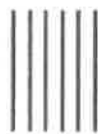


Egitania
s c i e n c i a .

ANO 7; DEZ.-MAI.; ISSN: 1646-8848

12



número 12

2 0 1 3

Título
Egitania Scientia

Direção
Teresa Paiva
(Diretora da Unidade de Investigação para o Desenvolvimento do Interior)

Conselho Editorial

Ascensão Mário Passos (HAAGA-HELIA - Universidade de Ciências Aplicadas, Finlândia); Aytelim Isman (Universidade de Sakarya, Turquia); Constantino Rei (Instituto Politécnico da Guarda, Portugal); Ernesto Barceló (Instituto Colombiano de Neuropedagogia, Colômbia); Fernando Neves (Instituto Politécnico da Guarda, Portugal); Gonçalo Fernandes (Instituto Politécnico da Guarda, Portugal); Helder Sequeira (Instituto Politécnico da Guarda, Portugal); João Pedro de Almeida Couto (Universidade dos Açores, Portugal); Jorge Mendes (Instituto Politécnico da Guarda, Portugal); Marianna Sigala (Universidade de Aegean, Grécia); Pedro Tadeu (Instituto Politécnico da Guarda, Portugal); Peter Nijkamp (Universidade Free, Holanda); Teresa Paiva (Instituto Politécnico da Guarda, Portugal); Vítor Rojo (Universidade de Sevilha, Espanha); Vítor Santos (Universidade Nova de Lisboa, Portugal).

Comissão Científica

Disponível na página da revista, (*available in the webpage*).

Revisão Científica

Ana Ferreira da Vinha (Universidade Fernando Pessoa); Ana Margarida Godinho Fonseca (Instituto Politécnico da Guarda); Carla Ravasco Nobre (Instituto Politécnico da Guarda); Carlos Reis (Instituto Politécnico da Guarda); Celeste da Cruz Meirinho Antão (Instituto Politécnico de Bragança); Daniel Marinho (Universidade da Beira Interior); Elisabete Fernanda Mendes Duarte (Instituto Politécnico de Leiria); Ernestina Batoca Silva (Instituto Politécnico de Viseu); Fernando Valente (Instituto Politécnico da Guarda); Joaquim Gonçalves Antunes (Instituto Politécnico de Viseu); José Augusto Alves (Instituto Politécnico de Santarém); José Brites Ferreira (Instituto Politécnico de Leiria); José Manuel Silva (Instituto Politécnico de Leiria); José Rebelo dos Santos (Instituto Politécnico de Setúbal); Maria do Rosário Silva Santana (Instituto Politécnico da Guarda); Maria Luísa Faria de Sousa C. C. Castilho (Instituto Politécnico de Castelo Branco); Maria Teresa Borges Tiago (Universidade dos Açores); Marici Cristine Gramacho Sakata (Universidade de São Paulo); Paula Coutinho Borges (Instituto Politécnico da Guarda); Paulo Faustino (Instituto Politécnico de Leiria); Raúl Manuel da Silva Laureano (Instituto Universitário de Lisboa – ISCTE); Susana Fidalgo (Instituto Politécnico de Viseu); Teresa Paiva (Instituto Politécnico da Guarda)

Equipa Editorial: Manuela Natário; Pedro Tadeu; Helder Sequeira

Revisão de provas: Ana Fonseca, Guadalupe Arias Mendez, Sílvia Réis

Propriedade: Instituto Politécnico da Guarda, Av. Dr. Francisco Sá Carneiro nº 50 | 6300-559 Guarda /Portugal

Contactos: Telf. 271 220 100 * Fax 271 222 690, Email: udigeral@ipg.pt; egitaneasciencia@ipg.pt;

Endereço Web: <http://www.egitaneasciencia.ipg.pt>

Composição Gráfica: Ana Batista e Daniel Ferreira

Acabamentos: Ana Batista, Daniel Ferreira e Francisco Leite

Impressão: Serviços de Artes Gráficas do IPG | www.ipg.pt/sag

Revista impressa em papel reciclado

Depósito Legal: nº 260795/07

ISSN: 1646-8848

Ano 7; Nº XII, maio de 2013

Periodicidade: Semestral (dezembro de 2012 a maio de 2013)

Tiragem: 1 000 exemplares

Assinatura: Portugal 20€, Europa 30€, Resto do Mundo 50€ / **Preço Capa:** 20€

Proibida a reprodução total ou parcial desta Revista sem autorização expressa da Direção de "Egitania Scientia". Todos os direitos reservados. Forbidden the total or partial reproduction of this Magazine without express authorization of the Direction Board of "Egitania Scientia". All rights reserved.

Apoio a este número:

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
Unidade de Investigação para o Desenvolvimento do Interior (UDI/IPG)

Nota: Os artigos são da responsabilidade dos autores, não refletindo necessariamente os pontos de vista da direção ou dos revisores.
A presente revista foi elaborada seguindo as normas do novo Acordo Ortográfico.

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DE FITOQUÍMICOS BIOATIVOS EM PLANTAS MEDICINAIS PORTUGUESAS

STUDY OF BIOACTIVE PHYTOCHEMICAL COMPOSITION IN
PORTUGUESE MEDICINAL PLANTS

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE LOS FITOQUÍMICOS BIOATIVOS EN
PLANTAS MEDICINALES PORTUGUÉS

Ana F. Vinha (acvinha@ufp.edu.pt)*, Portugal

Ana Costa (ana_costa@gmail.com)**, Portugal

António Santos (asisanto@gmail.com)***, Portugal

Maria T. Herdeiro (therdeiro@yahoo.com)****, Portugal

Marisa Machado(srmachado@gmail.com)*****, Portugal

RESUMO:

O presente estudo teve como objetivo determinar os teores de fitoquímicos em três espécies vegetais nativas de Portugal - erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.), camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e tília (*Tilia cordata* Mill.) - , através da quantificação dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais, próantocianidinas (taninos totais) e carotenoides totais. Foi também avaliada a possível correlação entre a atividade antioxidante (*in vitro*) e o efeito sinérgico entre os diferentes fitoquímicos presentes, através do método do radical livre DPPH. Os extratos aquosos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os fitoquímicos estudados. A erva-cidreira apresentou maiores concentrações em fenólicos totais ($258.1 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e flavonoides totais ($686.4 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), verificando-se uma correlação positiva entre estes compostos e o seu poder antioxidante (65%). A camomila foi a planta medicinal com maiores teores em taninos ($37.0 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), compostos reconhecidos pelo seu poder adstringente e propriedades digestivas. Todas as plantas apresentaram atividade antioxidante, superior à amostra controlo, com valores compreendidos entre 8.5% e 65% para a tília e erva-cidreira, respetivamente. Este estudo prova que as plantas medicinais portuguesas são uma fonte rica em compostos bioativos para a aplicação nas indústrias alimentares e farmacêuticas.

Palavras Chave: *Melissa officinalis* L.; *Matricaria chamomilla* L.; *Tilia cordata* Mill.; Fitoquímicos; Atividade antioxidante (DPPH*)

ABSTRACT:

The aim of the present study was to determine the bioactive photochemical contents presented in three native species of Portugal, *Melissa officinalis* L., *Matricaria chamomilla* L., *Tilia cordata* Mill. by UV-Vis spectrophotometric quantification of total phenolics, flavonoids, proanthocyanidins (tannins total) and total of carotenoids. It was also analysed the possible correlation between antioxidant activity (*in vitro*) and the synergistic effect between the different phytochemicals, using the free radical DPPH assay. The aqueous extracts showed significant differences ($p < 0.05$) among all phytochemicals studied. The lemon balm showed higher concentrations of total phenolics ($258.1 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) and total flavonoids ($686.4 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), verifying a positive correlation between those compounds and their antioxidant capacity (65%). Chamomile was the medicinal herb with higher concentrations of tannins ($37.0 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), recognized for its astringent and digestive properties. All medicinal herbs showed antioxidant activity, significantly higher than control sample, with values varying between 8.5% and 65% for lime and lemon balm, respectively. This study proves that Portuguese medicinal plants are a rich source of bioactive compounds which may be useful for application in food and pharmaceutical industries.

Keywords: *Melissa officinalis* L.; *Matricaria chamomilla* L.; *Tilia cordata* Mill.; Phytochemicals; Antioxidant activity (DPPH*).

RESUMEN:

El presente estudio tuvo como objetivo determinar los niveles de fitoquímicos bioactivos en tres especies nativas de Portugal, melisa (*Melissa officinalis* L.), manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) y el tilo (*Tilia cordata* Mill.) por la cuantificación espectrofotométrica UV-Vis de los fenoles totales, flavonoides totales, taninos y los carotenoides totales. Se estudia la posible correlación entre la actividad antioxidante (*in vitro*) y el efecto sinérgico de los diferentes fitoquímicos, por el método de DPPH radicales libres. Los extractos acuosos mostraron diferencia significativas ($p < 0.05$) entre todos los fitoquímicos estudiados. El bálsamo de limón mostró una mayor concentración de fenoles totales ($258.1 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) y flavonoides totales ($686.4 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), con la verificación de una correlación positiva entre estos compuestos y su poder antioxidante (65%). La manzanilla es una planta medicinal con mayor concentración de taninos ($37.0 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), compuestos reconocidos por sus propiedades astringentes y digestivas. Todas las plantas mostraron una actividad antioxidante, superior a la muestra de control, con valores entre 8,5% y el 65% de tilo y melisa, respectivamente. Este estudio demuestra que las

plantas medicinales portugués son una fuente rica de compuestos bioactivos para su posible aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica.

Palabras clave: *Melissa officinalis* L.; *Matricaria chamomilla* L.; *Tilia cordata* Mill.; Fitoquímicos; Actividad antioxidante (DPPH*)

* Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, Porto Portugal /Membro investigador do REQUIMTE/ Departamento de Químicas Finas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto /Investigador colaborador do CITS (Centro de Investigação em Ciências da Saúde), Vila Nova de Famalicão, Portugal. acvinha@ufp.edu.pt

** Aluna Finalista de Licenciatura em Farmácia, do Departamento de Farmácia da Escola Superior de Saúde do Vale do Ave, Instituto Politécnico de Saúde do Norte (ESSVA-IPSN).

*** Professor Coordenador sem Agregação da Escola Superior de Saúde do Vale do Ave, Instituto Politécnico de Saúde do Norte (ESSVA-IPSN) /Membro Investigador do CITS (Centro de Investigação em Ciências da Saúde), Vila Nova de Famalicão, Portugal. asisanto@gmail.com

**** Professor Coordenador com Agregação e Diretora do Departamento de Farmácia e Marketing Farmacêutico da Escola Superior de Saúde do Vale do Ave, Instituto Politécnico de Saúde do Norte (ESSVA-IPSN).

***** Professor Coordenador sem Agregação da Escola Superior de Saúde do Vale do Ave, Instituto Politécnico de Saúde do Norte (ESSVA-IPSN) /Membro Investigador do CITS (Centro de Investigação em Ciências da Saúde), Vila Nova de Famalicão, Portugal.

Submitted: 17th July 2012

Submitted: 13th October 2012

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem incluído o uso de plantas medicinais *in natura* ou produtos que as insiram num contexto de medicina tradicional. A OMS (2002) define esta prática como "um termo amplo usado para referir-se à medicina tradicional e/ou indígena. Nos países industrializados, onde a medicina tradicional não se encontra inserida no sistema sanitário oficial, esta é classificada como medicina complementar, alternativa ou não convencional (OMS, 2002).

Desde os tempos primordiais, o Homem procura na natureza recursos para melhorar as suas condições de vida, para aumentar as suas hipóteses de sobrevivência e melhoria da qualidade de vida. As populações dos países europeus utilizam-nas, maioritariamente, por tradição, confiança e falta de poder económico para usufruir da medicina ocidental. A inventariação dos conhecimentos tradicionais relativamente à preparação e uso de plantas medicinais espontâneas ou cultivadas nas suas atividades quotidianas, para o tratamento de doenças, tornam a etnofarmacologia fundamental na identificação de novas moléculas úteis para o desenvolvimento de novos fármacos. São, portanto, estudos científicos que englobam além da inventariação outros estudos, nomeadamente o estudo fitoquímico conduzido por ensaios de atividade biológica e que permitem garantir maior eficácia destes compostos, validando o conhecimento tradicional e folclórico (Duraipandiyar *et al.*, 2006; Auger *et al.*, 2002). Os dados da OMS estimam que 80% da população mundial utilizam as plantas medicinais com finalidade terapêutica (Sasidharan *et al.*, 2011). Desta forma, o reconhecimento e resgate da sabedoria popular mundial sobre plantas medicinais são fundamentais pelo fato da fitoterapia caseira ser um recurso terapêutico, muitas vezes único. As chamadas medicinas alternativas são amplamente conhecidas, no entanto, tal como na maioria dos países europeus, nas últimas décadas tem-se registado em Portugal sobretudo nos últimos quinze anos, um aumento significativo na procura dessas terapias. Este crescente interesse levou o Estado Português a legislar esta atividade, cujo recurso às plantas medicinais é essencial. Assim, o Decreto-Lei nº 45/2003 de 22 agosto, faz um enquadramento base das terapêuticas não convencionais, reconhecendo como tal a homeopatia, osteopatia, fitoterapia, naturopatia e quiroprática.

As plantas medicinais naturais que já foram estudadas e reconhecidas quer pela sua eficiência terapêutica, toxicologia e

segurança, entre outros aspetos, podem ser comercializadas livremente, além de poderem ser cultivadas por aqueles que disponham de condições mínimas necessárias. Pelas razões supracitadas, a automedicação orientada é facilitada nos casos considerados mais simples e habituais de uma comunidade, facilitando e reduzindo ainda mais o custo do serviço de saúde pública (Lorenzi & Matos, 2002).

O chá obtido por infusão de plantas medicinais é a forma mais popular de uso, contribuindo para a prevenção e o tratamento de doenças pela presença de compostos biologicamente ativos (Godswill *et al*, 2010; SCHMITZ *et al*, 2005).

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como os seus mecanismos de ação, tem sido um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e farmacologia. As plantas contêm inúmeros constituintes fitoquímicos e os seus extratos, independentemente do tipo de solvente utilizado, quando testados *in vitro* podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos. Uma ampla variedade de metabolitos secundários é produzida pelos vegetais superiores, responsáveis pela defesa natural da planta sob condições de *stress* biótico e abiótico. Neste grupo de metabolitos secundários, estão envolvidos compostos azotados (alcalóides, aminas, aminoácidos, glicósidos cianogénicos, glicosinolatos, inibidores de proteases e lectinas) e compostos não azotados, como os terpenoides, saponinas, flavonoides, taninos, ácidos fenólicos, lignanas, ligninas e poliacetilenos (Win, 2004). Independentemente do grupo químico de cada um deles, todos eles apresentam funções terapêuticas, incluindo atividade antioxidante. Os antioxidantes sintéticos, produzidos artificialmente, são amplamente utilizados pelas indústrias alimentar e farmacêutica, como inibidores do processo de lipoperoxidação. No entanto, estes compostos têm sido reconhecidos como agentes químicos prejudiciais para a saúde (Barlow, 1990). A partir da década de 1980, estudos científicos com antioxidantes extraídos de fontes naturais foram amplamente intensificados visando o seu potencial na aplicação em produtos alimentares e de uso farmacêutico, tendo como objetivo principal a substituição total ou parcial dos antioxidantes sintéticos, de uso limitado e de efeitos nocivos (Kumar, 2011; Krishnaiah *et al*, 2007; Pokorný, 2007; Chen *et al*, 1992).

Os polifenóis são os antioxidantes naturais mais abundantes no reino vegetal, amplamente distribuídos nos frutos (Oviasogie, Okoro e Ndiokwere, 2009; Slimestad & Verheul, 2009), vegetais (Cartea *et al*, 2011; Dimitrios, 2006) e bebidas como chá, café e vinho (Yuwa-

Amompitak *et al*, 2012; Abdo *et al*, 2011; Yashin *et al*, 2011; Yang *et al*, 2009; Chu *et al*, 2008; Bastos *et al*, 2007).

Devido ao facto do chá ser considerado como a segunda bebida não alcoólica mais consumida no mundo e linearmente definido como um produto constituído por uma ou mais partes das espécies vegetais como inteiras, fragmentadas ou moídas, este estudo baseou-se na determinação dos teores dos fitoquímicos bioativos das espécies vegetais de maior consumo pela população portuguesa: erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.), camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e tília (*Tilia cordata* Mill.) através da quantificação espectrofotométrica UV-Vis dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais, próantocianidinas (taninos condensados) e carotenoides totais. Foi também avaliada a possível correlação entre a atividade antioxidante (*in vitro*) e o efeito sinérgico entre os diferentes fitoquímicos presentes, através do método do radical livre DPPH*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

O presente estudo foi realizado nos laboratórios de química e de farmácia do CITS (Centro Investigação em Tecnologias da Saúde). Foram selecionadas três espécies diferentes de chá, destinadas ao consumo doméstico, adquiridas no comércio local, mas provenientes do mesmo produtor. As plantas medicinais encontravam-se secas e embaladas em sacos hermeticamente selados. As espécies vegetais escolhidas para este estudo foram selecionadas mediante um questionário simples realizado a 1000 pessoas com idades compreendidas entre os 20 e os 60 anos, por ordem de preferência, sendo elas: folhas de erva-cidreira (*Melissa officinalis* L., família Lamiaceae), flores de camomila (*Matricaria Chamomilla* L., família Asteraceae), flores de tília (*Tilia cordata* Mill., família Tiliaceae).

2.2. Obtenção dos extratos

Os extratos aquosos foram obtidos por processo de extração sólido-líquido utilizando-se 5 g de amostra moída em 50 mL de água desionizada, à temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), mantida por 60 min,

sob agitação constante em placa de agitação magnética (Variomag Poly 15). Os extratos foram clarificados utilizando-se solução de hidróxido de bário (0,3M) e sulfato de zinco a 5%, sendo imediatamente filtrados. Posteriormente foi realizada a partição do extrato com hexano, por decantação, até remoção completa de substâncias interferentes para as análises, conforme procedimento descrito por Furlong *et al.* (2003). As amostras obtidas foram concentradas por evaporador rotativo (Marca Fisaton) à temperatura de 40°C, transferidas para tubos de ensaio com tampa, e acondicionadas a uma temperatura de -18°C.

2.3. Fenólicos totais

Para a análise do teor de compostos fenólicos totais, foi adotado procedimento proposto por Wéttasinghe *et al.* (1999), através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Foi escolhida a catequina (1 mg.mL⁻¹) como substância padrão, tendo sido realizadas diluições para obtenção de uma zona de linearidade compreendida entre 0,1 – 1 mg equivalente de catequina mL⁻¹. A 0,5 ml de cada amostra, foram adicionados 2 ml Folin-Ciocalteu diluído (1/10) e 2 ml de Na₂CO₃ a 4% (p/p), posteriormente armazenada ao abrigo da luz durante 2 horas. Os teores de compostos fenólicos totais foram expressos em equivalentes de catequina por 100g de amostra seca, sendo as absorbências medidas a 773 nm num espectrofotômetro de Marca Shimadzu Modelo modelo- UV-1800.

2.4. Carotenoides totais

Para a determinação dos carotenoides totais, adotou-se o procedimento proposto por Kimura *et al.* (2003). As leituras das absorbências foram registradas a 450 nm por espectrofotometria (Shimadzu Modelo modelo- UV-1800), e para a sua quantificação, recorreu-se ao espectro de absorção obtido ao comprimento de onda referido e a expressão matemática descrita por Gross (1987), considerando o coeficiente de absorção igual a 2500.

2.5. Proantocianidinas (taninos totais)

O teor de taninos totais nos extratos foi obtido a partir do método analítico de Folin-Denis. A uma alíquota de extrato aquoso de cada planta estudada foram adicionados 2 ml de reagente de Folin-Denis e a solução resultante foi agitada a 5000 rpm, durante 2 minutos. Após repouso, adicionaram-se 2 ml de uma solução aquosa de carbonato de sódio (8%) à mistura, mantendo-a em repouso durante 2 horas ao abrigo da luz. Para a quantificação dos taninos totais foram preparadas diferentes soluções de ácido tânico, as quais permitiram realizar uma reta de calibração para posterior cálculo experimental. O ácido tânico foi utilizado como padrão por ser um tanino hidrolisável e também por caracterizar os taninos totais pelo método espectrofotométrico, a $\lambda = 725$ nm.

2.6. Flavonoides totais

Os flavonoides totais foram determinados de acordo com o procedimento proposto por Lees e Francis (1972). A absorbência foi medida a 374 nm para quantificação dos flavonoides totais. Os resultados foram expressos em mg de quercetina por 100 g de peso seco do extrato.

2.7. Atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH[•]

O método é baseado na metodologia descrita por Blois (1958), posteriormente modificada por Brand-Williams e colaboradores (1995), utilizando o radical estável DPPH[•] que sofre redução na presença dos compostos antioxidantes, observando-se uma mudança de coloração, de violeta para amarela, respectivamente e proporcional à concentração da substância redutora da amostra em estudo. Para a avaliação da atividade antioxidante dos diferentes extratos, bem como do padrão BHT (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol), adicionou-se a 5 ml de solução metanólica de DPPH[•], uma alíquota de 0,05 ml de soluções com diferentes concentrações de cada extrato e de BHT. As leituras foram realizadas num espectrofotómetro Shimadzu Modelo modelo-UV-1800, a 517 nm, após decorridos 30 minutos do início da reação, medindo-se em intervalos de tempo de 5 minutos num total de 30 minutos. Como em todos os ensaios analíticos supracitados, as determinações

foram realizadas em triplicado e acompanhadas de um controlo (solução sem antioxidante).

2.8. Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicado para cada lote de espécies vegetais propostas para este trabalho e os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP) considerando os resultados de dois lotes, ou seja, duas repetições. A análise de variância (ANOVA) e as comparações múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%, foram realizadas usando o Sistema de Análises Estatísticas GraphPad Prism 5. O coeficiente de correlação para determinar a relação entre as diferentes variáveis, teor de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos, foi calculado através do software Excel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As ervas, plantas e chás são um dos alvos mais importantes na procura de antioxidantes naturais, do ponto de vista da segurança alimentar. O Homem tem usado estes produtos desde a época pré-histórica não somente para aromatizar os alimentos, mas também devido às suas reconhecidas propriedades antissépticas e medicinais.

Os resultados obtidos para os extratos aquosos das três plantas medicinais portuguesas (erva-cidreira, camomila e tília) estão representados na Tabela 1, através da quantificação espectrofotométrica UV-Vis dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais, proantocianidinás (taninos totais) e carotenoides totais. Todos os resultados foram expressos em miligramas por 100 g de peso seco do extrato ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

TABELA 1. Teores dos fitoquímicos bioativos dos extratos aquosos das três plantas medicinais portuguesas. Fenólicos totais (mg equivalente catequina. 100g⁻¹), flavonoides totais (mg equivalente quercetina. 100g⁻¹), taninos totais (mg equivalente ác. tânico. 100g⁻¹), carotenoides totais (mg. 100g⁻¹).

Planta Medicinal*	Fenólicos totais (mg.100g ⁻¹)	Flavonoides Totais (mg.100g ⁻¹)	Taninos (mg.100g ⁻¹)	Carotenoides (mg.100g ⁻¹)
Erva-cidreira	258.1±2.55 ^A	686.4±6.46 ^A	11.5±1.23 ^A	0.4±0.06 ^A
Camomila	236.1±5.88 ^A	619.1±3.73 ^B	37.0±0.42 ^B	1.4±0.08 ^B
Tília	68.3±15.80 ^B	592.1±5.43 ^C	16.0±0.78 ^C	0.1±0.04 ^C

*Os resultados estão expressos como média±desvio padrão (n=3); médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente (p > 0.05).

Ao comparar os teores de fenólicos totais dos diferentes extratos, observa-se que estes fitoquímicos encontram-se em maior quantidade na erva-cidreira (258.1 mg equivalente catequina. 100g⁻¹), seguida da camomila (236.1 mg equivalente catequina. 100g⁻¹) e por fim a tília (68.3mg equivalente catequina. 100g⁻¹), tendo esta última significância estatística com as outras duas espécies (p < 0.05). A mesma ordem decrescente de flavonoides totais foi verificada para as três espécies, mas todas estatisticamente significantes (p < 0.05). O maior teor de flavonoides totais foi encontrado na erva-cidreira, enquanto a tília apresentou menores quantidades, verificando-se uma relação direta entre os teores de compostos fenólicos e de flavonoides, uma vez que ambos são sintetizados pela mesma via metabólica (via chiquimato). Num estudo semelhante, Trendafilova e colaboradores (2010) verificaram que a erva-cidreira era a planta medicinal com maior riqueza em fenólicos totais de entre 5 espécies vegetais distintas, no entanto, os valores publicados são inferiores aos nossos, provando que as condições edafo-cimatéricas são fatores de extrema importância para o desenvolvimento e síntese dos metabolitos secundários presentes em espécies vegetais iguais. A mesma relação direta e proporcional entre os teores de fenólicos e flavonoides totais foram descritos por Atanassova *et al.* (2011). A *Mellissa officinalis* (erva-cidreira) é conhecida em literatura por ser uma planta aromática, rica em compostos voláteis, compostos fenólicos, como os ácidos cafeico e rosmarínico, respectivamente cujas propriedades antioxidantes estão bem documentadas (Herodez *et al.*, 2003). Outros estudos mostram que entre os diversos compostos isolados na erva-cidreira, os que apresentam maior representação são os compostos polifenólicos (ácido

cafeico e ácido rosmarínico), óleos essenciais (citrál), aldeídos monoterpénicos, sesquiterpenos, flavonoides (luteolina) e taninos (Dastmalchi *et al*, 2008; Kennedy *et al*, 2002; Carnat *et al*, 1998).

Na determinação de taninos totais, entre as espécies estudadas, a que mais se destacou foi a camomila (*Matricaria chamomilla* L.), apresentando um teor de $37.0 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de proantocianidinas, enquanto os teores para a tília e erva-cidreira foram de 16.0 e $11.5 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, respetivamente. A camomila é uma planta medicinal conhecida pelas suas propriedades espasmolítica, antialérgica, antibacteriana, antifúngica e calmante e os taninos, presentes na planta aumentam o seu poder terapêutico, nomeadamente, o efeito a nível digestivo é anti-inflamatório. Estes resultados vão de encontro ao "dizeres terapêuticos" da medicina tradicional uma vez que se caracteriza o chá de camomila pelas suas propriedades digestivas e calmantes, enquanto a erva-cidreira é comumente utilizada para fins calmantes. Curiosamente, a tília foi a planta medicinal com menores teores encontrados entre os fitoquímicos estudados, no entanto, esta planta é reconhecida por possuir propriedades emolientes, suavizantes, e hidratantes através das mucilagens e flavonoides, ação adstringente dos taninos, no entanto, é reconhecida cientificamente pela sua propriedade antisséptica, obtida pela sua riqueza em óleos essenciais, nomeadamente o farnesol.

Os carotenoides ou carotenos, são pigmentos naturais das plantas. Muitos estudos relacionam estes compostos com a elevada capacidade antioxidante e efeitos benéficos ao metabolismo humano. Um dos carotenoides principais, o β -caroteno, é o precursor da vitamina A. Os teores de carotenoides, de uma forma geral, foram significativamente inferiores aos outros fitoquímicos, encontrando-se em maiores quantidades na camomila > erva-cidreira > tília, com valores compreendidos entre $1.4 > 0.4 > 0.1 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, respetivamente. Pelos dados obtidos, observa-se que as espécies estudadas são fontes escassas de carotenoides. Estes pigmentos, que compreendem cores entre o amarelo e o vermelho, apresentam maior expressão nos frutos e vegetais, enquanto os flavonoides assumem um papel mais representativos nas plantas, nomeadamente as antocianinas.

Não existem muitos estudos relacionados com este grupo de compostos químicos e plantas medicinais, no entanto, uma vez que as partes vegetais utilizadas da camomila e da tília para as infusões, são as flores, tornou-se útil a sua quantificação para análise de uma possível

relação entre as espécies, a qual não foi observada, embora haja diferenças significativas entre elas ($p < 0.05$).

O modelo de sequestro do radical estável DPPH[•] é um método amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante num intervalo de tempo relativamente curto, quando comparado com outros modelos publicados. Uma vantagem deste método é o radical livre ser estável e disponível comercialmente, o que evita a sua alteração química, como isomerizações.

Para a medida da atividade antioxidante, utilizando-se os extratos aquosos, foi observada uma capacidade inibitória de 65%, 41.8% e 8.5% para a erva-cidreira, camomila e tília, respectivamente, sendo visível o elevado efeito antioxidante da erva-cidreira, quando comparado com o BHT, antioxidante sintético utilizado como referência, que apresentou uma atividade de 75%. Ainda comparativamente com o BHT, a camomila apresentou uma atividade moderada (41.8%) e a tília uma atividade antioxidante baixa (8.5%). As percentagens de inibição foram obtidas a partir das curvas de descoloração do radical livre DPPH, mediante os extratos aquosos das diferentes plantas medicinais estudadas (Figura 1).

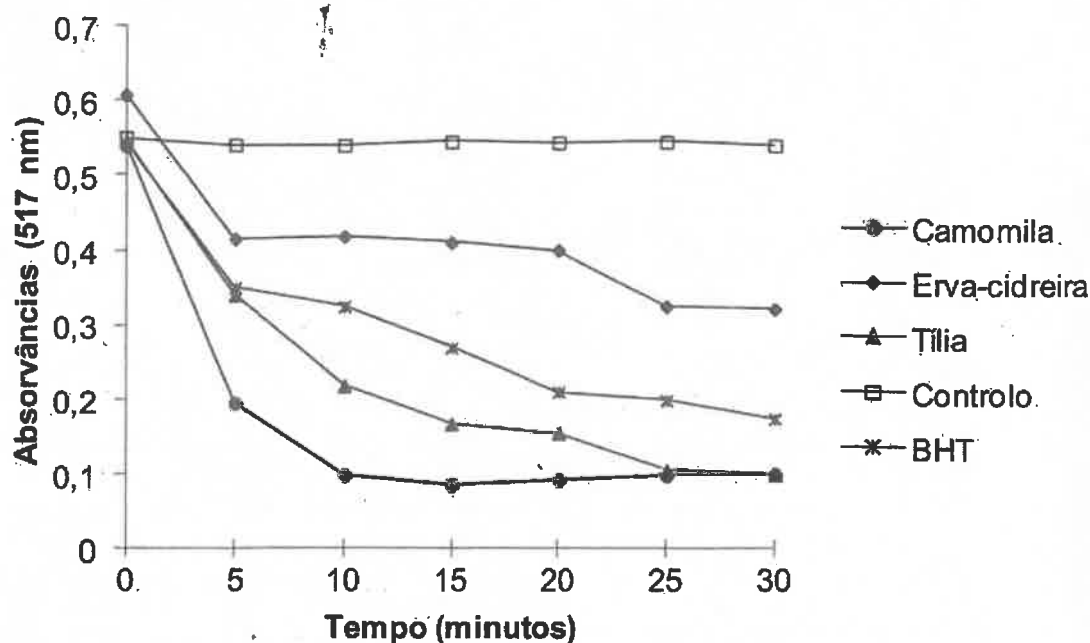


Figura 1: Curvas obtidas espectrofotometricamente a 517 nm, pela descoloração do radical DPPH[•] lidas ao longo do tempo.

No presente estudo foi estabelecido o coeficiente de correlação entre as variáveis fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante (Figuras 2 e 3). Para os diferentes extratos aquosos verificou-se um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0.9043 e 0.8858 para os fenólicos totais versus atividade antioxidante e flavonoides versus atividade antioxidante, respetivamente. Foi observada uma boa correlação entre as variáveis estudadas, principalmente entre a % inibição e os fenólicos totais, dados que podem ser explicados do ponto de vista analítico, uma vez que os teores destes fitoquímicos são significativamente diferentes entre as três plantas estudadas.

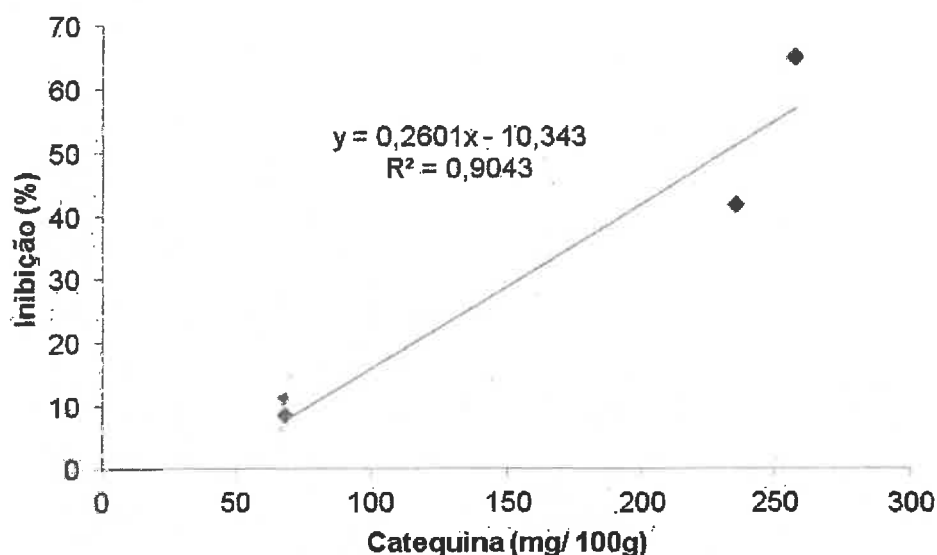


Figura 2: Correlação entre os teores de fenólicos totais versus percentagem de inibição das três plantas medicinais portuguesas; erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.), camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e tília (*Tilia cordata* Mill.)

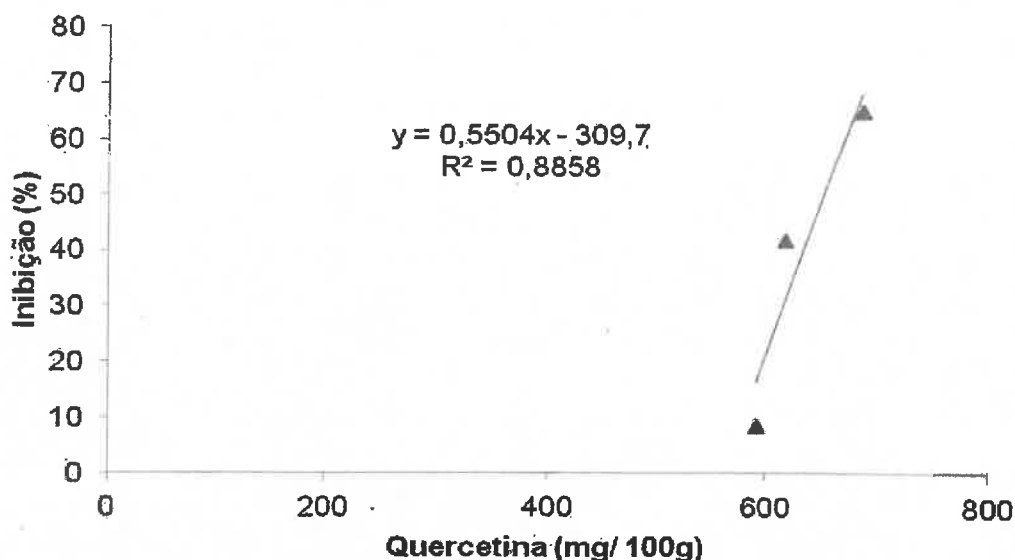


Figura 3: Correlação entre os teores de flavonoides totais versus percentagem de inibição das três plantas medicinais portuguesas; erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.), camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e tília (*Tilia cordata* Mill.)

4. CONCLUSÃO

O planeamento do estudo farmacológico com plantas consideradas como medicinais é ingeridas, habitualmente, na forma de chás exige uma série de investigações minuciosas, em prol dos inúmeros fatores que comumente dificultam a comprovação em modelos *in vivo*, ou seja, com animais e/ou humanos, uma vez que se tratam de misturas complexas e indefinidas com princípios ativos e metabolitos secundários que, além de variarem na sua composição, podem-se potenciar ou antagonizar mutuamente.

O conhecimento destes fatos contribuirá fundamentalmente para a utilização racional das plantas medicinais e dos seus manipulados com base na medicina tradicional, competindo aos profissionais das áreas de saúde, o estar alerta relativamente à orientação para a utilização de chás medicinais.

Este trabalho reforça a importância do incremento de uma maior intervenção por parte dos investigadores nacionais, relativamente às espécies vegetais, descritas como medicinais, envolvendo um reconhecimento dos compostos antioxidantes presentes em cada espécie vegetal, com o objetivo de reconhecer os compostos

fitoquímicos maioritários em cada uma delas e, a nível do próprio metabolismo da planta, estudar as interferências edafo-climatéricas que possam aumentar ou diminuir as suas concentrações. Por outro lado, o estudo das nossas plantas, independentemente de estarem classificadas botanicamente ou não, tomar-se-á uma mais-valia para a sua introdução nas indústrias alimentar e farmacêutica. No que diz respeito ao ramo alimentar, os estudos continuados sobre compostos antioxidantes mostram-se importantes no sentido de adquirir novos aditivos alimentares com menores efeitos colaterais possíveis. Relativamente ao ramo farmacêutico, a procura/caracterização e quantificação destes fitoquímicos é de todo o interesse no sentido de promover a introdução da fitoterapia como método alternativo terapêutico e, acima de tudo, natural.

5. BIBLIOGRAFIA

- Abdo Z.M.A.; Hassan, R.A.; El-Salam, A.A.; Helmy, S.A. (2011); "Effect of adding green tea and its aqueous extract as natural antioxidants to laying hen diet on productive, reproductive performance and egg quality during storage and its content of cholesterol." *Egypt. Poult. Sci.*, 30(IV), 1121-1149.
- Atanassova, M.; Georgieva, S.; Ivancheva, K. (2011); "Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs." *J Univ Chem Technol Metall.*, 46(1), 81-88.
- Auger, C.; Caporiccio, B.; Landrault, N.; Teisedre, P.; Laurent, C.; Cross, G. (2002); "Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B: prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*)." *J Nutr.*, 132: 1207-1213.
- Barlow, S.M. (1990); "Toxicological aspects of antioxidants used as food additives." in *Food Antioxidants*, Editor, B.J.F. HudsonUDSON, B.J.F. London: Elsevier, p. 253-307.
- Bastos D.H.M.; Saldanha, L.A.; Catharino, R.R.; Sawaya, A.C.H.F.; Cunha, I.B.S.; Carvalho, P.O.; Eberlin, M.N. (2007); "Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camellia sinensis*) Extracts." *Molecules*, 12, 423-432.
- Blois, M.S. (1958); "Antioxidant determination by the use of stable free radical." *Nature*, 181, 1199-2000.
- Bränd-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995); "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *Lebensm-Wiss u-Technol.*, 28, 25-30.
- Carnat, A.P.; Carnat, A.; Fraisse, D.; Lamaison, J.L. (1998); "The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *Officinalis*) tea." *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 72, 301-305.
- Cartea, M.E.; Francisco, M.; Soengas, P.; Velasco, P. (2011); "Phenolic Compounds in *Brassica* Vegetables." *Molecules*, 16, 251-280.

- Chen, C.; Pearson, A.M.; Gray, J.I. (1992); "Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds." *Food Chem.*, 43, 177-183.
- Chu, Q.; Lin, M.; Yu, X.; Ye, J. (2008); "Study on extraction efficiency of natural antioxidant in coffee by capillary electrophoresis with amperometric detection." *European Food Research and Technol.*, 226(6), 1373-1378.
- Dastmalchi, K.; Dorman, H.J.D.; Oinonen, P.P.; Darwis, Y.; LAAKSO, I.; Hiltunen, R. (2008); "Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract." *LWT – Food Sci Tech.*, 41(3), 391-400.
- Dimitrios, B. (2006); "Sources of natural Phenolic antioxidants." *Trends Food Sci Technol.*; 17, 505-512.
- Duraipandiyar, V.; Ayyanar, M.; Ignacimuthu, S. (2006); "Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India." *BMC Complementary Altern Med.*, 6, 35-41.
- Furlong, E.B.; Colla, E.; Bortolato, D.S.; Baisch, A.L.M.; Souza-soares, L.A. (2003); "Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais." *Vetor*, 13, 105-114.
- Godswill, N.; Anyasor, K.; Ogunwenmo, O.; Oyelana, O.A.; Akpofunurel, B.E. (2010); "Phytochemical constituents and antioxidant activities of aqueous and methanol stem extracts of *Costus afer* Ker Gawl. (Costaceae)." *Afric J Biotechnol.*, 9(31), 4880-4884.
- Gross, J. (1987); *Pigments in fruits*. London: Academic Press, p. 303.
- Herodez, S.S.; Hadolin, M.; Skerget, M.; Zeljko, K. (2003); "Solvent extraction study of antioxidants from balm (*Melissa officinalis* L.) leaves." *Food Chem.*, 80, 275- 282.
- Kennedy, D.O.; Scholey, A.B.; Tildesley, N.T.J.; Perry, E.K.; Wesnes, K.A. (2002); "Modulation of mood and cognitive performance following administration of *Melissa officinalis* (lemon balm)." *Pharmacol Biochem Behav.*, 72, 953-964.
- Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B.R. (2003); "Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables." *J Agric Food Chem.*, 51(9), 2603-2607.
- Krishnaiah, D.; Sarbaty, R.; Bono, A. (2007); "Phytochemical antioxidants for health and medicine – A move towards nature." *Biotechnol Molec Biol Review.*, 1(4), 97-104.
- Kumar, S. (2011); "Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System." *Advances in Applied Science Research*, 2(1), 129-135.
- Lees, D.H.; Francis, F.J. (1972); "Standardization of pigment analyses in cranberries." *Hort Sci.*, 7(1), 83-84.
- OMS. (2002); *Estrategias de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005*. Geneva
- Oviasogie P.O.; D. Okoro D.; Ndiokwere, C.L. (2009). "Determination of total phenolic amount of some edible fruits and vegetables." *Afri J Biotechnol.*, 8(12), 2819-2820.
- Pokorný, J. (2007); "Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants?" *European J Lipid Sci Technol*, 109(6), 629-642.
- Sasidharan, S.; Chen, Y.; Saravanan, D.; Sundram, K.M.; Latha, L.Y. (2011); "Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts." *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 8(1), 1-10.
- Schmitz, W.; Saito, A.Y.; Estevão, D.; Saridaki, H.O. (2005); "O chá verde e suas ações como quimioprotetor." *Ci Biol Saúde*, 26(2), 119-130.
- Slimestad, R.; Verheul, M. (2009); "Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars." *J Sci Food Agric.*, 89(8), 1255-1270.
- Trendafilova, A.; Todorova, M.; Vassileva, E.; Ivanova, D. (2010); "Comparative study of total phenolic content and radical scavenging activity of conventionally and organically grown herbs." *Botanica Sèrbica*, 34(2), 133-136.
- Wink, M. (2004); "Phytochemical diversity of secondary metabolites." In *Encyclopedia of plant and Crop Science*, New York; p. 915-919.

Wettasinghe, M.; Shahidi, F. (1999); "Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals." *J Agric Food Chem.*, 47(5), 1801-1812.

Yang, J.; Martinson, T.E.; Liu R.H. (2009); "Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes." *Food Chem.*, 116, 332-339.

Yashin A.; Yashin, Y.; Nemzer, B. (2011); "Determination of Antioxidant Activity in Tea Extracts, and Their Total Antioxidant Content." *Am J Biomed Sci.*, 3(4), 322-335.

Yuwa-Amornpitak, T.; Koguchi, M.; Teramoto, Y. (2012); "Antioxidant Activity of Herbal Wine Made from Cassava Starch." *World Appl Sci J.*, 16 (6): 874-878.