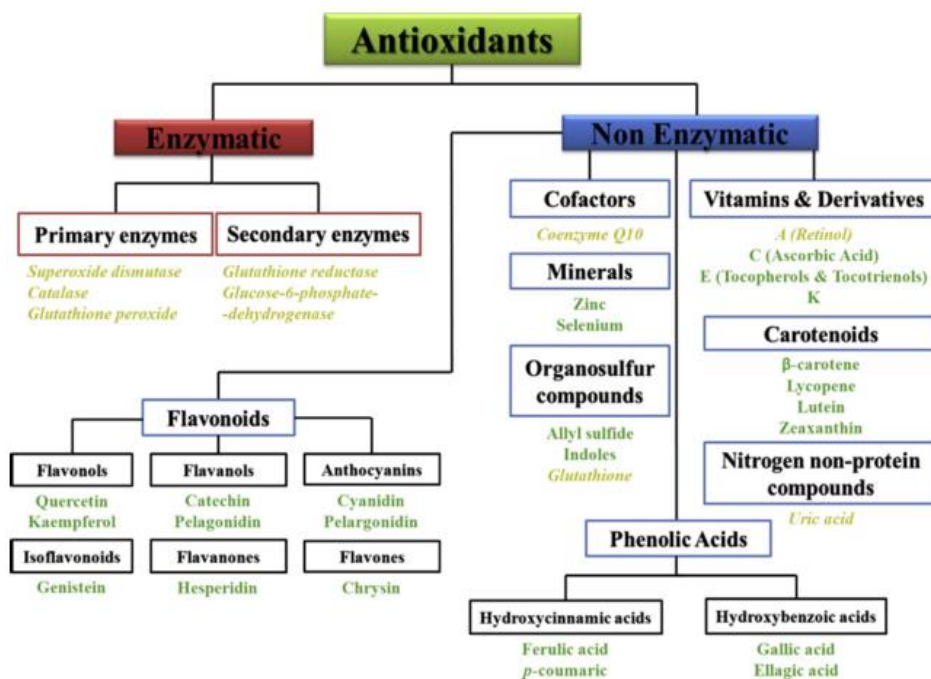


Figura 8 - Esquema da separação dos antioxidantes naturais por grupos.

Fonte: Carochi e Ferreira (2013)

### 1.5.2.1 Enzimáticos

Os antioxidantes naturais enzimáticos dividem-se ainda em defesas enzimáticas primárias e secundárias. A defesa primária é composta por três enzimas importantes que impedem a formação ou neutralizam radicais livres: a glutathione peroxidase, a catalase e a superóxido dismutase. A glutathione peroxidase doa dois elétrons para reduzir e eliminar peróxidos como potenciais substratos para a reação de Fenton. A catalase converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. E a superóxido dismutase converte ânions superóxido em peróxido de hidrogênio que pode ser substrato para a catalase (Rahman, 2007; Carochi e Ferreira, 2013).

A defesa enzimática secundária inclui as enzimas glutathione reductase (GRS) e glucose-6-fosfato desidrogenase. A GRS reduz a glutathione (antioxidante) da sua forma oxidada para a reduzida, reciclando-a para continuar a neutralizar mais radicais livres. A glucose-6-fosfato regenera NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato - coenzima utilizada em reações anabolizantes) criando um meio de redução. Estas duas enzimas não neutralizam os radicais livres diretamente, mas servem como apoio a outros antioxidantes endógenos (Gamble e Burke, 1984; Ratnam *et al.*, 2006; Carochi e Ferreira, 2013).

### 1.5.2.2 Não enzimáticos

Existem vários antioxidantes naturais não enzimáticos, nomeadamente vitaminas (A), cofatores de enzimas (Q10), compostos de azoto (ácido úrico) e péptidos (glutaciona).

A vitamina A ou retinol é um carotenóide produzido no fígado que resulta da degradação do  $\beta$ -caroteno. Existem cerca de 12 formas de vitamina A que podem ser isoladas. Sabe-se que são benéficas para a pele, olhos e órgãos internos. A capacidade de se combinarem com radicais de peróxido antes deles propagarem a peroxidação em lípidos é o que lhes confere a atividade antioxidante (Palace *et al.*, 1999; Jee *et al.*, 2006; Carochó e Ferreira, 2013).

A coenzima Q10 está presente em todas as células e membranas. Desempenha um papel importante na cadeia respiratória e em metabolitos celulares; impede a formação de radicais peroxílicos lipídicos, embora tenha sido reportado que esta coenzima consegue neutralizar esses radicais mesmo após a sua formação e possui a capacidade de regenerar a vitamina E, sendo este processo mais provável do que a regeneração de vitamina E através do ácido ascórbico (vitamina C) (Turunen *et al.*, 2004; Carochó e Ferreira, 2013).

O ácido úrico é o produto final do metabolismo de nucleótidos de purina em seres humanos. É conhecido por evitar a superprodução de oxidantes que resultem da reação entre a hemoglobina e peróxidos. Evita também a lise celular de eritrócitos por peroxidação e é um potente eliminador de oxigénio singleto e de radicais hidroxílicos (Kand'ár *et al.*, 2006; Carochó e Ferreira, 2013).

A glutaciona é um tripéptido endógeno que protege as células contra os radicais livres, tanto ao doar um átomo de hidrogénio como um eletrão. É também importante na regeneração de outros antioxidantes como o ascorbato (Steenvoorden e Henegouwen, 1997; Carochó e Ferreira, 2013).

Contudo e apesar da sua eficiência notável, o sistema antioxidante endógeno não é suficiente. A alimentação é a maior fonte de antioxidantes exógenos, que vão ajudar os seres humanos a manter as concentrações de radicais livres em níveis baixos (Pietta, 2000; Carochó e Ferreira, 2013).

Vitaminas C e E são nomes comuns para ácido ascórbico e tocoferóis. O ácido ascórbico é eficaz na eliminação do radical anião superóxido, do peróxido de hidrogénio, do radical

hidroxilo, do oxigénio singlete e de RNS (Barros *et al.*, 2011). A vitamina E é composta por oito isoformas, com quatro tocoferóis ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol e  $\delta$ -tocoferol) e quatro tocotrienóis ( $\alpha$ -tocotrienol,  $\beta$ -tocotrienol,  $\gamma$ -tocotrienol e  $\delta$ -tocotrienol), sendo  $\alpha$ -tocoferol a isoforma mais potente e abundante nos sistemas biológicos. A vitamina E interrompe a peroxidação lipídica ao doar o seu hidrogénio fenólico aos radicais peróxilos. É o único antioxidante solúvel em lípidos, encontrado no plasma, nos glóbulos vermelhos e nos tecidos, o que lhe permite proteger as estruturas lipídicas, principalmente as membranas (Burton e Traber, 1990). Estas duas vitaminas também exibem um comportamento sinérgico com a regeneração da vitamina E através da vitamina C. (Halpner *et al.*, 1998; Carochó e Ferreira, 2013).

A vitamina K é um grupo de compostos solúveis em gorduras, essencial para a conversão de glutamatos em  $\gamma$ -carboxiglutamatos em várias proteínas alvo. A estrutura de 1,4-naftoquinona dessas vitaminas confere o efeito protetor antioxidante. A vitamina K tem duas isoformas naturais, K<sub>1</sub> e K<sub>2</sub> (Vervoort *et al.*, 1997; Carochó e Ferreira, 2013).

Os polifenóis representam uma vasta variedade de compostos orgânicos, ocorrendo naturalmente em vegetais, frutas, e plantas. Flavonóides, ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, estilbenos e lignanas, são os principais grupos dos polifenóis. Os flavonóides e os ácidos fenólicos são os grupos que apresentam um poder antioxidante mais relevante (Al-Gubory *et al.*, 2010; Oroian e Escriche, 2015).

Os flavonóides são um grupo de compostos antioxidantes do qual fazem parte os seguintes sub-grupos: flavonóis, flavanóis, antocianinas, isoflavonóides, flavanonas e flavonas (a grande maioria são pigmentos de plantas). As propriedades antioxidantes são conferidas aos flavonóides pelos grupos hidroxilo fenólicos que se ligam a anéis estruturais. Podem atuar como agentes redutores, doadores de hidrogénio, eliminadores de radicais de superóxido e de oxigénio singlete e ainda como quelantes de metais. Os flavonóides também ativam as enzimas antioxidantes, reduzem os radicais de  $\alpha$ -tocoferol, inibem as oxidases, reduzem o stress nitrosativo e aumentam os níveis de ácido úrico e moléculas de baixo peso molecular. Alguns dos flavonóides mais importantes são a catequina, catequina-galato, quercetina e kaempferol (Rice-Evans *et al.*, 1996; Procházková *et al.*, 2011; Carochó e Ferreira, 2013).

Os ácidos fenólicos dividem-se em dois grupos, os ácidos hidroxicinâmicos e os ácidos hidroxibenzóicos. Ambos apresentam atividade antioxidante como quelantes e eliminadores de radicais livres com um impacto especial sobre os radicais hidroxilo e peróxilo, aniões

superóxido e peroxinitritos. Um dos compostos mais estudados e promissores no grupo hidroxibenzóico é o ácido gálico, que é o precursor de muitos taninos, enquanto que o ácido cinâmico é o precursor de todos os ácidos hidroxicinâmicos (Krimmel *et al.*, 2010; Terpinc *et al.*, 2011; Carochó e Ferreira, 2013).

Os carotenóides são um grupo de pigmentos naturais que são sintetizados por plantas e microrganismos. Podem ser separados em dois grandes grupos: os hidrocarbonetos carotenóides, conhecidos como carotenos, que contêm o licopeno e o  $\beta$ -caroteno; e os carotenóides oxigenados, conhecidos como xantofilas, grupo do qual fazem parte a zeaxantina e a luteína. A principal propriedade antioxidante dos carotenóides deve-se à eliminação de oxigênio singlete que resulta em carotenóides excitados que dissipam a energia recém-adquirida através de uma série de interações rotacionais e vibratórias com o solvente, voltando depois ao estado não excitado e permitindo assim que extingam mais espécies de radicais. Os únicos radicais livres que destroem completamente estes pigmentos são os radicais peróxido. Os carotenóides são relativamente não reativos, podendo decair e formar compostos não radicais que conseguem terminar os ataques de radicais livres ligando-se a eles (Paiva e Russell, 1999; Carochó e Ferreira, 2013).

Os minerais selênio e zinco são os mais importantes no que à atividade antioxidante diz respeito. O selênio pode ser encontrado em formas orgânicas e inorgânicas. Não atua diretamente nos radicais livres, mas é uma parte indispensável da maioria das enzimas antioxidantes (metaloenzimas, glutathiona peroxidase, tioredoxina redutase) que não teriam efeito sem o selênio (Tabassum *et al.*, 2010; Carochó e Ferreira, 2013). O mineral zinco tal como o selênio, não age diretamente nos radicais livres, mas é bastante importante na prevenção da sua formação. O zinco é um inibidor de NADPH oxidases que catalisam a produção do radical oxigênio singlete usando NADPH como dador de elétrões. Está presente na superóxido dismutase, uma importante enzima antioxidante que converte o radical de oxigênio singlete em peróxido de hidrogênio. O zinco induz ainda a produção de metalotioneína que é um eliminador do radical hidroxilo (Prasad *et al.*, 2004, Carochó e Ferreira, 2013).

### **1.5.2.3 Antioxidantes sintéticos**

De modo a existir um sistema padrão de medição da atividade antioxidante para comparar com antioxidantes naturais e para ser incorporado em alimentos, foram desenvolvidos



antioxidantes sintéticos. Estes compostos puros são adicionados aos alimentos fazendo com que resistam a vários tratamentos e condições, bem como para prolongar o tempo de prateleira. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são: BHA (hidroxianisol butilado), BHT (hidroxitolueno butilado), TBHQ (terc-butil-hidroquinona), PG (galato de propilo). O objetivo principal dos antioxidantes sintéticos é a prevenção da oxidação de alimentos, especialmente dos ácidos gordos (Carocho e Ferreira, 2013).

### **1.5.3 Aplicação dos antioxidantes na indústria alimentar**

Atualmente, quase todos os alimentos processados possuem antioxidantes sintéticos incorporados, que são reportados como seguros, embora alguns estudos indiquem o contrário. BHT e BHA são os antioxidantes químicos mais utilizados. Contudo, o BHA e o BHT sofreram restrições na sua utilização de regras legislativas devido a possíveis efeitos tóxicos e carcinogénicos (Gülçin, 2012; Carocho e Ferreira, 2013)

Entre 2011 e 2012, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) reavaliou toda a informação disponível sobre estes dois antioxidantes, incluindo os dados aparentemente contraditórios que foram publicados. A EFSA estabeleceu ingestões diárias aceitáveis revistas (ADIs) de 0,25 mg/kg de peso corporal/dia para BHT e 1,0 mg/kg de peso corporal/dia para BHA e observou que a exposição de adultos e crianças a estes antioxidantes provavelmente não ultrapassaria os valores definidos (EFSA, 2011; EFSA, 2012; Carocho e Ferreira, 2013). O TBHQ estabiliza e preserva a frescura, o valor nutritivo, o sabor e a cor dos alimentos para animais. Em 2004, a EFSA publicou uma opinião científica que analisou o impacto deste antioxidante sobre a saúde humana e afirmou que não havia prova científica de sua carcinogenicidade apesar dos dados conflitantes anteriores. (EFSA, 2004; Carocho e Ferreira, 2013).

### **1.5.4 Métodos para a determinação *in vitro* da capacidade antioxidante**

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse no estudo sobre a atividade antioxidante de alimentos e dietas, devido às conhecidas implicações dos radicais livres de oxigénio na evolução e desenvolvimento de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, no envelhecimento e no cancro. (García-Parrilla, 2008). Para este fim, muitos procedimentos

diferentes foram desenvolvidos para testar a capacidade antioxidante total dos alimentos (Pellegrini *et al.*, 2003; Pérez-Jiménez e Saura-Calixto, 2005). Foi assim referido que métodos confiáveis eram necessários para a avaliação da atividade antioxidante (Prior *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2004; Magalhães *et al.*, 2008).

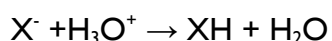
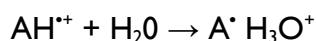
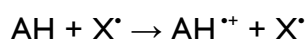
Um método padronizado para testar a atividade antioxidante de um componente alimentar devia verificar os seguintes requisitos: (1) medir as reações químicas que realmente ocorrem em potenciais aplicações; (2) utilizar uma fonte radical biologicamente relevante; (3) simplicidade; (4) usar um método com um ponto final definido e um mecanismo químico; (5) usar produtos químicos e instrumentos facilmente disponíveis; (6) boa reprodutibilidade intra e inter-dia assim como reprodutibilidade laboratorial; (7) adaptável para ensaios de antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos e uso de diferentes fontes de radicais; (8) adaptável a análises de alto rendimento para análises de controlo de qualidade de rotina (Prior *et al.*, 2005).

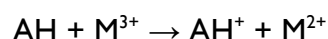
#### **1.5.4.1 Mecanismos de reação: Transferência de eletrão único (SET) e Transferência de átomos de hidrogénio (HAT)**

Os métodos para a determinação da atividade antioxidante podem ser divididos de acordo com os mecanismos de reação em transferência de eletrão único (SET) e transferência de átomos de hidrogénio (HAT).

Em geral, os métodos para determinar a capacidade antioxidante dos componentes alimentares podem desativar os radicais por dois mecanismos principais e foram divididos em dois grandes grupos: os ensaios baseados na reação SET e os ensaios baseados em HAT. O resultado final é o mesmo, independentemente do mecanismo, mas a cinética e o potencial para reações secundárias é diferente (Huang *et al.* 2005).

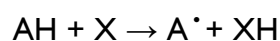
Os métodos baseados em SET detetam a capacidade de um antioxidante para transferir um eletrão para reduzir qualquer composto, incluindo metais, grupos carbonilo e radicais:





A reatividade relativa nos métodos SET baseia-se principalmente na desprotonação e no potencial de ionização do grupo reativo funcional, quando os seus valores são superiores a -45 kcal/mol (Lemańska *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2001). Estas reações dependem do pH. Em geral, os valores do potencial de ionização diminuem com o aumento do pH, refletindo o aumento da capacidade de doação de eletrões com a desprotonação. As reações SET são geralmente lentas e podem exigir um longo período de tempo para serem concluídas, de modo que os cálculos da capacidade antioxidante são baseados na percentagem de diminuição do produto em vez da cinética. Os métodos SET são muito sensíveis ao ácido ascórbico e ácido úrico assim como aos metais, que interferem e podem representar alta variabilidade e baixas reprodutibilidade e consistência dos resultados. Estas reações são perceptíveis através de uma mudança de cor à medida que o oxidante é reduzido (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005).

Os métodos baseados em HAT medem a capacidade clássica de um antioxidante para extinguir os radicais livres por doação de hidrogénio. As reações de HAT são independentes do pH, dos solventes e geralmente bastante rápidas, normalmente concluídas em segundos ou poucos minutos. Nos métodos baseados em reações de HAT, o antioxidante é capaz de extinguir os radicais livres por doação de hidrogénio:



A reatividade relativa destes métodos é determinada pela energia de dissociação da ligação do grupo de doação de H do antioxidante, que é característico de compostos com um intervalo de energia de dissociação da ligação e potencial de ionização. A presença de agentes redutores como iões metálicos em tais métodos não é recomendada porque pode originar uma reatividade aparentemente alta que é errónea (Prior *et al.* 2005; Miguel, 2010).

#### **1.5.4.1.1 Métodos baseados em SET**

Os ensaios baseados em SET envolvem uma única reação redox (oxidação-redução), sendo o oxidante o indicador para a medição do ponto final. Em vez de realmente medir a atividade "antioxidante" de uma amostra, estes métodos apenas medem a sua capacidade de redução (Benzie e Strain, 1999; Huang *et al.*, 2005; Tan e Lim, 2015).

Muitos ensaios antioxidantes comuns são baseados neste mecanismo, incluindo a capacidade de capturar eletrões do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), o método Folin-

Ciocalteu para a determinação dos fenóis totais, o Poder Antioxidante por Redução do ião Férrico (FRAP), a Capacidade Antioxidante de Redução dos ião Cobre (CUPRAC) e a Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox (TEAC) (Huang *et al.*, 2005; Tabart *et al.*, 2009).

O ensaio DPPH<sup>•</sup> tornou-se bastante popular em estudos sobre antioxidantes naturais, sendo um método indireto para determinar a capacidade antioxidante. Uma das razões é que este método é simples e muito sensível. Este ensaio baseia-se na teoria de que um dador de hidrogénio é um antioxidante. O radical DPPH é um dos poucos radicais de azoto orgânico estáveis e comercialmente disponíveis. O efeito antioxidante é proporcional ao desaparecimento do DPPH<sup>•</sup> nas amostras em teste. A monitorização do DPPH<sup>•</sup> com um espectrofotómetro UV tornou-se o método mais amplamente e geralmente usado recentemente devido à sua simplicidade e precisão. O DPPH<sup>•</sup> apresenta um máximo de absorção a 517 nm (violeta). A cor muda de violeta para amarelo seguida pela formação de DPPH após absorção de hidrogénio a partir de um antioxidante. Para padronizar os resultados de vários estudos, a unidade equivalente de Trolox tem sido usada. Trolox é uma vitamina E comercial solúvel em água. Os resultados também são expressos através do EC<sub>50</sub>, que é a quantidade necessária de antioxidantes para reduzir 50% dos radicais DPPH presentes na solução (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006; Moon e Shibamoto, 2009). Possui contudo algumas limitações, o facto de o DPPH<sup>•</sup> ser um radical azotado estável faz com que apresente pouca semelhança com os radicais peróxilo, envolvidos na peroxidação lipídica. Assim, os antioxidantes podem reagir rapidamente com os radicais peróxilo e lentamente com o radical DPPH *in vivo*. Outra limitação é o facto de haverem compostos que reagem de forma reversível com o radical DPPH, e como consequência ter-se valores de capacidade antioxidante falsamente baixos. Um exemplo é o eugenol, ou outros compostos fenólicos com uma estrutura semelhante, que ao possuírem moléculas fenólicas pequenas menos importantes e com melhor acesso ao radical apresentem valores de capacidade antioxidante, erroneamente, mais elevados (Prior *et al.*, 2005, Ndhlala *et al.*, 2010; Deshmukh e Amin, 2013; Tan e Lim, 2015).

O teste de determinação de fenólicos totais usando o reagente Folin-Ciocalteu é um dos métodos mais utilizados para quantificar o conteúdo fenólico de um extrato vegetal. É baseado numa reacção que ocorre em meio alcalino, entre os fenóis e o molibdénio e o tungsténio presentes no reagente Folin-Ciocalteu com a consequência da formação de iões de molibdénio coloridos, MoO<sup>4+</sup>. O produto formado tem coloração azul e pode ser monitorizado através

de espectrofotometria a 725-765 nm. A elevada sensibilidade, reprodutibilidade e conveniência deste ensaio tornou-o popular nos rastreios de rotina de produtos naturais (Huang *et al.*, 2005). Contudo, este método tem uma série de inconvenientes. O reagente Folin-Ciocalteu foi originalmente desenvolvido para a análise de proteínas e, portanto, não é específico para compostos fenólicos, pois pode reagir com uma grande variedade de outros compostos como aminas e aminoácidos, incluindo triptofano, hidrazina, hidroxilamina, tampões biológicos contendo amina terciária, (Ikawa *et al.*, 2003). Além disso, embora usualmente conhecido como o ensaio da determinação dos compostos fenólicos totais, o Folin-Ciocalteu não mede realmente o conteúdo fenólico, mas sim a capacidade de redução da amostra (Huang *et al.*, 2005) e, na melhor das hipóteses, fornece uma estimativa do conteúdo fenólico (Ignat, Volf e Popa, 2011). Além disso, a sua reatividade também é afetada pela presença de outros agentes redutores orgânicos e inorgânicos, tais como ácido ascórbico e sulfitos. O reagente também foi descoberto como sendo muito reativo em relação às aminas contendo -OH (tanto alifáticas como aromáticas) (Ikawa *et al.*, 2003). A popularidade generalizada do reagente Folin-Ciocalteu é em parte devido à sua facilidade e rapidez, permitindo que seja usado para a triagem de numerosas amostras num período de tempo relativamente curto e com baixos custos. Geralmente os resultados são expressos em equivalentes de ácido gálico, contudo podem ser utilizados outros padrões de referência. Uma relação positiva entre os resultados obtidos com este método e com os métodos da determinação da capacidade antioxidante, como o do radical DPPH, tem sido referida em vários estudos (Prior *et al.*, 2005; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006; Ndhlala *et al.*, 2010; Koch *et al.*, 2017).

O Poder Antioxidante por Redução do Ião Férrico (FRAP) foi desenvolvido por Benzie e Strain (1996) para medir a capacidade dos antioxidantes para reduzir o ferro Fe(III) a Fe(II). Baseia-se na redução do complexo de ferro férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina,  $[\text{Fe(III)-(TPTZ)}_2]^{3+}$  a complexo ferroso,  $[\text{Fe(II)-(TPTZ)}_2]^{2+}$  (Fig. 9) em meio ácido, formando uma intensa coloração azul. Esta redução pode ser monitorizada por meio de um espectrofotómetro a 593 nm. O ensaio é simples, rápido, pouco dispendioso e robusto (Prior *et al.*, 2005). Contudo, o método apresenta limitações. Qualquer composto (sem propriedades antioxidantes) com um potencial redox mais baixo que o do par Fe(III)/Fe(II), pode teoricamente reduzir o Fe(III) a Fe(II), resultando num valor FRAP erradamente elevado. No entanto, nem todos os antioxidantes reduzem o Fe(III) no tempo em que decorre a determinação da absorvância, usualmente 4 minutos, por exemplo, os polifenóis reagem mais lentamente e necessitam de

um tempo de reação geralmente superior a 30 minutos (Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008; Ndhlala *et al.*, 2010).

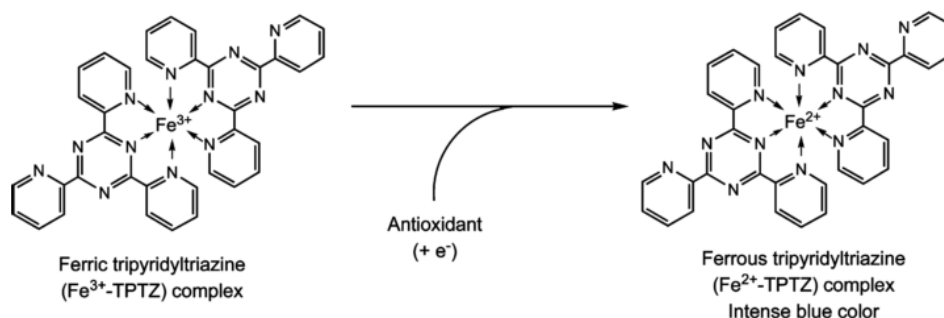


Figura 9 - Formação do complexo  $(\text{Fe}^{2+} - \text{TPTZ})$  a partir da redução do complexo  $(\text{Fe}^{3+} - \text{TPTZ})$  por um antioxidante. Fonte: Moon e Shibamoto (2009)

O teste CUPRAC é conceitualmente semelhante ao teste FRAP mas é baseado na redução do  $\text{Cu}(\text{II})$  para  $\text{Cu}(\text{I})$  por ação de redutores (antioxidantes) (Fig. 10) presentes numa amostra, num meio com pH 7, o que envolve uma cinética mais rápida. A forma reduzida do complexo  $\text{Cu}$ -neocuproína ( $\text{Cu}(\text{I})$ -neocuproína) apresenta uma coloração intensa que pode ser determinada espectrofotometricamente através da leitura da absorvância a 450 nm. É um método rápido, não necessita de aparelhos sofisticados, a reação é relativamente insensível ao ar, à luz, à humidade ou ao pH (Apak *et al.*, 2004; Amorati e Valgimigli, 2015).

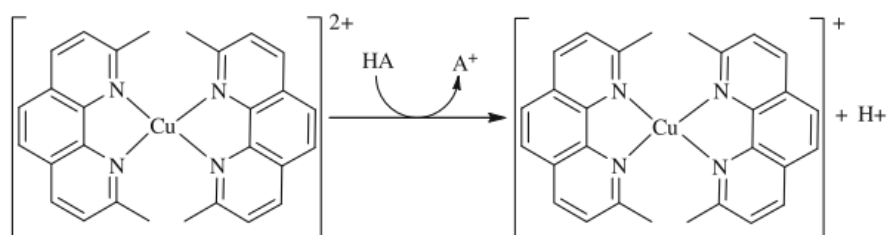


Figura 10 - Redução do  $\text{Cu}^{2+}$  para  $\text{Cu}^+$  por ação de uma molécula antioxidante (HA). Fonte: Moon e Shibamoto (2009)

O método TEAC ou ABTS baseia-se na capacidade dos compostos antioxidantes capturarem o cátion meta estável  $ABTS^{•+}$ . No decorrer do ensaio o antioxidante reduz o  $ABTS^{•+}$ , que apresenta uma cor intensa azul-verde, para ABTS, ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (Fig. 11) e torna-o num produto incolor. O poder antioxidante é determinado pela capacidade que os compostos antioxidantes têm em reduzir o radical  $ABTS^{•+}$  (Prior *et al.*, 2005; Ndhlala *et al.*, 2010). O decréscimo da coloração pode ser monitorizado espectrofotometricamente fazendo uma leitura da absorvância no comprimento de onda de 734 nm, sendo que quanto menor for a absorvância maior é a quantidade de radicais  $ABTS^{•+}$  que foram reduzidos pelos compostos antioxidantes. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox (Alam *et al.*, 2013; Pérez-Jiménez e Saura-Calixto, 2005).

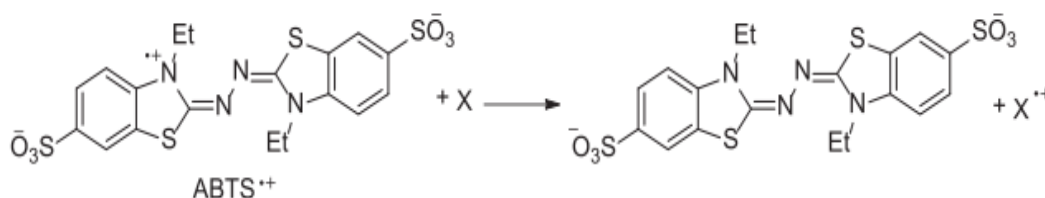


Figura 11 - Mecanismo de redução do  $ABTS^{•+}$  para ABTS por ação de um antioxidante.

Fonte: Amorati e Valgimigli (2015)

#### 1.5.4.1.2 Métodos baseados em HAT

Os ensaios baseados em HAT medem a capacidade de eliminar radicais e envolvem o uso de uma fonte sintética de radicais livres, um antioxidante e uma sonda molecular oxidável. Estes ensaios medem a cinética de reação competitiva e quantificam a atividade antioxidante com base em curvas cinéticas (Tan e Lim, 2015). Exemplos de ensaios baseados em HAT incluem a inibição do branqueamento do  $\beta$ -caroteno, a Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC) o Parâmetro Antioxidante de Captura de Radicais Totais (TRAP) e Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) (Huang *et al.*, 2005; Tabart *et al.*, 2009).

O método de inibição do branqueamento do  $\beta$ -caroteno é um método direto que permite avaliar a capacidade de compostos antioxidantes ao inibir a peroxidação lipídica. Sabe-se há muito que o caroteno reage com o radical peroxil para produzir epóxidos de  $\beta$ -caroteno. O  $\beta$ -caroteno recebeu assim atenção como um eliminador de radicais ou antioxidante. Posteriormente, foi estabelecido um ensaio antioxidante utilizando-o combinado com lipídios,

como o ácido linoleico. Os lípidos como o ácido linoleico, formam um radical peroxil ( $\text{LOO}^\cdot$ ) na presença de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) e  $\text{O}_2$  que o oxidam, oxidação essa que neste método é induzida através do calor (Reis *et al.*, 2012). Este radical peroxil reage com o  $\beta$ -caroteno para formar um radical estável conseqüentemente, a quantidade de  $\beta$ -caroteno reduz-se numa solução em teste. Se um antioxidante estiver presente numa solução, ele reage de forma competitiva com o radical peroxil. A capacidade antioxidante pode assim ser determinada pelo estado da descoloração através da sua monitorização com um espectrofotómetro a 470 nm, que é a absorção típica do  $\beta$ -caroteno. Normalmente os resultados são expressos através do coeficiente de atividade antioxidante (AAC) (Moon e Shibamoto, 2009). As principais limitações deste método são a falta de reprodutibilidade de iniciação, a complexidade da reação envolvendo carotenos sob  $\text{O}_2$  (apresentam ação antioxidante a baixas concentrações de  $\text{O}_2$ , enquanto propagam a cadeia oxidativa em soluções saturadas de ar) e o tratamento cinético grosseiro (Foti e Amorati, 2009; Alam *et al.*, 2013; Amorati e Valgimigli, 2015).

O método para medir a Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC) é baseado nos primeiros trabalhos de Ghiselli *et al.* (1995) e Glazer (1990), sendo posteriormente desenvolvido por Cao *et al.* (1993, 1995). O ensaio baseia-se na reação de radicais peroxilo com um composto fluorescente que origina um produto não-fluorescente. A atividade antioxidante é determinada pela diminuição da fluorescência que é resultado da formação de produtos não-fluorescentes. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox (Prior *et al.*, 2005; Alam *et al.*, 2013).

O método TRAP avalia a capacidade que os compostos antioxidantes têm para interferir na reação entre radicais peroxilo gerados por AAPH ou ABAP [dicloridrato de 2,2'-azo-bis-(2-metilpropanoamidina)] e um composto alvo. O mecanismo de reação é semelhante ao método ORAC. Existem variações do método cujas diferenças recaem no tipo de marcador da reação, como por exemplo, o consumo de oxigênio dissolvido, a fluorescência de R-ficoeritrina (R-PE) ou a absorvância do ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)). A fluorescência da R-ficoeritrina é extinta pelo ABAP como um gerador de radicais. Esta reação de extinção é medida na presença de antioxidantes. A capacidade antioxidante é determinada pelo tempo decorrido até à reação de todos os antioxidantes com os radicais peroxilo que pode ser monitorizada pelo decaimento na descoloração. Os resultados são expressos geralmente em equivalentes Trolox (Prior *et al.*, 2005; Alam *et al.*, 2013).



O ensaio TBARS é usado para quantificar a peroxidação lipídica. Baseia-se na reação do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) com malondialdeído (MDA) (Fig. 12), que é um dos produtos de oxidação de lípidos não saturados. Sob condições ácidas e a temperaturas elevadas (~ 100 ° C), TBA e MDA reagem na proporção de 2:1, formando um aduto de coloração rosa, que pode ser monitorizado espectrofotometricamente a uma absorção de 532 nm. Valores de absorvância baixos correspondem a pequenas quantidades formadas de MDA, o que significa uma maior capacidade de proteção contra a peroxidação lipídica pelos compostos antioxidantes presentes na amostra (Ndhlala *et al.*, 2010) Contudo, este método não consegue distinguir entre a cinética e a estequiometria da reação. Também sofre de limitações devido às reações de TBA com outros compostos não relacionados à peroxidação lipídica e à formação de bases de Schiff entre malondialdeído e aminas, levando à desestimulação da proteção antioxidante (Bozin *et al.*, 2007; Spickett *et al.*, 2010; Amorati e Valgimigli, 2015).



Figura 12 - Reação de dois ácidos 2-tiobarbitúrico com malondialdeído e formação de aduto.

Fonte: Amorati e Valgimigli (2015)

#### 1.5.4.2 Determinação do conteúdo em flavonóides totais

O método para a determinação dos flavonóides totais consiste na formação de complexos estáveis entre o alumínio e os flavonóides em meio alcoólico (Linda e Castro, 2008). Esta formação vai originar uma coloração avermelhada que pode ser monitorizada através de um espectrofotómetro a uma absorção máxima de 510 nm. Os resultados são apresentados em equivalentes de epicatequina ou outro padrão de referência (Naczk e Shahidi, 2006; Chowdhury *et al.*, 2015). É um método muito seletivo para as estruturas flavonóides, sendo que a reação entre os derivados de isoflavona e o cloreto de alumínio não origina formação de cor. Embora, não seja um método que avalie diretamente a capacidade antioxidante, permite quantificar um grupo específico de compostos fenólicos (Chang *et al.*, 2002; Palacios *et al.*, 2011).

## I.6 Inflamação

Inflamação, ou resposta inflamatória, é uma resposta biológica e fisiológica dos tecidos vivos à agressão (como exposição ao calor ou ao frio, isquemia, trauma, bactérias, químicos, etc.), fundamentada na vascularização, e que conduz à orientação dos meios de resposta (particularmente os celulares) para o local onde se processou a agressão para tentarem restaurarem o tecido lesionado para o seu estado pré-lesão. É considerada o paradigma da resposta imunitária inespecífica, caracterizando-se fundamentalmente por diversos fenómenos locais (que decorrem na zona da lesão) associados a alterações sistémicas e que no seu conjunto configuram a chamada reação de fase aguda (Pinto e Rosa, 2007).

O tecido agredido induz na microcirculação uma vasodilatação dos vasos sanguíneos locais. As alterações no calibre dos vasos dependem da intensidade do estímulo, isto é, quanto mais intenso mais rapidamente se verificam as alterações, que conduzem a um afluxo de sangue excessivo ao tecido: verifica-se vasoconstrição transitória, que dura apenas alguns segundos, seguida de vasodilatação, que justifica o rubor e o calor característicos da inflamação. Segue-se um aumento da permeabilidade dos capilares, que permitem que as proteínas plasmáticas e os leucócitos saiam dos vasos para os tecidos. Este movimento de proteínas e plasma para fora dos vasos reduz a pressão osmótica intravascular e a acumulação de água e proteínas no espaço extravascular resultando em edema. Ocorre o transporte de mediadores celulares e moleculares através da migração de grandes números de granulócitos e monócitos para os tecidos e por fim, acontece o inchaço das células dos tecidos (Guyton e Hall, 2006; Pinto e Rosa, 2007).

A resposta inflamatória é uma resposta inata, estereotipada, independente da natureza do estímulo (agressor) e da existência ou não de contactos prévios com o mesmo. Ainda que o objetivo principal da resposta inflamatória seja deter a agressão, a inflamação é uma resposta paradoxal e já que ao ser inespecífica acaba por atingir o tecido adjacente à lesão. Este facto dá origem a sinais e sintomas que podem sobrepor-se aos sinais clássicos, ou sinais *major* da inflamação: calor, rubor, tumor, dor. Um quinto sinal, impotência funcional foi acrescentado (Pinto e Rosa, 2007).

A inflamação pode ser classificada como aguda e crónica: a aguda com um curso breve e de resposta rápida à agressão e a crónica de curso arrastado e menos exuberante na tradução clínica e laboratorial (Pinto e Rosa, 2007).

A inflamação desempenha um papel importante em várias doenças, como a artrite reumatóide, a aterosclerose e a asma, que apresentam uma alta prevalência mundial (Mueller *et al.*, 2010).

## **1.6.1 Inflamação aguda**

A resposta inflamatória aguda é definida como uma série de respostas teciduais que podem ocorrer dentro das primeiras horas após a lesão. Consiste numa complexidade de eventos que envolve vazamento de água, sal e proteínas do compartimento vascular; ativação de células endoteliais; interações adesivas entre leucócitos e o endotélio vascular; recrutamento de leucócitos; ativação de macrófagos e neutrófilos; ativação de plaquetas; ativação do complemento; sistemas de coagulação e fibrinolíticos e libertação de proteases e oxidantes de células fagocíticas, podendo todos ajudar a lidar com o estado da lesão (Ward, 2010).

A resposta inflamatória é assim exuberante nas primeiras horas ou dias e depois diminui gradualmente, a menos que o agente que a provocou não tenha sido eliminado pela fagocitose. Existem inúmeras alterações dentro do compartimento vascular que desencadeiam a resposta inflamatória aguda, envolvendo pelo menos seis eventos intravasculares. A primeira alteração é a ativação de células endoteliais, durante a qual essas células começam a expressar moléculas de adesão para leucócitos nas superfícies. As células endoteliais ativadas também se envolvem na formação e libertação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que atraem e ativam os leucócitos polimorfonucleares à medida que essas células aderem ao endotélio antes da sua migração para o compartimento extravascular. O segundo evento é a abertura reversível de ligações apertadas de células endoteliais, o que permite o vazamento de proteínas e fluidos do compartimento vascular para o compartimento extravascular. Quando se desenvolve um edema extenso em compartimentos fechados, isso pode resultar num aumento da pressão hidrostática que pode prejudicar gravemente as funções do órgão. A reversibilidade das alterações de ligações no endotélio vascular implica que estas têm a capacidade de fechar para conter o líquido do edema acumulado no compartimento extravascular. O terceiro fator são as interações adesivas entre os leucócitos polimorfonucleares e as células endoteliais. Normalmente os leucócitos são levados na corrente sanguínea sem contactarem com as superfícies endoteliais. Os leucócitos polimorfonucleares submetem-se a respostas de ativação, enquanto as células endoteliais sofrem ativação, levando ao aparecimento de moléculas de adesão nas faces laminares das células endoteliais. De seguida, os leucócitos polimorfonucleares são ativados ficando rígidos, não podendo assim sofrer deformação para

se ajustar aos confins apertados dos capilares. Em quinto ocorre a ativação das plaquetas, que geralmente está associada à conversão de protrombina em trombina. O resultado final é a adesão entre várias plaquetas (resultando em agregados), bem como a células endoteliais. Finalmente, a resposta inflamatória aguda pode estar associada a hemorragia, provocada por danos estruturais diretos (reversíveis ou irreversíveis) à barreira endotelial. A hemorragia ocorre após traumatismo térmico por calor ou frio, em situações de disfunção ou de deficiência de plaquetas, após infeções devido à libertação de toxinas e em pacientes submetidos a terapia com anticoagulantes excessivos, entre outros exemplos. O seu desenvolvimento implica que a vasculatura foi severamente danificada (Ward, 2010).

## **1.6.2 Inflamação crónica**

Tal como descrito por Pinto e Rosa (2007) poderia parecer que a designação clássica de inflamação crónica corresponderia à inflamação que persiste, mas não é isso que os autores defendem. A inflamação crónica limita-se à inflamação que persiste enquanto se mantiver o mecanismo de agressão, terminando logo que ele cesse. Por exemplo, a inflamação granulomatosa que é um padrão especial de inflamação crónica, caracterizado pela acumulação de macrófagos ativados e que pode ocorrer na tuberculose, ou em resposta a exposição a partículas inertes, formando neste caso o granuloma de corpo estranho, é crónica enquanto se mantiver a tuberculose ou a agressão por partículas, tudo o que continue a ocorrer após o termo da agressão já é inflamação que persiste. A diferença está no facto de a partir do momento em que termine a agressão, a inflamação passa a ser autónoma, auto-entretida, independente de fenómenos externos ao hospedeiro e ditada pelas características de regulação biológica do próprio organismo onde se instaurou.

É importante conhecer-se e caracterizar-se o processo inflamatório persistente, que não se resolve, já autonomizado da agressão. Neste sentido tem vindo a tornar-se mais clara a intervenção de alguns mediadores, como macrófagos, da resposta inflamatória, que parecem ser elementos decisivos na evolução desta resposta e na importância das células do tecido (células do estroma) onde decorre a inflamação. Na verdade, a resolução ou persistência da inflamação passa por várias fases, com pelo menos dois pontos de comutação muito importantes: no primeiro, opera-se a mudança de um infiltrado celular neutrofílico para monocítico (através da comutação de quimiocinas CXC para CC, regulada pela IL-6 e outras

citocinas); no segundo, permite-se que as células infiltrantes sejam destruídas, resolvendo o processo inflamatório, ou que aumente a infiltração celular, com ativação de células do estroma (MØs e fibroblastos) e consequente auto-entretenimento do processo inflamatório persistente; para esta permutação de sentido persistente é importante a ação do IFN- $\beta$  e de quimiocinas CXC, como a CXCL12 (Pinto e Rosa, 2007).

### **1.6.2.1 Colite ulcerativa**

A colite ulcerativa é uma perturbação inflamatória do cólon, de etiologia desconhecida, que compromete o recto e tem uma disseminação proximal a uma distância variável. É caracterizada por recidivas e remissões, com um primeiro ataque a ocorrer na maioria das vezes entre os 20 e os 40 anos. A sua incidência é cerca de 1 em 10 000 pessoas por ano nas áreas de grande incidência que incluem EUA, Reino Unido, Austrália e Europa do Norte, e a sua prevalência é de cerca de 1 em 1000 na população geral (Hebden *et al.*, 2009).

Em aproximadamente 50% dos casos, a colite ulcerativa afeta a região rectal/rectossigmoideia, em cerca de 20%-30% afeta o lado esquerdo do colón (até ao ângulo esplénico), e em 20% das pessoas, afeta todo o colón (pancolite ou colite total). A apresentação é muitas vezes lenta e insidiosa mas pode ser abrupta e grave. O cancro colorretal associado à colite é um tumor que se desenvolve no contexto da inflamação crónica e é considerada a complicação mais grave das doenças inflamatórias intestinais. Pacientes com colite ulcerativa estão mais propensos a desenvolver cancro colorretal, risco de 20 a 30 vezes, quando comparados à população em geral. Além disso, o risco de desenvolver cancro colorretal associado à colite aumenta notavelmente 8 a 10 anos após o diagnóstico de doenças inflamatórias intestinais (Hebden *et al.*, 2009; Direito *et al.*, 2017).

Os sintomas de colite ulcerativa incluem diarreia, sangramento retal e cólicas abdominais. O diagnóstico depende da história clínica, baseia-se nas características sigmoidoscópicas ou colonoscópicas (juntamente com espécimes histológicos) e a exclusão da infeção (por cultura de fezes). A inflamação é caracteristicamente confluenta, com maior granularidade e aparência hemorrágica. Os primeiros sinais tendem a ser uma perda subtil de padrões vasculares com hiperemia e edema da mucosa. Com uma inflamação mais ativa, a mucosa torna-se granular com presença de mucopus e sangramento por contato. Em casos avançados, pode apresentar ulceração profunda. O stress oxidativo também desempenha um papel significativo na patogénese da colite ulcerativa. Os antioxidantes endógenos, como a superóxido dismutase,

a glutatona e a catalase normalmente são capazes de contrariar o *stress* oxidativo na mucosa intestinal. Contudo, a inflamação aumenta a demanda por esses antioxidantes e resulta num desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes com subsequente dano da mucosa (Ho *et al.*, 2007; Hebden *et al.*, 2009; Mandalari *et al.*, 2011; Impellizeri *et al.*, 2015).

O diagnóstico assim como as estratégias de tratamento dependem tanto da gravidade como da extensão da doença. A gravidade é avaliada segundo os seguintes parâmetros: frequência das dejeções; presença ou ausência de sangue nas fezes; taquicardia; febre; estimativas da hemoglobina, albumina e marcadores inflamatórios (velocidade sedimentação dos eritrócitos, proteína C reativa ou oromucóides). A extensão deve ser estimada por sigmoidoscopia flexível ou colonoscopia, a pergunta-chave é se a doença estará confinada ao lado esquerdo do colón (isto é, distal relativamente ao ângulo esplénico) ou se se estende de forma mais proximal (colite extensa ou total, caso todo o colón esteja comprometido). Os principais tratamentos são os 5-aminossalicilatos e esteróides (orais ou rectais) e a azatioprina ou 6-mercaptopurina. Crises graves, marcadas por frequência extrema, perturbações sistémicas, anemia e hipoalbuminemia, resultam numa colectomia de emergência em 20-30% da totalidade dos casos (Hebden *et al.*, 2009).

#### **1.6.2.1.1 Fisiopatologia**

A primeira linha de defesa do sistema imunitário é a barreira epitelial, coberta por uma camada mucinosa, porque proporciona uma separação física e sintetiza os péptidos antimicrobianos. Na colite ulcerativa, a síntese e a alteração da sulfatação de mucinas colónica diminui. Danos na barreira epitelial leva a uma maior permeabilidade, possivelmente devido à regulação irregular das junções apertadas. Esta perda de barreira permite o aumento da captação de antigénios luminais. Além da criação de uma barreira física, o epitélio intestinal contribui para a defesa do hospedeiro através da produção de péptidos antimicrobianos (como defensinas), limitando assim a invasão bacteriana. (Heller *et al.*, 2005; Ordás *et al.*, 2012).

Existe evidência de modelos animais geneticamente modificados, que desenvolvem inflamação intestinal crónica após a colonização com bactérias intestinais comensais, mas permanecem livres de doenças em condições livres de bactérias, sugerindo um papel primário das bactérias entéricas não patogénicas na patogénese da colite ulcerativa. Estudos em seres humanos também suportam a importância da microflora entérica, não só na patogénese da doença, mas também na gravidade da inflamação intestinal e fenótipo da doença (Ordás *et al.*, 2012).

Os antígenos ativam a resposta imune inata através da interação com macrófagos e células dendríticas. As células dendríticas podem enviar dendrites fora do epitélio, para fazerem o reconhecimento de bactérias e outros antígenos no lúmen. Este é povoado por macrófagos e células dendríticas que apresentam antígenos a células B e células T, o que leva à ativação de respostas imunes adaptativas. As células dendríticas expressam uma ampla gama de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (TLR), cujo principal papel é fornecer defesa contra agentes patogênicos e proteção contra lesões epiteliais, contribuindo assim para a homeostase intestinal e manutenção da barreira epitelial. A ativação de TLR desencadeia respostas imunes inatas e adaptativas que levam à ativação da transcrição do fator-kB (NF-κB) e outros fatores de transcrição que são importantes na ativação da cascata de inflamação. Na inflamação crônica intestinal, o NF-κB regula as funções pró-inflamação e de sobrevivência celular em macrófagos e células T, mas também é protetor em células epiteliais, o que torna o seu papel na inflamação intestinal complicado e dependente do tipo de célula (Ordás *et al.*, 2012).

Na mucosa de pacientes com colite ulcerativa, o equilíbrio homeostático entre células T reguladoras e efectoras é perturbado. A evidência sugere que a colite ulcerativa está associada a uma resposta atípica de células-T *helper* (Th2) mediada por células-T *killer* naturais que produzem interleucinas 5 e 13. A interleucina 13 (IL-13) é de particular importância porque exerce funções citotóxicas contra as células epiteliais, incluindo a indução da apoptose e a alteração da composição proteica das junções apertadas. A IL-13 e as células-T *killer* parecem ter um papel fundamental na patogênese da colite ulcerativa, porque o bloqueio desta interleucina e depleção das células T pode prevenir o desenvolvimento da doença (Heller *et al.*, 2005; Ordás *et al.*, 2012).

O recrutamento de leucócitos para a mucosa inflamada pela libertação de quimioattractores, como o CXCL8 é importante para a amplificação da resposta inflamatória. As citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de moléculas de adesão - por exemplo, molécula de adesão celular de adressina vascular mucosal-I (MAdCAM-I) - no endotélio vascular dos vasos sanguíneos da mucosa, que promove a adesão e extravasamento de leucócitos no tecido. A MAdCAM-I, através da interação com a integrina- $\alpha 4\beta 7$ , atua como mediador no caminho de linfócitos para o tecido linfoide associado ao intestino durante a inflamação. Os anticorpos para a MAdCAM-I e para a integrina- $\alpha 4\beta 7$  impedem o recrutamento de linfócitos e reduzem a gravidade da inflamação do colón (Fig. 13) (Matsuda *et al.*, 2009; Ordás *et al.*, 2012).

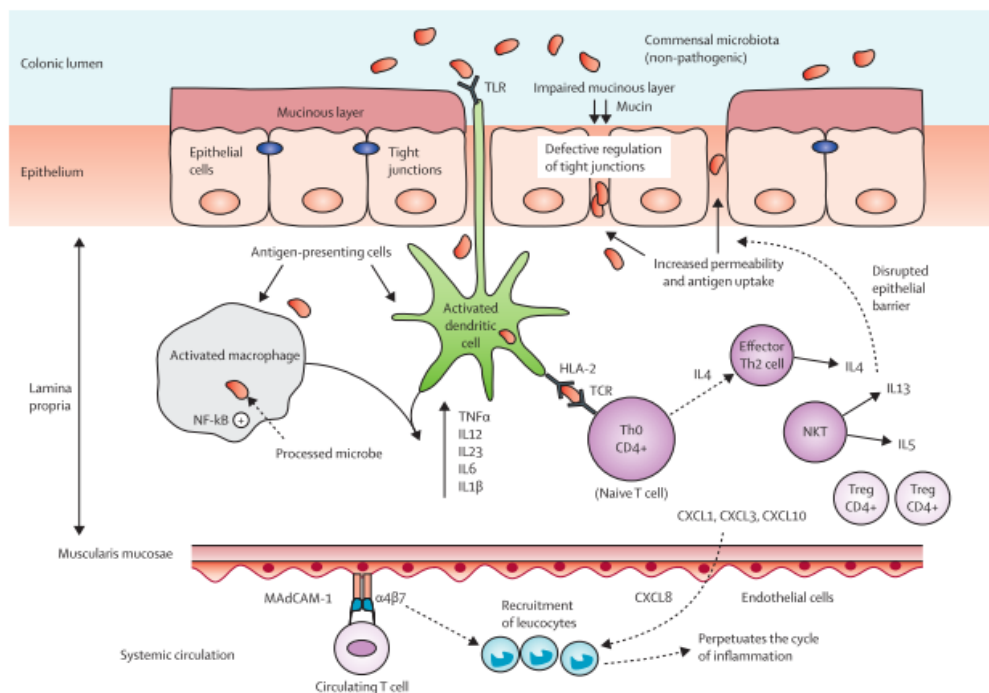


Figura 13 - Fisiopatologia da colite ulcerativa.

Fonte: Ordás *et al.* (2012)

### 1.6.3 Compostos fenólicos e a sua ação anti-inflamatória

Muitos dos estudos realizados sobre os compostos bioativos de plantas são feitos na perspectiva da atividade antioxidante. Contudo outras investigações sobre efeitos anti-inflamatórios e anti-tumorais levam a crer que os polifenóis, nomeadamente os compostos fenólicos, podem não servir apenas como eliminadores de radicais livres, podendo também modular os processos de sinalização celular durante a inflamação ou podem servir eles próprios como agentes de sinalização (Rubió *et al.*, 2013).

Vários compostos fenólicos e derivados de especiarias e plantas têm sido descritos como exibindo atividade anti-inflamatória. Diferentes estudos demonstraram ainda uma associação entre a dieta típica ocidental, rica em amidos refinados, açúcares, ácidos saturados e gorduras *trans* e pobres em frutas, vegetais, fibras, ácidos gordos, omega-3 e grãos integrais, com uma maior tendência para distúrbios inflamatórios e doenças relacionadas, como doenças cardiovasculares, artrite ou diabetes. A fim de reduzir a inflamação, uma dieta rica em frutas e vegetais, como é a dieta mediterrânea, tem sido negativamente correlacionada com inúmeras



doenças associadas a distúrbios inflamatórios. Neste sentido, vários polifenóis alimentares demonstraram melhorar os estádios inflamatórios através de diversos mecanismos (Giugliano *et al.*, 2006; González-Gallego *et al.*, 2010; Chrysohoou e Stefanadis, 2013; Rubió *et al.*, 2013).

Os últimos estudos e evidências experimentais e epidemiológicas sobre as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias dos ácidos hidroxicinâmicos concluíram que estes compostos fenólicos, presentes nos alimentos, podem exercer uma miríade de benefícios para a saúde, melhorando assim as doenças crônicas associadas ao *stress* oxidativo, como é o caso da colite ulcerativa, do cancro, de doenças cardiovasculares, da hipertensão e de distúrbios neurodegenerativos. Vários estudos mostraram que os polifenóis são muito reativos às ROS e inibem as atividades de muitas proteínas inflamatórias, como a NF- $\kappa$ B e a expressão de genes associados à doença inflamatória crônica (Rubio *et al.*, 2013; Impellizzeri *et al.*, 2015).

# **Capítulo II**

## **Objetivos**

## 2. Objetivos

O objetivo deste trabalho é estudar as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias da pasta de cacau e do chocolate preto, de modo a contribuir para um melhor conhecimento das propriedades bioativas destes alimentos.

Para atingir este objetivo neste trabalho far-se-á o estudo de:

- Teor em compostos fenólicos e flavonóides dos extratos obtidos de pasta de cacau e chocolate com 70 e 85% de cacau, uma vez que a literatura indica que estes são os principais responsáveis pelos atributos benéficos para a saúde do cacau e do chocolate preto.
- Atividade antioxidante dos extratos.
- Atividade anti-inflamatória do chocolate de 70% de cacau e da pasta de cacau usando um modelo *in vivo* de colite ulcerativa.

# **Capítulo III**

## **Materiais e**

### **Métodos**

## **3. Materiais e métodos**

### **3.1 Amostragem**

Para a execução deste estudo foram analisados extratos de pasta de cacau e chocolate preto com percentagens de 70 e 85% de cacau. As amostras, de chocolate e de pasta de cacau, foram fornecidas por uma empresa portuguesa de chocolates. Esta empresa produz os seus chocolates a partir de cacau obtido nos países Costa do Marfim e Gana.

### **3.2 Materiais**

#### **3.2.1 Ensaios *in vitro***

##### **3.2.1.1 Reagentes**

Na realização dos ensaios *in-vitro* foram utilizados os seguintes reagentes: n-hexano (Sigma-Aldrich  $\geq 97\%$ ), metanol absoluto (Merck), etanol absoluto (Merck  $\geq 99,9\%$ ); 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) (Sigma-Aldrich), ácido gálico (Sigma-Aldrich), cafeína (Sigma-Aldrich), ácido cítrico (Sigma-Aldrich), EGC 98% (Sigma-Aldrich), EGCG 95% (Sigma-Aldrich), EC  $\geq 90\%$  (Sigma-Aldrich), EGCG  $\geq 80\%$  (Sigma-Aldrich), BHT (Sigma-Aldrich), TBHQ (Sigma-Aldrich); clorofórmio (Panreac),  $\beta$ -caroteno (Sigma-Aldrich), Tween<sup>®</sup> 40 (Sigma-Aldrich), ácido linoleico (Sigma-Aldrich); ácido gálico (Sigma-Aldrich), Reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), carbonato de sódio (Merck); epicatequina (Sigma-Aldrich), nitrito de sódio (Sigma-Aldrich), cloreto de alumínio (Sigma-Aldrich) e hidróxido de sódio (Merck), água destilada e água ultrapura.

#### **3.2.2 Ensaios *in vivo***

##### **3.2.2.1 Animais**

No ensaio do modelo de colite ulcerativa foram utilizados 38 ratinhos machos da estirpe CD-1 com peso que variou entre as 25g e as 40g, com 5 a 6 semanas de idade (Harlan Iberica, Barcelona, Espanha). Foram mantidos em gaiolas padrão de polipropileno com acesso a água

e a comida (IPM-R20 (Leticia) *ad libitum*, numa sala com ambiente controlado mantida a cerca de 22°C com um ciclo de 12 horas de luz, 12h escuro na Instalação Central de Animais na Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.

As experiências foram conduzidas de acordo com a *Guidance in the Operation of Animals (Scientific Procedures) Act 1986*, publicada pelo escritório estacionário de Sua Majestade, Londres, Reino Unido e o Guia do Comitê Institucional de Pesquisa de Animais para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório publicados pelos Institutos Nacionais de Saúde dos USA (Publicação NIH nº 85-23, revista em 1996), assim como os regulamentos CE atualmente adotados (Diretiva 2010/63/UE). O protocolo experimental foi autorizado pela Comissão de Ética Animal da Faculdade Farmácia da Universidade de Lisboa.

### **3.2.2.2 Reagentes e soluções**

Na realização dos ensaios *in-vivo* foram utilizados os seguintes reagentes: cetamina (Imalgene® 1000) e xilazina (Rompun® 2%) compradas em Bio2 Produto Veterinários, ácido 2,4,6 – trinitrobenzeno sulfónico (TNBS) 5% (Sigma-Aldrich), etanol a 50% (Sigma-Aldrich), solução fisiológica estéril (B.Braun), formol (Sigma-Aldrich).

## **3.3 Métodos**

### **3.3.1 Desengorduramento dos chocolates e pasta de cacau**

As amostras começaram por ser desengorduradas de modo a remover os lípidos que possuem e que mais à frente iriam interferir nas análises a que seriam sujeitas. Este processo foi realizado segundo uma adaptação feita à metodologia proposta por Counet *et al.* (2006). Consistiu em pesar 50g de cada uma das amostras para balões de fundo redondo e derretê-las em banho-maria até obter uma pasta homogénea. Adicionou-se 100 ml de n-hexano na proporção de 1:2 (amostra: solvente) e as amostras foram colocadas num banho ultra-sons (Bandelin Sonorex RK 510 S) durante 10 minutos, de seguida foram mantidas sob agitação em placa de agitação (KL 2) a 420 rpm (máximo permitido pelo equipamento) durante 20 minutos

à temperatura ambiente. A solução obtida foi então filtrada. Primeiramente esta etapa foi realizada por filtração com papel de filtro (Whatman nº1) e funis contudo, tendo em conta a morosidade do método e dada a substancial quantidade de solução para filtrar passou-se a fazer esta etapa com filtração a vácuo acoplando um kitassato a uma bomba de vácuo (Büchi V-700) e utilizando um funil de Büchner de vidro com placa porosa G1 o que permitiu acelerar um pouco o processo devido à pressão baixa que se cria no kitassato. As frações das amostras obtidas após a filtração foram raspadas do papel de filtro de novo para os balões. Toda esta etapa de extração sólido-líquido foi repetida 5 vezes devido ao elevado teor de gordura das amostras. A quantidade de n-hexano adicionada foi sempre de 100 ml, o que fez com que a proporção amostra: solvente fosse aumentando ao longo da repetição das etapas uma vez que os chocolates e a pasta de cacau iam perdendo gordura e conseqüentemente peso/gramas. Após a última filtração o solvente foi descartado e as frações das amostras de chocolate e pasta de cacau foram secas numa estufa (Memmert U 10) durante 10 minutos a 40°C de modo a eliminar qualquer eventual solvente residual. Com os chocolates e a pasta de cacau secos e desengordurados passou-se à preparação dos extratos.

### **3.3.2 Preparação e extração das amostras**

Das amostras obtidas, depois de serem sujeitas à remoção de lípidos, pesou-se 4g de chocolate com 70% de cacau, 4g de chocolate com 85% de cacau e 2g de pasta de cacau. Os ensaios foram realizados em duplicado. Foram adicionados 50 ml de etanol absoluto para todas as determinações com exceção dos fenólicos totais em que se adicionou 50 ml de metanol na preparação dos extratos para posterior leitura (Laličić-Petronijević *et al.*, 2016). Nesta etapa foram testados outros reagentes, como água destilada, acetona e uma solução de água destilada e etanol 50% (v/v) (Veber *et al.*, 2014; Alam *et al.*, 2013) também com a quantidade de 50 ml, no entanto devido ao facto do rotavapor (Büchi RE 111) e ao tempo que este demorava a evaporar estas soluções (cerca de 5 - 6 horas para evaporar 50 ml) eliminaram-se estas opções e continuou-se o trabalho com o etanol e metanol. Todos os extratos foram colocados a agitar numa placa de agitação (KL 2) durante 30 minutos a 420 rpm à temperatura ambiente e depois a mistura foi centrifugada a 15°C durante 15 minutos a 4000 G (Sigma 3-16k). De seguida, retirou-se o sobrenadante para um balão piriforme e colocou-se a evaporar o etanol/metanol num evaporador rotativo (Büchi RE 111) a 50 °C até à secura. Seguidamente os balões foram colocados na estufa (Memmert U 10) a 50°C durante 10 minutos de modo a se assegurar que todo o solvente se havia evaporado. O resíduo seco obtido foi dissolvido

num volume final de etanol e metanol, previamente calculado tendo em conta a quantidade de extrato obtida em mg, de modo a se obter uma concentração de 5 mg/ml para todos os extratos preparados de chocolate com 70% de cacau, chocolate com 85% de cacau e pasta de cacau. A partir destas soluções foram preparadas outras diluições para avaliar a capacidade antioxidante através de diferentes ensaios colorimétricos.

### 3.3.3 Determinação dos compostos fenólicos totais

Este método foi realizado segundo Erkan, Ayranci e Ayranci (2008) com algumas modificações. Adicionou-se, em tubos de ensaio, 7,5 ml de reagente Folin-Ciocalteu (previamente diluído dez vezes em água ultrapura, 1:10 v/v) a uma alíquota de 1 ml do extrato (que para este método foi preparado com metanol, deixou-se a repousar à temperatura ambiente durante 5 minutos. De seguida, adicionou-se 7,5 ml de solução aquosa de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) com uma concentração de 60mg/ml (preparada com água ultrapura). As soluções foram agitadas e guardadas durante duas horas ao abrigo da luz para o desenvolvimento da coloração. Após este período mediu-se a absorvância num espectrofotómetro (Hitachi U-3900) a 725 nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE). A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita para os 3 extratos (chocolate com 70% cacau, chocolate com 85% cacau e pasta de cacau) sempre em triplicado e numa concentração de 0,25 mg/ml (1:20 v/v) depois de várias tentativas de diluições e leituras de modo a que todos os valores obtidos caíssem no intervalo de valores da reta (Fig. 14).

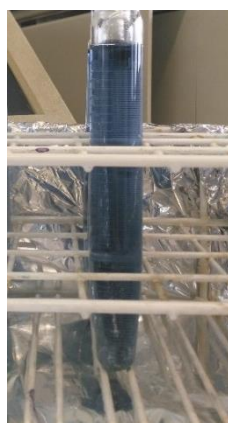


Figura 14 - Determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais. Coloração característica da presença de compostos fenólicos.



Foi preparada uma solução *stock* de ácido gálico com concentração de 10 mg/ml, a partir da qual se fizeram três soluções intermédias de 5 mg/ml. A partir destas soluções intermédias fizeram-se soluções de diferentes concentrações. Procedeu-se ao método dos fenólicos totais, como descrito anteriormente, para as diferentes diluições. Determinaram-se cinco concentrações que obtivessem absorvâncias no intervalo obtido para as amostras. Posteriormente, fizeram-se diluições a partir das outras duas soluções de 5 mg/ml, de forma a obter os valores em triplicado. A curva de calibração, absorvância (nm) vs concentração (mg/ml), do ácido gálico, foi feita com a média dos triplicados que permitiu calcular os equivalentes de ácido gálico por g de extrato e por g de amostra (mg GAE/g de extrato e amostra).

### 3.3.4 Determinação dos flavonóides totais

Para a determinação dos flavonoides totais seguiu-se a metodologia de Yoo *et al.* (2008). Adicionou-se num tubo de ensaio 1 ml do extrato (concentração de 0,5 mg/ml (1:10 v/v)) com 4 ml de água ultrapura, de seguida, adicionou-se 0,3 ml de nitrito de sódio,  $\text{NaNO}_2$  (5%, p/v preparado com água ultrapura) e homogeneizou-se. Após 5 minutos juntou-se 0,6 ml de cloreto de alumínio,  $\text{AlCl}_3$  (10%, p/v, preparado com água ultrapura) e voltou-se a homogeneizar. Passados 6 minutos adicionou-se 2 ml de hidróxido de sódio,  $\text{NaOH}$  (1 M, preparado com água ultrapura) e 2,1 ml de água destilada, de modo a perfazer 10 ml (Fig. 15). As absorvâncias foram medidas num espectrofotómetro (Hitachi U-3900) a 510 nm, usando água como branco. Os resultados foram expressos em equivalentes de epicatequina por g de extrato (mg de ECE/g de extrato). Os ensaios foram realizados em triplicado.

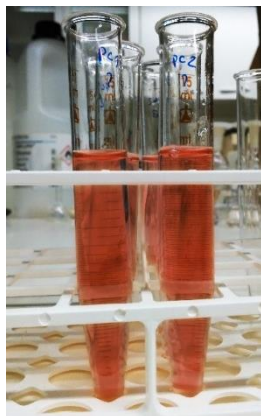


Figura 15 - Realização do ensaio da determinação dos flavonóides totais.

Para a preparação da curva padrão da epicatequina foi inicialmente preparada uma solução *stock* de epicatequina com uma concentração de 1 mg/ml e, a partir desta fizeram-se diluições de diferentes concentrações. Fez-se o ensaio dos flavonóides totais como descrito anteriormente, para as várias diluições. Determinaram-se cinco concentrações que dessem origem a absorvâncias no intervalo obtido para as amostras. Os ensaios foram realizados em triplicado. Para traçar a curva de calibração com a absorvância (nm) vs a concentração (mg/ml) utilizou-se a média dos triplicados. Calcularam-se os equivalentes de epicatequina por g de amostra (mg de ECE/g de amostra).

### **3.3.5 Determinação da capacidade antioxidante pelo Sistema de inibição do radical livre DPPH**

O seguinte método avalia a atividade antioxidante através da capacidade que os compostos presentes nas amostras têm para capturar radicais DPPH.

O método utilizado foi adaptado da metodologia utilizado por Moure *et al.* (2001). Começou-se por preparar diluições dos extratos, que previamente estavam com concentração de 5 mg/ml, de modo a ficarem com uma concentração de 0,5 mg/ml, foi então efetuada uma diluição de 1:10. A metodologia foi aplicada mas com uma alteração no tempo de reação da amostra com o radical, de 16 para 30 minutos. Foi preparada num balão âmbar uma solução metanólica de DPPH' com concentração 14,2 µg/ml. De seguida, em tubos de ensaio fez-se reagir 50 µL de amostra com 2 ml da solução metanólica de DPPH' e colocaram-se os tubos ao abrigo da luz durante 30 minutos. No caso dos controlos, utilizou-se 50 µL do solvente utilizado na preparação dos extratos, que foi etanol. Após os 30 minutos da reação procedeu-se à leitura das absorvâncias a 517 nm num espectrofotómetro (Hitachi U-3900) para avaliar a redução do radical DPPH que, ao verificar-se, provoca uma descoloração da solução de radical DPPH e, conseqüentemente, uma diminuição da absorvância face ao controlo (Fig. 16). Todas as amostras foram analisadas em triplicado. O valor final da diluição a utilizar para fazer as leituras foi obtido depois de várias tentativas até se obter uma concentração que permitisse que todas as leituras caíssem no intervalo de valores da reta trolox.

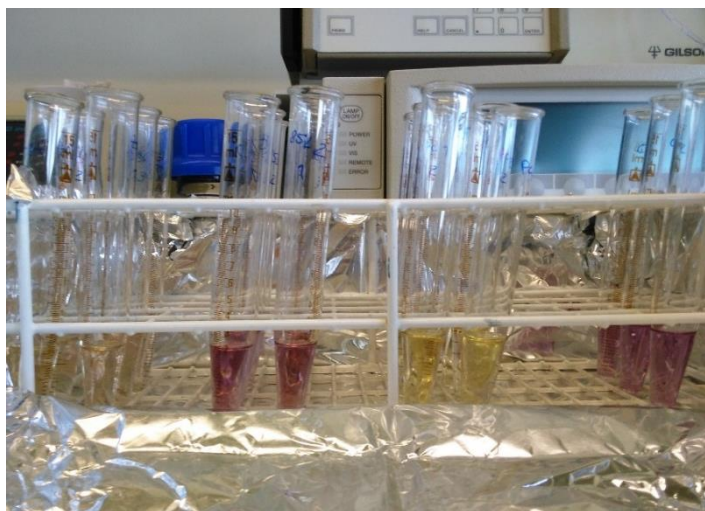


Figura 16 - Realização do ensaio da capacidade antioxidante pelo sistema de inibição do radical livre DPPH.

A percentagem de inibição (IP%) do radical DPPH foi calculada pela seguinte equação:

$$IP(\%) = \left( \frac{Ac - AA\ 30}{Ac} \right) \times 100$$

Em que:

IP (%) – percentagem de inibição do radical DPPH;

Ac – absorvância do controlo;

AA 30 – absorvância da amostra aos 30 minutos.

A percentagem de inibição expressa a quantidade de radicais DPPH que foram captados pelos compostos antioxidantes do chocolate e da pasta de cacau. Depois de calculada a IP foi avaliada a atividade antioxidante através do equivalente Trolox. O Trolox é um antioxidante sintético hidrossolúvel, semelhante à vitamina E, usado para fazer comparações entre a capacidade antioxidante de uma dada substância com a do Trolox. Esta comparação é denominada por equivalente Trolox e é apresentada em  $\mu\text{g ET/ml}$  (Kuskoski *et al.* 2006). Para esta comparação foi preparada uma curva de calibração, IP % vs concentração mg/ml, a partir de uma solução padrão de Trolox. Assim a partir da curva obtida determinou-se a equação linear para calcular o  $EC_{50}$  (mg/ml) que consiste na concentração necessária de amostra para captar 50% da quantidade de radicais livres DPPH presentes na solução. Os resultados da atividade captadora de radicais DPPH são expressos pelo  $EC_{50}$  (mg/ml).

### 3.3.6 Determinação da capacidade antioxidante pelo Teste do Branqueamento do $\beta$ -Caroteno

Este ensaio, assim como o anterior é um método colorimétrico que permite avaliar a capacidade antioxidante. A metodologia utilizada para este trabalho foi adaptada do método descrito por Miller (1971). O procedimento utilizado detém uma mudança no período de tempo a que as amostras ficam sujeitas à temperatura de 50°C, passando de 3 horas para 2. Começou-se por preparar a solução de  $\beta$ -caroteno, diluiu-se então 2 mg de  $\beta$ -caroteno em 10 ml de clorofórmio. Num balão de evaporação, fez-se uma emulsão de 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de Tween<sup>®</sup>40 e 2 ml da solução de  $\beta$ -caroteno previamente preparada em clorofórmio. A solução colocou-se a evaporar num evaporador rotativo (Büchi RE 111) a 40°C. Para completar a emulsão adicionou-se 100 ml de água ultrapura oxigenada (que incorporou oxigénio através de agitação em placa de agitação magnética) e agitou-se a solução vigorosamente de modo a formar uma emulsão estável.

Fez-se reagir em tubos de ensaio 0,2 ml dos extratos com uma concentração de 5 mg/ml (chocolate com 70% de cacau, chocolate com 85% de cacau e pasta de cacau) com 5 ml da emulsão de  $\beta$ -caroteno. Os tubos de ensaio foram colocados num bloco de aquecimento (Stuart SBH200D/3) a 50°C durante 2 horas (Fig. 17). Para os ensaios de controlo utilizou-se 0,2 ml do mesmo solvente utilizado na preparação dos extratos, etanol. Havia dois grupos de controlo, ao primeiro grupo a absorvância foi medida num espectrofotómetro (Hitachi U-3900) a 470 nm ao tempo 0 minutos ( $t=0$ ), ao segundo grupo assim como aos extratos também foi lida a absorvância a um comprimento de onda de 470 nm mas decorridas as duas horas da reação ( $t=120$ ). Todas as amostras foram analisadas em triplicado.



Figura 17 - Realização do ensaio do branqueamento do  $\beta$ -caroteno.

O Coeficiente da Atividade Antioxidante (AAC) calculou-se pela seguinte equação:

$$AAC = \left( \frac{AA\ 120 - Ac\ 120}{Ac\ 0 - Ac\ 120} \right) \times 1000$$

Em que:

AA 120 – absorvância da amostra aos 120 minutos

Ac 120 – absorvância dos ensaios de controlo aos 120 minutos de reação

Ac 0 – absorvância dos ensaios de controlo no tempo inicial

### **3.3.7 Determinação da ação anti-inflamatória dos extratos no modelo da colite ulcerativa – ensaio *in vivo***

Para este ensaio seguiu-se a metodologia proposta por Impellizzeri *et al.*, 2015 e Direito *et al.* 2017. Os animais foram identificados, pesados e divididos aleatoriamente em 5 grupos, como descrito na tabela 2.

Tabela 2. Caracterização dos vários grupos em estudo.

Grupo	Nº animais (n)	Administração intracolónica	Tratamento oral
Sham (controlo negativo)	6	Soro fisiológico	Soro fisiológico
Etanol	6	EtOH 50 %	Soro fisiológico
TNBS + etanol	10	TNBS + EtOH 50%	Soro fisiológico
TNBS + chocolate 70%	8	TNBS + EtOH 50%	Extrato de chocolate 70%
TNBS + pasta de cacau	8	TNBS + EtOH 50%	Extrato de pasta de cacau

Existem vários métodos para avaliar de que modo um composto, extrato ou um alimento têm propriedades anti-inflamatórias. No geral são usados modelos animais quer para estudar a inflamação aguda como a inflamação crónica.

A colite ulcerativa foi induzida em ratinhos CDI adultos (25g-40g) por instilação intracolónica de uma dose baixa de TNBS, tendo sido demonstrado em estudos anteriores que esta dose permite obter resultados reprodutíveis sem mortalidade associada. O TNBS induz quimicamente a colite em ratinhos provocando inflamação aguda e úlceras. O TNBS liga-se a proteínas endógenas na mucosa do cólon e induz uma resposta imunológica local através da ativação de macrófagos e células T. É induzida uma inflamação aguda que rapidamente passa a crónica com aparecimento de lesões ulcerativas mais ou menos graves no cólon e desenvolvimento de diarreias profusas em que as fezes, muitas vezes, surgem contaminadas com sangue. O TNBS é diluído em etanol (EtOH), de modo a facilitar a passagem através da barreira mucosa (Morris *et al.*, 1989; Ishiguro *et al.*, 2010; Mandalari *et al.* 2011; Mateus *et al.*, 2013).

O modelo da colite ulcerativa é de cinco dias. No primeiro dia os ratinhos começaram por ser anestesiados por via intra-peritoneal com uma solução de cetamina 100 mg/kg e xilazina 100 mg/kg. Sendo depois administrado TNBS (100µl de 50% de etanol) por via intracolónica numa única dose, através da inserção de um cateter 4,5 cm a partir do ânus. De modo a evitar o refluxo, os animais foram mantidos em posição de Trendelenburg durante 15 minutos.

Neste primeiro dia, assim como nos três seguintes (4 dias no total) os animais receberam uma dose de 0,5 ml dos extratos de chocolate com 70% cacau e pasta de cacau (15 mg de compostos fenólicos por kg de animal) por via oral (gavagem). Aos grupos Sham, Etanol TNBS+ etanol foi administrado oralmente 0,5 ml de soro fisiológico.

No quinto dia, os animais foram anestesiados, submetidos a punção cardíaca de modo a retirar-se sangue (no soro serão determinados alguns marcadores de inflamação como TNF $\alpha$  e IL1, que, infelizmente não constam como resultados nesta dissertação por não estarem disponíveis em tempo útil) e sacrificados por deslocamento cervical. O abdómen foi aberto por uma incisão na linha média. O cólon foi removido, isolado dos tecidos adjacentes, aberto ao longo da borda antimesentérica, lavado e observado por microscópio cirúrgico de bancada (Zeiss OPMI) para avaliação das lesões. A consistência das fezes foi também avaliada, segundo os critérios da tabela 7 (4.5). O intestino foi medido e as lesões apresentadas foram observadas

e fotografadas e posteriormente processadas e submetidas a análise histológica que também não constará desta dissertação por impossibilidade temporal.

### **3.3.8 Análise estatística dos resultados**

Para o tratamento estatístico dos dados dos ensaios *in-vitro* recorreu-se ao *software* Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation, Washington).

Para o ensaio *in vivo*, modelo de colite ulcerativa, todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de n observações, em que o n representa o número de animais estudados. Os resultados foram comparados através de uma análise de variância ANOVA de uma via, seguida de um pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações usando o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

# **Capítulo IV**

## **Resultados e**

### **Discussão**



## 4. Resultados e discussão

Na presente dissertação tal como referido anteriormente foram quantificados o teor em compostos fenólicos totais e flavonóides e avaliada a capacidade antioxidante dos extratos de chocolate de 70, 85% de cacau e pasta de cacau utilizando duas metodologias diferentes e complementares (DPPH' e  $\beta$ -caroteno). Foi também feita uma avaliação da atividade anti-inflamatória do chocolate com 70% de cacau e da pasta de cacau.

Inicialmente as seguintes leituras (4.1- 4.4) foram feitas após 3 desengorduramentos das amostras contudo, foi feita uma alteração para 5 ciclos de remoção de lípidos uma vez que após 3 observavam-se bolhas de gordura nos extratos que prejudicavam e impediam uma correta leitura dos métodos.

### 4.1 Determinação dos compostos fenólicos totais

Tal como anteriormente referido (3.3.5) o teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do método Folin-Ciocalteu. Os resultados (tabela 3) são apresentados por mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extrato e de amostra de modo a se poderem fazer comparações com a literatura.

Os resultados dos compostos fenólicos variaram entre  $3,26 \pm 0,24$  e  $3,67 \pm 0,58$  mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato para os chocolates com 70 e 85% de cacau, apresentando assim valores próximos, e a pasta de cacau registou  $11,32 \pm 0,77$ , obtendo um valor consideravelmente mais alto. O mesmo se observa quando os resultados são expressos por g de amostra. Os chocolates têm valores de  $49,58 \pm 1,85$  e  $51,08 \pm 1,20$ , respetivamente e a pasta de cacau destaca-se com um valor de  $83,11 \pm 1,42$ .

Tabela 3 - Resultados do teor em compostos fenólicos totais.

Amostra	Compostos fenólicos totais (mg GAE/g extrato)	Compostos fenólicos totais (mg GAE/g amostra)
Chocolate 70% cacau	$3,26 \pm 0,24$	$49,58 \pm 1,85$
Chocolate 85% cacau	$3,67 \pm 0,58$	$51,08 \pm 1,20$
Pasta de cacau	$11,32 \pm 0,77$	$83,11 \pm 1,42$

Laličić-Petronijević *et al.* (2016) avaliaram o teor em compostos fenólicos totais, obtendo os seguintes resultados, expressos por mg GAE/g extrato: chocolate de leite com 27% de cacau  $1,6 \pm 0,4$ ; chocolate meio amargo com 44% cacau  $6,4 \pm 1,0$  e chocolate preto com 75% cacau  $8,4 \pm 0,5$ . Embora os resultados apresentados no estudo sejam superiores aos obtidos, estes aparentam coincidir com a ideia de que o teor de compostos fenólicos e a % de sólidos de cacau nos chocolates aumenta de forma proporcional. Giacometti *et al.* (2016) contudo obtiveram um valor mais baixo para um extrato de cacau,  $3,08 \pm 0,18$ . Tabernerero *et al.* (2006) determinaram o teor de compostos fenólicos de chocolate de leite (34% cacau), chocolate preto (52% cacau) e pasta de cacau. Os valores obtidos, expressos por mg de equivalentes de GAE por grama de amostra, foram  $13,10 \pm 0,48$ ;  $18,16 \pm 0,17$  e  $77,59 \pm 1,82$ , respetivamente.

Apesar dos resultados obtidos na pasta de cacau serem mais altos do que os reportados pelo estudo, o facto dos valores obtidos nos chocolates de 70 e 85% de cacau serem superiores aos registados no estudo dos chocolates de leite 34% e preto 52% de cacau vai de encontro à evidência de que o aumento da percentagem de sólidos de cacau nos chocolates é responsável pelo aumento do teor em compostos fenólicos. As desigualdades existentes podem dever-se às diferentes percentagens de cacau nos chocolates, ao processamento dos mesmos, assim como aos métodos de extração e às modificações na metodologia utilizada.

## 4.2 Determinação dos flavonóides totais

Na tabela 4 estão os resultados obtidos que são apresentados por mg de equivalentes de epicatequina (ECE) por g de extrato.

Através da análise dos resultados é possível verificar, mais uma vez, uma variação entre os chocolates e a pasta de cacau. Os chocolates de 70 e 85% de cacau apresentaram valores próximos,  $2,17 \pm 0,25$  e  $2,67 \pm 0,20$ . Na pasta de cacau voltou-se a registar valores mais elevados,  $7,35 \pm 0,54$ . Mantém-se assim a ordem dos valores, embora os valores esperados fossem mais altos do que os efetivamente obtidos.

Tabela 4 - Resultados dos flavonóides totais.

Amostra	Flavonóides totais (mg ECE/g extrato)
Chocolate 70% cacau	2,17 ± 0,25
Chocolate 85% cacau	2,67 ± 0,20
Pasta de cacau	7,35 ± 0,54

Giacometti *et al.* (2016) avaliaram um extrato de cacau obtendo um valor de  $23,85 \pm 2,03$ , valor consideravelmente mais elevado do que o registado. Laličić-Petronijević *et al.* (2016) estudaram o conteúdo de flavonóides em três tipos de chocolate, de leite (27% de cacau), meio amargo (44%) e preto (75%), obtendo como resultados:  $0,3 \pm 0,1$ ;  $2,3 \pm 0,2$  e  $3,1 \pm 0,2$  respetivamente. Comparando com o chocolate de 70% o valor do estudo é consideravelmente superior, podendo dever-se à utilização de diferentes solventes para a extração e modificações na metodologia. Contudo mais uma vez foi possível verificar uma concordância entre o aumento da percentagem de cacau e dos fitoquímicos, neste caso os flavonóides, nos chocolates e na pasta. Sarriá *et al.* (2015) também avaliaram o teor de flavonóides num produto rico em cacau e registaram um valor de  $3,02 \pm 0,35$ , valor mais baixo do que o obtido no nosso trabalho. As diferenças do conteúdo de flavonóides podem depender, como referiram Latham *et al.* (2014), do tipo de cultura, das práticas de manuseamento após a colheita dos frutos de cacau e das técnicas de processamento do chocolate. Como resultado, dois chocolates com 70% de cacau produzidos por duas empresas distintas podem conter uma composição de flavonóides completamente diferente.

### 4.3 Determinação da capacidade antioxidante pelo Sistema de inibição do radical livre DPPH

Os resultados obtidos da determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH são apresentados na tabela 5. Os valores são apresentados em percentagem de inibição (IP %) e  $EC_{50}$  concentração que inibe 50% da concentração inicial do radical DPPH, de modo a facilitar comparações com a literatura.

Através da análise dos resultados percebe-se que os chocolates têm valores relativamente semelhantes com IP de  $21,28 \pm 1,06$  para 70% de cacau e  $28,76 \pm 1,09$  para o chocolate de

85% de cacau. Na pasta de cacau observou-se  $56,81 \pm 0,91$ , sendo este resultado, tal como expectável, o mais elevado.

Tabela 5 - Resultados da determinação da capacidade antioxidante pelo radical DPPH.

Amostra	IP (%)	EC <sub>50</sub> (mg/ml)
Chocolate 70% cacau	$21,28 \pm 1,06$	-
Chocolate 85% cacau	$28,76 \pm 1,09$	-
Pasta de cacau	$56,81 \pm 0,91$	$3,50 \pm 0,39$

- não foi determinado

Ali *et al.* (2015) estudaram a atividade antioxidante em pasta de cacau obtendo um valor de IP% de  $48,2 \pm 5,10$ ; embora não consideravelmente mas mais baixo do que o obtido no presente estudo. A atividade antioxidante também é demonstrada pelo EC<sub>50</sub>. Apenas foi medido o EC<sub>50</sub> para a pasta de cacau, uma vez que foi o extrato com melhores resultados a nível de equivalentes de trolox. Taberner *et al.* (2006) avaliaram a capacidade antioxidante de diversos tipos de chocolate e de pasta de cacau. No chocolate de leite (34% cacau) registaram um EC<sub>50</sub> de  $17,31 \pm 1,06$ ; no chocolate preto (52% cacau)  $7,04 \pm 0,29$  e na pasta de cacau  $1,68 \pm 0,02$ . O valor de EC<sub>50</sub> obtido para a pasta de cacau é mais baixo, e por isso melhor relativamente a  $3,50 \pm 0,39$ , obtido no presente estudo. Medeiros *et al.* (2015) realizaram um estudo em que também avaliaram o EC<sub>50</sub> de vários tipos de chocolate, incluindo chocolate preto (67% cacau) obtendo um valor de  $10,43 \pm 1,39$ . Na investigação em questão não foi estudada pasta de cacau, contudo foram estudados chocolates de leite e meio amargo (43% cacau), cujos valores obtidos foram  $49,18 \pm 2,47$  e  $32,60 \pm 2,07$ , respetivamente, sendo possível deduzir que com o aumento da percentagem de cacau no alimento o EC<sub>50</sub> vai diminuindo, o que vai de encontro ao valor de  $3,50 \pm 0,39$  obtido em pasta de cacau na presente dissertação. O que comprova que é a pasta de cacau que possui melhor capacidade antioxidante, seguida pelo chocolate com 85% de cacau e por fim o chocolate com 70% de cacau.

BHT e TBHQ, dois antioxidantes sintéticos, também foram estudados para servirem de referência e para comparações. Os valores de IP registados foram de  $91,23 \pm 1,68$  para o BHT e de  $95,09 \pm 1,24$  para o TBHQ. Tal como esperado, devido à sua natureza ambos os compostos apresentam uma capacidade antioxidante mais elevada que os extratos de chocolate e pasta de cacau.

## 4.4 Determinação da capacidade antioxidante pelo Teste do Branqueamento do $\beta$ -Caroteno

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método do branqueamento do  $\beta$ -caroteno, os extratos não sofreram qualquer diluição, sendo as leituras feitas com uma concentração de 5 mg/ml. Os resultados podem ser observados na tabela 6, sendo expressos pelo coeficiente da atividade antioxidante (AAC).

Nos chocolates com 70 e 85% de cacau foram registados valores de AAC próximos,  $430 \pm 14,0$  e  $464 \pm 13,8$ , respetivamente. A pasta de cacau distanciou-se ao expressar um valor de  $688 \pm 17,5$ . Estes resultados foram de encontro ao esperado, com a pasta de cacau a revelar valores claramente superiores aos dos chocolates o que pode, talvez ser explicado pela maior capacidade antioxidante da pasta de cacau, por um lado e por outro sugerir que o chocolate deve as suas propriedades antioxidantes à quantidade de cacau que contém.

Tabela 6 - Valores obtidos da inibição branqueamento do  $\beta$ -caroteno.

Amostra	AAC
Chocolate 70% cacau	$430 \pm 14,0$
Chocolate 85% cacau	$464 \pm 13,8$
Pasta de cacau	$688 \pm 17,5$

Ali *et al.* (2015) avaliaram a capacidade antioxidante da pasta de cacau obtendo um valor de  $582 \pm 19,8$ , sendo o valor obtido na presente dissertação mais alto do que o apresentado no estudo referido. A diferença, embora não seja considerável pode ser causada por diferenças nas extrações realizadas e na metodologia adoptada, assim como nos produtos em si. Os chocolates resultam de um longo e complexo processamento, sendo que também a cultura dos cacauzeiros, a colheita dos frutos (altura do ano, estado do amadurecimento) e as práticas de manuseamento dos mesmos representam muitas variáveis que mais tarde se traduzem em diferentes produtos com distintas características sensoriais e composição química.

Foram ainda utilizados e feitas as leituras de dois antioxidantes sintéticos, BHT e TBHQ, para servirem de referência. Os valores obtidos foram respetivamente  $1072 \pm 5,1$  e  $1081 \pm 4,3$ . Verificando-se que ambos os compostos apresentam uma capacidade antioxidante bastante elevada, em comparação com os extratos de chocolate e pasta de cacau.

## 4. 5 Determinação da ação anti-inflamatória dos extratos no modelo da colite ulcerativa

Neste estudo a ação anti-inflamatória foi avaliada nos extratos de chocolate 70% e de pasta de cacau utilizando o modelo da colite ulcerativa (3.3.7) em que se fez a indução da doença, sendo depois observadas as alterações morfológicas e funcionais provocadas pela mesma com um microscópio cirúrgico.

Em seguida apresentam-se fotografias dos intestinos correspondentes aos vários grupos em estudo (Fig. 18).

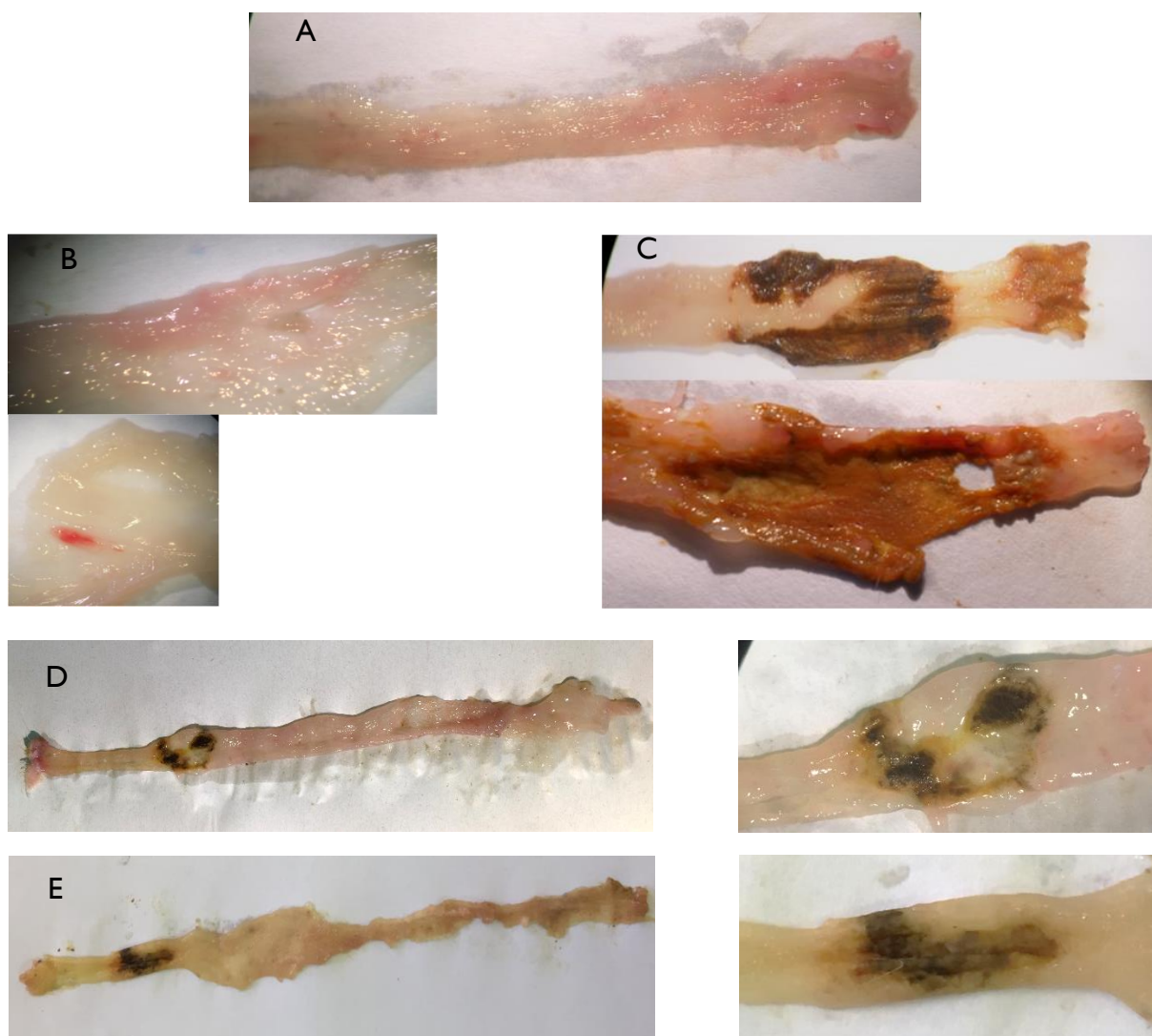


Figura 18 - Observações a microscópio cirúrgico do cólon aberto transversalmente. A - Grupo Sham; B - Grupo Etanol; C - Grupo TNBS + etanol; D - Grupo TNBS + Chocolate 70%; E - Grupo TNBS + Pasta de cacau

Tal como é possível observar-se pela figura 18 A não existem alterações histológicas no grupo Sham que é o controlo negativo da colite ulcerativa. Os intestinos apresentam, como esperado, uma coloração rosada quase translúcida. Representado em B está o grupo etanol, em que se pode observar um pequeno derrame, contudo apresenta uma cor rosada, normal, idêntica à do grupo Sham. Estas evidências comprovam que é o TNBS o responsável pelas lesões ulcerativas. O grupo C, administração de TNBS e etanol 50%, apresenta flacidez, inflamação, necrose e lesões ulcerativas dos tecidos do cólon dos animais. Os grupos D e E, TNBS + Chocolate 70% e TNBS + Pasta de cacau, apresentam uma menor extensão de lesões e com menor gravidade em relação às alterações morfológicas provocadas pelo TNBS + etanol. Observa-se nos dois grupos manifestas e consideráveis melhorias relativas a lesões e úlceras.

No gráfico abaixo encontra-se representado o tamanho dos intestinos dos vários grupos.

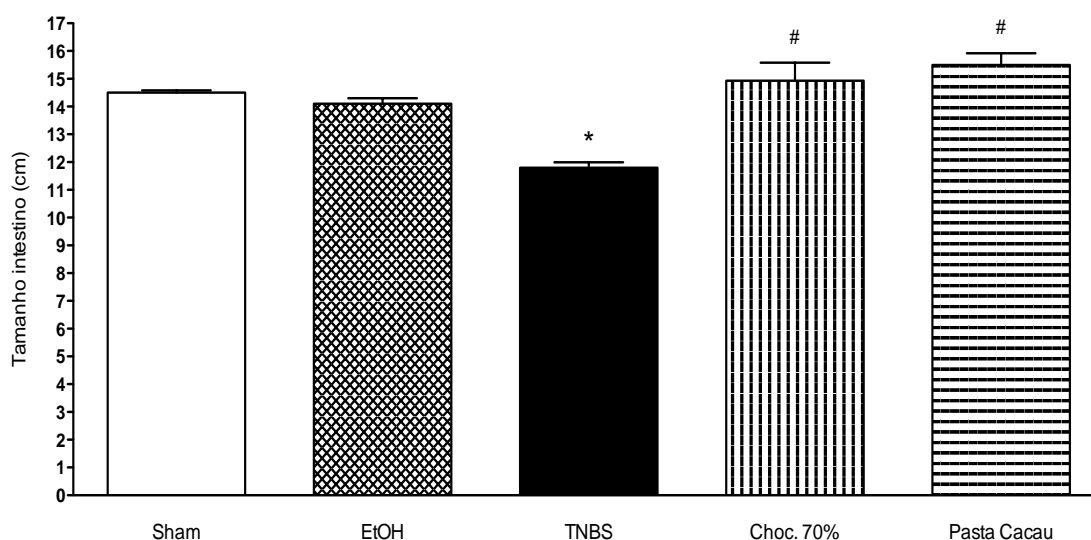


Figura 19 - Efeito das diferentes administrações no tamanho dos intestinos dos ratinhos, em particular dos grupos TNBS + etanol, TNBS + Chocolate 70% e TNBS + Pasta de cacau (\*  $P < 0,01$  vs Sham, #  $P < 0,001$  vs TNBS)

Na fig. 19 pode observar-se os diferentes tamanhos de intestino correspondentes a cada grupo em estudo, sendo detetadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre alguns grupos. É possível perceber que o grupo Sham e o grupo etanol não apresentam diferenças significativas no tamanho do intestino com valores de  $14,5 \pm 0,1$  e  $14,2 \pm 0,2$ , respetivamente, o que era expectável pois não são grupos que apresentem lesões. O grupo TNBS + etanol, tal como esperado, é claramente o mais afetado observando-se uma redução do comprimento do

intestino, comprovado com o valor de  $11,7 \pm 0,2$ , sendo este valor significativamente diferente do valor do grupo Sham. Este resultado explica-se pelo facto das lesões fazerem com que o intestino perca a sua elasticidade e diminua de tamanho. Os animais do grupo TNBS + chocolate 70% não apresentam um comprimento de intestino significativamente diferente do controlo negativo ( $15,0 \pm 0,5$ ) mas são estatisticamente diferentes dos animais do grupo TNBS + etanol. Por fim o grupo de TNBS + pasta de cacau apresenta valores de comprimento de intestino de  $15,5 \pm 0,4$ , valores também significativamente diferentes do valor do grupo TNBS + etanol e iguais ao grupo Sham.

Estes resultados sugerem que tanto o chocolate a 70% como a pasta de cacau suavizaram a lesão provocada pelo TNBS, não conseguindo, no entanto, evitá-la por completo.

Outra alteração morfológica considerada e estudada foi o tamanho das lesões apresentadas pelos diferentes grupos, cujos resultados estão no gráfico da Fig. 20.

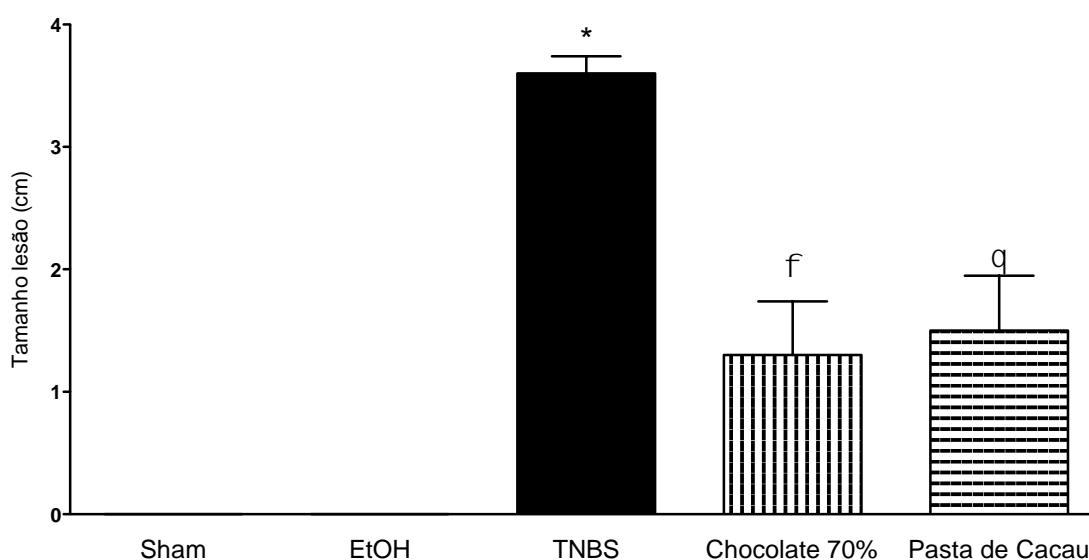


Figura 20 - Efeito das diversas administrações no tamanho das lesões no intestino, nomeadamente nos grupos TNBS + etanol, TNBS + Chocolate 70% e TNBS + Pasta de cacau (\*  $P < 0,001$  vs Sham,  $\Phi P < 0,01$  vs TNBS,  $\theta P < 0,001$  vs TNBS)

Neste parâmetro, e tal como anteriormente referido, os grupos Sham e Etanol não apresentaram alterações morfológicas. Por outro lado o grupo TNBS apresenta notáveis alterações como expectável, com um tamanho de lesão de  $3,7 \pm 0,2$  cm. Os grupos de chocolate e pasta de cacau também sofreram lesões, porém de menores dimensões,  $1,3 \pm 0,3$  e  $1,5 \pm 0,3$ , respetivamente, o que demonstra que os extratos em estudo são responsáveis por melhorias nas lesões/danos provocados pelo TNBS.



Foram também observadas as fezes dos animais sobretudo no que concerne à sua consistência. Para isso, e de modo a poder usar valores num gráfico que permitam comparações, foi usada uma escala previamente elaborada no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia de Lisboa que se apresenta na tabela 7.

Tabela 7 - Classificação da severidade da diarreia.

Score	Consistência das fezes
0	Normal (pellets duros)
1	Ligeiramente mucosa
2	Mole
3	Aquosa

Usando a classificação apresentada foi elaborado o gráfico seguinte (Fig. 21) em que estão representadas as consistências das fezes dos animais dos vários grupos.

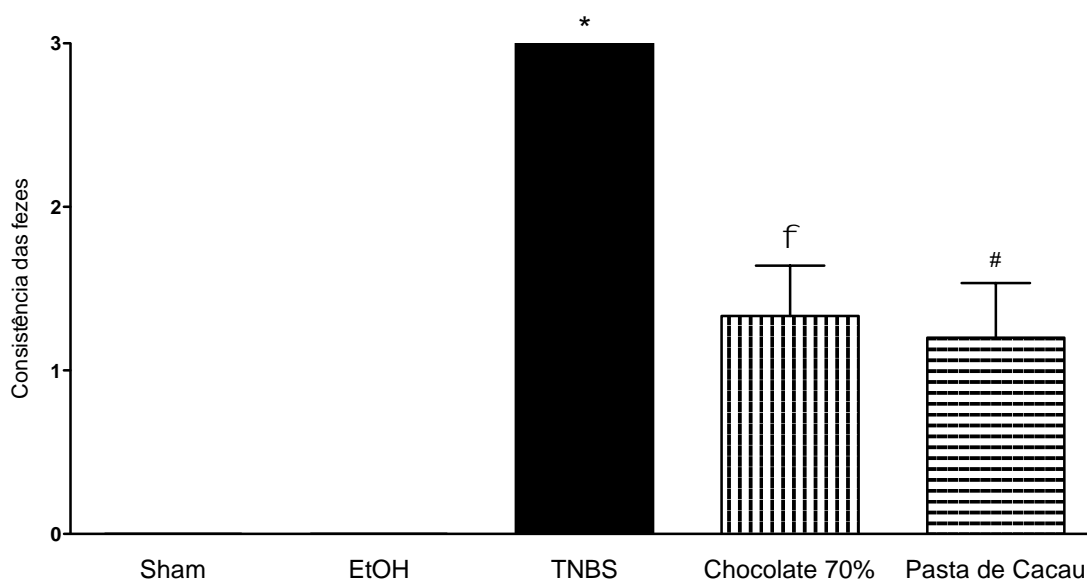


Figura 21 - Efeito das diferentes administrações na consistência das fezes, particularmente nos grupos TNBS + etanol, TNBS + Chocolate 70% e TNBS + Pasta de cacau (\* P<0,001 vs Sham,  $\Phi$  P<0,01 vs TNBS, # P<0,001 vs TNBS)

Como é possível observar, aos grupos Sham e Etanol foi atribuída a classificação 0 que se caracteriza por uma consistência normal. No extremo oposto, no grupo TNBS + EtOH registou-se uma consistência aquosa, 3; valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). O chocolate e a pasta de cacau também revelaram diferenças estatísticas significativas quando comparadas com o grupo TNBS. No grupo chocolate 70%, assim como no da pasta de cacau observaram-se fezes às quais foram atribuídos os scores  $1,3 \pm 0,25$  e  $1,2 \pm 0,3$ , respetivamente, cujas consistências estavam entre o normal e o ligeiramente mucoso. Por observação das fezes, meramente visual pode-se acrescentar que as fezes do grupo da pasta de cacau eram as mais parecidas com o grupo controlo negativo, com um aspeto mais normal em forma de pellets mais duros.

Ambos os extratos parecem ter efeitos anti-inflamatórios. Contudo, a capacidade anti-inflamatória da pasta de cacau parece ser ainda mais eficiente no combate à inflamação neste modelo animal que a do chocolate com 70% sólidos de cacau. Tal como anteriormente apontado, estes resultados, que aparentam confirmar a atividade anti-inflamatória da pasta de cacau e do chocolate preto, parecem poder ser justificados pela composição química dos extratos (1.3.1) especialmente pela sua riqueza em compostos fenólicos e pelas suas anteriormente apontadas (1.4) e depois confirmadas, propriedades antioxidantes (4.1 - 4.4). Um dos mecanismos que pode inibir ou suavizar os processos inflamatórios é a capacidade antioxidante. No entanto, há muitos mecanismos que poderão estar envolvidos e mais estudos deverão ser desenvolvidos para poder confirmar com certeza se o efeito anti-inflamatório observado se deve ou não às propriedades antioxidantes das amostras.

Andújar *et al.* (2011) estudaram um extrato de cacau enriquecido com polifenóis com epicatequina, procianidina B2, catequina e procianidina B1 considerando-os como sendo os principais fenólicos responsáveis pelas suas propriedades anti-inflamatórias contra a colite ulcerativa. Doença que no estudo foi induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) em ratinhos. Contudo, os animais utilizados foram fêmeas Balb/C com pesos entre as 18 - 20g, e o estudo prolongou-se ao longo de 8 dias. Estipularam três grupos: controlo negativo, DSS, DSS + cacau. No grupo do controlo negativo registaram  $94,17 \pm 3,27$  mm no comprimento do intestino. Observaram que uma diminuição do intestino tinha sido evitada pelo extrato de cacau ( $59,17 \pm 2,39$  mm) em comparação com o grupo que tinha apenas sido induzido com DSS ( $49,17 \pm 1,54$  mm) ( $p < 0,05$ ). Avaliaram também a consistência das fezes, que consideraram: 0 - normal, 2 - mole, 4 - diarreia. Nos animais tratados com o extrato registaram uma consistência das fezes normal ( $0,8 \pm 0,2$ ) contrapondo com uma consistência entre mola

a diarreica ( $2,6 \pm 0,2$ ) do grupo DSS. Observaram também significantes reduções tanto na gravidade como na extensão da inflamação.

Pérez-Berezo *et al.* (2012) estudaram o efeito de uma dieta enriquecida com cacau na colite ulcerativa, induzida, também com DSS. Os ratinhos eram fêmeas Wistar de cinco semanas. O estudo demorou 15 dias. Os grupos dividiam-se no controlo negativo, com uma dieta padrão; DSS + dieta padrão, DSS + cacau. Os animais do último grupo contudo já estavam a ser alimentados com o extrato enriquecido com cacau à 21 dias antes da administração do DSS. Observaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no comprimento do intestino entre os grupos. No grupo do controlo negativo registaram  $7,8 \pm 0,4$  cm. Observaram que o intestino dos animais do grupo DSS + cacau tinha melhores resultados do que o grupo DSS com  $5,4 \pm 0,6$  e  $13 \pm 1,0$  cm respetivamente.

Embora em ambos os estudos anteriormente referidos o modelo de colite ulcerativa não seja o mesmo que o utilizado na presente dissertação, assim como o tipo de animais e a duração do tratamento, o que explica a variação dos comprimentos de intestinos, no geral as observações são muito semelhantes: o grupo do controlo negativo revela o esperado, nenhuma alteração histológica ou funcional; os piores resultados ocorrem nos grupos em que se induziu a doença, registou-se diarreia e comprimentos de intestinos consideravelmente reduzidos e por fim, observa-se, em todos os estudos, uma melhoria nas alterações morfológicas e funcionais resultantes da administração dos extratos de cacau e chocolate. Mais uma diferença é que os estudos anteriormente referidos só consideram o cacau como objeto de estudo, não tendo encontrado nenhum que analisasse o chocolate preto, independentemente da sua percentagem de sólidos de cacau.

Os nossos resultados parecem importantes na demonstração dos efeitos benéficos para a saúde do cacau e do chocolate mas, como já referido anteriormente, mais estudos precisam de ser feitos para entender os compostos responsáveis, os mecanismos envolvidos e até as doses mínimas com efeito.

Um tópico algo discutido entre diversos estudos é a quantidade recomendada de chocolate preto que deve ser consumida de modo a obter tais benefícios. Para alguns estudos é de até 30 g por dia, outros recomendam um consumo máximo de 50 g por semana, e muitos outros não conseguiram ainda chegar a uma quantidade, dizendo que são necessários mais estudos em relação à dose-resposta. Através dos resultados obtidos na presente dissertação em relação ao estudo da atividade anti-inflamatória e dos valores e efeitos registados, um consumo

de 10 g por dia de chocolate de 70% de cacau idealmente surtirá efeitos semelhantes num humano aos que foram verificados nos animais. Embora tal avaliação não tenha sido feita, para o chocolate com 85% de cacau pode-se especular que uma quantidade recomendada ligeiramente inferior originará tais efeitos uma vez que este registou valores mais altos de polifenóis em comparação ao chocolate de 70%.

# **Capítulo V**

## **Conclusão**

## 5. Conclusão

O chocolate é um alimento há muito consumido e apreciado pelo Homem, embora sempre com a ideia presente de que é um produto extremamente calórico, com elevados teores de gordura e açúcar. Tal noção não é errada, deve-se no entanto ter em atenção que nem todos os chocolates são iguais e que há efetivamente opções mais saudáveis que outras, como é o caso do chocolate preto, e por isso objeto de estudo da presente dissertação. Tal como muitos estudos têm vindo a apontar este alimento tem vindo a receber mais interesse e atenção desde que se começou a associar-lhe propriedades benéficas para saúde, sendo algumas delas o facto de prevenir doenças cardiovasculares, controlar o colesterol e combater o envelhecimento. Assim como o facto de possuir características antioxidantes e anti-inflamatórias.

Os resultados do nosso estudo com a pasta de cacau e com chocolate com 85 e 70% de cacau permitem-nos concluir que:

A pasta de cacau foi das 3 amostras a que continha maiores teores de compostos fenólicos e flavonóides e também a que demonstrou melhor capacidade antioxidante (nos dois métodos usados).

Os melhores resultados, tanto a nível da atividade antioxidante como dos teores de compostos fenólicos e flavonóides, foram obtidos com o chocolate com 85% de cacau.

O chocolate com 70% de cacau foi o que continha menores quantidades de compostos fenólicos e também menor atividade antioxidante.

Os resultados obtidos sugerem ser os compostos fenólicos e os flavonóides os responsáveis pela capacidade antioxidante.

Tanto o extrato de pasta de cacau como o de chocolate reduziram os danos e suavizaram as lesões no modelo de colite em murganhos o que indica a sua atividade anti-inflamatória e nos sugerem a possibilidade desta atividade ser da responsabilidade dos compostos fenólicos presentes e poder ser explicada pela capacidade antioxidante demonstrada pelos extratos em estudo.

No entanto mais estudos deverão ser realizados futuramente para esclarecer se a atividade anti-inflamatória se deve à capacidade antioxidante e/ou a outro mecanismo.

Estes resultados podem ser importantes porque se considera as doenças inflamatórias do intestino, como a colite ulcerativa, uma das causas do aparecimento do cancro do cólon, podendo o cacau e o chocolate, ao serem incluídos na dieta, tornarem-se muito importantes na prevenção do aparecimento e/ou desenvolvimento destas doenças.

O chocolate deixa assim de ser apenas associado a um alimento saboroso e calórico para ser considerado um alimento funcional ganhando um novo estatuto. Contudo a sua composição nutricional não mudou e os cuidados com o seu consumo devem manter-se, uma vez que não são só benefícios. Assim, a chave do consumo do chocolate é a moderação, devendo ser incluído numa dieta equilibrada. Em suma, todos estes dados reforçam e suportam o valor que o próprio Linnaeus depositou no chocolate, generosamente chamando-lhe, *Theobroma Cacao*, a planta dos deuses.

# **Capítulo VI**

## **Perspetivas**

### **futuras**



## 6. Perspetivas futuras

À medida que este estudo ia sendo desenvolvido iam surgindo questões e ideias que poderiam vir a ser executadas de modo a enriquecê-lo e a esclarecer dúvidas que surgiram.

Para começar e uma vez que nesta dissertação não foi possível, devido à inexistência de estudos, seria interessante o desenvolvimento de investigações sobre chocolate preto com diferentes percentagens de cacau de modo a permitir futuras comparações.

Seria fundamental determinar com exatidão, através de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), o perfil fenólico e flavonóide do chocolate e da pasta de cacau de modo a se estabelecer associações entre as atividades estudadas e os fitoquímicos responsáveis por elas.

Comprovando-se, como muitos estudos apontam, uma elevada quantidade de flavonóides nos alimentos poderia também ser interessante realizar um modelo de colite ulcerativa mas baseado no teor de flavonóides.

Uma questão que se levantou com o ensaio *in vivo* e que pode levar a novos estudos foi acerca da quantidade de fenólicos administrados aos animais. Na presente dissertação observou-se que ao administrar 15 mg/kg de ratinho se observa melhoras, o que leva à questão de qual será a menor dose a surtir efeito.

Outra questão prende-se com a dose recomendada do chocolate, tal como muitos autores defendem, mais estudos devem ser feitos de modo a perceber claramente qual a dose-resposta do alimento no organismo humano tendo em conta as devidas extrapolações animal-Homem, assim como a biodisponibilidade do alimento e qual a percentagem dos fitoquímicos, vitaminas e minerais que o organismo consegue efetivamente metabolizar e aproveitar.

Por fim, e numa vertente mais direcionada para a indústria alimentar seria interessante pensar na aplicação da pasta de cacau num suplemento alimentar, devidamente controlado, sujeito a ensaios clínicos regulares e de acordo com a legislação existente e com tudo o que esta exige.

# **Capítulo VII**

## **Referências bibliográficas**

## 7. Referências bibliográficas

AKYOL, A.; DASGIN, H.; AYAZ, A.; BUYUKTUNCER, Z.; BESLER, H. T. (2014) -  **$\beta$ -Glucan and Dark Chocolate: A Randomized Crossover Study on Short-Term Satiety and Energy Intake.** *Nutrients*. 6, 3863–3877.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. (2013) - **Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity.** *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21(2), 143–152.

ALI, F.; RANNEH, Y.; ISMAIL, A.; ESA, N. M. (2015) - **Identification of phenolic compounds in polyphenols-rich extract of Malaysian cocoa powder using the HPLC-UV-ESI-MS/MS and probing their antioxidant properties.** *Journal of Food Science and Technology*. 52(4), 2103–2111.

AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P.A.; GARREL, C. (2010) - **The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 42(10), 1634–1650.

AMORATI, R.; VALGIMIGLI, L. (2015) - **Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants.** *Free Radical Research*. 49(5), 633–649.

ANDÚJAR, I.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E.; LAGHI, S.; MUGUERZA, B.; RÍOS, J. L. (2011) - **Inhibition of ulcerative colitis in mice after oral administration of a polyphenol-enriched cocoa extract is mediated by the inhibition of STAT1 and STAT3 phosphorylation in colon cells.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(12), 6474–6483.

APAK, R.; GÜÇLÜK, K.; ÖZYÜREK, M.; KARADEMİR, S. E. (2004) - **Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method .** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7970–7981.

AREMU, C. Y.; ABARA, A. E. (1992) - **Hydrocyanate, oxalate, phytate, calcium and zinc in selected brands of Nigerian cocoa beverage.** *Plant Foods for Human Nutrition*. 42(3), 231–237.

- BELŠČAK, A.; KOMES, D.; HORŽIĆ, D.; GANIĆ, K. K.; KARLOVIĆ, D. (2009) - **Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition**. Food Research International. 42(5-6), 707–716.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. (1996) - **The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of «Antioxidant Power»: The FRAP Assay**. Analytical Biochemistry. 239(1), 70–76.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. (1999) - **Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration**. Methods in Enzymology, 299, 15–27.
- BORCHERS, A. T.; KEEN, C. L.; HANNUM, S. M.; GERSHWIN, M. E. (2000) - **Cocoa and chocolate: composition, bioavailability and health implications**. Journal of Medicinal Food. 3(2), 77–105.
- BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; JOVIN, E. (2007) - **Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55, 7879–7885.
- BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANNO, M. L. (2010) - **Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species**. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine. 15(4), 186–190.
- CADY, R. J.; DURHAM, P. L. (2010) - **Cocoa-enriched diets enhance expression of phosphatases and decrease expression of inflammatory molecules in trigeminal ganglion neurons**. Brain Research. 1323, 18–32.
- CAO, G.; VERDON, C. P.; WU, A. H.; WANG, H.; PRIOR, R. L. (1995) - **Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II**. Clinical Chemistry. 41(12 Pt 1), 1738–1744.
- CAROCHO, M; FERREIRA, I. C. (2013) - **A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives**. Food and Chemical Toxicology. 51, 15–25.

- CARR, A. C.; MCCALL, M. R.; FREI, B. (2000) - **Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection.** *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology.* 20(7), 1726–1723.
- CASTELNUOVO, A. D.; GIUSEPPE, R.; IACOVIELLO, L.; GAETANO, G. (2012) - **Consumption of cocoa, tea and coffee and risk of cardiovascular disease.** *European Journal of Internal Medicine.* 23(1), 15–25.
- CHANG, C.-C.; YANG, M.-H.; WEN, H.-M.; CHERN, J.-C. (2002) - **Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods.** *Journal of Food and Drug Analysis.* 10(3), 178–182.
- CHOWDHURY, M. M. H.; KUBRA, K.; AHMED, S. R. (2015) - **Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh.** *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 14(8).
- CHRYSOHOOU, C.; STEFANADIS, C. (2013) - **Longevity and Diet. Myth or pragmatism?** *Maturitas.* 76(4), 303–307.
- COHEN, K. O.; LUCCAS, V.; JACKIX, M. N. H. (2004) - **Revisão: temperagem ou pré-cristalização do chocolate.** *Brazilian Journal of Food Technology.* 7(1), 23–30.
- COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. (2006) - **Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid.** *Food Chemistry.* 98(4), 649–657.
- DARMANYAN, A. P.; GREGORY, D. D.; GUO, Y.; JENKS, W. S.; BUREL, L.; ELOY, D.; JARDON, P. (1998) - **Quenching of singlet oxygen by oxygen- and sulfur-centered radicals: evidence for energy transfer to peroxy radicals in solution.** *Journal of the American Chemical Society.* 120(2), 396–403.
- DESHMUKH, K.; AMIN, P. (2013) - **Meltlets<sup>®</sup> of soy isoflavones: Process optimization and the effect of extrusion spheronization process parameters on antioxidant activity.** *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 75(4), 450.
- DIREITO, R.; LIMA, A.; ROCHA, J.; FERREIRA, R. B.; MOTA, J.; REBELO, P.; FERNANDES, A.; PINTO, R.; ALVES, P.; BRONZE, R.; SEPODES, B.; FIGUEIRA, M.-E. (2017) - **Dyospiros kaki phenolics inhibit colitis and colon cancer cell proliferation, but not gelatinase activities.** *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 46, 100–108.

DRÖGE, W. (2002) - **Free radicals in the physiologic control of cell function.** Physiological Reviews. 82(1), 47–95.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. (2011) - **Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde.** Brazilian Journal of Food Technology. 14(3), 181–201.

EFSA - (2004) - **Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to tertiary-butylhydroquinone (TBHQ).** EFSA Journal. 84, 1–50. Disponível na Internet: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/84.pdf>.

EFSA - (2011) - Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS); **Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxyanisole–BHA (E 320) as a food additive.** EFSA Journal. 9(10), 2392. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2392. Disponível na Internet: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2392.pdf>.

EFSA - (2012) - Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS); **Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive.** EFSA Journal. 10(3), 2588. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2588. Disponível na Internet: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2588.pdf>.

ELLINGER, S.; STEHLE, P. (2016) - **Impact of Cocoa Consumption on Inflammation Processes - A Critical Review of Randomized Controlled Trials.** Nutrients. 8(6), E321.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. (2008) - **Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol.** Food Chemistry. 110(1), 76–82.

FARHAT, G.; DRUMMOND, S.; FYFE, L.; AL-DUJAILI, E. A. (2014) - **Dark chocolate: An obesity paradox or a culprit for weight gain?** Phytotherapy Research. 28(6), 791–797.

FERREIRA, I. C. F. R. ABREU; R. M. V. (2007) - **Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos.** Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde. 2, 32–39.

FOTI, M. C.; AMORATI, R. (2009) - **Non-phenolic radical-trapping antioxidants.** Journal of Pharmacy and Pharmacology. 61(11), 1435–1448.

- GAMBLE, P. E.; BURKE, J. J. (1984) - **Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system.** *Plant Physiology*. 76(3), 615–621.
- GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. (2012) - **Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2012, Article ID 428010, 11 pages.
- GARCÍA-PARRILLA, M. C. (2008) - **Antioxidantes en la dieta mediterránea.** *Nutrición Clínica en Medicina*. 2(3), 129–140.
- GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; MAIANI, G.; AZZINI, E.; FERRO-LUZZI, A. (1995) - **A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability.** *Free Radical Biology & Medicine*. 18(1), 29–36.
- GIACOMETTI, J.; MUHVIĆ, D.; PAVLETIĆ, A.; ĐUDARIĆ, L. (2016) - **Cocoa polyphenols exhibit antioxidant, anti-inflammatory, anticancerogenic, and anti-necrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice.** *Journal of functional foods*. 23, 177–187.
- GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; ESPOSITO, K. (2006) - **The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome.** *Journal of the American College of Cardiology*. 48(4), 677–685.
- GLAZER, A. N. (1990) - **Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species.** *Methods Enzymol*. 186, 161–168.
- GLICERINA, V.; BALESTRA, F.; ROSA, M. D.; BERGENHSTÅL, B.; TORNBERG, E.; ROMANI, S. (2014) - **The Influence of Different Processing Stages on Particle Size, Microstructure, and Appearance of Dark Chocolate.** *Journal of Food Science*. 79(7), E1359–1365.
- GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; GARCÍA-MEDIAVILLA, M. V.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J. (2010) - **Fruit polyphenols, immunity and inflammation.** *British Journal of Nutrition*. 104(3), S15–27.
- GÜLÇİN, I. (2012) - **Antioxidant activity of food constituents: an overview.** *Archives of Toxicology*. 86(3), 345–391.

GUTTERIDGE, J. M. C. (1994) - **Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection.** *Chemico-Biological Interactions*. 91(2-3), 133–140.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. (2000) - **Free radicals and antioxidants in the year 2000: A historical look to the future.** *Annals of the New York Academy of Sciences*. 899(1), 136–147.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. (2006) - **Resistance of the Body to Infection: I. Leukocytes, Granulocytes, the Monocyte-Macrophage System, and Inflammation.** In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders. 429–438.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. (1995) - **The characterization of antioxidants.** *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601–617.

HALLIWELL, B. (2007) - **Biochemistry of oxidative stress.** *Biochemical Society Transactions*. 35(5), 1147–1150.

HALPNER, A. D.; HANDELMAN, G. J.; BELMONT, C. A.; HARRIS, J. M.; BLUMBERG, J. B. (1998) - **Protection by vitamin C of oxidant-induced loss of vitamin E in rat hepatocytes.** *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 9(6), 355–359.

HEBDEN, J.; DONNELLY, M.; RICKETS, M. (2009) - **Diarreaia.** In: HEBDEN, J.; DONNELLY, M.; RICKETS, M. *Guia prático de gastroenterologia*. Lisboa: Climpsi editores. ISBN: 978-972-796-314-0. 111–132.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J.; (2002) - **Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships.** *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13(10), 572–584.

HELLER, F.; FLORIAN, P.; BOJARSKI, C.; RICHTER, J.; CHRIST, M.; HILLENBRAND, B.; MANKERTZ, J.; GITTER, A. H.; BÜRGEL, N.; FROMM, M.; ZEITZ, M.; FUSS, I.; STROBER, W.; SCHULZKE, J. D. (2005) - **Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution.** *Gastroenterology*. 129(2), 550–64.

HO, G-T.; LEES, C.; SATSANGI, J. (2007) - **Ulcerative colitis.** *Medicine*. 35(5), 277–282.



- HONG, M. Y.; NULTON, E.; SHELECHI, M.; HERNÁNDEZ, L. M.; NEMOSECK, T. (2013) - **Effects of dark chocolate on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci.** Nutrition and cancer. 65(5), 677–85.
- HU, S.; KIM, B. Y.; BAIK, M. Y. (2016) - **Physicochemical properties and antioxidant capacity of raw, roasted and puffed cacao beans.** Food Chemistry. 194, 1089–1094.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. (2005) - **The chemistry behind antioxidant capacity assays.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(6), 1841–1856.
- HURST, W. J.; GLINSKI, J. A.; MILLER, K. B.; APGAR, A.; DAVEY, M. H.; STUART, D. A. (2008) - **Survey of the *trans*-resveratrol and *trans*-piceid content of cocoa-containing and chocolate products.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56(18), 8374–8378.
- IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. (2011) - **A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables.** Food Chemistry. 126(4), 1821–1835.
- IKAWA, M., SCHAPER, T. D., DOLLARD, C. A., SASNER, J. J. (2003) - **Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51, 1811–1815.
- IMPELLIZZERI, D.; BRUSCHETTA, G.; DI PAOLA, R.; AHMAD, A.; CAMPOLO, M.; CUZZOCREA, S.; ESPOSITO, M.; NAVARRA, M. (2015) - **The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (BJe) in an experimental model of inflammatory bowel disease.** Clinical Nutrition. ISSN 02615614, 34(6), 1146–1154.
- JEE, J. P.; LIM, S. J.; PARK, J. S.; KIM, C. K. (2006) - **Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 63(2), 134–139.
- JERKOVIC, V.; BROHAN, M.; MONNART, E.; NGUYEN, F.; NIZET, S.; COLLIN, S. (2010) - **Stilbenic profile of cocoa Liquors from different origins determined by RP-HPLC-APCI(+)-MS/MS. Detection of a new resveratrol hexoside.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58(11), 7067–7074.

KANCHEVA, V. D., (2009) - **Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chain-breaking activity: a comparative study.** European Journal of Lipid Science and Technology. 111(11), 1072–1089.

KAND'ÁR, R.; ZÁKOVÁ, P.; MUZÁKOVÁ, V. (2006) - **Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography.** Clinica Chimica Acta. 365(1-2), 249–256.

KÄNEL, V. R.; MEISTER, R. E.; STUTZ, M.; KUMMER, P.; ARPAGAU, A.; HUBER, S.; EHLERT, U.; WIRTZ, P. H. (2014) - **Effects of dark chocolate consumption on the prothrombotic response to acute psychosocial stress in healthy men.** Thrombosis and Haemostasis. 112(6), 1151–1158.

KOCH, W.; KUKULA-KOCH, W.; GŁOWNIAK, K. (2017) - **Catechin Composition and Antioxidant Activity of Black Teas in Relation to Brewing Time.** Journal of AOAC International. 1–6.

KOHEN, R. (1999) - **Skin antioxidants: Their role in aging and in oxidative stress—new approaches for their evaluation.** Biomed Pharmacother. 53(4), 181–192.

KOHEN, R.; GATI, I. (2000) - **Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress.** Toxicology. 148(2-3), 149–157.

KOHEN, R.; NYSKA, A. (2002) - **Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification.** Toxicologic Patholog. 30(6), 620–650.

KOVACIC, P.; JACINTHO, J. D. (2001) - **Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer.** Current Medicinal Chemistry. 8(7), 773–796.

KRIMMEL, B.; SWOBODA, F.; SOLAR, S.; REZNICEK, G. (2010) - **OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic- and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products – a gamma radiolysis study.** Radiation Physics and Chemistry. 79(12), 1247–1254.

KUSKOSKI, E. M.; ASSUERO, A. G.; MORALES, M. T. FETT, R. (2006) - **Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas.** Ciência Rural. 36(4), 1283–1287.

KWOK, C. S.; BOEKHOLDT, S. M.; LENTJES, M. A.; LOKE, Y. K.; LUBEN, R. N.; YEONG, J. K.; WAREHAM, N. J.; MYINT, P. K.; KHAW, K. T. (2015) - **Habitual chocolate consumption and risk of cardiovascular disease among healthy men and women.** *Heart*. 101(6), 1279–1287.

LALIČIĆ-PETRONIJEVIĆ, J.; KOMES, D.; GORJANOVIĆ, S.; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; PEZO, L.; PASTOR, F.; OSTOJIĆ, S.; POPOV-RALJIĆ, J.; SUŽNJEVIĆ ET D. (2016) - **Effect of Chocolate Storage on Total Phenolics, Flavan-3-Ols, Proanthocyanidins, Oxidative Stability and Antioxidant Capacity.** *Food Technology and Biotechnology*. 54(1), 13–20.

LATHAM, L. S.; HENSEN, Z. K.; MINOR, D. S. (2014) - **Chocolate-Guilty Pleasure or Healthy Supplement?** *Journal of Clinical Hypertension*. 16(2), 101–106.

LEMAŃSKA, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; ZIELIŃSKI, R.; SOFFERS, A. E.; RIETJENS, I. M. (2001) - **The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones.** *Free Radical Biology & Medicine*. 31(7), 869–881.

LIMA, L. J. R.; ALMEIDA, M. H.; NOUT, M. J. R.; ZWIETERING, M. H. (2011) - **Theobroma cacao L., “The food of the Gods”: quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51(8), 731–61

LIMA, L. J.; VAN DER VELPEN, V.; WOLKERS-ROOIJACKERS, J.; KAMPHUIS, H. J.; ZWIETERING, M. H.; NOUT, M. J. (2012) - **Microbiota dynamics and diversity at different stages of industrial processing of cocoa beans into cocoa powder.** *Applied and Environmental Microbiology*. 78(8), 2904–2913.

LIPPI, G.; FRANCHINI, M.; MONTAGNANA, M.; FAVALORO, E. J.; GUIDI, G. C.; TARGHER, G. (2009) - **Dark chocolate: Consumption for pleasure or therapy?** *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 28(4), 482–488.

LIPPI, D. (2013) - **Chocolate in History: Food, Medicine, Medi-Food.** *Nutrients*. 5(5), 1573–1584.

LIPPI, D. (2015) - **Sin and Pleasure: The History of Chocolate in Medicine.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(45), 9936–9941.

LIU, J.; LIU, M.; HE, C.; SONG, H.; GUO, J.; WANG, Y.; YANG, H.; SU X. (2014) - **A comparative study of aroma-active compounds between dark and milk chocolate: Relationship to sensory perception.** Journal of the Science of Food and Agriculture. 95(6), 1362–1372.

LOPES, A. S.; GARCIA, N. H. P.; VASCONCELOS, M. A. M. (2003) - **Avaliação das condições de torração após a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum Schum*) e cacau (*Theobroma cacao L.*).** Brazilian Journal of Food Technology. 6(2), 309–316.

MACDONALD-WICKS, L. K.; WOOD, L. G.; GARG, M. L. (2006) - **Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review.** Journal of the Science of Food and Agriculture. 86, 2046–2056.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M, A; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. (2008) - **Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties.** Analytica Chimica Acta. 613(1), 1–19.

MANDALARI, G.; BISIGNANO, C.; GENOVESE, T.; MAZZON, E.; WICKHAM, M. S.; PATERNITI, I.; CUZZOCREA, S. (2011) - **Natural almond skin reduced oxidative stress and inflammation in an experimental model of inflammatory bowel disease.** International Immunopharmacology. 11(8), 915–24.

MATEUS, V.; FAÍSCA, P.; MOTA-FILIPE, H.; SEPODES, B.; PINTO, R. (2013) - **Development of TNBS-induced colitis: animal model to test new pharmacological approaches.** Acta farmacêutica portuguesa. 2(2), 29–35.

MATSUDA, R.; KOIDE, T.; TOKORO, C.; YAMAMOTO, T.; GODAI, T.; MOROHASHI, T.; FUJITA, Y.; TAKAHASHI, D.; KAWANA, I.; SUZUKI, S.; UMEMURA, S. (2009) - **Quantitative cytokine mRNA expression profiles in the colonic mucosa of patients with steroid naïve ulcerative colitis during active and quiescent disease.** Inflammatory Bowel Diseases. 15(3), 328–34.

MEDEIROS, N. S.; MARDER, R. K.; WOHLBERG, M. F.; FUNCHAL, C.; DANI, C. (2015) - **Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Types of Chocolate, Milk, Semisweet, Dark, and Soy, in Cerebral Cortex, Hippocampus, and Cerebellum of Wistar Rats.** Biochemistry Research International. Volume 2015. 1–9.

- MEHROTRA, S.; KAKKAR, P.; VISWANATHAN, P. N. (1991) - **Mitochondrial damage by active oxygen species *in vitro***. *Free Radical Biology & Medicine*. 10(5), 277–85.
- MIAO, L.; CLAIR, D.K.S. (2009) - **Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease**. *Free Radical Biology & Medicine*. 47(4), 344–356.
- MIGUEL, M. G. (2010) - **Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review**. *Flavour and Fragrance Journal*. 25, 291–312.
- MILLER, H. E. (1971) - **A simplified method for the evaluation of antioxidants**. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 48(2), 91–91.
- MILLER, D. M.; BUETTNER, G. R.; AUST, S. D. (1990) - **Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions**. *Free Radical Biology & Medicine*. 8(1), 95–108.
- MIN, D. B.; BOFF, J. M.; (2002) - **Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 1(2), 58–72
- MOON, J-K.; SHIBAMOTO, T. (2009) - **Antioxidant Assays for Plant and Food Components**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(5), 1655–1666.
- MOURE, A.; FRANCO, D.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; LEMA, J. M. (2001) - **Antioxidant activity of extracts from *Gevuina avellana* and *Rosa rubiginosa* defatted seeds**. *Food Research International*. 34(2–3), 103–109.
- MUELLER, M.; HOBIGER, S.; JUNGBAUER, A. (2010) - **Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices**. *Food Chemistry*. 122(4), 987–996.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. (2006) - **Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41(5), 1523–1542.
- NATSUME, M.; OSAKABE, N.; YAMAGISHI, M.; TAKIZAWA, T.; NAKAMURA, T.; MIYATAKE, H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T. (2000) - **Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC**. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 64(12), 2581–2587.
- NDHALA, A. R.; MOYO, M.; STADEN, J. V. (2010) – **Natural antioxidants; Fascinating or mythical biomolecules?** *Molecules*. 15, 6905–6930.

NETO, P. J. S.; MATOS, P. G. G.; MARTINS, A. C. S.; SILVA, P. S. (2001) - **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Belém, CEPLAC, 125p.

OLIVEIRA, L. N.; CASTRO, R. J. C.; OLIVEIRA, M. A. L.; OLIVEIRA, L. F. C. (2015) - **Lipid characterization of white, dark, and milk chocolates by FT-Raman spectroscopy and capillary zone electrophoresis**. Journal of AOAC International. 98(6), 1598–1607.

ORDÁS, I.; ECKMANN, L.; TALAMINI, M.; BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. (2012) - **Ulcerative colitis**. The Lancet. 380(9853), 1606–1619.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. (2015) - **Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis**. Food Research International. 74, 10–36.

PAIVA, S. A.; RUSSELL, R. M. (1999) - **Beta-Carotene and other carotenoids as antioxidants**. The Journal of the American College of Nutrition. 18(5), 426–433.

PALACE, V.P.; KHAPER, N.; QIN, Q.; SINGAL, P.K.; (1999) - **Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease**. Free Radical Biology & Medicine. 26(5-6), 746–761.

PALACIOS, I.; LOZANO, M.; MORO, C.; D'ARRIGO M.; ROSTAGNO, M. A.; MARTÍNEZ, J. A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A. (2011) - **Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms**. Food Chemistry. 128(3), 674–678.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; DEL RIO, D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. (2003) - **Total antioxidant capacity of plant foods, beverages, and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays**. The Journal of Nutrition. 133(9), 2812–2819.

PÉREZ-BEREZO, T.; RAMÍREZ-SANTANA, C.; FRANCH, A.; RAMOS-ROMERO, S.; CASTELLOTE, C.; PÉREZ-CANO, F. J.; CASTELL, M. (2012) - **Effects of a cocoa diet on an intestinal inflammation model in rats**. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.). 237(10), 1181–1188.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. (2005) - **Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(12), 5036–5040.

- PIETTA, P. (2000) - **Flavonoids as antioxidants**. Journal of Natural Products. 63(7), 1035–1042.
- PINTO, A. M.; ROSA, M. S. (2007) - **Resposta Inflamatória**. In: PINTO, A. M. Fisiopatologia, Fundamentos e Aplicações. Lisboa: Lidel. ISBN: 978-972-757-429-2. 185–218.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. (2015) - **The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review**. European Journal of Medicinal Chemistry. 97, 55–74.
- POKORNÝ, J. (2007) - **Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants?** European Journal of Lipid Science and Technology. 109(6), 629–642.
- PRASAD, A. S.; BAO, B.; BECK, F. W.; KUCK, O.; SARKAR, F. H. (2004) - **Antioxidant effect of zinc in humans**. Free Radical Biology & Medicine. 37(8), 1182–1190.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. (2005) - **Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(10), 4290–4302.
- PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. (2011) - **Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids**. Fitoterapia. 82(4), 513–523.
- RAHMAN, K. (2007) - **Studies on free radicals, antioxidants and co-factors**. Clinical Interventions in Aging. 2(2), 219–236.
- RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E. N.; LAKSHMINARASIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I. (2014). - **Antioxidants and human diseases**. Clinica Chimica Acta. 436(25), 332–347.
- RATNAM, D.V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. (2006) - **Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective**. Journal of Controlled Release. 113(3), 189–207.
- REIS, F. S.; MARTINS, A.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. (2012) - **Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples**. Food and Chemical Toxicology. 50(5), 1201–1207.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. (1996) - **Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids**. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(7), 933– 956.

RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; ESPEY, M. G.; THOMAS, D. D.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A. (2005) - **Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(37), 13147–13152.

RUBIÓ, L.; MOTILVA, M.-J.; ROMERO, M.P. (2013) - **Recent Advances in Biologically Active Compounds in Herbs and Spices: A Review of the Most Effective Antioxidant and Anti-Inflammatory Active Principles**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53(53), 943–953.

SARRIÁ, B.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, S.; SIERRA-CINOS, J. L.; GARCIA-DIZ, L.; GOYA, L.; MATEOS, R.; BRAVO, L. (2015) - **Effects of bioactive constituents in functional cocoa products on cardiovascular health in humans**. *Food Chemistry*. 174, 214–218.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E.I.; MILNER, J. A. (2007) - **A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species**. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 18(9), 567–579.

SELMI, C.; COCCHI, C. A.; LANFREDINI, M.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. (2008) - **Chocolate at heart: the anti-inflammatory impact of cocoa flavanols**. *Molecular Nutrition & Food Research*. 52(11), 1340–1348.

SORG, O. (2004) - **Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?** *Comptes Rendus Biologies*. 327(7), 649–662.

SPICKETT, C. M.; WISWEDEL, I.; SIEMS, W.; ZARKOVIC, K.; ZARKOVIC, N. (2010) - **Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products**. *Free Radical Research*. 44(10), 1172–1202.

STEENVOORDEN, D. P.; VAN HENEGOUWEN, G. M. (1997) - **The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection**. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 41(1-2), 1–10.



TABART, J., KEVERS, C., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, J-O., DOMMES, J. (2009) - **Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests.** Food Chemistry, 113(4), 1226–1233.

TABASSUM, A.; BRISTOW, R. G.; VENKATESWARAN, V. (2010) - **Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: a good thing?** Cancer Treatment Reviews. 36(3), 230–234.

TABERNERO, M.; SERRANO, J.; SAURA-CALIXTO, F. (2006) - **The antioxidant capacity of cocoa products: Contribution to the Spanish diet.** International Journal of Food Science and Technology. 41(Supplement 1), 28–32.

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. (2015) - **Critical analysis of current methods for assessing the *in vitro* antioxidant and antibacterial activity of plant extracts.** Food Chemistry. 172, 814–822.

TERPINC, P.; POLAK, T.; ŠEGATIN, N.; HANZLOWSKY, A.; ULRIH, N. P.; ABRAMOVIČ, H. (2011) - **Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids.** Food Chemistry. 128(1), 62–68.

TORRES-MORENO, M.; TARREGA, A.; COSTELL, E.; BLANCH, C. (2012) - **Dark chocolate acceptability: Influence of cocoa origin and processing conditions.** Journal of the Science of Food and Agriculture. 92(2), 404–411.

TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. (2004) - **Metabolism and function of coenzyme Q.** Biochimica et Biophysica Acta. 1660(1-2), 171–199.

VALKO, M.; MORRIS, H.; MAZUR, M.; RAPTA, P.; BILTON, R. F. (2001). **Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of Vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer?** Biochim Biophys Acta. 1527(3), 161–166.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T. (2005) - **Metals, toxicity and oxidative stress.** Current Medicinal Chemistry. 12(10), 1161–1208.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZURA, M.; TELSER, J. (2007) - **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 39(1), 44–84.

VEBER, J. PETRINI, L. A.; ANDRADE, L. B.; SIVIERO, J. (2014) - **Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.)**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 17(2), 267–273.

VERVOORT, L. M.; RONDEN, J. E.; THIJSSSEN, H. H. (1997) - **The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation**. Biochemical Pharmacology. 54(8), 871–876.

WARD, P. A. (2010) - **Acute and Chronic Inflammation**. In: SERHAN, C. N.; WARD, P. A.; GILROY, D. V. Fundamentals of Inflammation. Cambridge: Cambridge University Press. ISBN: 978-0-521-88729-8. 1–16.

WRIGHT, J. S.; JOHNSON, E. R.; DILABIO, G. A. (2001) - **Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical methods, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants**. Journal of the American Chemical Society. 123, 1173–1183.

WU, X.; GU, L.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; BEECHER, G.; PRIOR, R. L. (2004) - **Factors in the development of a database of food total antioxidant capacity using lipophilic and hydrophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>): a preliminary study of 28 foods/ Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study**. Journal of Food Composition and Analysis. 17, 407–422.

YOO, K. M.; LEE, C.H.; MOON, B.; LEE, C. Y. (2008) - **Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs**. Food Chemistry. 106(3), 929–936.

ZENG, H.; LOCATELLI, M.; BARDELLI, C.; AMORUSO, A.; COISSON, J. D.; TRAVAGLIA, F.; ARLORIO, M.; BRUNELLESCHI, S. (2011) - **Anti-inflammatory Properties of Clovamide and Theobroma cacao Phenolic Extracts in Human Monocytes: Evaluation of Respiratory Burst, Cytokine Release, NF- K B Activation, and PPAR  $\gamma$  Modulation**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59(10), 5342–5350.