

Ana Sofia Moreira de Magalhães

**Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller na
danificação oxidativa em eritrócitos humanos**

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2009

Ana Sofia Moreira de Magalhães

**Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller na
danificação oxidativa em eritrócitos humanos**

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2009

Ana Sofia Moreira de Magalhães

**Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller na
danificação oxidativa em eritrócitos humanos**

Monografia original realizada por:

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Licenciada em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Professora Doutora Márcia Carvalho

Resumo

A formação de radicais livres e o stresse oxidativo estão envolvidos numa série de fenómenos fisiológicos e patológicos do nosso organismo, tais como o envelhecimento, o cancro, a aterosclerose, a diabetes, a anemia hemolítica e a doença de Alzheimer. O eritrócito constitui um modelo celular adequado para o estudo dos efeitos de radicais livres, em virtude da sua simplicidade estrutural, acessibilidade e da vulnerabilidade dos seus constituintes à oxidação.

Neste trabalho foram utilizadas suspensões de eritrócitos humanos para avaliar o efeito protector dos extractos metanólicos da folha e fruto (casca, polpa e semente) de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Miller) na danificação oxidativa induzida pelo 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH). O AAPH é um sistema gerador de radicais livres (do tipo peróxido) no meio extracelular que atacam a membrana eritrocitária causando várias alterações oxidativas, as quais foram avaliadas neste estudo pela indução da hemólise.

Os resultados obtidos mostram que os extractos metanólicos da folha, casca e polpa de *C. oblonga* protegem os eritrócitos da lesão oxidativa de uma forma dependente da concentração de extracto e do tempo de incubação, enquanto que as sementes de marmeleiro apresentam actividade hemolítica.

O perfil fenólico da folha e fruto de *C. oblonga* foi igualmente determinado neste trabalho por HPLC/UV. O composto fenólico maioritário foi o ácido 5-*O*-cafeoilquínico para a folha, polpa e casca, enquanto que para as sementes foi a 2-estelarina. Em termos quantitativos, podem ser ordenados pela seguinte ordem decrescente de teor fenólico total: folha > casca > polpa > semente.

Os resultados indicam que a folha, polpa e casca de *C. oblonga* apresentam um considerável potencial anti-radicalar, o que sugere a sua eventual aplicação como adjuvantes na terapêutica de diversas situações patológicas em que os radicais livres estão implicados, bem como na respectiva prevenção.

Agradecimentos

Foram muitas as pessoas, que com diferentes contributos, me apoiaram em mais esta etapa, às quais quero expressar o meu agradecimento:

Ao Reitor da Universidade Fernando Pessoa, Prof. Doutor Salvato Trigo, e ao Director da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, Prof. Doutor Luís Martins, pela disponibilização das condições materiais indispensáveis ao desenvolvimento do trabalho experimental.

À Professora Doutora Márcia Carvalho por toda a ajuda prestada, por pacientemente responder às minhas mais variadas questões, pela orientação, apoio e conhecimentos que me transmitiu ao longo do decorrer deste trabalho.

À Professora Doutora Branca Silva pelos ensinamentos facultados e toda a disponibilidade demonstrada.

À Mestre Mary Duro, por gentilmente ter aceite efectuar as recolhas de sangue.

Ao Prof. Doutor José Alberto Pereira, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, pelas amostras de folha e fruto de marmeleiro que me forneceu graciosa e amavelmente.

Ao pessoal técnico dos laboratórios, pela ajuda e apoios prestados.

À Rossana pela energia e companheirismo em laboratório.

Ao Joel pelo incentivo, pelo apoio incondicional e por “ser do melhor”.

Aos meus pais e irmã, agradeço por tudo...

A todos a minha sincera gratidão.

Índice Geral

Índice de figuras.....	ix
Índice de tabelas.....	xi
Abreviaturas.....	xii
I. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento e objectivos.....	2
1.2 Plano geral.....	4
II. Espécies oxidantes.....	5
2.1 Radicais livres e espécies oxidantes.....	6
2.1.1 Espécies reactivas de oxigénio (ROS).....	7
2.1.2 Espécies reactivas de azoto (RNS).....	9
2.2 Lesão oxidativa induzida por radicais livres.....	9
2.2.1 Stresse oxidativo.....	9
2.2.2 Peroxidação lipídica.....	10
2.2.3 Danificação do DNA.....	13
2.2.4 Oxidação de proteínas.....	14
III. Sistemas de defesa antioxidantes.....	16
3.1 Antioxidantes enzimáticos.....	18
3.1.1 Superóxido dismutase.....	18
3.1.2 Catalase.....	18
3.1.3 Glutaciona peroxidase.....	19
3.1.4 Glutaciona redutase.....	19
3.1.5 Glutaciona S-transferase.....	20
3.1.6 Tiorredoxina.....	20
3.2 Antioxidantes não enzimáticos.....	22
3.2.1 Glutaciona.....	22
3.2.2 Vitamina C.....	26
3.2.3 Vitamina E.....	28
3.2.4 β -Caroteno e outros carotenóides.....	29
3.2.5 Ácido úrico.....	29

3.2.6	Proteínas específicas de ligação aos metais.....	30
3.2.7	Compostos fenólicos.....	30
IV.	O eritrócito como modelo <i>in vitro</i> para avaliação da actividade antioxidante...	38
4.1	O eritrócito humano.....	39
4.1.1	Sistema antioxidante do eritrócito.....	39
4.2	Danificação oxidativa eritrocitária.....	41
4.3	Substâncias oxidantes usadas como modelos experimentais.....	41
V.	Parte experimental: Estudo do efeito protector da espécie <i>Cydonia oblonga</i> Miller na danificação oxidativa em eritrócitos humanos.....	43
5.1	“Evaluation of free radical scavenging and antihemolytic activities of quince (<i>Cydonia oblonga</i>) leaf: a comparative study with green tea (<i>Camellia sinensis</i>)”.....	44
5.2	“Protective effect of quince (<i>Cydonia oblonga</i> Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes”.....	50
VI.	Considerações finais e conclusões.....	56
VII.	Bibliografia.....	60

Índice de Figuras

Figura 1 – Formação de espécies reactivas de oxigénio por redução do oxigénio molecular..	8
Figura 2 – Produtos da danificação oxidativa induzida por radicais livres.....	10
Figura 3 – Representação esquemática das etapas e dos radicais livres envolvidos no processo de peroxidação lipídica.....	12
Figura 4 – Principais produtos da oxidação do DNA por ROS e RNS.....	14
Figura 5 – Mecanismo de actuação do sistema tiorredoxina.....	21
Figura 6 – Interligação das funções dos agentes antioxidantes enzimáticos.....	22
Figura 7 – Estrutura da glutathiona.....	23
Figura 8 – Ciclo redox da glutathiona.....	25
Figura 9 – Estrutura do ácido ascórbico.....	26
Figura 10 – Estrutura dos tocoferóis.....	28
Figura 11 – Estrutura do β -caroteno.....	29
Figura 12 – Estrutura do ácido úrico.....	30
Figura 13 – Estrutura base e sistema de numeração geral dos flavonóides.....	31
Figura 14 – Estrutura das principais classes de flavonóides presentes na dieta humana.....	33

Figura 15 – Relação estrutura-actividade antioxidante dos flavonóides.....	34
Figura 16 – Sequestração de radicais livres por flavonóides.....	34
Figura 17 – Mecanismo de acção antioxidante da quercetina.....	35
Figura 18 – Estrutura dos principais ácidos fenólicos.....	36
Figura 19 – Reacção de oxidação do AAPH.....	42

Figuras inseridas na publicação Costa et al. 2009

Figure 1 – HPLC phenolic of quince leaf methanolic extract (sample 1).....	46
Figure 2 – Antiradicalar activity of the methanolic extracts from quince leaf (sample 1) and green tea.....	47
Figure 3 – Effects of quince leaf (sample 1) and green tea methanolic extracts on AAPH-induced hemolysis in erythrocytes.....	47

Figuras inseridas na publicação Magalhães et al. 2009

Figure 1 – HPLC phenolic profile of quince pulp (A), peel (B) and seed (C) methanolic extracts.....	52
Figure 2 – DPPH radical scavenging activity of quince (A) pulp, peel and (B) seed methanolic extracts.....	53
Figure 3 – Inhibition of AAPH-induced erythrocyte hemolysis by quince (A) pulp and (B) peel methanolics extracts.....	54

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Exemplos de espécies radicalares.....	6
Tabela 2 – Espécies reactivas de oxigénio.....	7
Tabela 3 – Principais agentes de defesa antioxidante.....	17

Tabelas inseridas na publicação Costa et al. 2009

Table 1 – HPLC/UV quantification of phenolics compounds present in quince leaf methanolic extract (sample 1) (Costa et al., 2009).....	46
Table 2 – Total reducing capacity of quince leaf samples as determined by Folin-Ciocalteu assay (Costa et al., 2009).....	46
Table 3 – Extraction yields and EC ₅₀ values found in the DPPH assay of quince leaf samples (Costa et al., 2009).....	46

Tabelas inseridas na publicação Magalhães et al. 2009

Table 1 – Phenolic composition of quince pulp, peel and seed methanolic extract.....	51
--	----

Abreviaturas

AAPH	2,2'-azo-bis(2-amidinopropano)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC ₅₀	Concentração efectiva 50
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa
GST	Glutationa-S-transferase
HNO ₂	Ácido nitroso
HO [•]	Radical hidroxilo
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
IC ₅₀	Concentração inibitória 50
L [•]	Radical lipídico
LO [•]	Radical alcóxilo lipídico
LOO [•]	Radical peróxilo lipídico
LOOH	Hidroperóxido lipídico
M	Metal de transição
N ₂ O ₃	Óxido nitroso
NO [•]	Monóxido de azoto
NO ₂ ⁻	Anião nitrito
NO ₃ ⁻	Anião nitrato
NOS	Sintetase do monóxido de azoto
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
O ₂ ²⁻	Anião peróxido
8-OHdA	5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina
8-OHdG	5'-8-ciclo-2'-desoxiguanosina
8-OHG	8-Hidroxiguanina
ONOO ⁻	Anião peroxinitrito
P	Probabilidade
RNS	Espécies reactivas de azoto
ROOH	Hidroperóxidos orgânicos

ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SOD	Superóxido dismutase
UV	Ultra-violeta

Para algumas abreviaturas foi mantida a notação anglo-saxónica dado o seu carácter universal, facilitando o seu reconhecimento.

I. Introdução

1.1 Enquadramento e objectivos

Os radicais livres participam na patogénese de múltiplas situações patológicas das quais se salientam doenças cardiovasculares como a aterosclerose, doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer e doença de Parkinson), doenças auto-imunes (lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide), vários tipos de cancro, bem como no envelhecimento. A produção endógena excessiva de espécies reactivas de oxigénio, a exposição a fontes exógenas de radicais livres ou a diminuição das defesas antioxidantes podem levar a sobrecarga/lesão oxidativa (Cerutti et al., 1994; Bianchi e Antunes, 1999). Quando o balanço normal entre as espécies pró-oxidantes e antioxidantes é deslocado com favorecimento dos primeiros, a célula entra numa situação de stresse oxidativo. A suplementação com antioxidantes parece prevenir o aparecimento de algumas doenças cardiovasculares e de certos tipos de cancro.

Vários estudos demonstraram que as plantas possuem diversos antioxidantes naturais, tais como carotenóides, vitaminas e compostos fenólicos, que possuem um considerável potencial anti-radicalar, podendo intervir na prevenção de doenças nas quais os radicais livres estão envolvidos. De entre os diferentes tipos de compostos naturais, o grupo dos compostos fenólicos é talvez dos mais estudados, com actividade antioxidante comprovada em diversos sistemas. Os ácidos fenólicos e os flavonóides são reconhecidos como poderosos antioxidantes. De facto, muitos flavonóides amplamente distribuídos na natureza, como os encontrados no chá verde ou no vinho tinto, são várias vezes mais potentes que a vitamina C ou E. Estes compostos actuam prevenindo os danos provocados pelos radicais livres e, desta forma, têm uma vasta gama de efeitos protectores tais como anti-inflamatórios, prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, e acção antihipertensiva, antitrombótica e carcinostática.

O marmeleiro (*Cydonia oblonga* Miller) é uma espécie originária da região do Cáucaso, que se difundiu até à Europa Central e Países Mediterrâneos (Oliveira et al., 2007a). O seu fruto, o marmelo, é consumido em grande quantidade no nosso país, sendo utilizado tradicionalmente na produção de doces, compotas, geleias e em fitoterapia. O marmelo é conhecido como sendo adstringente, emoliente e antidiarreico (Oliveira et al., 2007a). As folhas de *C. oblonga*

Miller, quando submetidas a decocção, são utilizadas pela medicina popular devido à sua actividade sedativa, calmante, antipirética, antidiarreica, antitússica, entre outras. Na última década a composição química da folha e fruto de *C. oblonga* tem sido largamente estudada, tendo-se verificado que se trata de uma excelente fonte de compostos fenólicos e de ácidos orgânicos (Silva, 2005; Silva et al., 2004, 2008; Oliveira et al., 2007b, 2008). Tendo em consideração a sua composição química é de prever que esta espécie vegetal tenha um considerável potencial anti-radicalar, podendo intervir na prevenção de doenças nas quais os radicais livres estão envolvidos. De facto, estudos preliminares demonstraram a actividade sequestrante para o radical 1,1'-difeníl-2-picrilhidrazilo (DPPH[•]) de extractos obtidos de frutos (Silva, 2005; Silva et al., 2004, 2008). Assim, o objectivo do presente trabalho de monografia é o de avaliar a actividade antioxidante da espécie *C. oblonga* em sistemas biológicos. Para o efeito, o eritrócito humano foi escolhido como modelo *in vitro* para avaliação da actividade antioxidante, visto que a membrana dos eritrócitos é rica em ácidos gordos poliinsaturados que são muito susceptíveis à peroxidação lipídica mediada por radicais livres. O eritrócito constitui assim um bom modelo experimental para o estudo *in vitro* dos mecanismos de lesão por radicais livres nas membranas biológicas, bem como do efeito protector de alguns compostos. Os azocompostos têm sido usados para estudar o mecanismo de stresse oxidativo em eritrócitos. O 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH) produz radicais livres do tipo peroxilo por decomposição térmica unimolecular em uma taxa constante. Estes radicais gerados no meio extracelular atacam a membrana eritrocitária causando várias alterações oxidativas, tais como formação de peróxidos lipídicos, redução da deformabilidade, mudanças na morfologia, ligação cruzada e fragmentação de proteínas, hemólise e alterações no metabolismo intracelular. Neste estudo, os danos oxidativos serão avaliados pela percentagem de hemólise.

Pretende-se assim estudar o papel protector dos extractos metanólicos obtidos de folhas e frutos de *C. oblonga* relativamente aos danos oxidativos induzidos pelo AAPH em eritrócitos humanos. Dada a reconhecida actividade antioxidante das folhas de chá verde (*Camellia sinensis*), outro objectivo deste trabalho é o de comparar a actividade dos extractos de folha de marmeleiro com a do chá verde.

1.2 Plano geral

A presente monografia encontra-se estruturada em sete capítulos.

No presente Capítulo procedeu-se ao enquadramento da monografia e apresentaram-se os objectivos do trabalho.

Nos Capítulos 2 e 3, “Espécies oxidantes” e “Sistemas de defesa antioxidantes”, faz-se uma revisão da literatura no que concerne aos fundamentos teóricos e à importância do balanço entre as espécies pró-oxidantes e sistemas antioxidantes na saúde humana.

No Capítulo 4, “O eritrócito como modelo *in vitro* para avaliação da actividade antioxidante”, é apresentado o modelo experimental escolhido para a realização do estudo do efeito antioxidante da espécie *C. oblonga*.

A “parte experimental” é apresentada no Capítulo 5 na forma de duas publicações científicas. De salientar que os resultados apresentados na publicação de Costa et al. (2009) referentes à determinação do perfil fenólico e avaliação do poder antioxidante dos extractos metanólicos da folha de *C. oblonga* através do estudo do efeito protector na danificação oxidativa em eritrócitos humanos foram obtidos no âmbito do trabalho de investigação realizado na presente monografia.

No Capítulo 6, “Considerações finais e conclusões”, faz-se a sinopse deste trabalho.

Por último, no Capítulo 7 é apresentada uma listagem de todas as referências bibliográficas citadas ao longo do texto.

II. Espécies oxidantes

2.1 Radicais livres e espécies oxidantes

O termo “radical livre” é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais electrões desemparelhados (Tabela 1). É esta configuração que torna os radicais livres moléculas altamente instáveis, quimicamente muito reactivas e com um tempo de semi-vida curto (Ternay e Sorokin, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1990).

Radicais livres	
O_2^{\bullet}	Radical superóxido
HO_2^{\bullet}	Radical hidroperóxido
HO^{\bullet}	Radical hidróxido
RO^{\bullet}	Radical alcóxido
ROO^{\bullet}	Radical peróxido
NO^{\bullet}	Radical monóxido de azoto
NO_2^{\bullet}	Radical dióxido de azoto

Tabela 1 – Exemplos de espécies radicalares

Os radicais livres são gerados continuamente durante os processos metabólicos, tendo como principal fonte os organelos citoplasmáticos que metabolizam o oxigénio e o azoto. No entanto, a produção excessiva de radicais livres pode levar a diversas formas de dano celular.

O alvo celular dos radicais livres (proteínas, lípidos, DNA) está relacionado com o local de formação. O radical hidróxido (HO^{\bullet}) mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reactivo na indução de danos oxidativos nos componentes celulares. Assim, o HO^{\bullet} ataca moléculas próximas ao local onde é formado, essencialmente lípidos. Este radical é capaz de abstrair um hidrogénio das duplas ligações dos ácidos gordos presentes nas membranas celulares, iniciando-se assim o processo de peroxidação lipídica. No caso do radical peróxido, este tem um tempo de semi-vida mais longo, o que significa que poderá sair do local onde é produzido e exercer o seu efeito tóxico noutros alvos celulares (Myers, 1997).

2.1.1 Espécies Reactivas de Oxigénio (ROS)

O conceito de “espécies reactivas de oxigénio” é mais amplo e abrange não apenas os radicais livres de oxigénio mas também espécies químicas não radicalares com potencial oxidante. As espécies reactivas de oxigénio que apresentam maior relevância em sistemas biológicos são apresentadas na Tabela 2 (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Radicais livres	
$O_2^{\bullet -}$	Radical superóxido
HO_2^{\bullet}	Radical hidroperoxilo
HO^{\bullet}	Radical hidroxilo
RO^{\bullet}	Radical alcoxilo
ROO^{\bullet}	Radical peroxilo
Espécies não radicalares	
1O_2	Oxigénio singuleto
H_2O_2	Peróxido de hidrogénio
HClO	Ácido hipocloroso
O_3	Ozono

Tabela 2 – Espécies reactivas de oxigénio

Estas espécies são geradas em vários processos no nosso organismo, nomeadamente na cadeia respiratória mitocondrial, via xantina oxidase, via NADPH oxidase em células fagocíticas, via síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso e no sistema enzimático citocromo P450 (Myers, 1997; Acworth et al., 1997).

O radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) é formado pela adição de um electrão à molécula de oxigénio no estado fundamental (Figura 1). Com apenas mais um electrão adicionado a este radical, surge o anião peróxido (O_2^{2-}), que aquando a adição de outro electrão forma o radical hidroxilo (HO^{\bullet}). Por fim, se o oxigénio molecular consumido na cadeia respiratória mitocondrial for reduzido pela adição simultânea de quatro electrões forma-se a água (Acworth et al., 1997).

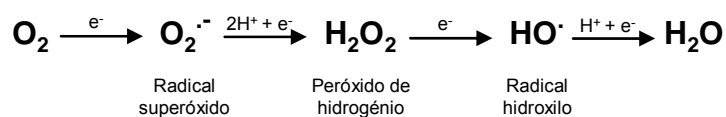


Figura 1 – Formação de espécies reactivas de oxigénio por redução do oxigénio molecular

O peróxido de hidrogénio apesar de não ser considerado um radical livre, pois apresenta a sua orbital externa emparelhada, é capaz de inactivar enzimas, principalmente por oxidação de grupos tióis essenciais. No entanto, a sua toxicidade deve-se em grande parte à conversão no radical hidroxilo na presença de metais de transição (M), como o ferro e cobre, presentes na célula através da reacção de Fenton (Reacção 1) e pela interacção com o radical superóxido na reacção de Haber-Weiss (Reacção 2) (Acworth et al, 1997).



Apesar do radical superóxido não ser um radical muito reactivo, é considerado tóxico uma vez que está envolvido na formação de outras ROS bastante reactivas, nomeadamente o radical hidroxilo através da reacção de Haber-Weiss (Reacção 2) e o anião peroxinitrito (ONOO^-) por reacção com o monóxido de azoto (Reacção 3).



O radical hidroxilo é extremamente reactivo, podendo levar a um efeito de extrema toxicidade, via, por exemplo, peroxidação dos lípidos das membranas celulares e quebra e modificação das bases de DNA levando a alterações na expressão genética (Richter, 1997).

2.1.2 Espécies Reactivas de Azoto (RNS)

Dentro das espécies reactivas de azoto incluem-se o monóxido de azoto (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (Halliwell e Gutteridge, 1999). O radical NO^\bullet pode ser gerado a partir da L-arginina por acção da enzima sintetase do monóxido de azoto (NOS) (Acworth et al., 1997). O monóxido de azoto não ataca directamente o DNA, mas pode reagir com o anião superóxido formando o peroxinitrito. É o peroxinitrito que pode sofrer reacções secundárias, formando compostos capazes de nitrar aminoácidos aromáticos, como por exemplo a tirosina gerando a nitrotirosina, e as bases do DNA, em particular a guanina, no qual o produto principal é a 8-nitroguanina (Eiserich et al., 1996; Barreiros et al., 2006).

2.2 Lesão oxidativa induzida por radicais livres

2.2.1 Stresse oxidativo

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre através da acção catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de electrões que ocorrem no metabolismo celular, e pela exposição a factores exógenos, tais como as radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta e tabaco. Contudo, a concentração destes radicais pode aumentar devido a um aumento de produção intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (Cerutti et al., 1994; Bianchi e Antunes, 1999). Quando o balanço normal entre as espécies pró-oxidantes e antioxidantes é deslocado com favorecimento dos primeiros, a célula entra numa situação de stresse oxidativo. A ocorrência de stresse oxidativo moderado é frequentemente acompanhado do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos irreversíveis e morte celular.

Os radicais livres podem reagir com diversas macromoléculas celulares, tais como ácidos nucleicos, lípidos ou proteínas, o que resulta na formação de diversos produtos de oxidação (Figura 2). Deste modo, o stresse oxidativo pode estar envolvido em processos de

mutagénese, carcinogénese, processos inflamatórios, envelhecimento, aterosclerose, entre outros.

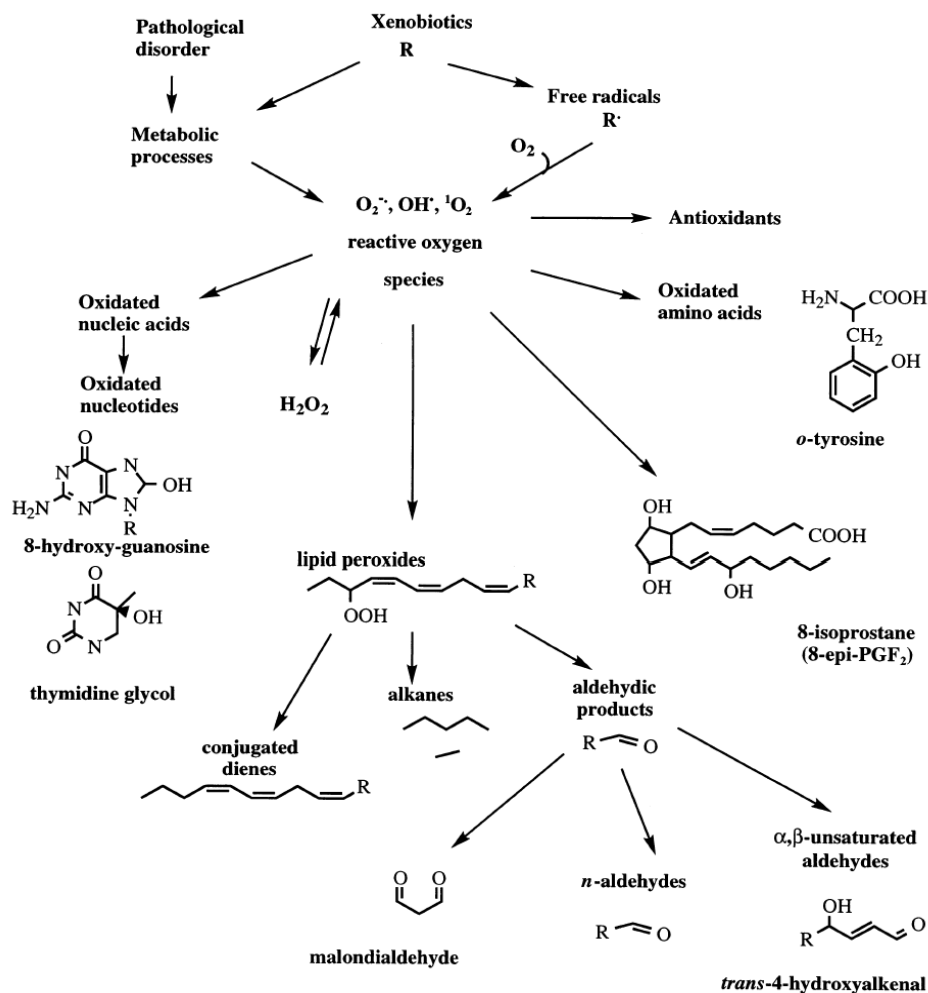


Figura 2 – Produtos da danificação oxidativa induzida por radicais livres (adaptado de Zwart et al., 1999)

2.2.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é a consequência mais estudada do stresse oxidativo. Os radicais livres são os responsáveis pelo início deste processo (Figura 3). Quando um radical livre (como por exemplo o HO[•]) contacta com estruturas como as membranas celulares, constituídas por lípidos insaturados, há abstracção de um hidrogénio das duplas ligações dos ácidos gordos,

iniciando-se assim o processo de peroxidação lipídica. O radical lipídico formado (L^{\bullet}) é convertido sucessivamente a radical peróxilo (LOO^{\bullet}) pela entrada de O_2 , a hidroperóxido ($LOOH$) e radical alcóxilo (LO^{\bullet}) pela reacção de Fenton. A consequente fragmentação dá origem a hidrocarbonetos como o etanol e a aldeídos como o 4-hidroxinonal e o malonildialdeído. Este processo propaga-se cíclica e continuamente, dado que estão constantemente a formar-se radicais lipídicos (L^{\bullet}). O termo do processo ocorre quando há uma condensação de radicais ou a intervenção de sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

Como consequências da peroxidação lipídica pode ocorrer alteração da fluidez, permeabilidade e integridade das membranas e “cross-linking” das proteínas das membranas celulares.

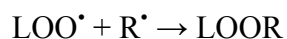
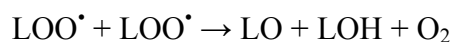
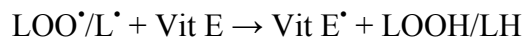
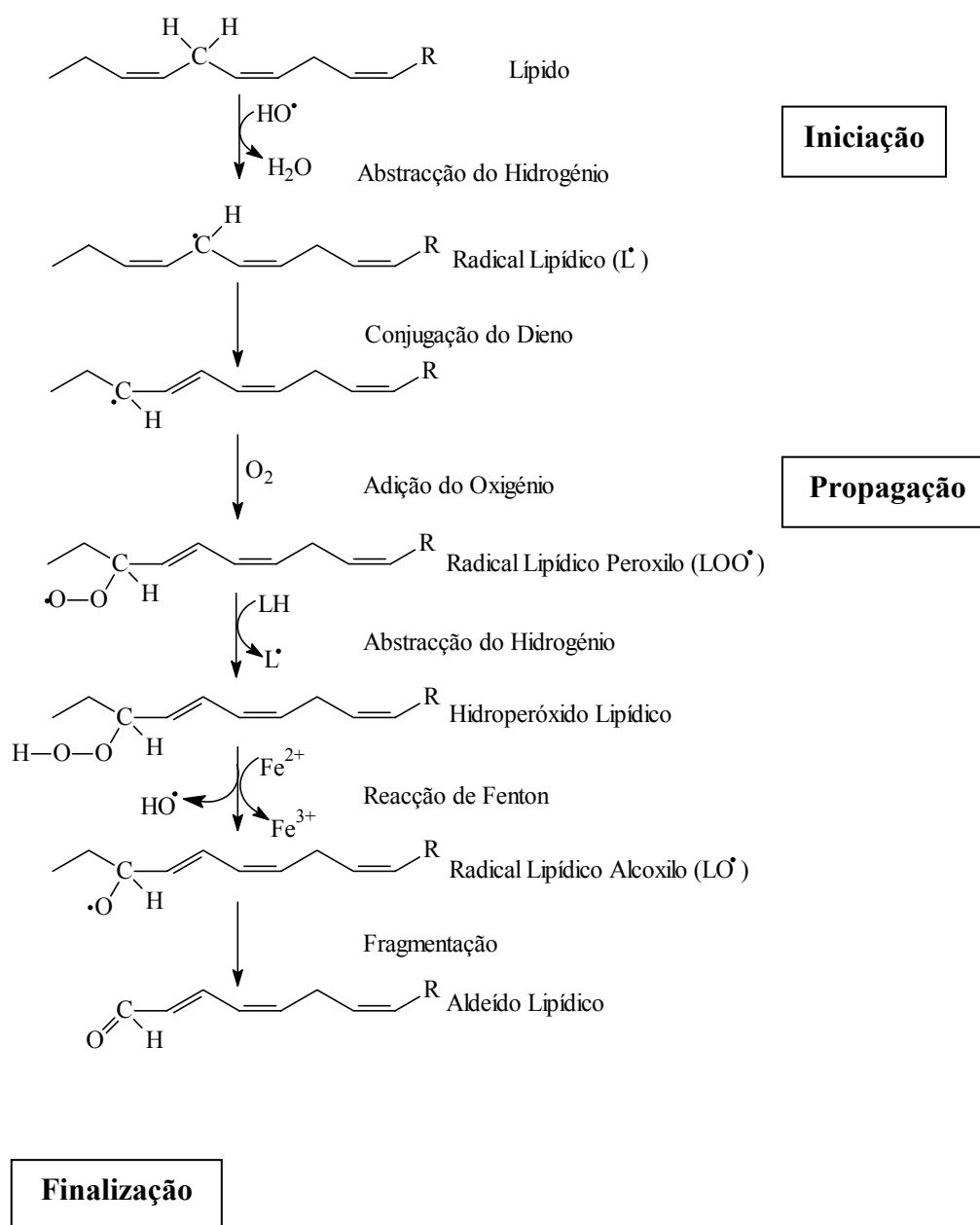


Figura 3 – Representação esquemática das etapas e dos radicais livres envolvidos no processo de peroxidação lipídica

2.2.3 Danificação do DNA

Os danos oxidativos causados por ROS e RNS envolvem a alteração de bases (oxidação e desaminação), perda de bases, fragmentação e ligações cruzadas no DNA, desempenhando um papel importante nos processos de mutagénese e de carcinogénese (Poulsen et al., 1998; Richter, 1997).

Dada as diferenças existentes na reactividade das ROS/RNS, o padrão da lesão no DNA depende da natureza da espécie em questão (Richter, 1997). Assim, o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 não reagem directamente com o DNA, mas são espécies importantes na geração do radical hidroxilo catalizada por metais. O radical HO^{\cdot} reage com as 4 bases do DNA, com formação de vários produtos característicos, entre os quais a 8-hidroxi guanina (8-OHG) (Figura 4). Esta base modificada também pode ser formada pela reacção do 1O_2 com o DNA. O NO^{\cdot} e espécies análogas causam essencialmente desaminações no DNA, mas o $ONOO^{\cdot}$ causa um padrão de dano similar ao induzido pelo radical HO^{\cdot} (Richter, 1997).

O radical hidroxilo pode igualmente reagir com a desoxirribose (Figura 4). O ataque ocorre por abstracção de um dos átomos de hidrogénio do carbono 1, 2 ou 4 do resíduo de açúcar, o que leva quase sempre à ruptura da cadeia de DNA tendo como principais produtos a 5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina (8-OHdA) e a 5'-8-ciclo-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) (Richter, 1997).

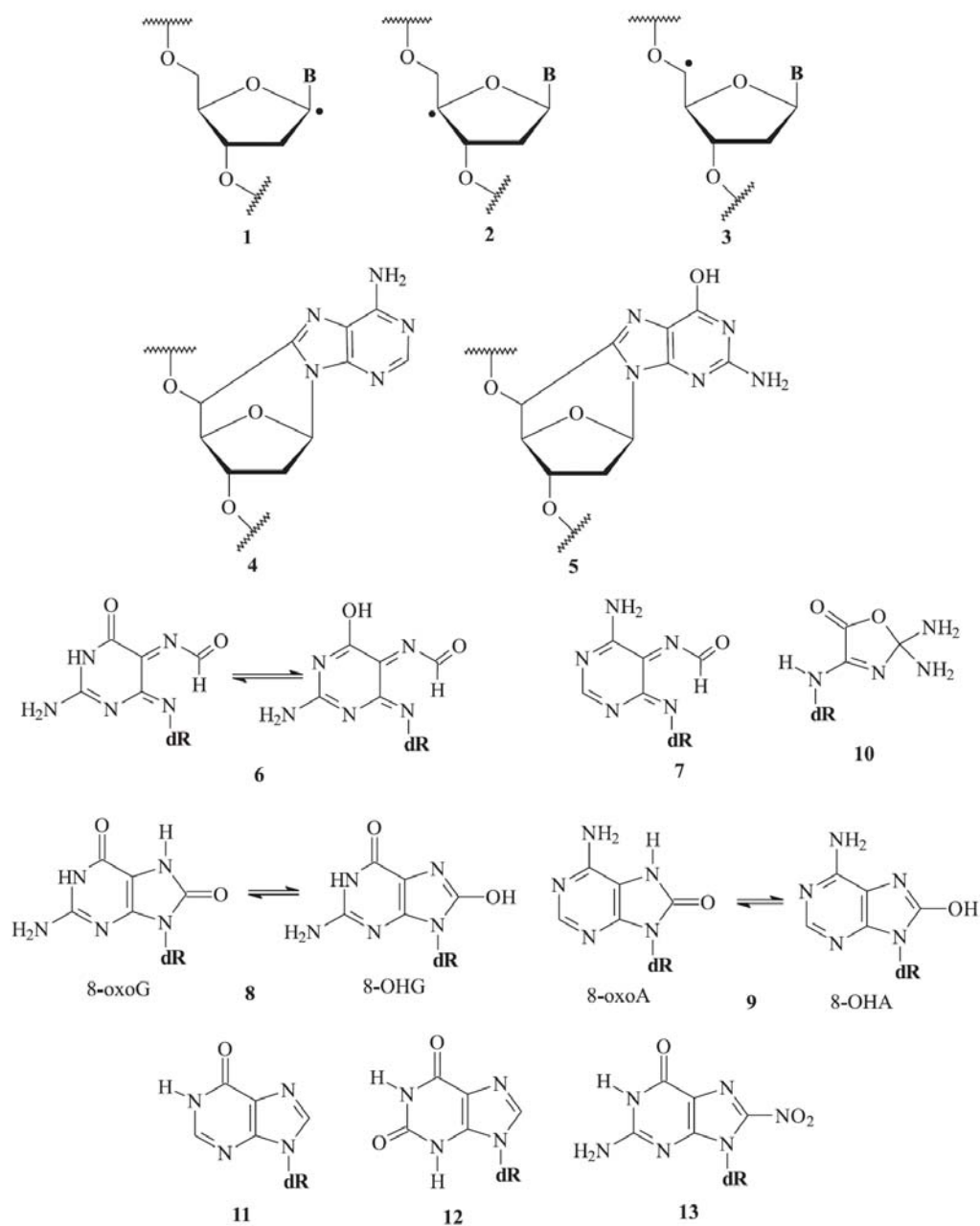


Figura 4 – Principais produtos da oxidação do DNA por ROS e RNS. B, base do DNA; dR, desoxirribose (adaptado de Barreiros et al., 2006).

2.2.4 Oxidação de proteínas

É já bem conhecido que a exposição de proteínas a ROS leva a alteração das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos, conversão das proteínas em formas de elevado peso molecular

(ligações cruzadas entre proteínas) e fragmentação da cadeia peptídica (Stadtman e Berlett, 1997), alterando a função dessas proteínas (Levine et al., 1990).

O HO[•] pode reagir na cadeia lateral, onde ataca preferencialmente a cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, e, em menores proporções, arginina e asparagina. Os ataques aos aminoácidos que compõem as proteínas podem gerar danos como clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações cruzadas, o que pode ter como consequência a perda de actividade enzimática, dificuldades no transporte activo através das membranas celulares e morte celular. O ataque ocorre por adição do radical ou por abstracção de hidrogénio. Todos os aminoácidos podem sofrer abstracção do hidrogénio do carbono C α ligado ao grupo carboxílico e ao grupo amina. Essa abstracção, com excepção da glicina, leva à perda de CO₂ e formação de um carbono radicalar, o qual reage com o O₂ dando origem a um radical peroxilo. Este radical é posteriormente responsável pela clivagem da cadeia polipeptídica (Stadtman e Berlett, 1997).

III. Sistemas de defesa antioxidantes

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (Sies, 1993). Segundo Halliwell e Gutteridge (1995), um antioxidante pode ser definido como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação desse substrato”. Estes agentes que protegem as células dos efeitos dos oxidantes podem ser classificados como antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos (Bianchi e Antunes, 1999). Estes mecanismos incluem antioxidantes endógenos (glutathione, vitamina A, C e E, ácido úrico) e enzimas antioxidantes, como a catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e glutathione S-transferase (Tabela 3).

Agentes não enzimáticos	Agentes enzimáticos
Vitamina E	Superóxido dismutase
Vitamina C	Catalase
Glutathione	Glutathione peroxidase
β -caroteno	Glutathione reductase
Ácido úrico	Glutathione-S-transferase
Proteínas específicas para metais	Tiorredoxina
Flavonóides	
Ácidos fenólicos	

Tabela 3 – Principais agentes de defesa antioxidante

Os agentes antioxidantes protegem os organismos de quatro formas possíveis (Sies, 1993; Bianchi e Antunes, 1999):

- (i) impedindo a formação dos radicais livres;
- (ii) interceptando os radicais livres formados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas;

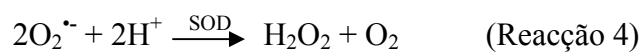
(iii) reparando as lesões causadas pelos radicais;

(iv) e ainda por vezes proporcionando uma adaptação do organismo em resposta à geração desses radicais, com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes.

3.1 Antioxidantes enzimáticos

3.1.1 Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) encontra-se presente em todos os tecidos, sendo a sua actividade particularmente elevada no fígado e rim (Somani et al., 1997). Esta enzima protege as células aeróbias da acção do radical superóxido, catalisando a conversão deste em peróxido de hidrogénio (Reacção 4).

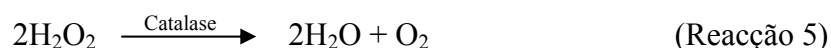


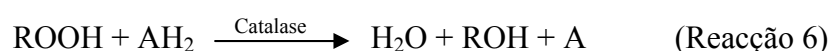
Pode conter diferentes grupos prostéticos metálicos, sendo os mais comuns o cobre e o zinco presentes na enzima citoplasmática e o manganês presente na enzima mitocondrial (Somani et al., 1997).

3.1.2 Catalase

A catalase é uma enzima citoplasmática, presente nos peroxissomas, que cataliza a decomposição do peróxido de hidrogénio a água. Encontra-se no fígado em níveis relativamente elevados (Somani et al., 1997).

A catalase exerce uma dupla função: (i) decomposição de H_2O_2 , originando O_2 (actividade catalítica) (Reacção 5) e (ii) oxidação de dadores de H, como é o caso do metanol, ácido fórmico e fenóis, com o consumo de peróxido (actividade peroxídica) (Reacção 6).

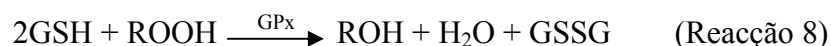
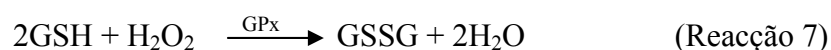




Tem a mesma acção que a glutathiona peroxidase ao metabolizar o peróxido de hidrogénio, mas é mais activa que esta quando as concentrações de H_2O_2 são da ordem dos milimolar (Somani et al., 1997).

3.1.3 Glutathiona peroxidase

A glutathiona peroxidase (GPx) é uma enzima dependente do selénio, que tem como função metabolizar o peróxido de hidrogénio (Reacção 7) e os hidroperóxidos orgânicos (ROOH) (Reacção 8). Nesta acção, a GPX utiliza a glutathiona (GSH) como cofactor (Somani et al., 1997).



Esta enzima encontra-se em grandes quantidades quer no citoplasma quer na mitocôndria. É importante realçar que a nível mitocondrial não existe catalase e, por isso, a glutathiona peroxidase exerce aí um papel fundamental na metabolização do peróxido de hidrogénio (Halliwell e Gutteridge, 1999). No citoplasma a GSHPx é mais activa que a catalase para concentrações de peróxido de hidrogénio da ordem dos micromolar (Kaul e tal, 1993).

3.1.4 Glutathiona redutase

A glutathiona redutase (GR) é uma enzima citosólica essencial na manutenção do quociente GSH/GSSG, regenerando a glutathiona na forma reduzida a partir da sua forma oxidada, utilizando o NADPH como cofactor (Reacção 9) (Halliwell e Gutteridge, 1999).



3.1.5 Glutationa-S-transferase

A glutathione-S-transferase (GST) é uma família de isoenzimas que catalisa a conjugação da GSH com compostos electrofílicos (Reacção 10) (Salinas e Wong, 1999).



O fígado é particularmente rico nesta enzima, que é maioritariamente citosólica, embora também se encontre ligada a membranas (Halliwell e Gutteridge, 1999). A GST possui múltiplas funções no metabolismo endógeno de xenobióticos, além de poder funcionar como transportadora de proteínas celulares, tais como o grupo heme, a bilirrubina, entre outros (Halliwell e Gutteridge, 1999).

3.1.6 Tiorredoxina

No sistema tiorredoxina incluem-se as reacções catalisadas pelas enzimas oxirredutases: tiorredoxinas e tiorredoxina redutase (Figura 5) (Nordberg e Arner, 2001). As tiorredoxinas ($\text{TR}-(\text{SH})_2$) doam equivalentes redutores para proteínas, GSSG, H_2O_2 , ficando desta forma oxidadas ($\text{TR}-\text{SS}$) e são em seguida reduzidas pela tiorredoxina redutase (TRR). Esta enzima utiliza NADPH para reduzir pontes de dissulfureto da tiorredoxina. Vários outros substratos podem ser reduzidos pela TRR, tais como o ácido desidroascórbico, hidroperóxidos lipídicos, GSSG, H_2O_2 , peroxirredoxinas e outras proteínas oxidadas.

As glutarredoxinas ($\text{GRO}-(\text{SH})_2$) são tiorredoxinas que contêm um dissulfureto redox activo e um local de ligação para GSH e juntamente com NADPH, glutathione redutase e glutathione formam o principal sistema oxirredutase de dissulfuretos proteicos (Nordberg e Arner, 2001).

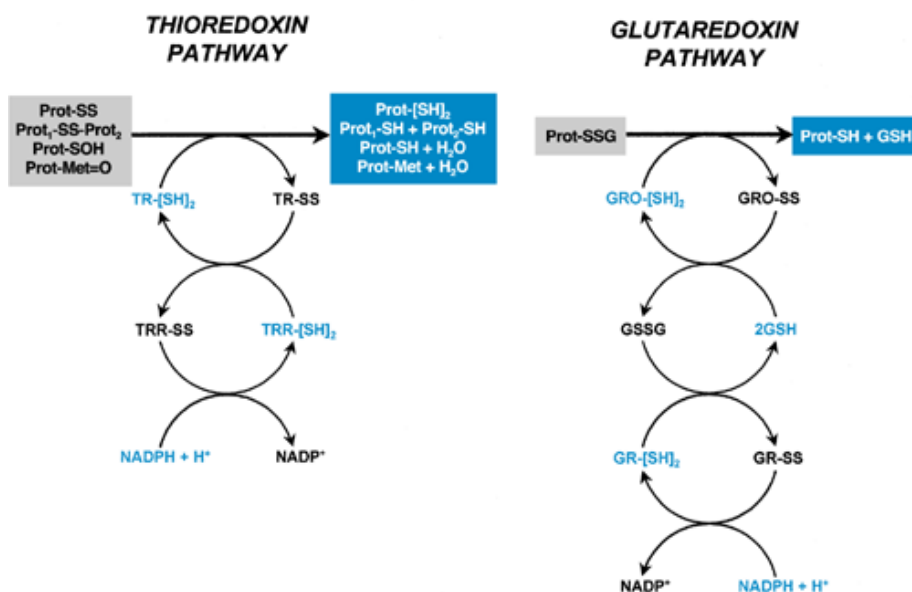


Figura 5 – Mecanismo de actuação do sistema tiorredoxina (adaptado de Klaassen, 2001)

Por fim, é importante salientar que as enzimas antioxidantes apresentam cooperação sinérgica para manter os níveis de ROS dentro de limites fisiológicos, tal como esquematizado na Figura 6. A catalase e a SOD actuam principalmente em regiões hidrofílicas, enquanto o sistema GPx protege regiões hidrofóbicas, com especificidade para peróxidos lipídicos (Michiels et al., 1994). O sistema tiorredoxina protege amplamente os componentes celulares e auxilia as demais enzimas na manutenção do estado redox celular (Nordberg e Arner, 2001).

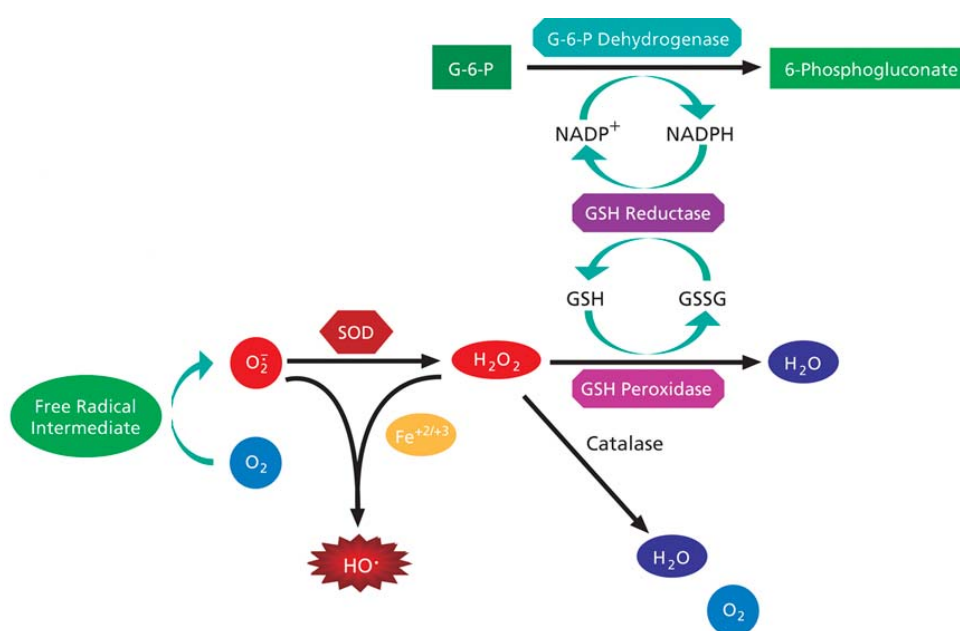


Figura 6 – Interligação das funções dos agentes antioxidantes enzimáticos

3.2 Antioxidantes não enzimáticos endógenos

Além das enzimas já referidas acima, a célula contém também substâncias antioxidantes que lhe conferem protecção contra as espécies reactivas de oxigénio e de azoto.

3.2.1 Glutathiona

A glutathiona (γ -glutamilcisteinilglicina) é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos (Sies, 1999). É sintetizada no organismo e trata-se de um tripéptido linear, constituído por três aminoácidos: glicina, ácido glutâmico e cisteína, sendo o grupo tiol (-SH) deste último o local activo responsável pelas propriedades bioquímicas da molécula (Figura 7) (Sies, 1999).

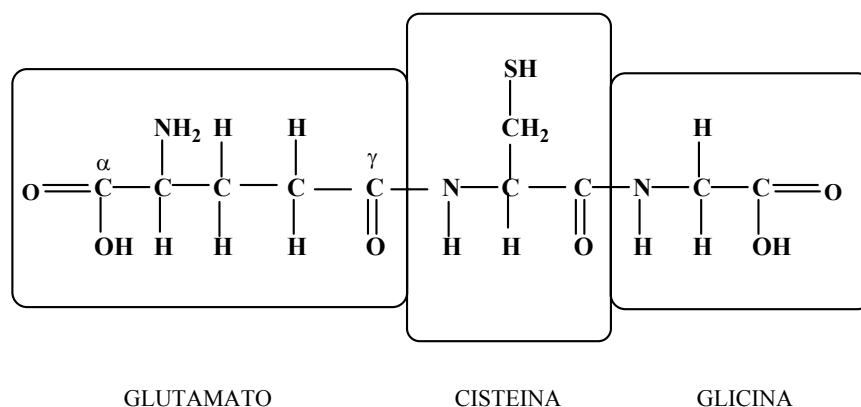


Figura 7 – Estrutura da glutathiona

Trata-se de um tripéptido pouco comum devido à ligação entre o NH_2 do resíduo de cisteína e o carboxilo gama do ácido glutâmico, que o torna resistente à degradação pelas peptidases, excepto pela γ -glutamyltranspeptidase, situada especialmente em algumas membranas celulares, nomeadamente nos rins, pâncreas, intestinos e fígado.

Existe, na maioria das células, em concentrações compreendidas entre 1 e 8 mM, sendo o fígado o órgão mais rico neste tripeptídeo (Halliwell e Gutteridge, 1999). Ao nível mitocondrial parece ter a sua própria “pool”, de importância crucial na protecção da mitocôndria da acção das ROS. Ao nível extracelular a concentração de GSH é da ordem de 5-50 μM (Griffith, 1999).

Pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou dimerizada (GSSG, forma oxidada da GSH). Em situações normais a GSSG representa apenas uma pequena fracção da glutathiona total (menos de 10%) (Halliwell e Gutteridge, 1999). No entanto, em situações de stresse oxidativo, o quociente GSH/GSSG pode estar diminuído, uma vez que a GSH é consumida com formação de GSSG. A GSH pode, no entanto, também formar dissulfuretos do tipo GSSR com o tiol da cisteína presente em proteínas (Sies, 1999).

A GSH é sintetizada em dois passos, catalisados pela γ -glutamyl-cisteína-sintetase e pela glutathione-sintetase (Sies, 1999). Este processo ocorre essencialmente no fígado, sendo a GSH exportada, através da circulação sanguínea, para todos os tecidos.

A glutathione está omnipresente na célula onde tem um papel crucial na (i) metabolização do H_2O_2 e outros hidroperóxidos (ROOH) como cofactor da GPx; (ii) na metabolização de xenobióticos como cofactor da GST; (iii) no co-transporte de xenobióticos para o exterior da célula e (iv) e na desactivação de radicais (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A glutathione pode reagir com as espécies reactivas de oxigénio de duas formas (Sciuto, 1997):

-actuar como redutor, originando GSSG e H_2O , mediante reacção catalisada pela enzima glutathione peroxidase (Reacções 7 e 8);

-ou reagir directamente com os radicais, com transferência do electrão livre para a GSH, levando à formação do radical livre glutathionilo (GS^\bullet) (Reacção 11).



O R^\bullet pode ser um HO^\bullet , RO^\bullet , ROO^\bullet , radicais com centro de carbono ou o oxigénio singuleto (1O_2).

Posteriormente, o radical GS^\bullet pode dimerizar e formar GSSG (Reacção 12).



Por fim, a glutathione oxidada pode ser regenerada a GSH pela enzima glutathione reductase (Reacção 9).

O ciclo redox da glutatona (Figura 8) constitui o meio de defesa antioxidante mais importante usado pelas células.

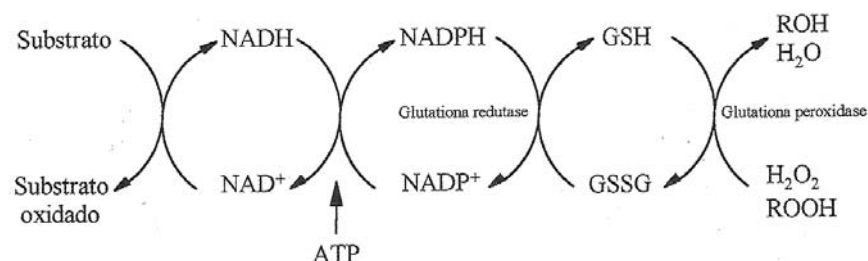


Figura 8 – Ciclo redox da glutatona

Adicionalmente, a glutatona funciona como sequestrador nucleofílico de vários compostos e dos seus metabolitos, através de mecanismos químicos e enzimáticos (mediado pela glutatona-S-transferase), ligando-se covalentemente a centros electrofilicos (Reacção 13) (Sciuto, 1997).



A glutatona é importante para a redução de dissulfuretos proteicos e sulfuretos mistos de GSH e proteína, contribuindo assim para a manutenção do potencial redox celular e do equilíbrio sulfidrilo-dissulfureto proteico (Reacção 14).



As funções de protecção da glutatona não podem ser atribuídas unicamente à presença do resíduo de cisteína. A GSH está também envolvida na regeneração da vitamina C e do α -tocoferol e na inibição da peroxidação lipídica.

A GSH serve também de reservatório não tóxico e não rapidamente oxidável de cisteína e participa na biossíntese de vários compostos endógenos, nomeadamente prostaglandinas, leucotrienos e estrogénios catecólicos.

Durante a síntese de DNA, a GSH é necessária para a redução de glutaredoxina, que por sua vez fornece electrões à ribonucleotídeo redutase.

Em suma, a GSH tem um papel muito importante na defesa celular e a sua depleção pode resultar na exacerbação da toxicidade induzida por ROS e RNS.

3.2.2 Vitamina C

A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico (Figura 9), é um antioxidante com características hidrofílicas, presente no citoplasma celular e no soro em concentrações da ordem das micromoles.

A vitamina C é obtida através da dieta, uma vez que o organismo humano não a consegue sintetizar. É, geralmente, consumida em grandes doses pelos seres humanos, sendo adicionada a muitos produtos alimentares para inibir a formação de metabolitos nitrosos carcinogénicos. Estudos epidemiológicos atribuem a esta vitamina um possível papel protector no desenvolvimento de tumores nos seres humanos (Bianchi e Antunes, 1999).

Possui características que lhe são conferidas pelo grupo enediol:

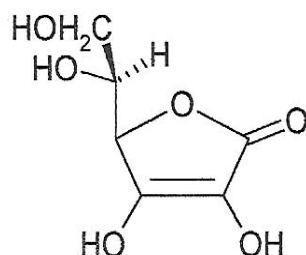
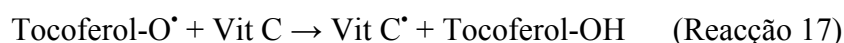


Figura 9 – Estrutura do ácido ascórbico

As suas características permitem-lhe actuar como agente redutor e assim reagir directamente com as ROS, originando o ácido dehidroascórbico (DHA) (Reacção 15) (Somani et al., 1997). O DHA pode ser posteriormente reduzido a ácido ascórbico por agentes redutores como a glutathione (Reacção 16).

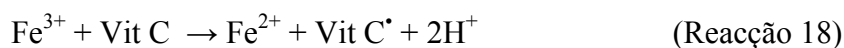


A vitamina C pode também actuar indirectamente através da regeneração da vitamina E a partir do radical tocoferilo (Reacção 17) (Ternay e Sorokin, 1997; Liebler e Reed, 1997).



O efeito cooperativo entre as vitaminas C e E é frequentemente mencionado, mostrando que a acção destas duas vitaminas é efectiva na inibição da peroxidação dos lípidos da membrana e na protecção do DNA (Bianchi e Antunes, 1999).

De notar, no entanto, que em experiências *in vitro* a vitamina C demonstrou actuar como pró-oxidante (Liebler e Reed, 1997). Por exemplo, na presença de ferro, a vitamina C quando em baixa concentração induz fortemente a peroxidação lipídica dada a sua capacidade para reduzir metais de transição, como por exemplo o Fe^{3+} a Fe^{2+} (Reacções 18 e 19).



onde o Fe^{2+} poderá catalisar a reacção de Fenton, levando à formação do radical hidroxilo (Reacção 1).

3.2.3 Vitamina E

Quimicamente, a vitamina E é uma mistura de quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis lipossolúveis (Figura 10), sendo o α -tocoferol o mais activo (Halliwell e Gutteridge, 1999; Liebler e Reed, 1997).

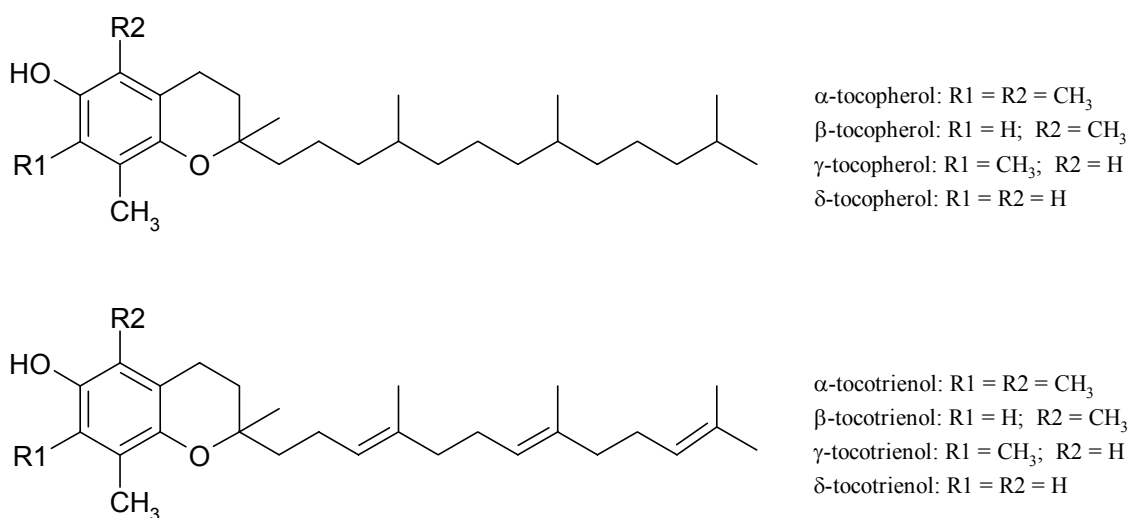


Figura 10 – Estrutura dos tocoferóis (adaptado de Seabra et al., 2006)

O α -tocoferol é uma molécula lipossolúvel presente nas membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas, com capacidade para quebrar a cadeia de radicais livres do processo de peroxidação lipídica. Esta molécula apresenta um grupo hidroxilo fenólico na sua estrutura, cujo átomo de hidrogénio é facilmente abstraído por radicais peróxido (LOO \cdot) e alcóxido (L \cdot) formados durante a peroxidação dos lípidos das membranas (Reacção 20).



Desta forma, a vitamina E evita a reacção destes radicais com as cadeias de ácidos gordos poliinsaturados, prevenindo a peroxidação lipídica. O radical α -tocoferilo (α -tocoferol-O \cdot) formado é pouco reactivo e pode originar dímeros ou ser regenerado a α -tocoferol pela vitamina C, glutathiona ou ubiquinol (Liebler e Reed, 1997).

Paradoxalmente, tratando-se de reacções de equilíbrio, a vitamina E em concentrações elevadas pode actuar como pró-oxidante, originando peroxidação lipídica.

3.2.4 β -caroteno e outros carotenóides

Os carotenóides que incluem o α , β , γ e δ -caroteno são antioxidantes lipossolúveis abundantes em plantas verdes, cenouras e outros vegetais. O β -caroteno é o mais importante precursor da vitamina A (Ternay e Sorokin, 1997).

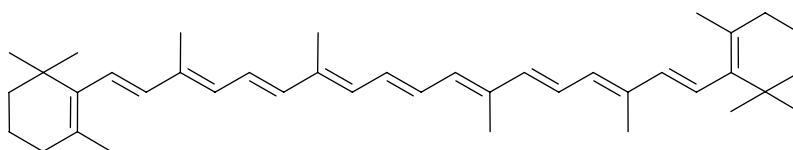


Figura 11 – Estrutura do β -caroteno (adaptado de Seabra et al., 2006).

Estes compostos reagem directamente com as ROS e os radicais lipídicos peroxilo e alcoxilo formados durante a peroxidação lipídica e apresentam algum sinergismo com a vitamina E.

3.2.5 Ácido Úrico

O ácido úrico (Figura 12) é o produto do metabolismo das purinas:

Guanina \rightarrow Xantina \rightarrow Ácido úrico

Adenina \rightarrow Hipoxantina \rightarrow Xantina \rightarrow Ácido úrico

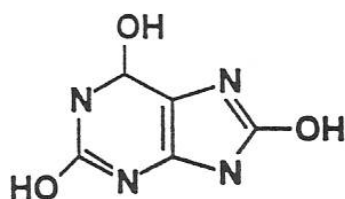


Figura 12 – Estrutura

do ácido úrico

Nas concentrações em que se encontra no plasma (124-450 μ M), o ácido úrico reage com os radicais hidroxilo e peroxilo e reage também com o ácido hipocloroso. Este composto liga-se ao ferro e ao cobre, presentes na célula, em formas que não promovem as reacções radicalares.

3.2.6 Proteínas específicas de ligação aos metais

Nos sistemas biológicos existem diversas proteínas que captam e armazenam metais na forma ionizada, tais como o ferro e o cobre. Ao fazê-lo, estas proteínas evitam a participação destes metais na formação de ROS pela reacção de Fenton e Haber-Weiss. Para o ferro essas proteínas são a ferritina, a transferrina e a lactoferrina e para o cobre é a ceruloplasmina.

3.2.7 Compostos fenólicos

Os mecanismos endógenos de defesa, referenciados até aqui, podem ser auxiliados favoravelmente com a introdução de antioxidantes por meio da dieta (Brenna & Pagliarini 2001; Yildirim et al., 2002). Os alimentos, principalmente as frutas, verduras e legumes, contêm agentes antioxidantes, tais como as vitaminas, clorofilinas, os flavonóides, ácidos fenólicos, carotenóides, curcumina e outros que são capazes de restringir a propagação das reacções em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres (Stavric 1994; Fotsis et al. 1997; Pool-Zobel et al., 1997).

Os compostos fenólicos formam um dos maiores e mais diversos grupos de metabolitos secundários das plantas. A acção antioxidante destes compostos assenta essencialmente no elevado potencial que apresentam para sequestrar radicais livres, tais como, os radicais

superóxido, hidroxilo e peróxido (Halliwell, 2000; Yanishlieva-Maslareva 2001). Os compostos fenólicos não reagem rapidamente com o peróxido de hidrogénio mas são capazes de sequestrar o oxigénio singuleto e ácido hipocloroso (Payá et al., 1992).

Uma outra propriedade dos compostos fenólicos é a possibilidade de quelatarem iões metálicos (Rice-Evans et al.,1995; Decker, 1997; Brown et al.,1998; Croft, 1998). No entanto, esta capacidade poderá conferir-lhes poder pró-oxidante na medida em que podem reduzir os iões metálicos aumentando desta forma a formação de radicais livres via reacção de Fenton.

Adicionalmente, os compostos fenólicos podem ainda interagir sinergicamente com outros antioxidantes como o ácido ascórbico e o α -tocoferol (Croft, 1998; Liao e Yin, 2000).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides, estando ambos presentes em frutas e vegetais.

▪ Flavonóides

Os flavonóides são pigmentos naturais de baixo peso molecular, com uma estrutura base C6-C3-C6 (Figura 13) (Aherne e O'brein, 2002 ; Proença da Cunha, 2005).

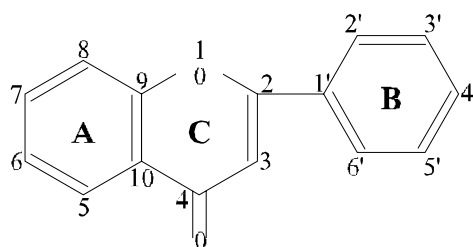


Figura 13 – Estrutura base e sistema de numeração geral dos flavonóides

Dependendo da substituição e do nível de oxidação do anel C, os flavonóides podem ser divididos em 14 classes, sendo os que se incluem na dieta divididos essencialmente em 6 (Figura 14):

- Flavonas - possuem um grupo carbonilo na posição 4 e uma ligação dupla entre as posições 2,3. Exemplos: apigenina, luteoleína.
- Flavonóis - possuem um grupo carbonilo na posição 4, um grupo hidroxilo na posição 3 e uma ligação dupla entre as posições 2,3. Exemplos: quercetina, kaempferol e quercitagetina.
- Flavanonas - possuem um grupo carbonilo na posição 4. Exemplos: miricetina, hesperidina, naringina, naringenina.
- Flavanóis - possuem um grupo hidroxilo na posição 3. Exemplos: catequina, epicatequina.
- Antocianidinas - possuem um grupo hidroxilo na posição 3 e duas ligações duplas, uma entre o átomo de oxigénio e o carbono 2 e outra entre os carbonos 3 e 4. Exemplos: cianidina, petunidina, malvidina.
- Isoflavonas - possuem um grupo carbonilo na posição 4 e o anel B encontra-se ligado à restante molécula através do carbono 3. Podem ainda possuir uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3. Exemplos: genisteína, coumestrol.

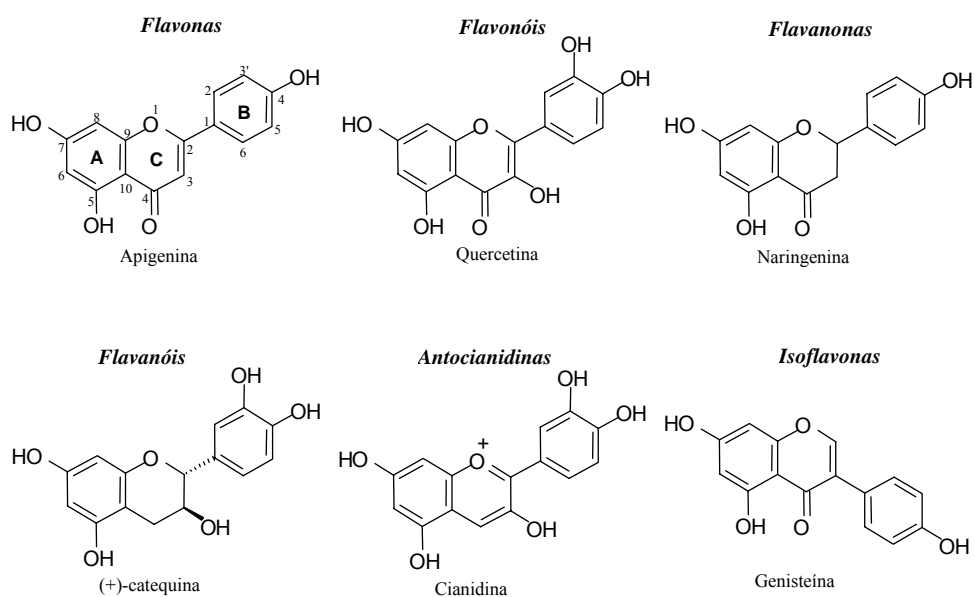


Figura 14 – Estruturas das principais classes de flavonóides presentes na dieta humana (adaptado de Seabra et al., 2006)

Geralmente, os flavonóides encontram-se na natureza sob a forma de glicósidos, o que promove uma melhor absorção gastro-intestinal e uma maior biodisponibilidade destes compostos. No entanto, os glicósidos apresentam menor actividade anti-radicalar que a aglicona correspondente (Rice-Evans et al., 1996, Hopia and Heinonen 1999, Fukumoto and Mazza 2000), o que pode ser justificado, pelo menos em parte, pela sua maior hidrofília, o que dificulta o acesso do antioxidante à fase lipídica (Heim et al., 2002).

A actividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura química, estando associada às seguintes características estruturais: (i) padrão de substituição *ortho*-di-hidroxi no anel B (grupo catecol), (ii) ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 e grupo carbonilo em 4, no anel C, e (iii) grupos hidroxilo em 3, no anel C, e em 5 e 7, no anel A (Valentão, 2002, Silva, 2005; Silva et al., 2004) (Figura 15).

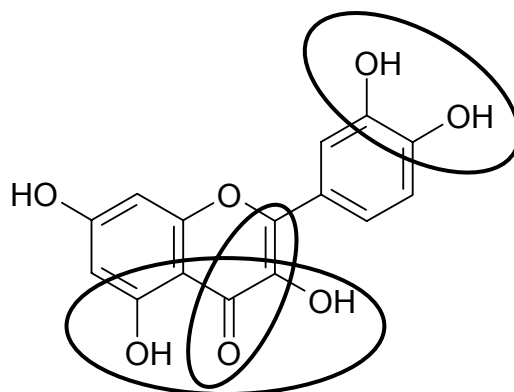


Figura 15 – Relação estrutura-actividade antioxidante dos flavonóides (adaptado de Valentão, 2002).

As propriedades antioxidantes dos flavonóides prendem-se sobretudo com a sua capacidade de sequestrar os radicais livres (Decker, 1997). Estes actuam como antioxidantes na inactivação dos radicais livres nos compartimentos celulares lipofílicos e hidrofílicos, dada a capacidade destes compostos de doar átomos de hidrogénio e, desta forma, inibir as reacções em cadeia provocadas pelos radicais livres (Hartman et al., 1990; Arora et al., 1998). Como mostra a Figura 16, a oxidação do flavonóide por um radical livre (R^\bullet) origina um radical flavonóide relativamente estável devido à estabilização do electrão desemparelhado.

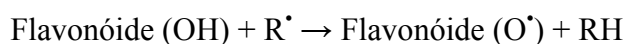


Figura 16 – Sequestração de radicais livres por flavonóides

Este radical flavonóide pode reagir com um segundo radical (R^\bullet) tal como demonstrado na Figura 17 para a quercetina (Rice-Evans et al., 1996, Pietta, 2000, Seabra et al., 2006).

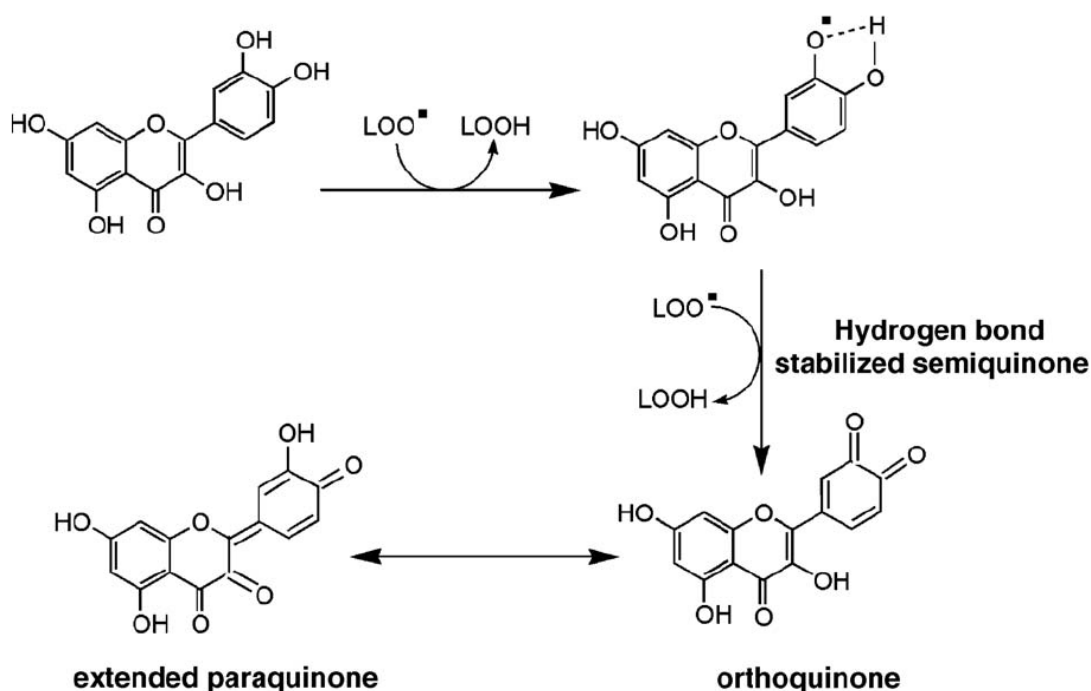


Figura 17 – Mecanismo de acção antioxidante da quercetina (adaptado de Dai et al., 2006).

Sabe-se já há alguns anos que existem flavonóides com uma actividade muito mais potente que a vitamina C ou E, como os encontrados no chá verde ou no vinho tinto. Estes compostos têm uma vasta gama de efeitos protectores tais como anti-inflamatórios, prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, e acção antihipertensiva, antitrombótica e carcinostática (Middleton et al., 2000).

As catequinas, principais constituintes do chá verde, possuem uma das mais elevadas actividades antioxidantes determinadas, pelo que têm sido sugeridos efeitos protectores tais como anti-inflamatórios, prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e acção antihipertensiva, antitrombótica e carcinostática (Nijveldt et al., 2001). Os extractos obtidos das folhas de chá verde têm uma actividade antioxidante potente que resulta sobretudo da presença dos seguintes flavanóis: epigalhocatequina galhato (EGCG), epigalhocatequina (EGC), epicatequina galhato (ECG), epicatequina (EC), galhocatequina galhato (GCG), galhocatequina (GC) e catequina (C) (Borse et al., 2007). Estas catequinas são sequestradores eficazes de radicais livres, sendo mais potentes as que possuem uma molécula de galhato em C3 (Rice-Evans e Miller, 1996) e uma estrutura trihidroxí no anel B (Nanjo et al., 1996).

Vários estudos epidemiológicos e pré-clínicos sugerem fortemente que a ingestão de chá verde diminui o risco de cancro e doença cardiovascular (Dreosti et al., 1997; Tijburg et al., 1997). Outros efeitos benéficos para a saúde também já foram reportados tais como anti-inflamatórios e anti-trombóticos.

▪ **Não flavonóides**

Os compostos fenólicos não flavonóides incluem os ácidos fenólicos, as cumarinas, os taninos, os estilbenos e os lignanos. Dentro deste grupo, os ácidos fenólicos são os mais abundantes na natureza, estando presentes em frutos e vegetais. Estes compostos estão divididos em dois grupos: os derivados do ácido hidroxicinâmico e os derivados do ácido hidroxibenzóico (Figura 18) (Degáspari et al., 2004).

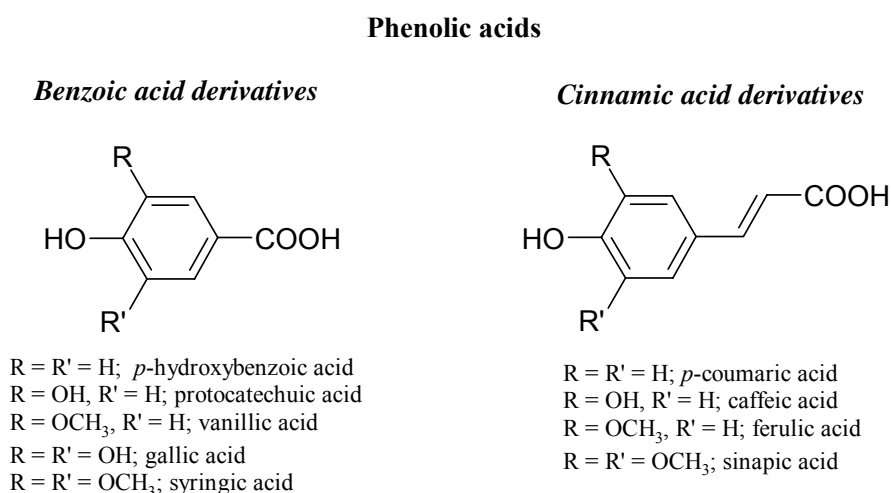


Figura 18 – Estrutura dos principais ácidos fenólicos (adaptado de Seabra et al., 2006)

A posição e o número de grupos hidroxilo presentes nestes compostos são determinantes para a sua actividade anti-radicalar (Figura 18). O hidroxilo do ácido ferúlico existente na posição *orto* com o grupo metoxilo, dador de electrões, constitui um factor que aumenta a estabilidade do radical fenoxilo e bem como a eficiência antioxidante deste ácido fenólico (Cuvelier et al, 1992). A presença de um segundo hidroxilo na posição *orto* ou *para*, também aumenta a

actividade anti-radicalar. O efeito sequestrante do radical hidroxilo parece estar directamente relacionado aos grupos hidroxilo localizados na posição *para* no anel aromático.

Os ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos sináptico, ferúlico e *p*-cumárico, são antioxidantes mais eficazes do que os ácidos hidroxibenzóicos, tais como ácido procatéquico, siríngico e vanílico. Isso deve-se à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico (-HC=CHCOOH) (Silva, 2005; Silva et al., 2004; Valentão, 2002), que participa da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do electrão desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica (Natella et al., 1999).

**IV. O eritrócito como modelo *in vitro* para
avaliação da actividade antioxidante**

4.1 O eritrócito humano

O eritrócito humano maduro é uma célula simples, que vive aproximadamente 120 dias na circulação periférica. A sua principal função é transportar oxigénio para os tecidos através da hemoglobina (Dacie e Lewis, 1995).

Durante o processo de diferenciação do eritrócito, a partir de células progenitoras da medula óssea, ocorre a perda, por exocitose, do núcleo e organelos citoplasmáticos, como o retículo endoplasmático, mitocôndrias e ribossomas. Dessa forma, o eritrócito maduro é incapaz de sintetizar proteínas, e não possui metabolismo aeróbio (Krukoski, 2006). A forma normal do eritrócito é de disco bicôncavo, com diâmetro de cerca de 8 μm , com características de deformabilidade e superfície ideais para o transporte e trocas de gases com os tecidos.

A membrana tem um papel fundamental na manutenção da forma do eritrócito, sendo constituída por 42% de lípidos, 52% de proteínas e 7% de carboidratos. Entre os lípidos, o colesterol e os fosfolípidos estão organizados em bicamada, em quantidades quase equimolares. A interação das proteínas do citoesqueleto (periféricas) com a bicamada lipídica e com as proteínas integrais da membrana são responsáveis pela flexibilidade e deformabilidade do eritrócito.

O eritrócito é um excelente modelo experimental, dada a facilidade de obtenção e preservação desta célula, bem como o interesse pelos processos fisiopatológicos que nele ocorrem. Distúrbios causados por alterações genéticas ou exposição a agentes externos químicos e físicos podem levar a uma diminuição na vida média do eritrócito, muitas vezes relacionada a processos oxidativos (Ferrali et al., 1992).

4.1.1 Sistema antioxidante do eritrócito

O eritrócito transporta grande quantidade de oxigénio de forma relativamente segura para a sua integridade, graças a um complexo sistema de defesa antioxidante, que previne a acumulação de radicais livres e de outras espécies altamente reactivas. Estes mecanismos

incluem os antioxidantes enzimáticos e os antioxidantes não enzimáticos endógenos já referidos (Biswas et al., 2005). Entre estes, a glutathione tem um papel crucial na manutenção do estado redox no eritrócito. Como referido anteriormente, a GSH tem como função manter os componentes intracelulares no estado reduzido, especialmente proteínas e iões Fe^{2+} de grupos heme. A GSH também actua como um nucleófilo, ligando-se covalentemente a centros electrofilicos, e como cofactor da glutathione peroxidase, exercendo aí um papel fundamental na metabolização de peróxidos. Deficiência ou comprometimento nas enzimas deste metabolismo, nomeadamente a glucose-6-fosfato desidrogenase, aumentam claramente a susceptibilidade do eritrócito ao stresse oxidativo. Outras enzimas importantes são a superóxido dismutase (SOD), que forma peróxido de hidrogénio a partir do radical superóxido, e a catalase, que remove o peróxido de hidrogénio formado. A hemoglobina auto-oxidada pode ser convertida à desoxihemoglobina pela metahemoglobina reductase, uma enzima NADH dependente (Krukoski, 2006). Os eritrócitos possuem ainda mecanismos capazes de transferir equivalentes redutores através da sua membrana para o meio extracelular. A actividade da oxirredutase transmembranar está relacionada à manutenção do estado redox de proteínas, neutralização de agentes oxidantes externos e reciclagem da vitamina E na membrana (May, 1999).

Compostos não enzimáticos de baixo peso molecular que actuam na remoção preventiva de ROS e RNS também são muito importantes para a manutenção do equilíbrio redox na célula. Pode-se citar compostos como os tocoferóis (vitamina E), compostos fenólicos, como os flavonóides e ácidos fenólicos, o ácido ascórbico e quelantes de ferro. A vitamina E revela-se mais eficaz na protecção da membrana das células e consequentemente na prevenção de hemólise oxidativa (May et al., 1998), especialmente na presença de co-antioxidantes que a regeneram continuamente, nomeadamente a vitamina C (Chan et al., 1999).

Compostos polifenólicos, como os flavonóides, também têm actividade antioxidante comprovada, sendo capazes de entrar no eritrócito e inactivar radicais hidroxilo e peroxilo. Os flavonóides também são capazes de quelatar metais, podendo inibir o dano oxidativo resultante da reacção de Fenton (Ferrali et al., 1997).

Desta forma, o eritrócito constitui um bom modelo experimental para o estudo *in vitro* quer dos mecanismos de lesão por radicais livres em membranas biológicas, quer para a investigação do efeito protector de alguns compostos.

4.2 Danificação oxidativa eritrocitária

O eritrócito constitui um sistema celular adequado para o estudo dos efeitos de ROS e RNS, em virtude da sua simplicidade estrutural, acessibilidade e vulnerabilidade dos seus constituintes à oxidação. As principais estruturas eritrocitárias afectadas por estas espécies são os constituintes membranares e a hemoglobina. A membrana dos eritrócitos é rica em ácidos gordos insaturados sendo, por isso, muito susceptíveis à peroxidação lipídica. As proteínas do eritrócito também podem ser modificadas no processo oxidativo, sobretudo se possuírem grupos sulfidrilo (-SH), ocorrendo uma acumulação intracelular de proteínas desnaturadas.

A acção dos radicais livres em membranas eritrocitárias pode levar a uma série de alterações como formação de peróxidos lipídicos, redução da deformabilidade, alteração na morfologia celular, fenómenos de cross-linking proteico, hemólise e alterações no metabolismo intracelular (Shiva et al., 2007; Begum e Terao, 2002; Sato et al., 1995; Sandhu et al., 1992). Estas alterações têm como principal consequência a diminuição do tempo médio de vida do eritrócito.

4.3 Substâncias oxidantes usadas como modelos experimentais

Diversas substâncias têm sido usadas como modelos de agentes oxidantes para estudar o mecanismo de injúria oxidativa em eritrócitos, tais como o peróxido de hidrogénio (Lii e Hung, 1997), terc-butilhidroperóxido (Rice-Evans et al., 1985; Zou et al., 2001), primaquina (Grinberg e Samuni, 1994) e hidrazinas (Biswas et al., 2005). Entre os agentes oxidantes usados, o 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH) tem sido largamente empregue como gerador de radicais livres em estudos biológicos (Dai et al., 2006; Ma et al., 2000; Cai et al., 2002; Shiva et al., 2007). O AAPH é um composto azo hidrossolúvel gerador de radicais livres do tipo peróxido por decomposição térmica (a 37° C) unimolecular em taxa constante

(Figura 19) (Sato et al., 1995; Lenfant et al., 2000). A geração de radicais pelo AAPH é tempo e dose dependente (Sandhu et al., 1992; Sato et al., 1995; Lenfant et al., 2000; Zou et al., 2001). Estes radicais gerados no meio extracelular atacam a membrana do eritrócito causando várias alterações oxidativas, tais como formação de peróxidos lipídicos, redução da deformabilidade, mudanças na morfologia, ligação cruzada e fragmentação de proteínas, hemólise e alterações no metabolismo intracelular. Essas alterações têm como principal consequência a diminuição do tempo de semi-vida do eritrócito.

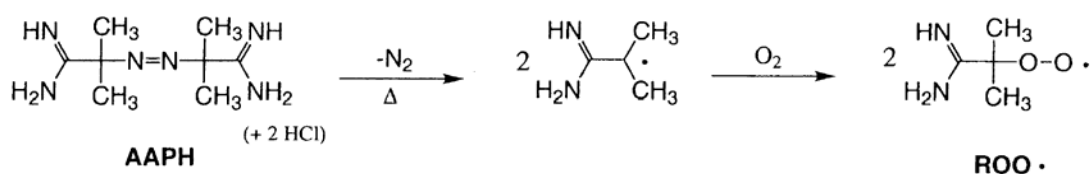
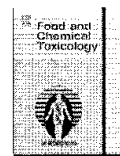


Figura 19 – Reacção de oxidação do AAPH (adaptado de Dunlap et al., 2003)

A hemólise induzida pelo AAPH proporciona assim um bom modelo para o estudo de lesões oxidativas na membrana induzidas por radicais livres e pode ser caracterizada principalmente por dois eventos: (i) a peroxidação lipídica, resultante do ataque dos radicais gerados pelo AAPH aos lípidos insaturados da membrana do eritrócito e (ii) a redistribuição de proteína de banda 3 oxidada na membrana, devido à sua alteração conformacional. Esta redistribuição leva a formação de poros hemolíticos e a forma característica de disco bicôncavo dos eritrócitos é alterada principalmente para formato esferocítico (Sato et al., 1995).

**V. Parte experimental: Estudo do efeito
protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller na
danificação oxidativa em eritrócitos humanos**



Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: A comparative study with green tea (*Camellia sinensis*)

Rossana M. Costa^a, Ana S. Magalhães^a, José A. Pereira^b, Paula B. Andrade^c, Patrícia Valentão^c, Márcia Carvalho^{a,d}, Branca M. Silva^{a,c,*}

^aCEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, R. Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal

^bCIMO, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

^cREQUIMTE, Serviço de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal

^dREQUIMTE, Serviço de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 October 2008
Accepted 12 January 2009

Keywords:
Antioxidant activity
Cydonia oblonga
Quince leaf
Hemolysis
Phenolic compounds
Camellia sinensis

ABSTRACT

This study aimed to determine the phenolic profile and to investigate the antioxidant potential of quince (*Cydonia oblonga*) leaf, comparing it with green tea (*Camellia sinensis*). For these purposes, methanolic extracts were prepared and phenolics content of quince leaf was determined by HPLC/UV. The antioxidant properties were assessed by Folin–Ciocalteu reducing capacity assay and by the ability to quench the stable free radical 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and to inhibit the 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative hemolysis of human erythrocytes.

5-O-Caffeoylquinic acid was found to be the major phenolic compound in quince leaf extract. Quince leaf exhibited a significantly higher reducing power than green tea (mean value of 227.8 ± 34.9 and 112.5 ± 1.5 g/kg dry leaf, respectively). Quince leaf extracts showed similar DPPH radical-scavenging activities (EC_{50} mean value of 21.6 ± 3.5 µg/ml) but significantly lower than that presented by green tea extract (EC_{50} mean value of 12.7 ± 0.1 µg/ml). Under the oxidative action of AAPH, quince leaf methanolic extract significantly protected the erythrocyte membrane from hemolysis in a similar manner to that found for green tea (IC_{50} mean value of 30.7 ± 6.7 and 24.3 ± 9.6 µg/ml, respectively, $P > 0.05$). These results point that quince leaf may have application as preventive or therapeutic agent in diseases in which free radicals are involved.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Many plants have been known to produce biologically active substances, some of which are related to special flavour or taste and others are found to be useful as antioxidants and/or antimicrobial agents. Antioxidants reduce oxidative damage to cells and biomolecules due to reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) (Fiorentino et al., 2008). During the past years, ROS and RNS have been implicated in the oxidative deterioration of food products as well as in the pathogenesis of several human diseases such as atherosclerosis, diabetes mellitus, chronic inflammation, neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease, and certain types of cancer (Valko et al., 2006, 2007). The putative protective effects of antioxidants against these deleterious oxidative-induced injuries have received increasing attention in recent times, especially within biological, medical, nutritional, and agrochemical areas. Among dietary antioxidants, phenolic compounds, second-

ary metabolites from plants, are the most abundant natural antioxidants (Fiorentino et al., 2008). Phenolics are able to act as antioxidants in a number of ways. These antioxidants act as reducing agents, hydrogen donors, free radicals scavengers, and singlet oxygen quenchers and, therefore, as cell saviours (Fattouch et al., 2007).

Several studies have showed that quince tree (*Cydonia oblonga* Miller) is a good and low-cost natural source of phenolic acids and flavonoids (Silva et al., 2004, 2008; Oliveira et al., 2007), which are potent antioxidants. These compounds could provide a chemical basis to some health benefits claimed for quince leaf and fruit in folk medicine, namely in cardiovascular diseases, haemorrhoids, bronchial asthma, and cough (Oliveira et al., 2007, 2008; Yildirim et al., 2001). However, the supporting scientific information is lacking. At present, quince fruit is recognized as an important dietary source of health promoting compounds, due to its antioxidant, antimicrobial and antiulcerative properties (Fattouch et al., 2007; Fiorentino et al., 2006, 2007, 2008; García-Alonso et al., 2004; Hamauzu et al., 2005, 2006; Silva et al., 2004, 2008; Yildirim, 2006; Wang et al., 2006).

Green tea (*Camellia sinensis*) is one of the most widely consumed beverages in the world. A number of polyphenolic

* Corresponding author. Address: CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, R. Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal. Tel.: +351 225074630; fax: +351 225508269.
E-mail address: bsilva@ufp.edu.pt (B.M. Silva).

compounds extracted from green tea, especially catechins (flavan-3-ol family), have been found to be potent antioxidants (Cao et al., 1996; Li et al., 2008; Pokorný, 2007; Stewart et al., 2005; Wheeler and Wheeler, 2004) and to be effective in preventing cancer (Li et al., 2008; Wheeler and Wheeler, 2004). Interest in natural antioxidant sources prompted us to investigate the antioxidant activity of quince leaf having green tea extract as reference. So, following our work on quince tree and considering the high phenolic content of leaf (Oliveira et al., 2007), its methanolic extract capacity to scavenge the 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) was studied and compared with that of green tea. Additionally, normal human erythrocytes were used to investigate the capability of the methanolic extracts of quince leaf (12.5–50 µg/ml) to protect erythrocytes against oxidative damage *in vitro*. In this study, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was used as the free-radical initiator to induce oxidative damage in erythrocytes, ultimately leading to hemolysis. As far as we know, this is the first time that antioxidant activity of quince leaf is evaluated by using these two microassays.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The standards were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and from Extrasynthèse (Genay, France). Methanol and formic acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The water was treated in a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2. Sample preparation and extraction

Twelve healthy quince leaf samples were collected in the beginning of June and October 2006, in three different places of two geographical origins of Northern and Central of Portugal (Carrazeda de Ansiães and Covilhã, respectively). Each quince leaf sample was dried in a stove at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ for 5 days (in the dark). The mean drying yield was 50%. Green tea dried leaf sample was purchased on the Portuguese market.

For each sample, three methanolic extracts were prepared. Briefly, 0.25 g of dried sample was thoroughly mixed with methanol ($3 \times 25\text{ ml}$) at 40°C .

For HPLC analysis, sample 1 extract was filtered, concentrated to dryness under reduced pressure (40°C) and redissolved in methanol (1 ml).

2.3. Identification and quantification of phenolic compounds

Quince leaf extract (sample 1) was analyzed using an analytical HPLC unit (Gilson) and a C18 Spherisorb ODS2 column ($25.0 \times 0.46\text{ cm}$; $5\ \mu\text{m}$, particle size) from Waters (Ireland). The solvent system used was a gradient of water-formic acid (19:1) (A) and methanol (B), starting with 5% methanol and installing a gradient to obtain 15% B at 3 min, 25% B at 13 min, 30% B at 25 min, 35% B at 35 min, 45% B at 39 min, 45% B at 42 min, 50% B at 44 min, 55% B at 47 min, 70% B at 50 min, 75% B at 56 min and 80% B at 60 min, at a solvent flow rate of 0.9 ml/min (Oliveira et al., 2007). Detection was achieved with a Gilson Diode Array Detector (DAD). Spectral data from all peaks were accumulated in the range 200–400 nm, and chromatograms were recorded at 350 nm. Chromatographic data was processed by Uni-point® System software from Gilson Medical Electronics (Villiers le Bel, France). The compounds in each sample were identified by comparing their retention times and UV-Vis spectra in the 200–400 nm range with the library of spectra previously compiled by the authors (Oliveira et al., 2007).

Quantitative determinations were made by injection of 20 µl of sample 1 extract on a HPLC system equipped with UV detector (Agilent 1100 series) set at 350 nm. Chromatographic separation was carried out using a C18 Lichrocrap® 250-4 column ($25.0 \times 0.40\text{ cm}$; $5\ \mu\text{m}$, particle size) from Merck (Germany) and the same solvent system described above for qualitative analysis. Phenolic quantification was achieved by the absorbance recorded in the chromatograms relative to external standards. 3-O-Caffeoylquinic and 3,5-O-dicaffeoylquinic acids were quantified as 5-O-caffeoylquinic acid. Kaempferol-3-O-glycoside was quantified as kaempferol-3-O-rutinoside. The other compounds were quantified as themselves.

2.4. Folin-Ciocalteu reducing capacity assay

As proposed by Huang et al. (2005), the Folin-Ciocalteu's phenol reagent was used here for the measurement of total reducing capacity of samples, according to a previously described procedure (Wang et al., 1997). Briefly, 100 µl of methanolic

extract was mixed with 1 ml of Folin-Ciocalteu's phenol reagent and 5 ml of sodium carbonate solution (20%) and the mixture adjusted to 10 ml with water. The reaction was kept in the dark for 20 min, after which the absorbance was read at 735 nm. The total reducing capacity was determined from a standard curve using 5-O-caffeoylquinic acid as standard.

2.5. DPPH radical-scavenging activity assay

The antiradical activity of ascorbic acid, 5-O-caffeoylquinic acid and methanolic extracts was determined spectrophotometrically, by monitoring the disappearance of DPPH, as previously described (Silva et al., 2004). For each extract, a dilution series (five different concentrations) was prepared in a 96 well plate. The reaction mixtures in the sample wells consisted of 25 µl of extract and 200 µl of 150 µM DPPH (dissolved in methanol). The reaction was conducted at room temperature, until no variation of the absorbance was observed. Ascorbic and 5-O-caffeoylquinic acids were used as reference compounds. Four experiments were performed in triplicate. The antiradical activity was expressed in terms of the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH absorbance by 50% (EC_{50}). The EC_{50} value for each extract (or reference compounds) was determined graphically by plotting the percentage of DPPH scavenging as a function of extract concentration.

2.6. Preparation of human erythrocyte suspensions and hemolysis assay

Blood (5–10 ml) was obtained from healthy non-smoking volunteers by venipuncture, after written informed consent was obtained. Human erythrocytes from citrated blood were immediately isolated by centrifugation at 1500 rpm for 10 min, at 4°C . After removal of plasma and buffy coat, the erythrocytes were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4), and then resuspended using the same buffer to the desired hematocrit level. In order to induce free-radical chain oxidation in erythrocytes, aqueous peroxyl radicals were generated by thermal decomposition of AAPH (dissolved in PBS; final concentration 50 mM). To study the protective effects of methanolic extracts against AAPH-induced hemolysis, an erythrocyte suspension at 2% hematocrit was preincubated with the extracts of quince leaf (sample 1) and green tea (redissolved in PBS; final concentrations 12.5–50 µg/ml) at 37°C for 30 min, followed by incubation with and without 50 mM AAPH. This reaction mixture was shaken gently while being incubated for 4 h, at 37°C . In all experiments, a negative control (erythrocytes in PBS), as well as extract controls (erythrocytes in PBS with each extract) were used.

The extent of hemolysis was determined spectrophotometrically according to a method reported before (Ko et al., 1997). Briefly, aliquots of the reaction mixture were taken out at each hour of the 4 h incubation period, diluted with saline, and centrifuged at 4000 rpm for 10 min to separate the erythrocytes. The percentage of hemolysis was determined by measuring the absorbance of the supernatant (A) at 545 nm and compared with that of complete hemolysis (B), by treating an aliquot with the same volume of the reaction mixture with distilled water. The hemolysis percentage was calculated using the formula: $A/B \times 100$. The inhibitory concentration 50% (IC_{50}) at 3 h was also calculated from dose-response curve obtained by plotting the percentage of hemolysis inhibition versus the extract concentration. Five independent experiments were used for these calculations.

2.7. Statistical analysis

Statistic analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 16.0) for Windows. Comparisons between two groups were performed by unpaired *t*-test. Multiple comparisons between more than two groups were performed by one-way ANOVA supplemented with Tukey's HSD post hoc test. Significance was accepted at *P* lower than 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Phenolic profile

Methanolic extract from quince leaf (sample 1) was submitted to HPLC analysis for phenolics determination. This extract presented a chemical profile composed by six phenolic compounds: 3-O- and 5-O-caffeoylquinic acids, 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, quercetin-3-O-rutinoside (rutin), kaempferol-3-O-glycoside and kaempferol-3-O-rutinoside (Fig. 1; Table 1). Caffeoylquinic acids were the major phenolic compounds, being 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) the most abundant one, followed by 3-O-caffeoylquinic acid (45% and 22%, respectively). In a previous study, 4-O-caffeoylquinic acid, quercetin-3-O-galactoside and kaempferol-3-O-glucoside were also found in quince leaf (Oliveira et al., 2007), but in small amounts. These compounds were not detected in the analysed sample, probably due to lower extraction effective-

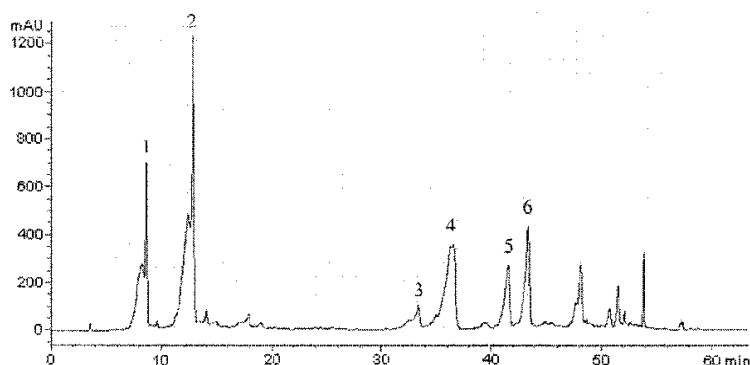


Fig. 1. HPLC phenolic profile of quince leaf methanolic extract (sample 1). Detection at 350 nm. Peaks: (1) 3-O-caffeoylquinic acid, (2) 5-O-caffeoylquinic acid, (3) 3,5-dicafeoylquinic acid, (4) quercetin-3-O-rutinoside, (5) kaempferol-3-O-glycoside and (6) kaempferol-3-O-rutinoside.

Table 1
HPLC/UV quantification of phenolic compounds present in quince leaf methanolic extract (sample 1).

Phenolic compound	Content (g/kg of methanolic extract)	SD (g/kg of methanolic extract)
3-O-Caffeoylquinic acid	7.85	0.01
5-O-Caffeoylquinic acid	15.71	0.25
3,5-O-Dicafeoylquinic acid	1.38	0.04
Quercetin-3-O-rutinoside	2.21	0.09
Kaempferol-3-O-glycoside	3.13	0.03
Kaempferol-3-O-rutinoside	4.66	0.06
Total (sum)	34.94	

ness (three extractions with methanol instead of ten extractions used before). Considering the extraction yield of 35% obtained for sample 1 (Table 3), the sum of determined phenolic compounds (35 g/kg of methanolic extract) was within the range of phenolic content previously reported (Oliveira et al., 2007).

The phenolic profile of quince fruit has already been established by HPLC/DAD (Silva et al., 2005a,b, 2008). Even considering the drying and extraction yields of sample 1 (50% and 35%, respectively), the total content (6.1 g/kg of fresh matter) was much higher than that found for pulp, peel and seed (0.2, 1.2 and 0.1 g/kg of fresh matter, respectively) (Silva et al., 2005a,b, 2008). As peel, quince leaf revealed the presence of kaempferol glycosides. Never-

theless, leaf presented the greatest content of kaempferol derivatives, especially kaempferol-3-O-rutinoside. The high flavonoid content of this leaf is not surprising since this type of compounds act as UV filters, protecting some fragile cell structures, such as chloroplasts, from UV radiation (Oliveira et al., 2007; Silva et al., 2005a, 2008).

3.2. Antioxidant activity

In the present study, the antioxidant properties of quince leaf and green tea samples were evaluated by three distinct assays: reducing capacity, DPPH radical-scavenging activity, and inhibition of erythrocyte hemolysis mediated by peroxy free radicals. Table 2 presents the total reducing capacity of twelve samples of quince leaf as determined by Folin-Ciocalteu assay. Quince leaf reducing power varied between 164.5 and 294.6 g of 5-O-caffeoylquinic acid/kg dry leaf (mean value of 227.8 ± 34.9 g of 5-O-caffeoylquinic acid/kg dry leaf) and was found to be significantly higher ($P \leq 0.001$) than that observed for green tea (112.5 ± 1.5 g of 5-O-caffeoylquinic acid/kg dry leaf).

As shown in Fig. 2, both quince leaf and green tea methanolic extracts presented a strong concentration-dependent antiradical activity. Quince leaf extract exhibited high DPPH free radical-scavenging capacity, although significantly lower than that observed for green tea extract ($P \leq 0.005$). The EC_{50} values calculated for quince leaf extracts varied from 14.5 to 27.6 $\mu\text{g/ml}$ (mean value of 21.6 ± 3.5 $\mu\text{g/ml}$) (Table 3), while for green tea it was found an

Table 2
Total reducing capacity of quince leaf samples as determined by Folin-Ciocalteu assay.

Samples	Geographical origin	Collection month	Total reducing capacity (g/kg of dry leaf)	SD (g/kg of dry leaf)
1	Carrazeda de Ansiães	June	245.1	2.8
2			237.5	1.0
3			249.1	2.4
4	Covilhã	June	205.3	3.3
5			227.3	5.5
6			185.3	1.3
7	Carrazeda de Ansiães	October	262.3	0.5
8			227.0	1.6
9			294.6	6.4
10	Covilhã	October	202.1	3.4
11			232.5	0.8
12			164.5	6.7
Mean			227.8	
SD			34.9	

Table 3
Extraction yields and EC_{50} values found in the DPPH assay of quince leaf samples.

Samples	Extraction yield (%)	EC_{50} (μg of methanolic extract/ml)	SD (μg of methanolic extract/ml)
1	35.0	17.6	0.4
2	38.6	21.8	1.8
3	38.7	20.4	1.2
4	25.7	14.5	1.5
5	35.7	21.3	0.8
6	30.4	23.3	0.6
7	41.1	22.2	1.5
8	36.4	19.9	0.7
9	38.6	27.6	1.2
10	25.8	23.5	0.7
11	33.4	26.1	1.9
12	22.4	20.7	1.5
Mean	30.0	21.6	
SD	7.4	3.5	

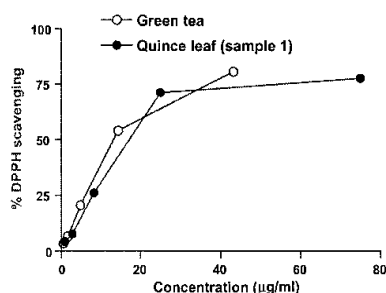


Fig. 2. Antiradical activity of the methanolic extracts from quince leaf (sample 1) and green tea.

EC₅₀ of 12.7 ± 0.1 µg/ml. As suggested by Silva et al. (2004, 2008), hydroxycinnamic acid derivatives seem to be the main responsible for this activity. The antioxidant effect of caffeoylquinic acids can be explained by the presence of a catechol group, which confers a great stability to phenoxyl radicals by participating in electron delocalization. Additionally, conjugated double bond in the side chain of a catechol group is likely to have great effect in stabilizing the putative phenoxyl radical and, therefore, in enhancing antiradical activity (Laranjinha et al., 1994; Silva et al., 2004, 2008).

Considering the EC₅₀ values obtained for the reference compounds used in this assay, both ascorbic and 5-O-caffeoylquinic acids presented higher antiradical potential (EC₅₀ value of 8.1 and 15.1 µg/ml, respectively) than quince leaf extracts. Nevertheless, the content of 5-O-caffeoylquinic acid in these concentrated quince leaf extracts is much lower than the EC₅₀ of individual pure compound. For sample 1, total caffeoylquinic acids content is about 0.4 µg/ml, which is much lower than EC₅₀ value of 5-O-caffeoylquinic acid solution (15.1 µg/ml). The assays were performed with the whole methanolic extract, since it could be more beneficial than isolated constituents due to additive and synergistic effects of phytochemicals. In fact, the present results clearly indicate that the potent antioxidant activity of quince leaf might be due to the synergistic action of bioactive compounds, for instance between phenolic compounds and/or between them and organic acids, present in the methanolic extracts.

As expected, considering the high phenolics contents of quince leaf, this material is much more effective than fruit (Silva et al., 2004). In that earlier study, peel methanolic extract showed an EC₅₀ of 600 µg/ml, followed by pulp and seed extracts, with EC₅₀ of 1700 and 2000 µg/ml, respectively.

Some authors have reported excellent linear correlations between antioxidant/antiradical activity tests and Folin–Ciocalteu assay (Kim et al., 2008; Li et al., 2005). In our study, no linear correlation was observed between the scavenging effects on DPPH radicals and the reducing power expressed by Folin–Ciocalteu assay (data not shown). However, and in accordance with other authors (Yildirim et al., 2001; García-Alonso et al., 2004), our results indicate that, although the reducing power of a substance or an extract may be an indicator of its potential antioxidant activity, there is not necessarily a linear correlation between those two activities. This could be the result of the synergies (or antagonisms) among the antioxidants in the mixture, still unknown.

Recent research has demonstrated an increasingly interest in the protective biochemical function of naturally occurring antioxidants in biological systems and on the mechanism of their action. The *in vitro* oxidative hemolysis of human erythrocytes was used here as a model to study the free radical-induced damage of biological membranes and the protective effect of quince leaf (sample 1) and green tea methanolic extracts. Fig. 3 shows the antihemo-

lytic effects of the quince leaf (A) and green tea (B) methanolic extracts (12.5–50 µg/ml) on human erythrocytes exposed to the water-soluble radical initiator AAPH. Erythrocytes incubated at 37°C as a 2% suspension in PBS were stable, with little hemolysis observed within 4 h (5.8 ± 0.6%). When AAPH was added to the erythrocytes' suspension, hemolysis induction was time-dependent. The hemolysis is lagged, indicating that endogenous antioxidants in the erythrocytes, namely glutathione, tocopherol, ascorbate and enzymes, such as catalase and superoxide dismutase, can efficiently quench radicals to protect them against free radical-induced hemolysis, as described previously (Zou et al., 2001). Both quince leaf and green tea extracts significantly protected the erythrocyte membrane from hemolysis induced by AAPH in a concentration- and time-dependent manner (Fig. 3A and B, respectively). Further, a strong correlation can be demonstrated between lag time and extract concentration. The IC₅₀ value calculated for quince leaf and green tea after 3 h of incubation were 30.7 ± 6.7 and 24.3 ± 9.6 µg of methanolic extract/ml, respectively. Comparison of results based on inhibitory efficiency did not reveal any statistically significant difference ($P = 0.257$) between quince leaf and green tea. When the cells were incubated with 50 µg/ml extracts of quince leaf or green tea alone, hemolysis was maintained at a background level similar to that in the control samples (AAPH untreated samples) (data not shown).

Erythrocyte membrane is rich in polyunsaturated fatty acids which are susceptible to free radical-mediated peroxidation.

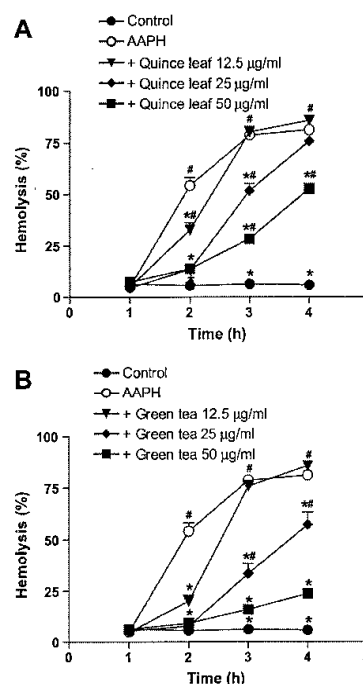


Fig. 3. Effects of quince leaf (sample 1) and green tea methanolic extracts on AAPH-induced hemolysis in erythrocytes. An erythrocyte suspension at 2% hematocrit was preincubated with quince leaf or green tea extracts at the indicated concentrations for 30 min at 37 °C. The cell suspension was then incubated with 50 mM AAPH for 4 h at 37 °C. In all experiments, control erythrocytes (incubated only with PBS) and AAPH-treated erythrocytes (incubated with 50 mM AAPH) were used. Values are expressed as the mean ± SEM of five independent experiments. * $P < 0.05$, as compared with AAPH at respective time; # $P < 0.05$, as compared with control at respective time.

Thermal decomposition at physiological temperature of AAPH generates peroxy radicals (ROO[•]) in the aqueous phase (Niki, 1990), which can attack the erythrocyte membrane to induce lipid peroxidation. Since peroxidation of membrane lipids is a free-radical chain reaction, the erythrocyte membrane is quickly damaged, leading to hemolysis. Green tea catechins are well-known effective scavengers of free radicals (Nanjo et al., 1996) and, as expected, protected human erythrocytes against AAPH-induced oxidative hemolysis. Likewise, the antioxidant activities of chlorogenic acid and related catechols have already been studied in both cell free systems (such as DPPH microassay) and in cell models (as erythrocytes) (Lekse et al., 2001; Ohnishi et al., 1994; Psotová et al., 2003). Those compounds always exhibited strong antiradical activities and inhibitory effects on hemolysis. So, as expected, quince leaf phenolic compounds present in the incubation medium may quench peroxy radicals in the aqueous phase before the radicals attack the biomolecules of the erythrocyte membrane to cause oxidative hemolysis.

Although antioxidant activity of polyphenols is attributed mainly to their capacity to scavenge ROS and RNS (Bors et al., 1990) and to chelate redox-active metals (van Acker et al., 1998), recent studies have suggested that certain polyphenols may interact with the membrane bilayer, decreasing its fluidity and the diffusion of free radicals into the cell membranes and its consequent damaging effects (Chaudhuri et al., 2007; Singh and Rajini, 2008; Suwalsky et al., 2007). In our study we did not look for morphological changes induced in erythrocytes but it was clearly observed that erythrocytes incubated in presence of quince leaf or green tea extracts sedimented faster, in a concentration-dependent manner, which may suggest that at least some phenolic compounds bind to the erythrocyte membrane. However, their interactions with cell membranes warrant future investigation.

In conclusion, the results of this study indicate that quince leaf methanolic extracts exhibit strong antioxidant activities similar to those of green tea extract. The scavenging activities observed against DPPH and peroxy radicals, as well as the protective activities against erythrocyte damage, lead us to propose quince leaf as a promising natural source of antioxidants suitable for application in nutritional/pharmaceutical fields, in the prevention of free radical-mediated diseases. Further studies are needed to explore the potential of quince leaf bioactive compounds as chemopreventive and therapeutic agents.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M., 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* 186, 343–355.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R., 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3426–3431.
- Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., Sengupta, P.K., 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules* 41, 42–48.
- Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C.I.G., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N., Cabras, P., 2007. Antimicrobial activity of tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 963–969.
- Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Mastellone, C., Piscopa, V., Monaco, P., 2006. Spectroscopic identification and antioxidant activity of glucosylated carotenoid metabolites from *Cydonia vulgaris* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 9592–9597.
- Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Mastellone, C., Piccolella, S., Monaco, P., 2007. Isolation, structure elucidation, and evaluation of cydonioside A, an unusual terpenoid from the fruits of *Cydonia vulgaris*. *Chemistry and Biodiversity* 4, 973–979.
- Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Mastellone, C., Piscopa, V., Caputo, R., Monaco, P., 2008. Isolation and structure elucidation of antioxidant polyphenols from quince (*Cydonia vulgaris*) peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 2660–2667.
- García-Alonso, M., Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry* 84, 13–18.
- Hamauzu, Y., Hisako, Y., Takaromi, I., Kume, C., Omnyuda, M., 2005. Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.) and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 928–934.
- Hamauzu, Y., Takaromi, I., Kume, C., Irie, M., Hiramatsu, K., 2006. Antioxidant and antitumor properties of phenolics from Chinese quince, quince, and apple fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 765–772.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1841–1856.
- Kim, M.Y., Seguin, P., Ahn, J.K., Kim, J.J., Chun, S.C., Kim, E.H., Seo, S.H., Kang, E.Y., Kim, S.L., Park, Y.J., Ro, H.M., Chung, I.M., 2008. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7265–7270.
- Ko, F.N., Hsiao, G., Kuo, Y.H., 1997. Protection of oxidative hemolysis by demethylisoeugenol in normal and β -thalassemic red blood cells. *Free Radical Biology and Medicine* 22, 215–222.
- Laranjinha, J.A., Almeida, L.M., Madeira, V.M., 1994. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochemical Pharmacology* 3, 487–494.
- Lekse, J.M., Xia, L., Stark, J., Morrow, J.D., May, J.M., 2001. Plant catechols prevent lipid peroxidation in human plasma and erythrocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 226, 89–95.
- Li, W., Shan, F., Sun, S., Corke, H., Beta, T., 2005. Free radical scavenging properties and phenolic content of Chinese black-grained wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8533–8536.
- Li, F., Wang, F., Yu, F., Fang, Y., Xin, Z., Yang, F., Xu, J., Zhao, L., Hu, Q., 2008. In vitro antioxidant and anticancer activities of ethanolic extract of selenium-enriched green tea. *Food Chemistry* 111, 165–170.
- Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., Hara, Y., 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine* 21, 895–902.
- Niki, E., 1990. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods in Enzymology* 186, 100–108.
- Ohnishi, M., Morishita, H., Iwahashi, H., Toda, S., Shirataki, Y., Kimura, M., Kido, R., 1994. *Phytochemistry* 36, 579–583.
- Oliveira, A.P., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R.M., Silva, B.M., 2007. Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7926–7930.
- Oliveira, A.P., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R.M., Silva, B.M., 2008. Organic acids composition of *Cydonia oblonga* Miller leaf. *Food Chemistry* 111, 393–399.
- Pokorný, J., 2007. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 629–642.
- Psotová, J., Lasovský, J., Vigar, J., 2003. Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomedical Papers* 147, 147–153.
- Silva, B.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R.M., Ferreira, M.A., 2004. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4405–4712.
- Silva, B.M., Andrade, P.B., Martins, R.C., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R.M., Ferreira, M.A., 2005a. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit characterization using principal component analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 111–122.
- Silva, B.M., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, M.A., Ferreres, F., 2005b. Composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) seeds: phenolics, organic acids and free amino acids. *Natural Products Research* 19, 275–281.
- Silva, B.M., Valentão, P., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2008. Quince (*Cydonia oblonga* Miller): an interesting dietary source of bioactive compounds. In: Papadopoulos, K.N. (Ed.), *Food Chemistry Research Developments*. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 243–266.
- Singh, N., Rajini, P.S., 2008. Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions* 173, 97–104.
- Stewart, A., Mullen, W., Crozier, A., 2005. On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. *Molecular Nutrition and Food Research* 49, 52–60.
- Suwalsky, M., Orellana, P., Avello, M., Villena, F., 2007. Protective effect of Ugni molinae Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology* 45, 130–135.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1–40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telsler, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39, 44–84.
- van Acker, S.A., van Balen, G.P., van den Berg, D.J., Bast, A., van der Vijgh, W.J., 1998. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology* 56, 935–943.

- Wang, C.-K., Lee, W.-H., Peng, C.-H., 1997. Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1185–1188.
- Wang, X., Jia, W., Zhao, A., Wang, X., 2006. Anti-influenza agents from plants and traditional Chinese medicine. *Phytotherapy Research* 20, 335–341.
- Wheeler, D., Wheeler, W., 2004. The medicinal chemistry of tea. *Drug Development Research* 61, 45–65.
- Yildirim, H.T., 2006. Evaluation of colour parameters and antioxidant activities of fruit wines. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 57, 47–63.
- Yildirim, H.T., Oktay, M., Bilaloglu, V., 2001. Antioxidant activity of the leaf of *Cydonia vulgaris*. *Turkish Journal of Medical Sciences* 21, 23–27.
- Zou, C.G., Agar, N.S., Jones, G.L., 2001. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. *Life Sciences* 69, 75–86.



Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes

Ana S. Magalhães^a, Branca M. Silva^{a,b}, José A. Pereira^c, Paula B. Andrade^b,
Patrícia Valentão^b, Márcia Carvalho^{a,d,*}

^a CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, R. Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal

^b REQUIMTE, Serviço de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha, 4050-047 Porto, Portugal

^c CIMO, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

^d REQUIMTE, Serviço de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha, 4050-047 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 January 2009
Accepted 11 March 2009

Keywords:
Cydonia oblonga
Quince
Phenolic compounds
Erythrocyte
Antioxidant activity
Hemolysis

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the phenolic content and evaluate the antioxidant activity of quince (*Cydonia oblonga*) fruit. For this purpose, fruits were separated into pulps, peels and seeds and methanolic extracts were prepared. The phenolic profiles were determined by HPLC/UV and antioxidant properties were studied for their ability to quench the stable free radical 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and to inhibit the 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative hemolysis of human erythrocytes.

The main phenolic compounds were 5-O-caffeoylquinic acid for pulp and peel (57% and 29%, respectively) and stellarin-2 for seed (18%). Total phenolics content was 2.5, 6.3 and 0.4 g/kg of methanolic extract for pulp, peel and seed, respectively. Pulp and peel extracts showed similar DPPH free radical scavenging activities (EC₅₀ of 0.6 and 0.8 mg/ml, respectively), while seed extract presented much lower antioxidant potential (EC₅₀ of 12.2 mg/ml). Under the oxidative action of AAPH, pulp and peel extracts showed significant protection of the erythrocyte membrane from hemolysis, in a time- and concentration-dependent manner. Seed extracts by themselves induced extensive hemolysis. These results indicate higher antioxidant activity for certain parts of quince fruit, namely pulp and peel, that may therefore represent accessible sources of natural antioxidants with potential application in nutritional/pharmaceutical fields, as preventive or therapeutic agents in diseases in which free radicals are implicated.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biomolecules in fruits and vegetables have attracted a great deal of attention mainly concentrated on their role in preventing diseases. Epidemiological studies have consistently shown that there is a clear significant positive association between intake of these natural food products, consumed regularly as part of the Mediterranean diet, and reduced rate of heart disease mortalities, common cancers, and other degenerative diseases, as well as aging (Yáñez et al., 2004; Fattouch et al., 2007; Silva et al., in press). The protection that fruits and vegetables provide against those diseases has been attributed to several antioxidants, especially to antioxidative vitamins, including ascorbic acid (vitamin C), α -tocopherol (vitamin E) and β -carotene (provitamin A) (Cao et al., 1996). Nevertheless, recent studies seem to indicate that (poly)phenolic

substances are the main phytochemicals with antioxidant properties of higher plants (Cao et al., 1996; Silva et al., 2004, in press; Giada and Filho, 2006; Fattouch et al., 2007; Oliveira et al., 2007; Fiorentino et al., 2008).

More than 4000 phenolic compounds (such as phenolic acids, flavonoids or tannins) have been found in vascular plants, where they prevent free radical damage to proteins, carbohydrates, lipids and DNA caused by UV radiation from the sun (Vinson et al., 2005). In human body, these phytochemicals are able to operate as reducing agents, hydrogen donors, free radicals scavengers, and singlet oxygen quenchers and, therefore, as cell saviors (Fattouch et al., 2007). Thus, scientific interest in antioxidants isolated from plant materials, in particular fruits, leaves and seeds, has recently been encouraged in order to ascertain whether the course of oxidative stress related diseases can be altered. Considering the results of recent research, it is expectable that in a near future an adequate value for a "recommended dietary ingestion" of this class of phytochemicals will be established (Giada and Filho, 2006).

Several studies have showed that *Cydonia oblonga* Miller species is an excellent natural source of phenolic acids and flavonoids,

* Corresponding author. Address: CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, R. Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal. Tel.: +351 225074630; fax: +351 225508269.

E-mail address: mcarv@ufp.edu.pt (M. Carvalho).

which are considered potent antioxidants (Silva et al., 2004, in press; Oliveira et al., 2007). In fact, quince fruit is recognized as an important dietary source of health promoting compounds, due to its antioxidant, antimicrobial and antiulcerative properties (Silva et al., 2004, 2008; García-Alonso et al., 2004; Hamauzu et al., 2005, 2006; Yildirim, 2006; Wang et al., 2006; Fattouch et al., 2007; Oliveira et al., 2007; Fiorentino et al., 2006, 2007, 2008). Interest in natural antioxidant sources prompted us to investigate the antioxidant activity of *C. oblonga* fruit phenolics. So, the capacity of methanolic extracts of quince pulp, peel and seed to scavenge the 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical was studied and the phenolics profile determined by HPLC/UV. Additionally, normal human erythrocytes were used to investigate the capability of the methanolic extracts of quince fruit parts to protect erythrocytes against oxidative damage *in vitro*. The erythrocyte was chosen as an *in vitro* model to study the oxidant/antioxidant interaction since its membrane is rich in polyunsaturated fatty acids, which are extremely susceptible to free radical-mediated peroxidation, and is considered to be representative of the plasma membrane in general (Shiva Shankar Reddy et al., 2007). Erythrocyte lipid peroxidation may be involved in normal cell aging and it has been associated with a variety of pathological events (Ko et al., 1997; Sivilotti, 2004). In this study, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was used as the free radical initiator to induce oxidative damage in erythrocytes. Thermal decomposition at physiological temperature of AAPH generates peroxy radicals (ROO[•]) in the aqueous phase (Niki, 1990), which can attack the erythrocyte membrane to induce lipid peroxidation. Since peroxidation of membrane lipids is a free radical chain reaction, the erythrocyte membrane is quickly damaged, leading to hemolysis. As far as we know, this is the first time that antioxidant activity of quince fruit is evaluated by using this last microassay.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The standards were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and from Extrasynthèse (Genay, France). Methanol and formic acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The water was treated in a Milli-Q water purification system

(Millipore, Bedford, MA, USA). 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2. Sample preparation and extraction

Healthy quince fruits were collected in Carrazeda de Ansiães (Northern Portugal). Fruits were separated into pulps, peels and seeds and each part was freeze-dried. Lyophilization was carried out using a Labconco 4.5 apparatus (Kansas City, MO).

For each part of the fruit, methanolic extracts were prepared. Briefly, 0.25 g of lyophilized sample was thoroughly mixed with methanol (3 × 25 mL) at 40 °C. The methanolic extract was filtered, concentrated to dryness under reduced pressure at 40 °C. The extraction efficiency in relation to dry matter was variable as follows: 69%, 62% and 19% for pulp, peel and seed, respectively.

2.3. Identification and quantification of phenolic compounds

Extracts were redissolved in methanol (1 ml) and 20 µl were analyzed using an analytical HPLC unit (Gilson) and a C18 Spherisorb ODS2 column (25.0 × 0.46 cm; 5 µm, particle size) from Waters (Ireland). The solvent system used was a gradient of water-formic acid (19:1) (A) and methanol (B), starting with 5% methanol and installing a gradient to obtain 15% B at 3 min, 25% B at 13 min, 30% B at 25 min, 35% B at 35 min, 45% B at 39 min, 45% B at 42 min, 50% B at 44 min, 55% B at 47 min, 70% B at 50 min, 75% B at 55 min and 80% B at 60 min, at a solvent flow rate of 0.9 mL/min (Oliveira et al., 2007). Detection was achieved with a Gilson Diode Array Detector (DAD). Spectral data from all peaks were accumulated in the range 200–400 nm, and chromatograms were recorded at 350 nm. Chromatographic data was processed by Unipoint[®] System software from Gilson Medical Electronics (Villiers le Bel, France). The compounds in each sample were identified by comparing their retention times and UV–Vis spectra in the 200–400 nm range with the library of spectra previously compiled by the authors (Oliveira et al., 2007).

Quantitative determinations were made by injection of 20 µl of extracts on a HPLC system equipped with UV detector (Agilent 1100 series) set at 350 nm. Chromatographic separation was carried out using a C18 Lichrocart[®] 250-4 column (25.0 × 0.40 cm; 5 µm, particle size) from Merck (Germany) and the same solvent system described above for qualitative analysis. Phenolics quantification was achieved by the absorbance recorded in the chromatograms relative to external standards. 3-O-caffeoylquinic and 3,5-O-dicaffeoylquinic acids were quantified as 5-O-caffeoylquinic acid. Kaempferol-3-O-glycoside, kaempferol-3-O-glucoside and kaempferol glycoside acylated with *p*-coumaric acid were quantified as kaempferol-3-O-rutinoside. Quercetin-3-O-galactoside and quercetin glycosides acylated with *p*-coumaric acid were quantified as quercetin-3-O-rutinoside. Luteolin, apigenin and chrysoeriol derivatives were quantified as luteolin-7-O-glucoside, apigenin-7-O-glucoside and chrysoeriol, respectively. The other compounds were quantified as themselves.

Table 1
Phenolic composition of quince pulp, peel and seed methanolic extract^a.

Phenolic compound	Pulp	Peel	Seed
3-O-caffeoylquinic acid	1.00 ± 0.02	1.28 ± 0.04	0.01 ± 0.00
5-O-caffeoylquinic acid	1.42 ± 0.06	1.84 ± 0.09	0.05 ± 0.00
Lucenin-2	nd	nd	0.03 ± 0.00
Vicenin-2	nd	nd	0.06 ± 0.00
Stellarin-2	nd	nd	0.08 ± 0.00
Isoschaftoside	nd	nd	0.02 ± 0.00
Schaftoside	nd	nd	0.06 ± 0.00
6-C-pentoyl-8-C-glucosyl chrysoeriol	nd	nd	0.03 ± 0.00
6-C-glucosyl-8-C-pentoyl chrysoeriol	nd	nd	0.06 ± 0.00
3,5-O-dicaffeoylquinic acid	0.07 ± 0.00	0.13 ± 0.00	nd
quercetin-3-O-galactoside	nd	0.55 ± 0.01	nd
quercetin-3-O-rutinoside	0.02 ± 0.00	1.50 ± 0.05	nd
kaempferol-3-O-glycoside	nd	0.25 ± 0.00	nd
kaempferol-3-O-glucoside	nd	0.34 ± 0.00	nd
kaempferol-3-O-rutinoside	nd	0.21 ± 0.00	nd
Quercetin glycoside acylated with <i>p</i> -coumaric acid	nd	0.11 ± 0.00	nd
Quercetin glycosides acylated with <i>p</i> -coumaric acid	nd	0.04 ± 0.00	nd
Kaempferol glycoside acylated with <i>p</i> -coumaric acid	nd	0.05 ± 0.00	nd
Σ	2.51	6.30	0.40

Abbreviations:

nd – Not detected.

SD – Standard deviation.

Σ – Sum of the determined phenolics.

^a Values are expressed as mean ± standard deviation of three assays for each sample (g/kg of methanolic extract).

2.4. Determination of DPPH radical scavenging activity

The antiradical activity of ascorbic acid, 5-O-caffeoylquinic acid and methanolic extracts was determined spectrophotometrically, by monitoring the disappearance of DPPH, according to a previously described procedure (Silva et al., 2004). For each extract, a dilution series (five different concentrations) was prepared in a 96 well plate. The reaction mixtures in the sample wells consisted of 25 μ L of

extract and 200 μ L of 150 μ M DPPH (dissolved in methanol). The reaction was conducted at room temperature, until no variation of the absorbance was observed. The extract concentration providing 50% of radical scavenging activity (EC_{50}) was calculated graphically by plotting the percentage of DPPH scavenging activity as a function of extract concentration. Ascorbic and 5-O-caffeoylquinic acids were used as reference compounds. Four experiments were performed in triplicate.

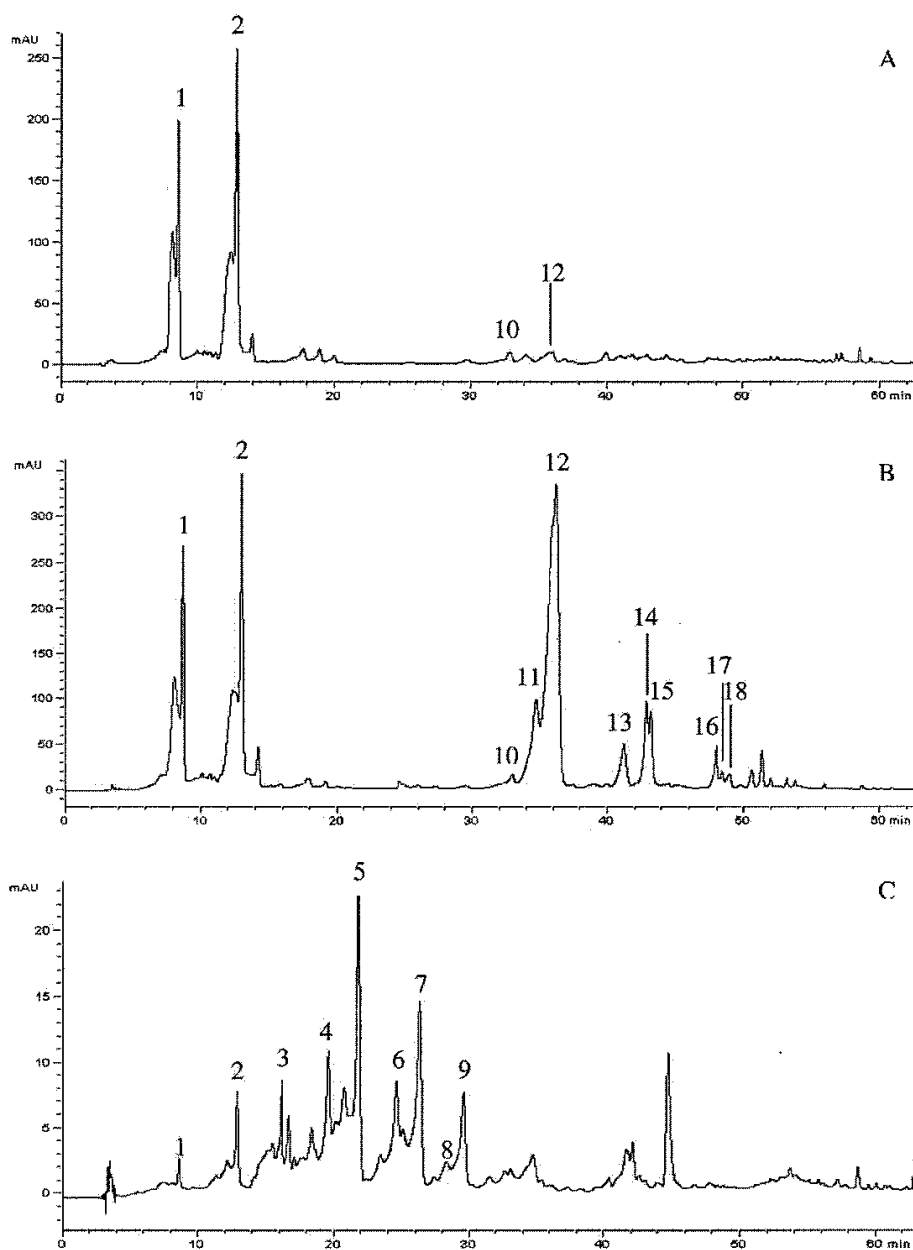


Fig. 1. HPLC phenolic profile of quince pulp (A), peel (B) and seed (C) methanolic extracts. Detection at 350 nm. Peaks: (1) 3-O-caffeoylquinic acid, (2) 5-O-caffeoylquinic acid, (3) lucenin-2, (4) vicenin-2, (5) stellarin-2, (6) isoschaftoside, (7) schaftoside, (8) 6-C-pentosyl-8-C-glucoside of chrysoeriol, (9) 6-C-glucosyl-8-C-pentoside of chrysoeriol, (10) 3,5-O-dicafeoylquinic acid, (11) quercetin-3-O-galactoside, (12) quercetin-3-O-rutinoside, (13) kaempferol-3-O-glycoside, (14) kaempferol-3-O-glucoside, (15) kaempferol-3-O-rutinoside, (16 and 17) quercetin glycosides acylated with *p*-coumaric acid and (18) kaempferol glycoside acylated with *p*-coumaric acid.

2.5. AAPH-induced hemolysis assay

Blood (5–10 ml) was obtained from healthy consenting donors by venipuncture and collected into tubes containing citrate as anticoagulant. Samples were immediately centrifuged at 1500 rpm for 10 min at 4 °C and plasma and buffy coat were then carefully discharged. Erythrocytes were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4), and then resuspended using the same buffer to the desired hematocrit level. In order to induce free radical chain oxidation in erythrocytes, aqueous peroxy radicals were generated by thermal decomposition of AAPH (dissolved in PBS; final concentration 50 mM). To study the protective effects of the methanolic extracts against AAPH-induced hemolysis, an erythrocyte suspension at 2% hematocrit was preincubated with the methanolic fractions of quince pulp, peel and seed (dissolved in PBS; final concentrations 250–2000 µg/ml) at 37 °C for 30 min, followed by incubation with and without 50 mM AAPH. This reaction mixture was shaken gently while being incubated for 4 h at 37 °C. In all experiments, a negative control (erythrocytes in PBS), as well as extract controls (erythrocytes in PBS with each extract) were used.

The extent of hemolysis was determined spectrophotometrically as described previously (Ko et al., 1997). Briefly, aliquots of the reaction mixture were taken out at each hour of the 4 h of incubation, diluted with saline, and centrifuged at 4000 rpm for 10 min to separate the erythrocytes. The percentage of hemolysis was determined by measuring the absorbance of the supernatant (A) at 545 nm and compared with that of complete hemolysis (B) by treating an aliquot with the same volume of the reaction mixture with distilled water. The hemolysis percentage was calculated using the formula: $A/B \times 100$. The extract concentration providing 50% inhibition (IC_{50}) at time 3 h was also calculated from dose-response curve obtained by plotting the percentage of hemolysis inhibition versus the extract concentration. Six independent experiments were used for these calculations.

2.6. Statistical analysis

Statistic analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 16.0) for Windows. Multiple comparisons between groups were performed by one-way ANOVA supplemented with Tukey's HSD post hoc test. Significance was accepted at p lower than 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Phenolic profile determination

Table 1 shows that methanolic extracts of quince fruit parts contains significant amounts of polyphenolic compounds. Pulp extract presented a chemical profile composed by four phenolic compounds (Fig. 1A and Table 1): 3-*O*- and 5-*O*-caffeoylquinic acids, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, and quercetin-3-*O*-rutinoside (rutin). Caffeoylquinic acids were the major phenolic compounds (99%) and the most abundant was 5-*O*-caffeoylquinic acid (57%). In previous studies, 4-*O*-caffeoylquinic acid was also found in quince pulps (Silva et al., 2004, 2005a), but in small amounts.

Peel extract contained a phenolic profile composed by eleven compounds (Fig. 1B and Table 1): the same which were found in pulp and quercetin-3-*O*-galactoside, a kaempferol-3-*O*-glycoside, kaempferol-3-*O*-glucoside, kaempferol-3-*O*-rutinoside, two quercetin glycosides acylated with *p*-coumaric acid and a kaempferol glycoside acylated with *p*-coumaric acid. 3-*O*- and 5-*O*-caffeoylquinic acid and quercetin-3-*O*-rutinoside were the main phenolic compounds (20%, 29% and 24%, respectively). Silva et al. (2004 and 2005a) also reported the presence of 4-*O*-caffeoylquinic acid and another kaempferol glycoside acylated with *p*-coumaric acid in quince peels, but in low concentrations.

Seeds extract was characterized by the presence of nine phenolics (Fig. 1C and Table 1): 3-*O*- and 5-*O*-caffeoylquinic acids, lucenin-2, vicenin-2, stellerin-2, isoschaftoside, schaftoside, a 6-*C*-pentosyl-8-*C*-glucosyl chrysoeriol and a 6-*C*-glucosyl-8-*C*-pentosyl chrysoeriol. *C*-glycosil flavones were the major phenolic compounds (85%) and the most abundant was stellerin-2 (18%). In previous studies, 4-*O*-caffeoylquinic and 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acids were also detected in quince seeds (Silva et al., 2004, 2005b), although in small levels.

Total phenolics content decreased in the following order: peel > pulp >> seed (6.3, 2.5 and 0.4 g / kg of methanolic extract, respectively).

3.2. DPPH radical scavenging activity

Fig. 2 shows that methanolic extracts of all quince fruit parts presented a strong concentration-dependent antiradical activity. The scavenging ability against DPPH radicals was high even at low extract concentrations, especially for pulp and peel extracts. EC_{50} values obtained for quince pulp, peel and seed were 0.6, 0.8 and 12.2 mg of methanolic extract/ml, respectively. These results evidence that pulp and peel extracts have similar antiradical activities but greatly higher than that of seed extracts. Considering the lowest total phenolic content of seed extract, its higher EC_{50} value (12.2 mg of methanolic extract/ml) was expected. Nevertheless, in a previous work, our research group has found an EC_{50} value of 2 mg of seed methanolic extract/ml (Silva et al., 2004). This discrepancy may be due to natural variability, different maturity stages or edapho-climatic conditions.

Although total phenolic content of pulp and peel extracts were different (2.5 and 6.3 g/kg of methanolic extract, respectively), total caffeoylquinic acids content was closer (2.5 and 3.2 g/kg of methanolic extract, respectively). As suggested by Silva et al. (2004 and 2008), caffeic acid derivatives seem to be the main responsible for the antioxidant activity of quince fruit. In fact, our results indicate that the antioxidant activity of quince pulp, peel and seed methanolic extracts is statistically correlated with total phenolic content ($r = 0.913$; $p < 0.05$) and especially with total caffeoylquinic acids content ($r = 0.989$; $p < 0.05$). Noteworthy, in our previous study (Silva et al., 2004) seed methanolic extract

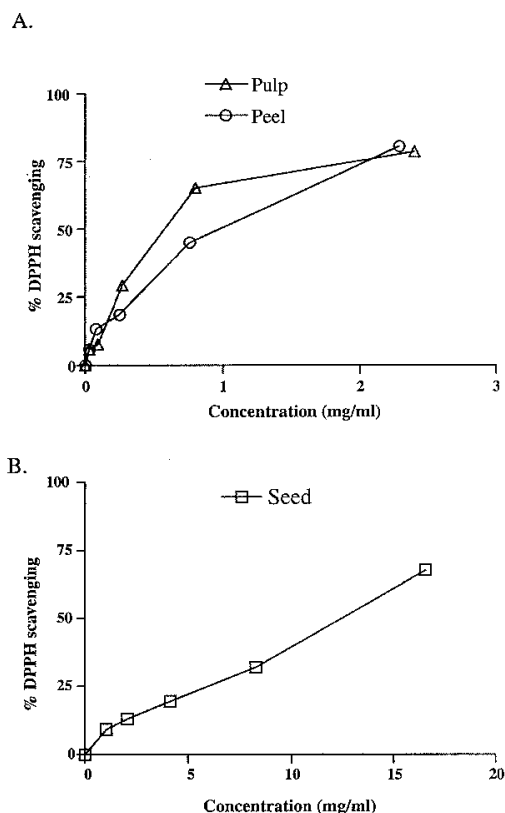


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of quince (A) pulp, peel and (B) seed methanolic extracts.

presented a lower EC_{50} value (2 mg of extract/ml against 12.2 mg of extract/ml) but a higher total caffeoylquinic acids content (0.14 g/kg of extract against 0.06 g/kg of extract), which may explain the observed differences of antioxidant activities.

In this study, reference antioxidants and extracts showed different orders of activity. The EC_{50} values of antioxidants showed that ascorbic acid had higher antiradical activity than 5-*O*-caffeoylquinic acid (8.1 and 15.1 $\mu\text{g/ml}$, respectively). The scavenging activities of all fruit parts (pulp, peel and seed) extracts were lower than those of ascorbic acid or 5-*O*-caffeoylquinic acid. Noteworthy, this assay was carried out using whole extracts since it could be more beneficial than individual compounds. According to Liu (2003), additive and synergistic effects of phytochemicals in fruits and vegetables are responsible for their potent bioactive properties and the benefit of a diet rich in fruits and vegetables is attributed to the complex mixture of phytochemicals present in whole foods. In fact, the total content of caffeoylquinic acids presented in these concentrated pulp, peel and seed extracts is about 1.5, 2.6 and 0.8 $\mu\text{g/ml}$, which is much lower than the EC_{50} value of 5-*O*-caffeoylquinic acid standard solution (15.1 $\mu\text{g/ml}$). This may indicate that interactions between different antioxidant components, for example between phenolics and/or between them and organic acids, are likely important in terms of the overall antioxidant activity of each fruit part.

3.3. Inhibition of erythrocyte hemolysis mediated by peroxy free radicals

The *in vitro* oxidative hemolysis of human erythrocytes was used here as a model to study the free radical-induced damage of

biological membranes and the protective effect of quince fruit methanolic extracts. When the erythrocytes were incubated with extracts of quince pulp or peel alone (without AAPH) at the highest concentration tested (2000 $\mu\text{g/ml}$), hemolysis was maintained at a background level similar to that in the control samples (AAPH untreated samples) (data not shown). The same was not observed with the seed extract. Even the lowest concentration studied (250 $\mu\text{g/ml}$) induced significant hemolysis when compared to control samples (data not shown). We also performed additional experiments using seed extract concentrations in which hemolysis was maintained at a background level similar to that in control, but those lower concentrations (12.5–50 $\mu\text{g/ml}$) provided no protection against AAPH-induced oxidative hemolysis (data not shown). This result is in accordance with the DPPH assay since EC_{50} of seed extract was found to be much higher than that of pulp or peel extracts. Hemolytic activity of seeds extract may be explained by the presence of saponins in the erythrocyte suspension, since these compounds are also extracted by methanol and recognized by their hemolytic activity and foaming properties (Vincken et al., 2007). In our experiments, durable foam was observed when tubes of seed extracts were shaken. Nonetheless, as far as we know, the chemical structures of quince seed saponins have not yet been identified.

Fig. 3 shows the effects of quince pulp and peel methanolic extracts (250–2000 $\mu\text{g/ml}$) on human erythrocytes exposed to the water-soluble radical initiator AAPH. Erythrocytes incubated at 37 °C as a 2% suspension in PBS were stable with little hemolysis observed within 4 h (5.8 \pm 0.6%). When AAPH was added to the suspension of erythrocytes, hemolysis induction was time-dependent until 3 h. The hemolysis is lagged, indicating that endogenous antioxidants in the erythrocytes, namely glutathione, tocopherol,

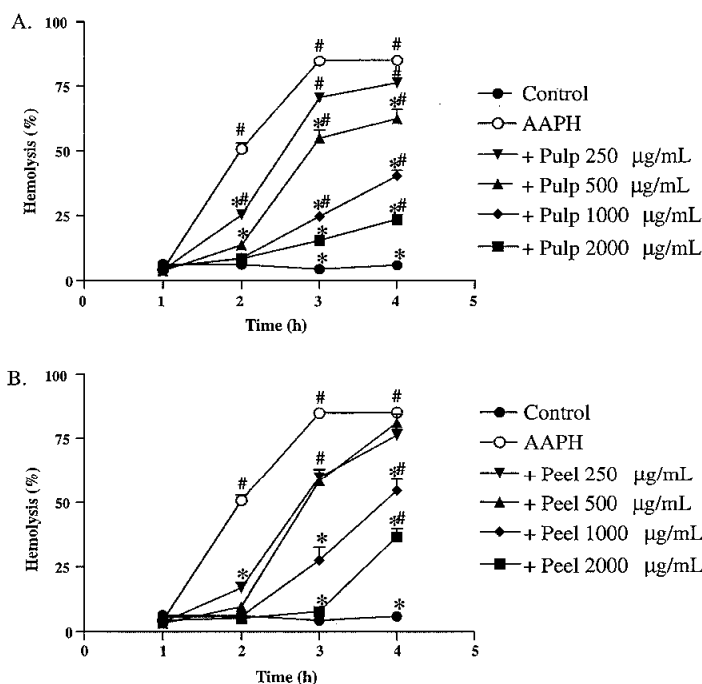


Fig. 3. Inhibition of AAPH-induced erythrocyte hemolysis by quince (A) pulp and (B) peel methanolic extracts. Erythrocyte suspension at 2% hematocrit was preincubated with methanolic extracts of quince pulp and peel at the indicated concentrations for 30 min at 37 °C. The cell suspension was then incubated with 50 mM AAPH for 4 h at 37 °C. In all experiments, control erythrocytes (without any treatment) and an AAPH-treated erythrocytes (with 50 mM AAPH) were used. Values are expressed as the mean \pm SEM of six independent experiments. * $p < 0.05$, as compared with AAPH at respective time; # $p < 0.05$, as compared with control at respective time.

ascorbate and enzymes such as catalase and superoxide dismutase, can efficiently quench radicals to protect them against free radical-induced hemolysis, as described previously (Zou et al., 2001). When production of peroxy radicals (and other reactive species formed throughout the free radical chain propagation) overcomes the numerous antioxidant barriers of defence, an "oxidative stress" condition will develop, inducing oxidative damage on erythrocyte constituents, namely on membrane and haemoglobin, which may lead ultimately to hemolysis (Cimen, 2008). It is clearly evident from Fig. 3 that both pulp and peel extracts significantly protected the erythrocyte membrane from hemolysis induced by AAPH in a concentration- and time-dependent manner. Moreover, a correlation can be demonstrated between lag time and extract concentration. The IC₅₀ value calculated for pulp extract after 3 h of incubation was 652 µg/ml, roughly the same as that of peel extract (695 µg/ml). The obtained results are in agreement with DPPH free radical scavenging activities determined for each quince fruit part.

It is known that polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress both *in vitro* and *in vivo* (Youdim et al., 2000). These compounds contain one or more aromatic hydroxyl groups that actively scavenge free radicals and are responsible for the antioxidant activity. So, phenolic antioxidant compounds of quince fruit (pulp and peel) present in the erythrocyte suspension may quench the chain propagating peroxy radicals in the aqueous phase to stop the peroxidation, hence inhibiting hemolysis. In fact, the antioxidant activities of chlorogenic acid and related catechols have already been studied by both cell free systems (such as DPPH microassay) and in cell models (as erythrocytes) (Lekse et al., 2001; Psotová et al., 2003). Those compounds always exhibited strong antiradical activities and inhibitory effects on the hemolysis. However, the molecular mechanisms of the antioxidant action of phenolic compounds have not been fully elucidated and are still a matter of considerable debate. Recent studies have suggested that the ability of certain polyphenols to partition in cell membranes and the resulting restriction of their fluidity could sterically hinder diffusion of free radicals and thereby decrease the kinetics of free radical reactions (Chaudhuri et al., 2007; Suwalsky et al., 2007; Singh and Rajini, 2008). However, the putative interaction of quince fruit phenolic compounds with the erythrocyte membrane bilayer was not yet studied and thus warrants future investigation.

In conclusion, our results indicate that quince fruit extracts, particularly pulp and peel, suppressed radical-induced oxidative hemolysis of erythrocytes *in vitro*. As far as we know, this is the first report concerning the antihemolytic activity of this fruit. The work herein indicates a high potential of application for these extracts in food and drug products, with remarkable benefits for human health.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Cao, G., Sofic, E., Prior, R., 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3426–3431.
- Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., Sengupta, P.K., 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* 41, 42–48.
- Cimen, M.Y., 2008. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta* 390, 1–11.
- Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C.I.G., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N., Cabras, P., 2007. Antimicrobial activity of tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *J. Agric. Food Chem.* 55, 963–969.
- Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Mastellone, C., Piccolella, S., Monaco, P., 2007. Isolation, structure elucidation, and evaluation of cydonioside A, an unusual terpenoid from the fruits of *Cydonia vulgaris*. *Chem. Biochem. J.* 4, 973–979.
- Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Mastellone, C., Piscopo, V., Caputo, R., Monaco, P., 2008. Isolation and structure elucidation of antioxidant polyphenols from quince (*Cydonia vulgaris*) peels. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2660–2667.
- Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Mastellone, C., Piscopo, V., Monaco, P., 2006. Spectroscopic identification and antioxidant activity of glucosylated carotenoid metabolites from *Cydonia vulgaris* fruits. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9592–9597.
- García-Alonso, M., Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem.* 84, 13–18.
- Giada, M.L., Filho, J.M., 2006. The importance of dietary phenolic compounds in the promotion of human health. *Biol. Health Sci.* 12, 7–15.
- Hamauzu, Y., Inno, T., Kume, C., Irie, M., Hiramatsu, K., 2006. Antioxidant and antiulcerative properties of phenolics from Chinese quince, quince, and apple fruits. *J. Agric. Food Chem.* 54, 765–772.
- Hamauzu, Y., Yasui, H., Inno, T., Kume, C., Omanyuda, M., 2005. Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits. *J. Agric. Food Chem.* 53, 928–934.
- Ko, F.N., Hsiao, G., Kuo, Y.H., 1997. Protection of oxidative hemolysis by demethylidiosougenol in normal and beta-thalassemic red blood cells. *Free Rad. Biol. Med.* 22, 215–222.
- Lekse, J.M., Xia, L., Stark, J., Morrow, J.D., May, J.M., 2001. Plant catechols prevent lipid peroxidation in human plasma and erythrocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 226, 89–95.
- Liu, R.H., 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 517–520.
- Niki, E., 1990. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods Enzymol.* 186, 100–108.
- Oliveira, A.P., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R.M., Silva, B.M., 2007. Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7926–7930.
- Psotová, J., Lasovský, J., Vácar, J., 2003. Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed. Papers* 147, 147–153.
- Shiva Shankar Reddy, C.S., Subramanyam, M.V., Vani, R., Asha Devi, S., 2007. *In vitro* models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements. *Toxicol. In Vitro* 21, 1355–1364.
- Silva, B.M., Andrade, P.B., Martins, R.C., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R.M., Ferreira, M.A., 2005a. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit characterization using principal component analysis. *J. Agric. Food Chem.* 53, 111–122.
- Silva, B.M., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, M.A., Ferreres, F., 2005b. Composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) seeds: phenolics, organic acids and free amino acids. *Nat. Prod. Res.* 19, 275–281.
- Silva, B.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R.M., Ferreira, M.A., 2004. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4405–4712.
- Silva, B.M., Valentão, P., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2008. Quince (*Cydonia oblonga* Miller): an interesting dietary source of bioactive compounds. In: Papadopoulos, K.N. (Ed.), *Food Chemistry Research Developments*. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 243–266.
- Singh, N., Rajini, P.S., 2008. Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Chem.-Biol. Interactions* 173, 97–104.
- Sivillotti, M.L., 2004. Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte. *Toxicol. Rev.* 23, 169–188.
- Suwalsky, M., Orellana, P., Avello, M., Villena, F., 2007. Protective effect of Ugni molinae Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food Chem. Toxicol.* 45, 130–135.
- Vincken, J.-P., Heng, L., Groot, A., Gruppen, H., 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68, 275–297.
- Vinson, J.A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., Proch, J., 2005. Dried fruits: excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *J. Am. Col. Nutr.* 24, 44–50.
- Wang, X., Jia, W., Zhao, A., Wang, X., 2006. Anti-influenza agents from plants and traditional Chinese medicine. *Phytother. Res.* 20, 335–341.
- Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Catillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Teruel, J., 2004. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nut. Cancer* 49, 191–199.
- Yildirim, H.T., 2006. Evaluation of colour parameters and antioxidant activities of fruit wines. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 57, 47–63.
- Youdim, K.A., Shukitt-Hale, B., MacKinnon, S., Kalt, W., Joseph, J.A., 2000. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: *in vitro* and *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 1523, 117–122.
- Zou, C.G., Agar, N.S., Jones, G.L., 2001. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. *Life Sci.* 69, 75–86.

VI. Considerações finais e conclusões

Os compostos fenólicos são fitoquímicos com propriedades antioxidantes amplamente distribuídos no Reino Vegetal. O seu consumo tem sido associado ao efeito protector cardiovascular e anticancerígeno de certas dietas. O perfil fenólico da folha e fruto de *C. oblonga* foi determinado neste trabalho por HPLC/UV.

O extracto metanólico da folha de *C. oblonga* revelou conter uma quantidade significativa de compostos polifenólicos. Este extracto apresentava um perfil químico composto por seis compostos fenólicos: os ácidos 3-*O*- e 5-*O*-cafeoilquínicos, o ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico, a quercetina-3-*O*-rutinósido (rutina), o campferol-3-*O*-glucósido e o campferol-3-*O*-rutinósido. Os ácidos cafeoilquínicos foram os compostos fenólicos encontrados em maior quantidade e o mais abundante foi o ácido 5-*O*-cafeoilquínico, seguido do ácido 3-*O*-cafeoilquínico (45 e 22%, respectivamente). Em estudos realizados previamente o ácido 4-*O*-cafeoilquínico, a quercetina-3-*O*-galactósido e o campferol-3-*O*-glucósido foram também encontrados nas folhas de marmeleiro (Oliveira et al., 2007a), mas em menor quantidade.

Os extractos metanólicos da polpa, casca e semente de *C. oblonga* também exibiram quantidades significativas de compostos polifenólicos. O extracto de polpa apresentou um perfil químico constituído por quatro compostos fenólicos: ácidos 3-*O*- e 5-*O*-cafeoilquínicos, ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico e quercetina-3-*O*-rutinósido (rutina). Os ácidos cafeoilquínicos apresentaram-se como os constituintes em maior percentagem (90%), sendo o composto maioritário o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (57%).

Os extractos metanólicos da casca apresentaram um perfil fenólico constituído por onze compostos, os mesmos encontrados na polpa acrescidos da 3-*O*-galactosilquercetina, o 3-*O*-glicosilcampferol, o 3-*O*-rutinosilcampferol e três compostos parcialmente identificados (um glicósido do campferol acilado com o ácido *p*-cumárico e dois glicósidos da quercetina aciladas com ácido *p*-cumárico). Os ácidos 3-*O*- e 5-*O*-cafeoilquínicos e a quercetina-3-*O*-rutinósido foram os constituintes fenólicos maioritários (20, 29 e 24%, respectivamente) deste extracto metanólico.

Os extractos metanólicos da semente foram caracterizados pela presença de nove compostos fenólicos: ácidos 3-*O*- e 5-*O*-cafeoilquínicos, 2-lucenina, 2-vicenina, 2-estelarina,

isoshaftósido, 6-*C*-pentosil-8-*C*-glucosil crisoeriol e 6-*C*-glucosil-8-*C*-pentosil crisoeriol. O constituinte fenólico maioritário dos extractos de semente foram as flavonas *C*-glicosiladas (85%) e o mais abundante a 2-estelarina (18%). Em estudos já realizados, os ácidos 4-*O*-cafeoilquínico e 3,5-*O*-dicafeoilquínico também foram detectados, embora em quantidades diminutas (Silva et al., 2004, 2005).

Tendo em consideração o conteúdo fenólico das várias partes do fruto do marmeleiro, poder-se-ia ordenar pela seguinte ordem decrescente de teor fenólico total: casca > polpa > semente (6,3, 2,5 e 0,4 g/Kg de extracto metanólico, respectivamente).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a espécie *C. oblonga* representa uma excelente fonte de compostos fenólicos, sendo de prever que a mesma tenha um considerável potencial anti-radicalar, podendo intervir na prevenção de doenças nas quais os radicais livres estão envolvidos. O eritrócito foi utilizado neste trabalho como modelo celular para o estudo *in vitro* dos efeitos dos radicais livres nas membranas biológicas, visto a membrana do eritrócito ser rica em ácidos gordos poliinsaturados, os quais são muito susceptíveis à peroxidação lipídica mediada por radicais livres.

Os azocompostos têm sido usados para estudar o mecanismo de stresse oxidativo em eritrócitos. O AAPH foi utilizado neste estudo como gerador de radicais peróxido (ROO[•]), os quais atacam a membrana eritrocitária causando várias alterações oxidativas em lipídios e proteínas presentes (Sato et al., 1995; Lenfant et al., 2000). Os eritrócitos humanos foram incubados com os extractos metanólicos da folha, casca, polpa e semente de *C. oblonga* na presença e ausência de AAPH 50 mM. O grupo controlo (suspensão eritrocitária em tampão fosfato sem adição de AAPH) incubada a 37°C manteve-se estável, com uma hemólise reduzida, ao longo das quatro horas de incubação. Quando se adicionou o AAPH à suspensão eritrocitária, a indução de hemólise passou a ser proporcional ao tempo de ensaio decorrido. O início da hemólise induzida pelo AAPH foi retardado, indicando que as defesas antioxidantes do eritrócito, nomeadamente a glutatona, vitamina E, ácido L-ascórbico e enzimas como a catalase e a superóxido dismutase, são capazes de sequestrar os radicais livres, conferindo protecção contra estas espécies (Zou et al., 2001).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os extractos metanólicos de folha de marmeleiro, bem como os extractos de polpa e casca de marmeleiro protegem significativamente a membrana dos eritrócitos das lesões oxidativas induzidas pelo AAPH, de um modo dependente da concentração e do tempo de incubação. Dada a reconhecida actividade antioxidante das folhas de chá verde (*Camellia sinensis*), a actividade anti-hemolítica da folha de marmeleiro foi comparada com a do chá verde, tendo-se verificado um efeito similar (IC_{50} de 30,7 e 24,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, $P > 0.05$). O valor de IC_{50} calculado para o extracto de polpa após três horas de incubação foi de 652 $\mu\text{g/mL}$, muito semelhante ao obtido para o extracto de casca (695 $\mu\text{g/mL}$). Porém, não foi o observado para os extractos de sementes, em que mesmo a concentração mais baixa estudada (250 $\mu\text{g/mL}$) induziu uma hemólise considerável quando comparada ao grupo controlo. Quando se experimentaram concentrações mais baixas (12,5-50 $\mu\text{g/mL}$) verificou-se que a hemólise descia para valores semelhantes aos encontrados no controlo, mas estas concentrações já não conferiam protecção contra a hemólise induzida pelo AAPH. A actividade hemolítica das sementes de marmeleiro pode ser explicada pela presença de saponinas, uma vez que estes compostos também são extraídos pelo metanol e apresentam reconhecidas actividades hemolíticas (Vincken et al., 2007).

As catequinas do chá verde são reconhecidas sequestradoras de radicais livres (Nanjo et al., 1996), protegendo desta forma os eritrócitos da indução oxidativa do AAPH. De igual forma, os compostos fenólicos antioxidantes da espécie *C. oblonga* presentes na suspensão eritrocitária poderão ter sequestrado os radicais peroxilo na fase aquosa, interrompendo desta forma a propagação em cadeia dos radicais peroxilo e evitando o ataque destes às membranas dos eritrócitos, ricas em ácidos gordos poliinsaturados, e com isto inibindo a peroxidação lipídica e consequente hemólise. Esta actividade antioxidante das folhas e fruto de marmeleiro pode não se dever apenas aos compostos fenólicos, mas ao resultado de diferentes fitoquímicos presentes que poderão ter efeito aditivo ou sinérgico.

Em conclusão, os nossos resultados mostram que os extractos metanólicos da folha, casca e polpa de *C. oblonga* protegem os eritrócitos da lesão oxidativa induzida por radicais livres, o que sugere a sua eventual aplicação como adjuvantes na terapêutica de diversas situações patológicas em que os radicais livres estão implicados, bem como na respectiva prevenção.

VII. Bibliografia

Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller na danificação oxidativa em eritrócitos humanos

Acworth, I. N., McCabe, D. R., e Maher, T. J. (1997). The analysis of free radicals, their reaction products, and antioxidants. *In*: Baskin, S. I. and Salem, H. (Ed.). *Oxidants, Antioxidants, and free radicals*. Taylor & Francis, pp. 23-77.

Aherne S.A., O'Brien N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18, pp. 75-81.

Arora A, Nair MG, Strasburg GM. (1998) Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free radical biology and medicine* 24, pp. 1355-1363.

Barreiros, A. L. B. S., David J. M. e David J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reactivas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29, pp. 113-123.

Begum AN., Terao J. (2002). Protective effect of alpha-tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66, pp. 398-403.

Betigeri, S., Thakur, A. e Raghavan, K. (2005). Use of 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride as a reagent tool for evaluation of oxidative stability of drugs. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 276, pp. 205–210.

Bianchi, M. L. P e Antunes, L. M. G. (1999) Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, Campinas, 12, pp. 123-130.

Biswas, S., Bhattacharyya, J. e Dutta, A. G. (2005). Oxidant induced injury of erythrocyte - Role of green tea leaf and ascorbic acid. *Pharmaceutical Research*. 22, pp. 205-210.

Borse, B. B., Kumar, H. V. e Rao, L. J. M. (2007). Radical scavenging conserves from unused fresh green tea leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 1750-1754.

Brenna O.V., Pagliarini E.(2001). Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, pp. 4841-4844.

Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C. e Rice-Evans, C. A. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, 330, pp. 1173-1178.

Cai, Y-J., Ma, L-P., Hou, L-F., Zhou, B., Yang, L. and Liu, Z-L. (2002). Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 120, 109-117.

Cerutti, P., Ghosh, R., Oya, Y., Amstad, P. (1994). The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environmental health perspectives*, 102, pp. 123-129.

Chan AC, Chow CK, Chiu D. (1999). Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 222, pp. 274-282.

Croft, K. D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, pp. 435-442.

Cuvelier, M. E., Richard, H. e Berset, C (1992). Comparison of antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 56, pp. 324-235.

Dacie, J. e Lewis, S. M. (1995). Practical haematology. 8. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 453p.

Dai, F., Miao, Q., Zhou, B., Yang, L. e Liu, Z-L. (2006) Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Sciences* 78, 2488-2493.

de Zwart, L. L., Meerman, J. H. N., Commandeur, J. N. M., Vermeulen, N. P. E. (1999) Biomarkers of free radical damage - markers for atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, pp. 202-226.

Decker, E.A. (1997). Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews* 55, pp. 396-398.

Degáspari, C.H., Waszczyński, N. (2004). Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, 5, pp. 33-40.

Dreosti IE., Wargovich MJ., Yang CS. (1997). Inhibition of carcinogenesis by tea: the evidence from experimental studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, pp. 761-770.

Dunlap, W., Llewellyn, L., Doyle, J. e Yamamoto, Y. (2003). A microtiter plate assay for screening antioxidant activity in extracts of marine organisms. *Marine Biotechnology*, 5, pp. 294-301.

Eiserich, J. P., Cross, C. E., Jones, A. D., Halliwell B, Vliet, A. V. (1996). Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *Journal of Biological Chemistry*, 271, pp. 19199-19208.

Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D., Comporti M. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*, 416, pp. 123-129.

Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller na danificação oxidativa em eritrócitos humanos

Ferrali M., Signorini C., Ciccoli L., Comporti M. (1992). Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. *Biochemical Journal*, 285, pp. 295-301.

Fotsis T., Pepper M.S., Aktas E., Breit S., Rasku S., et al. (1997) Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Research* 57, pp. 2916-2921.

Fukumoto, L. R., and G. Mazza. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pp. 3597-3604.

Griffith O.W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free radical biology and medicine* 27, pp. 922-935.

Grinberg, L. N., Samuni, A. (1994). Nitroxide stable radical prevents primaquine-induced lysis of red blood cell. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1201, pp. 284-288.

Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source biochemistry and role in human disease. *American Journal of Medicine*, 91, pp. 14S-22S.

Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *In: Packer, L. and Glazer A.N. (Ed.) Methods in Enzymology*. 186, pp. 1-85.

Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, pp. 125-126.

Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 3rd Edition, Cap.9, pP. 617-783.

Halliwell, B., Clement, M. V., Long, H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*. 486, pp.10-13.

Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller na danificação oxidativa em eritrócitos humanos

Hanasaki, Y., Ogawa, S. e Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16, pp.845-850.

Hartman, P.E. e Shankel, D.M. (1990) Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 15, pp.145-182.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition Biochemistry* 13: 572-584.

Hopia, A., and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. *JAACS* 76: 139-144.

Kaul, N., Siveski-Iliskovic, N., Hill, M., Slezak, J. & Singal, P.K. (1993). Free radicals and heart. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 30, pp. 55-67.

Klaassen, C.D. (2001). *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of poisons*. United States of America, McGraw-Hill.

Krukoski, D.W. (2006). Ação antioxidante do ácido L-ascórbico e desferoxamina em eritrócitos humanos isolados submetidos a sobrecarga oxidativa por terc-butilhidroperóxido. Tese de Mestrado disponível em http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/7049/1/Tese_VD_pronta.pdf.

Lenfant, F., Lahet, J.J., Vergely, C., Volot, F., Freysz, M., Rochette, L. (2000). Lidocaine inhibits potassium efflux and hemolysis in erythrocytes during oxidative stress in vitro. *General Pharmacology*, 34, pp. 193-199.

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 186, pp. 464-478.

Liao, K. L. e Yin, M. C. (2000). Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pp. 2266-2270.

Liebler, D. C. e Reed, D. J. (1997). Free-radical defense and repair mechanisms. *In*: Wallace, K. B. (Ed.). *Free Radical Toxicology*. Taylor & Francis, pp. 141-173.

Lii, C. K., Hung, C. N. (1997). Protein thiol modifications of human red blood cells treated with t-butyl hydroperoxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336, pp. 147-156.

Ma, L. P., Liu, Z. Q., Zhou, B., Yang, L. e Liu, Z.-L. (2000). Inhibition of free radical induced oxidative hemolysis of red blood cells by green tea polyphenols. *Chinese Science Bulletin*, 45, pp. 2052-2056.

May, J.M. (1999). Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *FASEB Journal*, 13, pp. 995-1006.

May, J.M., Qu, Z.C. e Mendiratta, S. (1998). Protection and recycling of alpha-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 349, pp. 281-289.

Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. e Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. New York, 17, pp. 235-248.

Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller na danificação oxidativa em eritrócitos humanos

Middleton, J. R. E., Kandaswami, C., Theoharides, C. T. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews* 52, pp. 673-751.

Myers, C. R. (1997). Subcellular sites of xenobiotic-induced free-radical generation. In: Wallace, K. B. (Ed.). *Free Radical Toxicology*. Taylor & Francis, pp. 25-41.

Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., Hara, Y. (1996). Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free radical biology and medicine*, 21, pp.895-902.

Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp. 1453-1459.

Nijveldt, R. J., Nood, E. V., van Hoorn, D. F. C., Boelens, P. G., Norren, K. V., van Leeuwen, P. A. M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418-425.

Nordberg J. e Arnér E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 31, pp. 1287-1312.

Oliveira, A.P., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R.M., Silva, B.M. (2007a). Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7926-7930.

Oliveira, A.P., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R.M., Silva, B.M. (2008) Organic acids composition of *Cydonia oblonga* Miller leaf. *Food Chemistry*, 111, 393-399.

Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller na danificação oxidativa em eritrócitos humanos

Oliveira, A.P., Silva, B.M. (2007b). Marmelo (*Cydonia oblonga* Miller): fonte de compostos biologicamente activos. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa*, 4, 76-86.

Payá, M., Halliwell, B. e Hoult J. R. S. (1992). Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochemical Pharmacology* 44, pp. 205-214.

Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, pp. 1035-1042.

Pool-Zobel B.L., Bub A., Müller H., Wollowski I. e Rechkemmer G. (1997). Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis* 18, pp. 1847-1850.

Poulsen HE, Prieme H, Loft S. (1998). Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European journal of cancer prevention* 7, pp. 9-16.

Rice-Evans C, Baysal E, Pashby DP, Hochstein P (1985). T-butyl hydroperoxide-induced perturbations of human erythrocytes as a model for oxidant stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 815, pp. 426-432.

Rice-Evans, C. A. e Miller, N.J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24, pp. 790-795.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20: 933-956.

Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller na danificação oxidativa em eritrócitos humanos

Rice-Evans, C.A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B. (1995). The relative anti-oxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, pp.375-388.

Richter, C. (1997). Free-radical mediated DNA oxidation. In: Wallace, K. B. (Ed.). *Free Radical Toxicology*. Taylor & Francis, pp. 89-113.

Salinas, A. E., Wong, M. G. (1999). Glutathione S-transferases-a review. *Current Medicine Chemistry*, 6, pp. 279-309.

Sandhu, I.S., Ware, K., Grisham, M.B. (1992). Peroxyl radical-mediated hemolysis: role of lipid, protein and sulfhydryl oxidation. *Free Radical Research Communications*, 16, pp. 111-122.

Sato Y, Kamo S, Takahashi T, Suzuki Y. (1995). Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-soluble radical initiator. *Biochemistry*, 34, pp. 8940-8949.

Sciuto, A. M. (1997). Antioxidant properties of glutathione and its role in tissue protection. In: Baskin, S. I. and Salem, H. (Ed.). *Oxidants, Antioxidants, and free radicals*. Taylor & Francis, pp. 171-191.

Seabra, R. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., e Bastos, M. L. (2006). Anti-oxidant compounds extracted from several plant materials. In: *Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms*. New Hampshire: Science Publishers – Enfield (NH) Jersey Plymouth.

Shi, X., Mao, Y., Saffiotti, U., Wang, L., Rojanasakul, Y., Leonard, S. S. e Vallyathan, V. (1995). Antioxidant activity of tetrandrine and its inhibition of quartz-induced lipid peroxidation. *Journal of Environmental Science and Health*, 46, pp. 233-248.

Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller na danificação oxidativa em eritrócitos humanos

Shiva Shankar Reddy C.S., Subramanyam, M.V., Vani, R., Asha, D. S. (2007) In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements. *Toxicology In Vitro*. 21, pp. 1355-1364.

Sies H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free radical biology and medicine*, 27, pp. 916-921.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defence. *European Journal Biochemistry*. 215, pp. 213-219.

Silva, B. M. (2005). Marmelo (*Cydonia oblonga* Miller) e marmelada: perfil em compostos fenólicos, ácidos orgânicos e aminoácidos livres e avaliação do potencial antioxidante. Tese de Doutoramento. Porto, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Silva, B. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R. M. e Ferreira, M. A. (2004). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 4705-4712.

Silva BM, Valentão P, Seabra RM, Andrade PB. (2008). Quince (*Cydonia oblonga* Miller): an interesting dietary source of bioactive compounds. *In Food Chemistry Research Developments*. Editado por K.N. Papadopoulos - Nova Science Publishers, Inc.: Nova York, EUA, 243-266.

Somani, S. M., Husain, K., e Schlorff E. C. (1997). Response of antioxidant system to physical and chemical stress. *In: Baskin, S. I. and Salem, H. (Ed.). Oxidants, Antioxidants, and free radicals*. Taylor & Francis, pp. 125-141.

Stadtman, E. R. e Berlett, B. S. (1997). Free-radical-mediated modification of proteins. *In: Wallace, K. B. (Ed.). Free Radical Toxicology*. Taylor & Francis, pp. 71-87.

Stavric B. (1994). Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food and Chemical Toxicology* 32, pp. 79-90.

Ternay, A. L. e Sorokin, V. (1997). Redox, radicals and antioxidants. *In*: Baskin, S. I. and Salem, H. (Ed.). *Oxidants, Antioxidants, and free radicals*. Taylor & Francis, pp. 1-21.

Tijburg LB, Mattern T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB. (1997). Tea flavonoids and cardiovascular disease: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, pp. 771-785.

Valentão, P. (2002). Limonete, Hipericão do Gerês, Cardo-do-Coalho, Fel-da-Terra: metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica e estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora. Tese de Doutoramento. Porto, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Vincken, J.-P., Heng, L., Groot, A., Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68, 275–297.

Yanishlieva-Maslarova, N. V. (2001). Inhibiting oxidation. *In*: Pokorny, J., Yanishlieva, N. e M. Gordon M. (Ed.). *Antioxidants in Food*. CRC Press, New York, pp. 22-70.

Yildirim A., Mavi A., Kara A.A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, pp. 4083-4089.

Zou, C. G., Agar, N. S., Jone, G. L. (2001). Oxidative insult in sheep red blood cells induced by t-butyl hydroperoxide: the roles of glutathione and glutathione peroxidase. *Free Radical Research* 34, pp. 45-56.