



AÇÃO DE EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE UVAS PRETAS (*Vitis vinifera*) EM ERITRÓCITOS HUMANOS E SOBRECARGA OXIDATIVA POR *tert*-BUTIL HIDROPERÓXIDO

The *in vitro* protective effect of black grape extracts on *tert*-butylhydroperoxide-induced red blood cell oxidative damage

**Samuel Ricardo Comar; Aguinaldo Jose do Nascimento^{*}; Tomoe Nakashima;
Obdúlio Gomes Miguel; Maria Suely Soares Leonart**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

Av. Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico 802210-170, Curitiba, PR

* Autor para correspondência: ajnasc@ufpr.br

Recebido em 01/08/2008 - Aceito em 14/10/2008

RESUMO: Analisou-se a ação oxidante do *tert*-butilhidroperóxido (*t*BHP) em eritrócitos humanos tratados com a ação antioxidante do extrato de cascas de *V. vinifera*. Os eritrócitos foram ressuspensos em PBS em um volume globular de 40%, e submetidos à ação pró-oxidativa do *t*BHP por 15-30 min, com ou sem incubação prévia com extrato hidroalcolico de uva. A formação de corpos de Heinz pelo *t*BHP foi inibida e o GSH depletado pelo *t*BHP foi mantido na presença do extrato da uva. Os resultados obtidos sugerem o efeito antioxidante dos flavonóides, dos taninos e das antocianidinas encontrados no extrato hidroalcolico de cascas de uvas pretas.

PALAVRAS-CHAVES: *tert*-butilhidroperóxido; *vitis vinifera*; extratos vegetais

ABSTRACT: The oxidative action of *tert*-butylhydroperoxide (*t*BHP) on human erythrocytes treated with antioxidant action of extract of black grape skins was studied. The erythrocytes were resuspended in PBS to obtain 40% globular volume, and then submitted to the oxidative action of *t*BHP for 15-30 min, with or without previous incubation with water-alcoholic extract of grape skins. Formation of Heinz bodies by *t*BHP was inhibited and the GSH depleted by *t*BHP was kept in the presence of the grape extract. The results obtained suggest the antioxidant effect of flavonoids, tannins and anthocyanidins found in the water-ethanol extract of black grape skins.

INTRODUÇÃO

Na reação de Fenton, a oxidação do íon ferroso facilita a conversão do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e a espécies freqüentemente envolvidas nas reações que iniciam a peroxidação lipídica (STOHS & BAGCHI, 1995).

O interesse em alimentos e plantas que contenham compostos polifenólicos vem crescendo enormemente, devido à sua capacidade antioxidante por quelação de metais e seqüestro de radicais livres através de transferência de elétrons, presentes em suas hidroxilas e a seus possíveis efeitos benéficos na saúde humana como proteção contra doenças cardiovasculares (CERIELLO et al., 2001), melhoramento da função de células endoteliais (AGEWALL et al., 2000), resistência ao estresse oxidativo (VELLOSA et al., 2007), proteção do DNA de células da mucosa do colo uterino (GIOVANNELLI et al., 2000), prevenção da agregação plaquetária (HALPERN et al., 1998), atividades antiinflamatórias (GALDINO et al., 2007) e inibição de crescimento de cultura de células cancerosas *in vitro* (ELATTAR & VIRJI, 2000).

Dentre vários compostos químicos que exercem ação antioxidante, seja por ação quelante de metais ou por seqüestro de radicais livres, destacam-se no presente trabalho as substâncias presentes no extrato de uva preta (*Vitis vinifera*) dentre as quais, as antocianidinas, flavonóides, taninos e fenilpropanóides. (SOUQUET et al., 2000; VINSON et al., 2000).

Este trabalho teve o objetivo de estudar a ação antioxidante de extrato de *V. vinifera* em eritrócitos humanos submetidos a estresse oxidativo por tBH, amplamente utilizado em estudos dos mecanismos de oxidação celular, por sua habilidade de reagir com a hemoglobina e outros derivados do heme, lipídeos da membrana e grupamentos tióis de proteínas plasmáticas. (DEUTICKE et al., 1987).

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação de suspensões de eritrócitos - Foram coletados 20 ml do sangue venoso em etilenodiaminotetraacetato (EDTA_K - 1mg/ml) de 12 indivíduos adultos saudáveis, sendo 8 do sexo masculino e 4 do sexo feminino, com idades de 18 a 40 anos, após consentimento informado e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba. O sangue foi centrifugado a 800 x g por 25 min a fim de remover o plasma, plaquetas e leucócitos. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com 123 mmoles/l NaCl em 28 mmoles/l de tampão de fosfato, pH 7,4, pela centrifugação a 1200 x g por 5 min, e ressuspensos no tampão fosfato em um volume globular de 40%. Em seguida foram divididas em alíquotas de 2 ml, centrifugadas a 1200 x g por 5 min, com substituição dos sobrenadantes das frações pelo mesmo volume dos reagentes da solução (0,01 - 5mg/ml do extrato de *V. vinifera*). Incubou-se as amostras, durante 30 min, à temperatura ambiente, homogeneizando-as em aparelho PHOENIX HS 22.

Incubação com tBHP - Suspensões de eritrócitos, incubadas ou não com extrato de *V. vinifera*, foram incubadas com o tBHP em uma concentração final de 0.5 - 5 mmoles/l e homogeneizadas durante 15 min à temperatura ambiente.

Preparo do extrato hidroalcolico de V. vinifera - A 350 g de cascas de uva (*V. vinifera*), obtidas através de expressão manual seguida de trituração, adicionou-se 700 ml de álcool etílico a 70 °GL. Levou-se a mistura à fervura em condensador de refluxo durante 5 min, até o esgotamento total dos pigmentos solúveis e visíveis no solvente, Filtrou-se o extrato em papel de filtro qualitativo, recolhendo-o em frasco Erlenmeyer. O filtrado hidroalcolico foi concentrado a sua nona parte em evaporador rotatório (IKAN, 1991) e liofilizado. O rendimento obtido foi de 18,71 g de extrato liofilizado, ou seja, 5,34 % do peso inicial. Fracionou-se o liofilizado em alíquotas solubilizadas em 123 mmoles/l de NaCl em 28 mmoles/l de tampão fosfato, pH 7,4 pouco antes de se realizar os experimentos. Polifenóis como antocianidinas foram observados por CLAE e espectroscopia UV-visível. A antocianidina malvidina-3-O-glucosídeo, foi o principal composto observado no extrato. O extrato produziu uma cor vermelha no teste de Shinoda, típico para flavonóides (CUNHA, 2005). O pH tem um efeito profundo na estabilidade da antocianidina e na expressão da cor, particularmente em uma solução aquosa. As mudanças na cor de vermelho (ácido) ao azul (alcalino) devido às mudanças de pH foram observadas (CUNHA, 2005). A reação do extrato com o 1% cloreto férrico e 10% de acetato chumbo desenvolveu uma cor azul, indicando a presença dos taninos (COSTA, 2001).

Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE) - As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em aparelho Merck-Hitachi® composto de bomba L7100, degaseificador de solventes L7812, válvula de injeção Rheodyne® 7725i com loop de 20µl, forno L-7300, detector DAD L7450, em 325 nm para ácido clorogênico e 350 nm para a rutina, interface L7000 conectada ao sistema operacional Windows® NT e tratamento dos dados pela ChemiStation Lachrom®. Utilizou-se a coluna analítica Xterra RP18 5µm. Gradiente ternário, utilizando como fase móvel A 0,2% de ácido fosfórico em ácido sulfúrico 0,0 1M, fase móvel B metanol e fase C acetonitrila. O gradiente de retenção foi: 0-5 min a 1,2 ml/min com 100% A; 5-15 min a 1,2ml/min com 90%A, 7%B e 3%B; 15-40 min a 1,2 ml/min com 59%A, 26%B e 15%C; 40-47 min a 1,2 ml/min com 55%A, 30%B e 15%C; 47-54 min a 1,3 ml/min com 45%A, 30%B e 25%C; 54-55 min a 1,3 ml/min com 20%A, 40%B e 40%C; 55-64 min a 1,2 ml/min com 100%A.

Análise do espectro ultra violeta - visível - As análises foram realizadas em espectrofotômetro acoplado ao equipamento de CLAE. Verificou-se no espectro UV-Visível do composto com tempo de retenção de 27,03 min, a presença de um pico de absorção em 280 nm e outro em 528 nm. As antocianidinas possuem absorbância intensa entre os comprimentos de onda de 465 a 550 nm (Banda I) e de 270 a 280 (Banda II). Os espectros foram, portanto, bastante característicos para a identificação de antocianidinas (JACKMAN; SMITH, 1992), sugerindo, desta forma, a sua presença no extrato estudado.

Determinações de corpos de Heinz – Realizou-se a contagem de corpos de Heinz, segundo o método de BEUTLER *et al.* (1955), modificado por CLARO (2006). Os corpos de Heinz foram contados usando o microscópio de luz (1000 células por lâminas). Os resultados foram expressos como a porcentagem dos eritrócitos mostrando mais de uma inclusão violeta, junto a membrana plasmática.

Determinação de GSH – A concentração de GSH foi analisada pelo método para a determinação da glutatona do sangue (BEUTLER *et al.*, 1963), avaliando-se a redução de 5.5' - ditiobis (ácido 2-nitro benzóico) (DTNB) por compostos sulfidrílicos em $\lambda = 412$ nm (espectrofotômetro Shimadzu). A concentração de GSH foi expressa em μ moles GSH/g de hemoglobina.

Análises estatísticas – A significância estatística dos dados experimentais foi analisada pela ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$), com o uso do programa para microcomputadores Statistica (StatSoft). Os tamanhos amostrais estão descritos nas figuras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema experimental foi constituído de eritrócitos humanos incubados em um meio contendo tBHP como pró-oxidante. A reação de tBHP com a molécula de hemoglobina pode resultar na formação de seus radicais alcoxil (TBHO) e peróxil (TBHOO), causando ações diretas em grupos sulfidril essenciais. Os danos induzidos por tBHP nos eritrócitos compreendem a ocorrência de vazamento de íons e peroxidação lipídica, bem como oxidação e precipitação da hemoglobina (TROTTA *et al.*, 1982; DEUTICKE *et al.*, 1987; van der ZEE *et al.*, 1989, CESQUINI *et al.*, 2003).

A concentração de GSH diminuiu na presença de 0,5 a 1 mmol/l tBHP, com depleção completa acima de 1 mmol/l de tBHP, após 15 min de incubação (Fig. 1). O tBHP é metabolizado pela GSH peroxidase, acompanhando a oxidação do GSH para sua forma dissulfeto (GSSG). O dissulfeto resultante é então reduzido a GSH pela GSH redutase, com consumo de NADPH. Se a defesa do eritrócito é enfraquecida, o tBHP inicia a cadeia de reações de radicais livres (DOMANSKI *et al.*, 2005).

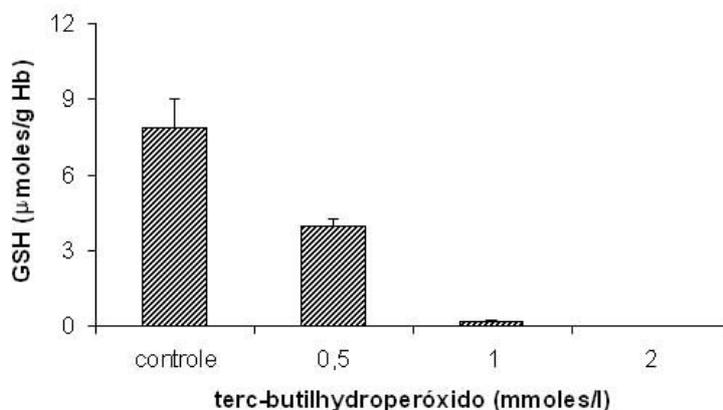


Fig 1. Efeito da concentração de tBHP sobre os níveis de GSH em eritrócitos humanos normais.

Os eritrócitos foram suspensos a 40% (v/v) em 123 mmoles/l de NaCl e 28 mmoles/l de tampão fosfato, pH 7,4.; N = 9.

Os eritrócitos foram submetidos à ação de 0,5 a 2,0 mmoles/l de tBHP durante 15 min à temperatura ambiente; Controle – suspensão de eritrócitos sem tBHP. Valor de referência em eritrócitos normais, GSH $6,7 \pm 1$ μ moles/g Hb (BEUTLER, 1984)

A Fig. 2 mostra que o extrato hidroalcolólico de uvas pretas (0,1 mg/ml) impediu a depleção parcial de GSH por 0,5 mmole/l de tBHP ($4,4 \pm 0,1$ moles GSH/g Hb) enquanto concentrações de 0,5 e 1,0 mg/ml de extrato, mantiveram valores normais de GSH, de $7,4 \pm 0,4$ e $7,3 \pm 0,1$ moles GSH/g Hb, respectivamente. Os polifenóis podem ser responsáveis pela recuperação de GSH devido à sua atividade antioxidante, relacionada ao deslocamento de elétron no núcleo aromático. Tais compostos reagem com os radicais livres, e os radicais fenoxil produzidos são estabilizados pelo efeito de ressonância do núcleo aromático (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

A formação de corpos de Heinz induzida por 1-5 mmoles/l de tBHP está ilustrada na Fig. 3. Foi observado aumento de 2 a 17% em função da concentração de tBHP. A Fig. 4 ilustra a ação de extrato de uva na formação de corpos de Heinz em eritrócitos expostos a 3 mmoles/l de tBHP. Pode-se observar uma diminuição significativa na formação dos corpos de Heinz acima de 1 mg/ml de extrato, sugerindo o efeito anti-oxidante.

No extrato de cascas de uvas pretas usadas neste trabalho, foi sugerido, através de cromatografia líquida de alta eficiência, que o composto presente em maiores quantidades era a antocianidina malvidina-3-O-glucosídeo. Geralmente, as antocianidinas podem ter uma atividade anti-oxidante atribuída tanto ao poder redutor da estrutura o-dihidroxi no anel B, como ao número e arranjo de grupos hidroxila na molécula. A antocianidina malvidina tem grupos metoxila nas posições 3 e 5 e um grupo hidroxila na posição 4 do anel B. Há também a ligação da função 4-oxo e dupla ligação 2,3 em conjugação no anel C. Esses critérios são eficientes para a exterminação de radicais livres, no fenômeno denominado *scavenging*. A glicosilação na posição 3 reduz fracamente a atividade anti-oxidante, provavelmente porque esta característica estrutural não traz uma contribuição significativa para a capacidade anti-oxidante total desta molécula (RICE-EVANS et al., 1996).

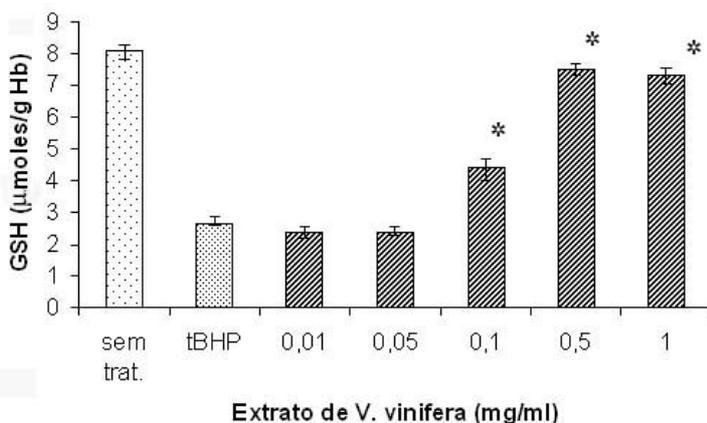


Fig. 2. Efeito protetor de extratos de *V. vinifera* contra a depleção de GSH induzida pelo tBHP

Os eritrócitos foram suspensos a 40% (v/v) em 123 mmoles/l de NaCl e 28 mmoles/l de tampão fosfato, pH 7,4; N = 9; Os eritrócitos foram tratados com 0 a 1 mg/ml de extrato de *V. vinifera* durante 30 min, seguidos da ação de 0,5 mmoles/l de tBHP durante 30 min à temperatura ambiente.

Sem trat. – não tratados; tBHP – tratados apenas com 0,5 mmoles/l de tBHP durante 30 min.

* - Diferenças estatisticamente significativas comparadas com o controle tBHP (p<0,05).

Valor de referência em eritrócitos normais, GSH 6,7±1 µmoles/g Hb (BEUTLER, 1984).

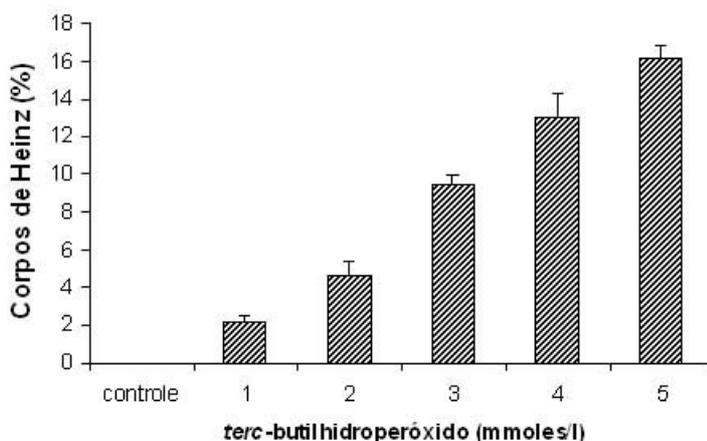


Fig. 3. Efeito da concentração de tBHP sobre a formação de corpos de Heinz em eritrócitos humanos normais.

Os eritrócitos foram suspensos em 123 mmoles/l de NaCl e 28 mmoles/l de tampão fosfato, pH 7,4 em aproximadamente 40% (v/v). N = 15

Os eritrócitos foram submetido à ação de 1,0 a 5,0 mmoles/l de tBHP durante 15 min à temperatura ambiente; Controle – suspensão de eritrócitos sem tBHP.
Valor de referência em eritrócitos normais, 0% de Corpos de Heinz (CHAVES et al., 2008).

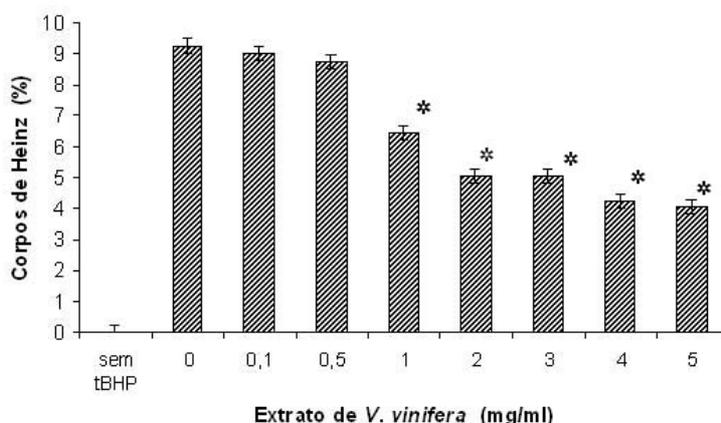


Fig. 4. Efeito protetor de extratos de *V. vinifera* contra a formação de corpos de Heinz induzida pelo tBHP

Os eritrócitos foram suspensos a 40% (v/v) em 123 mmoles/l de NaCl e 28 mmoles/l de tampão P, pH 7.4. N = 9
Os eritrócitos foram tratados com 0 a 5 mg/ml de extrato de *V. vinifera* durante 30 min, seguidos da ação de 3,0 mmoles/l de tBHP durante 15 min à temperatura ambiente.
Controle – Em amostras de eritrócitos não tratados com tBHP e tratados somente com extrato de *Vitis vinifera* 0,1 a 5,0 mg/ml não houve formação de corpos de Heinz.
* - Diferenças estatisticamente significativas comparadas com o controle ($p < 0,05$).
Valor de referência em eritrócitos normais, 0% de Corpos de Heinz (CHAVES et al., 2008).

Para combater o estresse anti-oxidativo, os tecidos desenvolveram sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Entretanto, esses antioxidantes endógenos não são suficientes sob estresses oxidativos acentuados, sendo necessário o uso de antioxidantes exógenos. Neste contexto, os flavonóides são altamente eficazes e conseqüentemente estão emergindo gradualmente como alternativas viáveis às drogas convencionais para as várias doenças mediadas por radical livre. Estes compostos contêm geralmente um ou mais grupo hidroxil aromático, que ativamente limpam radicais livres e são responsáveis pela atividade antioxidantes (SCHINDLER & MENTLEIN, 2006; TAKASU, et al., 2006; CHAUDHURI et al., 2007).

Outros compostos fenólicos encontrados no extrato, como flavonóides e taninos, têm também atividades antioxidantes e uma associação entre estes compostos para conferir uma atividade potencial não é descartada. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a capacidade do tBHP em afetar os mecanismos de defesa dos eritrócitos e de oxidar a molécula do hemoglobina, pode ser parcialmente inibida pelo extrato hidroalcolico de cascas de uvas pretas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGEWALL, S.; WRIGHT, S.; DOUGHTY, R.N.; WHALLEY, G.A., Duxbury, M., Sharpe, N. Does a glass of red wine improve endothelial function? *Eur. Heart J.* v. 21, n. 1, p. 74-78, 2000
- BEUTLER, E.; DERN, R.J.; ALVING, A.S. The hemolytic effect of primaquine. *J. Lab. Clin. Med.* v. 45, p. 40-45, 1955
- BEUTLER, E.; DUROM, O., KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* v. 61, p. 882-890, 1963.
- BEUTLER, E. *Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods.* 3 ed. Orlando:Grune & Stratton, 1984

- CERIELLO, A.; BORTOLOTTI, N.; MOTZ, E.; LIZZIO, S.; CATONE, B.; ASSALONI, R.; TONUTTI, M.; TABOGA, C. Red wine protects diabetic patients from meal-induced oxidative stress and thrombosis activation: a pleasant approach to the prevention of cardiovascular disease in diabetes. *Eur. J. Clin. Invest.* v. 31, n. 4, p. 322-328, 2001.
- CESQUINI, M.; TORSONI, M.A.; STOPPA, G.R.; OGO, S.H. *t*-BOOH- induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* v.57, p.1'23-129, 2003
- CHAVES, M. A.F., LEONART, M.S.S.; NASCIMENTO, A.J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. *Hematology*, v. 13. n.3, p. 187-192, 2008
- CHAUDHURI, S., BANERJEE, A., BASU, K., SENGUPTA, B., SENGUPTA, P.K. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules* v. 41 p. 42-48, 2007
- CLARO, L.M.; LEONART, M.S.; COMAR, S.R.; NASCIMENTO, A.J. Effect of vitamins C and E on oxidative processes in human erythrocytes. *Cell Biochem. Funct.* v. 24, p. 531-535, 2006
- COSTA, A.F. *Farmacognosis*, 3th ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Rio de Janeiro, 2001
- CUNHA, P.A. *Farmacognosia e Fitoquímica*, 1st ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2005.
- DEUTICKE, B.; HELLER, K.B.; HAEST, C.W. Progressive oxidative membrane damage in erythrocytes after pulse treatment with *t*-butylhydroperoxide. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 889, p. 113-124, 1987
- DOMANSKI, A.V.; LAPSHINA, E.A.; ZAVODNIK, I.B. Oxidative processes induced by tert-butyl hydroperoxide in human red blood cells: chemiluminescence studies. *Biochemistry (Mosc).* v. 70, p. 761-769, 2005
- ELATTAR, T.M.; VIRJI, A.S. The inhibitory effect of curcumin, genistein, quercetin and cisplatin on the growth of oral cancer cells in vitro. *Anticancer Res.* v. 20, p. 1733-1738, 2000
- GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M.V.M.; GONÇALVES, N.Z.; GUIMARÃES, H.A., MATOS, L.G.; PAULA, J.R.; COSTA, E.E. Espécies vegetais do cerrado, avaliadas no laboratório de farmacologia de produtos naturais. *Revista Eletrônica de Farmácia, suplemento.* v. 4, n. 2, p.183-186, 2007
- GIOVANNELLI, L.; TESTA, G.; DE FILIPPO, C.; CHEYNIER, V.; CLIFFORD, M.N.; DOLARA, P. Effect of complex polyphenols and tannins from red wine on DNA oxidative damage of rat colon mucosa in vivo. *Eur. J. Clin. Nutr.* v. 39, p. 207-212, 2000.
- HALPERN, M.J.; DAHLGREN, A.L.; LAAKSO, I.; SEPPANEN-LAAKSO, T.; DAHLGREN, J.; MCANULTY, P.A. Red-wine polyphenols and inhibition of platelet aggregation: possible mechanisms, and potential use in health promotion and disease prevention. *J. Internat. Med. Res.* v. 26, p. 171-180, 1998.
- IKAN, R. *Natural Products. A Laboratory guide.* 2nd. ed. San Diego: Academic Press, San Diego, pp. 1-23, 1991.
- JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. *Anthocyanins and betalains.* In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. *Natural Food Colorants.* London : Blackie Academic. 1992. p. 183-241.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* v. 20, p. 933-956, 1996

SCHINDLER, R.; MENTLEIN, R.. Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells. *J. Nutr.* v. 136, p. 1477-1482, 2006.

STOHS, S. J., BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 18(2), p. 321-336, 1995.

SOUQUET, J.M.; LABARBE, B.; LE GUERNEVE, C.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Phenolic Composition of Grape Stems. *J. Agric. Food Chem.* v. 48, p. 1076-1080, 2000.

TAKASU, J., UYKIMPANG, R., SUNGA, M.A., AMAGASE, H., NIIHARA, Y. Aged garlic extract is a potential therapy for sickle-cell anemia. *J. Nutr.* v. 136, p. 803S-805S, 2006

TROTTA, R.J.; SULLIVAN, S.G.; STERN, A. Lipid peroxidation and hemoglobin degradation in red blood cells exposed to *t*-butyl hydroperoxide. Effects of the hexose monophosphate sunt as mediated by glutathione and ascorbate. *Biochemical Journal.* v. 204, p. 1438-1442, 1982.

van der ZEE, J.; van STEVENINCK, J.; KOSTER, J.F.; DUBBELMAN, T. M. Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by *t*-butylhydroperoxide-derived radicals. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 980, p. 175-180, 1989.

VELLOSA, J.C.R.; BARBOSA, V.F.; OLGA DE F. OLIVEIRA, O. M. M. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais *Revista Eletrônica de Farmácia* v. 4, n. 2, p. 119-130, 2007

VINSON, J.A., YANG, J.; PROCH, J., LIANG, X., Grape juice, but not orange juice, has in vitro, ex vivo, and in vivo antioxidant properties. *J. Med. Food.* v. 3, p.167-171, 2000.