

Abordagem Fisiológica no Estudo do Impacto dos Polifenóis na Saúde Humana: o Caso das Amoras Silvestres Portuguesas

Physiological Approach in the Study of Polyphenols Impact in Human Health: the Case of Portuguese Wild Blackberries

LUCÉLIA TAVARES¹, RICARDO B. FERREIRA², CLÁUDIA NUNES DOS SANTOS¹

RESUMO

O envelhecimento e as doenças associadas têm assumido nos últimos anos grande importância na sociedade. A possibilidade de prevenção destas doenças através da intervenção nutricional tem impulsionado a investigação de determinadas classes de fitoquímicos, entre eles os polifenóis. Os polifenóis encontrados nas amoras têm-se revelado capazes de modular diversos aspetos relacionados com as doenças neurodegenerativas. Assim, as amoras apresentam-se como candidatos a alimentos funcionais na prevenção da neurodegeneração. A maioria dos estudos *in vitro* realizados com o objectivo de avaliar os efeitos dos polifenóis de alimentos no organismo humano são fisiologicamente pouco relevantes. Aspectos a ter em conta nesse tipo de estudos são a mimetização do processo digestivo a que os alimentos são submetidos quando ingeridos, a avaliação de concentrações de polifenóis passíveis de serem encontradas no plasma sanguíneo bem como a avaliação dos polifenóis em mistura e não de forma isolada. Foi considerando estas particularidades da investigação dos fitoquímicos dos alimentos que se tem conduzido à investigação do potencial de alguns frutos para a saúde humana, como o das amoras silvestres portuguesas na prevenção da neurodegeneração. Estas foram consideradas uma potencial fonte de polifenóis eficazes na proteção dos neurónios, tendo-se verificado que os seus efeitos benéficos se devem a mecanismos moleculares adaptativos, também designados por pré-condicionamento e não à sua capacidade antioxidante.

PALAVRAS-CHAVE: Amoras, Digestão gastrointestinal, Neurodegeneração, Polifenóis

ABSTRACT

Aging and related diseases have assumed in the last years a great importance in the society. The possible prevention of these diseases by nutritional intervention has driven the research of certain phytochemicals classes, such as polyphenols. Blackberry polyphenols have been shown as able to modulate several aspects related with neurodegenerative diseases. Therefore, blackberries are presented as candidates to functional food in neurodegeneration prevention. The majority of *in vitro* studies performed aiming to evaluate effects of polyphenols from food in the human organism had low physiological relevance. Aspects that must be considered in these sort of studies are: mimic the digestive process that food is subjected when ingested, evaluation of polyphenols concentrations that could be found in human plasma and evaluation of polyphenols in mixture, not in the isolated form. Considering these particularities of food phytochemicals research, the research of fruits potential for human health has been investigated, such as the potential of wild Portuguese blackberries in the neurodegeneration prevention. Wild blackberries were considered potential sources of polyphenols promoting an efficient neuronal protection. It was also verified that beneficial effects mediated by those blackberries are due to molecular adaptive mechanisms, also known as preconditioning and not to their antioxidant capacity.

KEYWORDS: Blackberries, Gastrointestinal digestion, Neurodegeneration, Polyphenols

INTRODUÇÃO

Envelhecimento e as Doenças Degenerativas

O aumento da esperança média de vida observado no último século tem conduzido ao emergir das doenças relacionadas com o envelhecimento. Nas sociedades modernas dos países industrializados estas doenças representam um grande desafio que necessita de constante investigação (1). De entre as doenças relacionadas com o envelhecimento destacam-se as doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica. Este grupo de doenças, ainda incuráveis, caracteriza-se pela perda lenta e progressiva de neurónios e conduz consequentemente à perda de determinadas funções do sistema nervoso central (2). O impacto económico e social destas doenças quer para

os idosos e suas famílias, quer para os sistemas de saúde é enorme e tende a aumentar nos anos futuros. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2004, as doenças neurodegenerativas afectavam 29,4 milhões de pessoas em todo o mundo (3), sendo a estimativa do número de pessoas com Alzheimer em 2040 de 81,1 milhões apenas na Europa (4). Um estudo mais recente aponta o custo por doente com doença neurodegenerativa de 22.000 € por ano, na Europa (4). A intervenção nutricional assume desta forma um papel muito importante na prevenção destas doenças. Estudos epidemiológicos têm revelado que o consumo regular de alimentos ricos em polifenóis como frutas e vegetais diminui a predisposição para contrair doenças neurodegenerativas (5-7).

¹ Investigadora, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica; Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa

² Professor Catedrático, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa; Investigador convidado, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa

Correspondência para Cláudia Santos: Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, 2780-157 Oeiras csantos@itqb.unl.pt

Recebido a 27 de Fevereiro de 2013
Aceite a 30 de Abril de 2013

O Papel das Amoras na Prevenção da Neurodegeneração

Os pequenos frutos têm um reconhecido elevado valor nutricional e estão descritos com vários efeitos benéficos para a saúde (8-10). Actualmente, existem várias evidências científicas do seu benefício na memória e manutenção do estado cognitivo, o qual é deteriorado com o envelhecimento (11, 12). Em modelos animais, usando ratos envelhecidos, o consumo de amoras melhorou a performance em testes motores relacionados com equilíbrio e coordenação motora, bem como em testes que avaliaram a memória espacial (13).

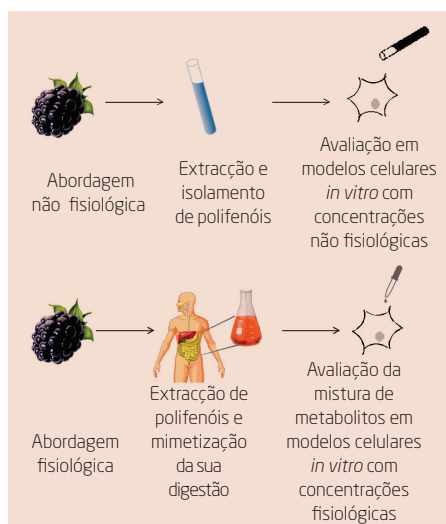
A Diversidade das Amoras

A ocorrência em Portugal de espécies de amoras silvestres, em estado selvagem, constitui uma enorme fonte de diversidade de fitoquímicos, nomeadamente polifenóis. Das espécies de amoras silvestres descritas na Península Ibérica ascende a uma dezena as identificadas em Portugal (14). Estas espécies são diferentes das que geralmente ocorrem no resto do mundo e das que são utilizadas nos processos de melhoria, que dão origem aos frutos que encontramos disponíveis no mercado (14, 15). Estas espécies de amoras pensa-se serem espécies pré-glaciares que sobreviveram às duas últimas glaciações em zonas consideradas refúgio, como a zona de Trás-os-Montes em Portugal (14). A diversidade química existente nestas espécies torna a avaliação do seu potencial neuroprotetor extremamente interessante.

Avaliação dos Efeitos dos Polifenóis dos Alimentos no Organismo Humano

Até recentemente a grande maioria dos estudos para avaliação dos efeitos benéficos dos polifenóis presentes nos alimentos eram realizados usando abordagens sem representatividade fisiológica (16, 17). Nesses ensaios os polifenóis eram geralmente extraídos dos alimentos e testados diretamente nas linhas celulares, de forma isolada (não em mistura como ocorre nos alimentos) e em elevadas concentrações (muitas vezes em concentrações superiores a 1 mM) (Figura 1) (16, 17).

FIGURA 1: Representação esquemática das diferenças entre a abordagem não fisiológica frequentemente adoptada em modelos *in vitro* em comparação com a abordagem fisiológica recentemente adoptada



No entanto, quando um alimento é consumido, os vários polifenóis que o alimento contém são ingeridos simultaneamente e são sujeitos às condições gastrointestinais (17). A acção dos enzimas e as alterações de pH durante o processo digestivo irão produzir alterações na estrutura química destes. Também a barreira intestinal desempenha um papel importante na biodisponibilidade destes compostos, limitando quais os polifenóis que são absorvidos e as suas quantidades que posteriormente poderão circular no plasma sanguíneo (18, 19). Recentemente e tendo em consideração os aspectos enumerados anteriormente, tem sido adoptada uma abordagem mais fisiológica para a avaliação do potencial dos polifenóis na saúde humana (20-22).

Actividade Antioxidante

Um das características frequentemente associada aos polifenóis é a sua actividade antioxidante. No entanto, devido às alterações da estrutura química dos polifenóis aquando da sua passagem pelo sistema gastrointestinal, esta poderá ser alterada (19). Por outro lado também a reduzida absorção destes compostos ao nível intestinal limita a quantidade destas moléculas que poderá exercer um efeito antioxidante junto da maioria dos órgãos internos humanos (23). A comunidade científica tem nos últimos anos vindo a reconhecer que a medição da capacidade antioxidante química (pelo método de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC), por exemplo) não traduz o efeito protector dos compostos provenientes dos alimentos, nas células. Como resultado, foram recentemente eliminados da base de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América os valores de ORAC para diversos alimentos. Um estudo realizado por Tavares et al. (2012) comparou os efeitos de polifenóis extraídos de amoras comerciais antes e depois de sujeitos a uma digestão *in vitro* que mimetiza o processo gastrointestinal. Nesse estudo avaliou-se a capacidade protectora dos polifenóis, em células humanas sujeitas a um stress oxidativo. Os resultados obtidos mostraram que a digestão potencia os efeitos protectores dos polifenóis de amoras no combate ao stress oxidativo, avaliados pela viabilidade celular (24). No entanto, os mecanismos protectores mediados pelos polifenóis após digestão *in vitro* não resultaram da captação directa de radicais livres (actividade antioxidante directa), nem da modulação dos níveis de glutatión (principal antioxidante endógeno não enzimático) (24). O efeito protector poder-se-á dever à modulação de outros sistemas antioxidante endógenos como enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, etc) (24). Apesar de ainda não estarem completamente esclarecidos os mecanismos de acção pelos quais os polifenóis de amoras actuam no organismo humano, o referido estudo reforçou a ideia de que a abordagem mais frequentemente adoptada para a avaliação do impacto dos alimentos na saúde humana deveria ser alterada, tendo em conta as alterações físico-químicas a que os alimentos estão sujeitos até atingirem o plasma sanguíneo ou o órgão sobre o qual irão actuar. A abordagem proposta contempla a avaliação *in vitro* dos polifenóis em condições de ensaio próximas das condições fisiológicas, em modelos celulares humanos de doença (Figura 1). Isto é, não utilizando os polifenóis isolados, mas alternativamente submetten-

do as amoras às condições gastrointestinais através de modelos *in vitro* e testando os metabolitos assim obtidos em células humanas em concentrações passíveis de serem encontradas no plasma sanguíneo (0-4 µM) (24, 25).

Avaliação dos Efeitos Neuroprotectores dos Polifenóis de Espécies de Amoras Silvestres Portuguesas

A abordagem acima referida foi a adoptada para a avaliação do potencial neuroprotector de espécies Portuguesas de amoras silvestres (25).

A avaliação das espécies silvestres foi iniciada com a prospecção em campo de diversas espécies de amoras silvestres na zona de Trás-os-Montes. Foram colhidos frutos de diversas populações de cada espécie e foi avaliado o seu perfil fitoquímico (25). Apesar da semelhança dos compostos existentes nas amoras silvestres e comerciais, as proporções relativas dos polifenóis revelaram-se diferentes. Posteriormente, foi realizada a mimetização da digestão gastrointestinal dos fitoquímicos e avaliados os efeitos neuroprotectores com concentrações fisiológicas dos mesmos num modelo celular humano de neurodegeneração. Os polifenóis das espécies de amora silvestres (*R. brigantinus* e *R. vagabundus*) após digestão gastrointestinal mostraram uma clara protecção da viabilidade e funcionalidade celular no modelo testado, melhor que a obtida por amoras comerciais (25). Os resultados obtidos mostraram uma clara neuroprotecção mediada por mecanismos moleculares adaptativos desencadeados pelas amoras silvestres, também conhecidos como pré-condicionamento ou hormese (25). Estes mecanismos são conhecidos por activarem mecanismos de defesa celulares a níveis equivalentes aos activados por um stress moderado (26, 27). Dessa forma, quando as células são submetidas a um stress que pode comprometer a integridade celular, as defesas então activadas conseguem atenuar ou mesmo anular os efeitos prejudiciais induzidos pelo agente stressante. Os polifenóis das amoras silvestres estudadas promoveram o aumento dos níveis de glutatión livre e da actividade de caspases efectoras 3 e 7, enzimas envolvidas no desenrolar da apoptose celular (25).

De forma a complementar e validar as conclusões obtidas até então estão a ser concluídos os estudos mecanísticos ao nível celular por abordagens transcriptómica e proteómica. Adicionalmente, decorre ainda a avaliação da estabilidade dos perfis fitoquímicos e bioactividades dos polifenóis existentes nestes frutos após sua introdução em cultura para produção comercial.

CONCLUSÕES

Os trabalhos desenvolvidos evidenciaram a importância de serem avaliados os efeitos dos polifenóis e outros fitoquímicos presentes nos alimentos, contemplando as etapas fisiológicas desde a sua ingestão até atingirem os órgãos alvo.

É portanto essencial fazer uma correcta avaliação dos estudos que determinam o efeito de polifenóis e outros fitoquímicos com interesse para a saúde humana existentes na literatura científica. Sendo esta uma área bastante dinâmica e em constante actualização, as alterações de paradigma repercutem-se em alterações na abordagem científica bastante rápidas. Nos

últimos meses têm surgido diversas publicações científicas em que a avaliação destes fitoquímicos é efectuada *in vitro* adoptando uma abordagem fisiológica. Por outro lado a diversidade de plantas, natural ou orientada pelo Homem através de melhoramento, representa uma enorme fonte de fitoquímicos a ser explorada. Pequenas alterações nos conteúdos ou estrutura dos polifenóis são capazes de mediar efeitos distintos em modelos celulares ou animais. Desta forma, novos ingredientes ou alimentos poderão surgir, visando a manutenção do bem-estar e saúde e até mesmo a prevenção de doenças.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao financiamento proporcionado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do programa estratégico PEst-OE/EQB/LA0004/2011 e bolsas SFRH/BPD/84618/2012 e SFRH/BPD/84336/2012. Gostariam ainda de agradecer ao financiamento através do projecto EUBerry (EU FP7 KBBE-2010-4 265942) e COST FA 1005 Infogest.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience* 2003;26:81-104
2. Coppède F, Mancuso M, Siciliano G, Migliore L, Murri L. Genes and the Environment in Neurodegeneration. *Bioscience Reports* 2006;26:341-367
3. WHO. Global Burden of Disease 2004
4. Wimo A, Jonsson L, Gustavsson A, McDaid D, Ersek K, Georges J et al. The economic impact of dementia in Europe in 2008-cost estimates from the Eurocode project. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 2011;26:825-832
5. Krikorian R, Shidler MD, Nash TA, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk MR, Shukitt-Hale B et al. Blueberry supplementation improves memory in older adults (dagger). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010;58:3996-4000
6. Nurk E, Refsum H, Drevon CA, Tell GS, Nygaard HA, Engedal K et al. Cognitive performance among the elderly in relation to the intake of plant foods. The Hordaland Health Study. *British Journal of Nutrition* 2010;104:1190-1201
7. Beking K, Vieira A. Flavonoid intake and disability-adjusted life years due to Alzheimer's and related dementias: a population-based study involving twenty-three developed countries. *Public Health Nutrition* 2010;13:1403-1409
8. Basu A, Lyons TJ. Strawberries, blueberries, and cranberries in the metabolic syndrome: Clinical perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011;doi: 10.1021/jf203488k
9. Paredes-Lopez O, Cervantes-Ceja ML, Vigna-Perez M, Hernandez-Perez T. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life--a review. *Plant Foods Hum Nutr* 2010;65:299-308
10. Kolehmainen M, Mykkanen O, Kirjavainen PV, Lepanen T, Moilanen E, Adriaens M et al. Bilberries reduce low-grade inflammation in individuals with features of metabolic syndrome. *Molecular Nutrition and Food Research* 2012;56:1501-1510
11. Shukitt-Hale B, Lau FC, Joseph JA. Berry fruit supplementation and the aging brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56:636-641
12. Malin DH, Lee DR, Goyarzu P, Chang YH, Ennis LJ, Beckett E et al. Short-term blueberry-enriched diet prevents and reverses object recognition memory loss in aging rats. *Nutrition* 2010;doi: 10.1016/j.nut.2010.05.001
13. Shukitt-Hale B, Cheng V, Joseph JA. Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. *Nutritional Neuroscience* 2009;12:135-140
14. Jennings DL. Raspberries and Blackberries: their breeding, diseases and growth. London: Academic Press; 1988
15. Finn CE, Hancock JF. Blackberries- Temperate fruit crop breeding: Springer Netherlands; 2008. p. 83-114
16. Virgili F, Marino M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* 2008;45:1205-1216
17. Del Rio D, Costa LG, Lean ME, Crozier A. Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2010;20:1-6
18. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004;79:727-747
19. Rein MJ, Renouf M, Cruz-Hernandez C, Actis-Goretti L, Thakkar SK, Pinto MD. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2013;75:588-602
20. Chiang CJ, Kadouh H, Zhou KQ. Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by *in vitro* digestion. *LWT - Food Science and Technology* 2013;51:417-422
21. Chen GL, Hu K, Zhong NJ, Guo J, Gong YS, Deng XT et al. Antioxidant capacities and total polyphenol content of nine commercially available tea juices measured by an *in vitro* digestion model. *European Food Research and Technology* 2013;236:303-310
22. Mandalari G, Bisignano C, Filocamo A, Chessa S, Saro M, Torre G et al. Bioaccessibility of pistachio polyphenols, xanthophylls, and tocopherols during simulated human digestion. *Nutrition* 2013;29:338-344
23. Stevenson D, Hurst R. Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences* 2007;64:2900-2916
24. Tavares L, Figueira I, Macedo D, McDougall GJ, Leitão MC, Vieira HLA et al. Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus sp.*) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 2012;131:1443-1452
25. Tavares L, Figueira I, McDougall G, Vieira H, Stewart D, Alves P et al. Neuroprotective effects of digested polyphenols from wild blackberry species. *European Journal of Nutrition* 2013;52:225-236
26. Calabrese EJ, Iavicoli I, Calabrese V. Hormesis: its impact on medicine and health. *Human & Experimental Toxicology* 2013;32:120-152
27. Calabrese V, Cornelius C, Mancuso C, Pennisi G, Calafato S, Bellia F et al. Cellular stress response: a novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochemical Research* 2008;33:2444-2471