

Lídia Isaura Sousa Mendes

**Estudo do efeito protector da folha e fruto da espécie *Arbutus unedo* L. na
danificação oxidativa em eritrócitos humanos**

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2010

Lídia Isaura Sousa Mendes

**Estudo do efeito protector da folha e fruto da espécie *Arbutus unedo* L. na
danificação oxidativa em eritrócitos humanos**

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2010

Lídia Isaura Sousa Mendes

**Estudo do efeito protector da folha e fruto da espécie *Arbutus unedo L.* na
danificação oxidativa em eritrócitos humanos**

Trabalho original realizado por:

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Professora Doutora Márcia Carvalho

Resumo

O *Arbutus unedo* L., vulgarmente designado por medronheiro, é uma planta endémica da região Mediterrânica amplamente utilizada na alimentação e na medicina tradicional devido às suas actividades biológicas. Estudos fitoquímicos realizados nesta espécie evidenciaram que os extractos da folha e fruto contêm diversos antioxidantes naturais. As folhas apresentam na sua constituição compostos fenólicos, tais como taninos, flavonóides e glicosídeos fenólicos e α -tocoferol, enquanto os frutos possuem também variados compostos fenólicos (antocianinas, derivados do ácido gálico, taninos e flavonóides), vitamina C e E e carotenos. Assim, é de prever que a espécie *Arbutus unedo* L. tenha um considerável potencial antioxidante. No entanto, as propriedades antioxidantes desta espécie em membranas biológicas não foram até então avaliadas.

Por esta razão, o presente trabalho deteve-se na avaliação do efeito protector dos extractos aquosos da folha e fruto de *Arbutus unedo* L. na danificação oxidativa induzida por radicais livres, utilizando como modelo celular *in vitro* o eritrócito humano. O 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH) é um sistema gerador de radicais livres peróxido no meio extracelular que atacam a membrana eritrocitária causando várias alterações oxidativas, as quais foram avaliadas neste estudo pela libertação de hemoglobina (hemólise) e pela peroxidação dos lípidos da membrana dos eritrócitos.

Os ensaios realizados mostram uma actividade antioxidante para o extracto da folha superior à do fruto. Ambos os extractos protegeram a membrana do eritrócito da hemólise induzida pelo AAPH, de forma dependente do tempo e da concentração, obtendo-se valores de IC₅₀ de $0,062 \pm 0,002$ mg/mL para as folhas e $0,377 \pm 0,047$ mg/mL para os frutos. Além disso, os eritrócitos humanos tratados com os extractos de *Arbutus unedo* L. apresentaram uma diminuição, dependente da concentração, dos níveis de malonildialdeído que é um produto de decomposição da peroxidação lipídica.

Os resultados indicam que a espécie *Arbutus unedo* L., especialmente a folha, constitui uma fonte promissora de antioxidantes naturais com potencial aplicação na prevenção e/ou terapêutica de doenças nas quais os radicais livres estão implicados.

Abstract

The *Arbutus unedo* L., usually known as strawberry tree, is a Mediterranean endemic plant widely employed as food and in traditional medicine owed to its biological activities. Phytochemical studies evidenced that this species leaf and fruit contains various natural antioxidants. Several phenolic compounds are present in leaves such as tannins, flavonoids, phenolic glycosides and α -tocopherol, while the fruit also possess a variety of fenolic compounds (anthocyanins, galic acid derivatives, tannins and flavonoids), vitamins C and E, and carotenoids. Based on their chemical composition, it is reasonable to expect a high antioxidant activity for *Arbutus unedo* L. fruit and leaf extracts. However, the antioxidant properties of this species in biological membranes have not been evaluated thus far.

Therefore, the current study focused on the evaluation of the protective effect of the aqueous extracts obtained from leaves and fruits of *Arbutus unedo* L. against the oxidative damage induced by free radicals using the human erythrocyte as *in vitro* cell-based model assay. The 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) (AAPH) was applied due to its properties as a free radical initiator to generate peroxy radicals in the aqueous phase which can attack the erythrocyte membrane to induce lipid peroxidation. Oxidative injury was assessed by release of hemoglobin (hemolysis) and peroxidation of the erythrocyte membrane lipids.

This study showed stronger inhibitory efficiency for the leaf extract in comparison to the fruit. Both extracts protected the erythrocyte membrane from hemolysis in a time- and concentration-dependent manner, with IC_{50} values of 0.062 ± 0.002 and 0.377 ± 0.047 mg/mL for leaf and fruit extracts, respectively. Moreover, human erythrocytes treated with *Arbutus unedo* L. extracts showed concentration-dependent decrease in levels of malondialdehyde, a breakdown product of lipid peroxidation.

In conclusion, these results suggest *Arbutus unedo* L. species, mainly its leaf, as a promising source of natural antioxidants with potential use in the prevention and/or treatment of diseases mediated by free radicals.

Agradecimentos

O meu mais sincero *Obrigado* a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a conclusão desta etapa da minha vida. Mas não poderia deixar de salientar o meu agradecimento:

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

À Professora Doutora Márcia Carvalho pela dedicação e amizade demonstradas, um agradecimento muito especial. Pelo modo empenhado e estimulante com que acompanhou todas as fases do trabalho e pela constante disponibilidade demonstrada para realizar as mais diversas tarefas relacionadas com a orientação e execução do trabalho. Gostaria ainda de enaltecer todos os seus excelentes conhecimentos científicos, conselhos, ideias e as valiosas sugestões apresentadas, que constituíram uma condição essencial para os resultados apresentados.

À Professora Doutora Branca Silva pelos conhecimentos concedidos e por toda a ajuda e disponibilidade demonstrada.

À Mestre Mary Duro, por amavelmente ter acedido efectuar as recolhas de sangue.

À Ana e ao Rui pela amizade e companheirismo sempre presentes durante a execução laboratorial deste estudo.

À Dulce, à Ana e à Joana por todo o apoio, confiança, conhecimento e motivação partilhados, mas acima de tudo pela amizade evidenciada ao longo destes cinco anos de curso.

Numa outra óptica quero salientar:

Os meus pais, por terem tornado este sonho possível. Sem vocês, nada disto seria possível! Devo-vos tudo aquilo que consegui alcançar. Se cheguei até este ponto foi devido ao vosso esforço e determinação.

O meu namorado Bruno, que esteve sempre ao meu lado apoiando-me e transmitindo-me a força que necessitava nos momentos em que fraquejei. Todas as palavras são poucas para te agradecer todo o amor, carinho, amizade e paciência que me dedicas e sem os quais teria sido muito mais difícil alcançar este meu objectivo.

A minha irmã, o meu cunhado e restante família por estarem sempre presentes.

A Marisa, pela fantástica companheira de casa que sempre foi! A nossa cumplicidade e amizade nunca se extinguirão.

Índice Geral

Índice de Figuras	xi
Índice de Gráficos.....	xii
Índice de Tabelas	xiii
Abreviaturas	xiv
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Enquadramento e objectivos.....	2
1.2. Plano Geral.....	4
II. A ESPÉCIE <i>Arbutus unedo</i> L.....	6
2.1. Características.....	7
2.1.1. Distribuição geográfica	8
2.1.2. O <i>habitat</i> natural.....	9
2.1.3. Fitologia do <i>Arbutus unedo</i> L.....	10
2.2. Interesse da espécie <i>Arbutus unedo</i> L.....	14
2.2.1. Actividades biológicas	16
2.3. Caracterização química.....	16
III. O ERITRÓCITO COMO MODELO <i>IN VITRO</i> PARA A AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	19
3.1. Características gerais do sangue	20
3.1.1. O eritrócito.....	22
IV. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	26
4.1. Objectivo do trabalho	27
4.2. Procedimento experimental	27
4.2.1. Preparação dos extractos	27
4.2.2. Avaliação da actividade antioxidante usando como modelo celular os eritrócitos humanos	28
V. RESULTADOS.....	34

5.1. Efeito protector da espécie <i>Arbutus unedo</i> L. na hemólise induzida pelo AAPH	35
5.1.1. Extracto aquoso da folha de <i>Arbutus unedo</i> L.....	35
5.1.2. Extracto aquoso do fruto de <i>Arbutus unedo</i> L.....	38
5.1.3. Ácido ascórbico	41
6.2. Efeito protector da espécie <i>Arbutus unedo</i> L. na peroxidação lipídica induzida pelo AAPH	42
VI. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	47
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
Anexos	63

Índice de Figuras

Figura 1 – Distribuição geográfica do <i>Arbutus unedo</i> L. na Península Ibérica.	8
Figura 2 – <i>Arbutus unedo</i> L.	11
Figura 3 – Tronco de um exemplar antigo de <i>Arbutus unedo</i> L.	11
Figura 4 – Folhas de <i>Arbutus unedo</i> L.	12
Figura 5 – Flores de <i>Arbutus unedo</i> L.	12
Figura 6 e 7 – Fruto de <i>Arbutus unedo</i> L. nas suas diversas fases de maturação.	13
Figura 8 – Pormenor da coexistência de flores e frutos de <i>Arbutus unedo</i> L.	14
Figura 9 – Composição do sangue e seus valores aproximados num adulto normal.	20
Figura 10 – Vaso sanguíneo seccionado no qual aparecem os elementos figurados suspensos no plasma.	22
Figura 11 – Eritrócito humano.	23
Figura 12 – Representação das quatro cadeias polipeptídicas, cada uma com um grupo heme (realçado para se evidenciar o seu átomo de ferro), que formam a molécula de hemoglobina.	24
Figura 13 – Estrutura e composição das membranas segundo o modelo do mosaico fluído.	24
Figura 14 – Reacção de oxidação do AAPH.	29

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Representação gráfica do efeito protector da folha de <i>Arbutus unedo</i> L. na hemólise induzida pelo AAPH.	36
Gráfico 2 – Gráfico representativo do cálculo do IC ₅₀ da folha de <i>Arbutus unedo</i> L.	38
Gráfico 3 – Representação gráfica do efeito protector do fruto de <i>Arbutus unedo</i> L. na hemólise induzida pelo AAPH.	40
Gráfico 4 – Gráfico representativo do IC ₅₀ do fruto de <i>Arbutus unedo</i> L.	41
Gráfico 5 – Representação gráfica da área do pico em função da concentração do padrão TEP.	43
Gráfico 6 – Representação gráfica da extensão da peroxidação lipídica <i>versus</i> a concentração de extracto.	45

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação taxonómica da espécie <i>Arbutus unedo</i> L.	7
Tabela 2 – Tabela usada na preparação dos tubos de hemólise para o ensaio da actividade anti-hemolítica da folha de <i>Arbutus unedo</i> L.	30
Tabela 3 – Tabela usada na preparação dos tubos de hemólise para o ensaio da actividade anti-hemolítica do fruto de <i>Arbutus unedo</i> L.	30
Tabela 4 – Tabela usada na preparação dos tubos de hemólise para o ensaio da actividade anti-hemolítica do ácido ascórbico.	31
Tabela 5 – Resultados obtidos para a percentagem de hemólise do extracto da folha de <i>Arbutus unedo</i> L.	35
Tabela 6 – Resultados obtidos para a percentagem de inibição da hemólise do extracto da folha de <i>Arbutus unedo</i> L.	37
Tabela 7 – Tabela representativa do IC ₅₀ da folha de <i>Arbutus unedo</i> L.	37
Tabela 8 – Resultados obtidos para a percentagem de hemólise do fruto de <i>Arbutus unedo</i> L.	39
Tabela 9 – Resultados obtidos para a percentagem de inibição da hemólise do extracto do fruto de <i>Arbutus unedo</i> L.	40
Tabela 10 – Tabela representativa do IC ₅₀ do fruto do <i>Arbutus unedo</i> L.	41
Tabela 11 – Resultados obtidos para a percentagem de hemólise do ácido ascórbico.	42
Tabela 12 – Valores obtidos de área de pico para os padrões de TEP.	42
Tabela 13 – Resultados obtidos para a concentração de MDA.	44
Tabela 14 – Resultados obtidos para a % de inibição da peroxidação lipídica para os extractos da folha e fruto de <i>Arbutus unedo</i> L.	45

Abreviaturas

AAPH	2,2'-azo-bis(2-amidinopropano).
ATP	Adenosina trifosfato.
BHT	Butilhidroxitolueno.
C	Concentração.
g	grama
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão.
IC ₅₀	Concentração inibitória 50.
MDA	Malonildialdeído
mg	miligrama.
mL	mililitro.
mm	milímetros.
mM	milimol.
PBS	Solução tampão fosfato.
ROO [•]	Radical peroxilo.
rpm	Rotações por minuto.
TBA	Ácido tiobarbitúrico.
TCA	Ácido tricloroacético.
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano.
UV	Ultra-violeta.
Vf	Volume final.
µg	micrograma.
µm	micrómetro.
µM	micromol.
µL	microlitro.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Enquadramento e objectivos

Evidências irrefutáveis indicam que os radicais livres induzem o dano oxidativo nas biomoléculas celulares (como proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos e lípidos) e estão implicados no envelhecimento e na patogénese dos problemas de saúde mais importantes do mundo industrializado como as doenças cardiovasculares, a aterosclerose, a diabetes, a inflamação crónica, as doenças neurodegenerativas e o cancro (Halliwell, 1997; Sorg, 2004; Atoui *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007 e Negre-Salvayre *et al.*, 2008). A extensão do dano oxidativo pode ser atenuada através da suplementação com um ou mais antioxidantes. Nesse âmbito, o consumo de alimentos vegetais ricos em antioxidantes naturais como os compostos fenólicos, entre os quais se destacam os flavonóides, os ácidos fenólicos, as antocianidinas e os taninos, pode desempenhar um papel fundamental na prevenção dessas doenças (Bourne e Rice-Evans, 1999; Diplock *et al.*, 1998; Kauer e Kapoor, 2001; El-Agamey *et al.*, 2004 e Omoni e Aluko, 2005). Nas últimas décadas, diversas plantas medicinais foram identificadas e avaliadas quanto às suas actividades terapêuticas de modo a avaliar o potencial da sua aplicação na prevenção de doenças mediadas pelo stress oxidativo.

O *Arbutus unedo* L., vulgarmente conhecido como medronheiro, é um arbusto ou pequena árvore da família *Ericaceae* endémica da região Mediterrânica, mas encontrada igualmente, noutras regiões com verões quentes e inversos chuvosos (Núñez e Castro, 1991; Ferreira e Gonçalves, 2001; Correia e Oliveira, 2002; Mereti *et al.*, 2002 e Celikel *et al.*, 2008). No nosso país, esta espécie é espontânea em quase todo o território embora com maior frequência a Sul do rio Tejo, especialmente nas Serras de Monchique e do Caldeirão (Ferreira e Gonçalves, 2001; Correia e Oliveira, 2002 e Godinho-Ferreira *et al.*, 2005).

O seu fruto, o medronho, é esférico e na época do Outono possui uma cor vermelha e um paladar saboroso pois está completamente maduro. Os frutos, embora comestíveis, raramente são consumidos frescos sendo geralmente processados antes do seu consumo (Brickell, 1999; Burnie *et al.*, 2004; González, 2006 e Brosse, 2010) Esse processamento origina produtos altamente apreciados, tais como bebidas alcoólicas, entre as quais, vinhos, licores e aguardentes; compotas; marmeladas e geleias. Além

disso, podem ainda ser incorporados em iogurtes, recheio de tortas e produtos derivados de cereais (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001; Pawlowska *et al.*, 2006 e Pallauf *et al.*, 2008).

Na medicina tradicional, os frutos do *Arbutus unedo* L. são reconhecidos pelas suas propriedades antisépticas, diuréticas e laxantes, enquanto as folhas são usadas como adstringentes, diuréticos, antisépticos urinários, antidiarreicos, depurativos e, mais recentemente, no tratamento da hipertensão, diabetes e doenças inflamatórias (Afkir *et al.*, 2008; Mariotto *et al.*, 2008 e Bnouham *et al.*, 2010). Essas propriedades são confirmadas por diversos estudos fitoquímicos que demonstram que os extractos da folha e fruto de *Arbutus unedo* L. são uma boa fonte de compostos com uma actividade antioxidante notável. Assim, verifica-se que os extractos de folhas contêm vários compostos fenólicos como os taninos, os flavonóides, os glicosídeos fenólicos (Males *et al.*, 2006; Fiorentino *et al.*, 2007 e Pavlović *et al.*, 2009), assim como o α -tocoferol (Kivçak *et al.*, 2001) e que os extractos de frutos possuem também compostos fenólicos, dos quais a classe mais representativa é a família dos flavonóides e dentro deste grupo, as mais abundantes são as antocianidinas que representam mais de 80% do teor total de flavonóides, as vitaminas C e E e os carotenóides (Ayaz *et al.*, 2000; Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001; Males *et al.*, 2006; Pawlowska *et al.*, 2006 e Pallauf *et al.*, 2008). As antocianidinas encontram-se também na forma de glicosídeos de cianidina, glicosídeos de delfinidina e cianidina-3-galactosídeos. Nestes frutos existem ainda outros compostos fenólicos antioxidantes, como os derivados do ácido gálgico e os taninos (Pallauf *et al.*, 2008).

Tendo como base a composição química destes extractos é de prever que esta espécie vegetal possua uma razoável actividade antioxidante. Assim, o objectivo do presente trabalho é o de avaliar a actividade antioxidante da espécie *Arbutus unedo* L. em sistemas biológicos. Para o efeito, o eritrócito humano será usado como modelo *in vitro* para a avaliação da interacção oxidante/antioxidante nas membranas destas células, as quais são representativas da membrana plasmática em geral, visto que a membrana dos eritrócitos é rica em ácidos gordos insaturados que são muito susceptíveis à peroxidação lipídica mediada por radicais livres (Shiva *et al.*, 2007). A peroxidação lipídica das membranas biológicas parece estar envolvida no envelhecimento celular e cada vez mais é associada a uma grande diversidade de

eventos patológicos (Ko *et al.*, 1997 e Sivilotti, 2004). Deste modo, pretendeu-se estudar o papel protector dos extractos aquosos obtidos das folhas e frutos do *Arbutus unedo* L. relativamente aos danos oxidativos induzidos por radicais livres em eritrócitos humanos. O 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH) será utilizado como sistema gerador de radicais livres pois a sua decomposição térmica à temperatura fisiológica e em fase aquosa origina radicais livres do tipo peróxilo (Niki, 1990) que atacam a membrana eritrocitária induzindo a peroxidação lipídica. 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 (Shiva *et al.*, 2007). Neste estudo, o efeito protector dos extractos da folha e fruto da espécie *Arbutus unedo* L. será avaliado pela inibição da hemólise e da peroxidação lipídica mediada pelos radicais livres nos eritrócitos humanos.

1.2. Plano Geral

A presente dissertação estrutura-se em sete capítulos.

O capítulo actual (capítulo 1) engloba o enquadramento deste trabalho e a explanação dos seus objectivos.

No capítulo 2 realiza-se uma revisão bibliográfica da espécie *Arbutus unedo* L. abordando as suas características gerais, o seu interesse e caracterização química.

No capítulo 3, “O eritrócito como modelo *in vitro* para a avaliação da actividade antioxidante”, são explanadas as razões que determinam o eritrócito humano como um modelo celular adequado para a avaliação dos mecanismos de lesão por radicais livres em membranas biológicas e do efeito antioxidante de alguns compostos.

Nos capítulos 4 (“Procedimento experimental”) e 5 (“Resultados”), são apresentados os vários procedimentos utilizados na execução do trabalho laboratorial e

os resultados obtidos para o estudo do efeito protector dos extractos aquosos da folha e fruto da espécie *Arbutus unedo* L. na danificação oxidativa em eritrócitos humanos.

No capítulo 6, “Discussão e Conclusões”, foram explicados e justificados os resultados apresentados no capítulo 5 e procedeu-se à sinopse deste estudo.

Por fim, no capítulo 7, encontra-se uma listagem de todas as referências bibliográficas inseridas ao longo de todo o texto.

II. A ESPÉCIE *Arbutus unedo* L.

2.1. Características

O *Arbutus unedo* L., vulgarmente designado como medronheiro, é um membro da família *Ericaceae* que engloba cerca de 80 géneros e 2.000 espécies distribuídas por todo o mundo (Heywood *et al.*, 2007). A posição taxonómica desta espécie encontra-se representada na tabela 1.

Tabela 1. Classificação taxonómica da espécie *Arbutus unedo* L.

Fonte: Adaptado de http://zipcodezoo.com/Plants/A/Arbutus_unedo/#Taxonomy.

Taxon	Designação
Domínio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Sub-Reino	<i>Viridiaeplantae</i>
Filo	<i>Tracheophyta</i>
Sub-Filo	<i>Euphyllophytina</i>
Infra-Filo	<i>Radiatopses</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sub-Classe	<i>Dilleniidae</i>
Super-Ordem	<i>Ericanae</i>
Ordem	<i>Ericales</i>
Família	<i>Ericaceae</i>
Sub-Família	<i>Arbutoideae</i>
Tribo	<i>Arbuteae</i>
Género	<i>Arbutus</i>
Restritivo específico	<i>unedo</i> L.

O nome desta espécie provém do latim *arbor* que significa árvore, ou do céltico *arbois* que significa fruto granuloso e tuberculoso, algo que define bem o medronho (fruto do *Arbutus unedo* L.) na medida em que a sua superfície é rugosa e possui muitas sementes. Na botânica, medronho significa *fama* (Núñez e Castro, 1991; González, 2006 e Brosse, 2010). O fruto é comestível mas, segundo a crença popular, a sua ingestão em grandes quantidades pode causar problemas digestivos e mal-estar geral, provavelmente devido ao seu conteúdo em álcool quando se encontra maduro, resultando daí o seu restritivo específico *unedo*, que deriva do verbo latim *edo* que significa comer e do numeral *unus* que significa um só, em suma quer dizer: comer apenas um (González, 2006 e Brosse, 2010).

No que diz respeito à sua designação em inglês de “strawberry tree”, esta deve-se ao facto do medronho possuir semelhanças com o morango e ser comestível (Brickell, 1999 e Burnie *et al.*, 2004). Em Portugal, como já foi referido, é vulgarmente denominado de medronheiro, mas também de êrvedo, ervado, ervedeiro ou érvodo (Núñez e Castro, 1991; Burnie *et al.*, 2004; González, 2006 e Brosse, 2010).

2.1.1. Distribuição geográfica

O *Arbutus unedo* L. é nativo da Irlanda, do Sul da Europa e da região Oeste do Mediterrâneo (Núñez e Castro, 1991; Burnie *et al.*, 2004 e González, 2006). É uma das plantas mais comuns da bacia do Mediterrâneo (Núñez e Castro, 1991; Ferreira e Gonçalves, 2001; Correia e Oliveira, 2002; Mereti *et al.*, 2002 e Celikel *et al.*, 2008), mas também é de vulgar ocorrência na Península Ibérica (Figura 1), França, Sul de Itália, Sul da Grécia, em quase todas as Ilhas Mediterrânicas, Irlanda, Israel, Noroeste de África, Oeste da Ásia e Macaronésia (Núñez e Castro, 1991 e Torres *et al.*, 2002).

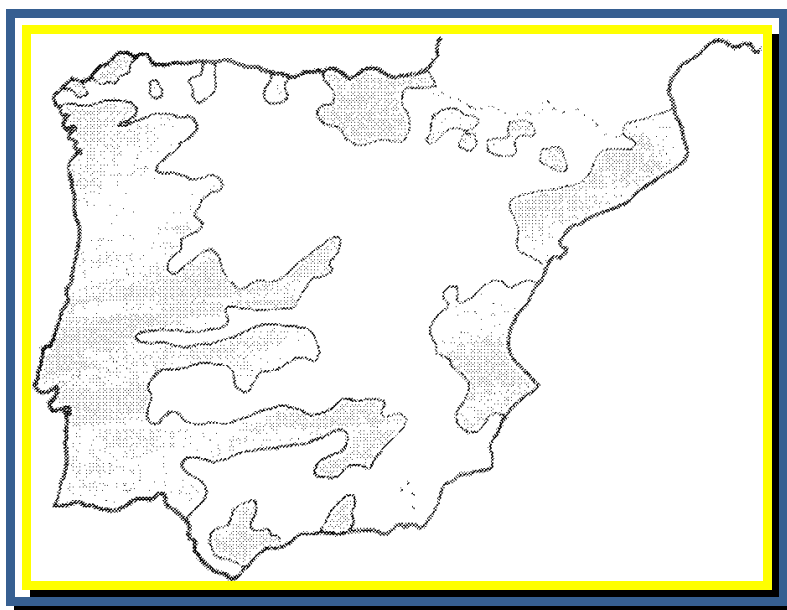


Figura 1. Distribuição geográfica do *Arbutus unedo* L. na Península Ibérica.

Fonte: Adaptado de Torres *et al.* (2002).

É uma espécie muito comum no nosso país, sendo possível encontrar um grande número de exemplares que crescem espontaneamente em algumas regiões, embora com maior frequência a Sul do rio Tejo, sobretudo nas Serras de Monchique e do Caldeirão

(Ferreira e Gonçalves, 2001; Correia e Oliveira, 2002 e Godinho-Ferreira *et al.*, 2005). Na região do Mediterrâneo existem apenas 4 espécies e dois híbridos: *Arbutus unedo* L., *Arbutus andrachne* L. (região Este do Mediterrâneo), *Arbutus pavarii* Pampanini (Costa da Líbia), *Arbutus Canariensis* Veill. (Ilhas Canárias), *Arbutus* × *andrachnoides* Link (*Arbutus unedo* × *Arbutus andrachne*, na região Este do Mediterrâneo) e *Arbutus* × *androsterilis* Salas, Acebes & Arco (*Arbutus unedo* × *Arbutus canariensis*, nas Ilhas Canárias), apesar do género *Arbutus* incluir cerca de 20 espécies. Entre elas, destaca-se o *Arbutus unedo* L. pelo seu interesse económico (Mereti *et al.*, 2002 e Torres *et al.*, 2002).

2.1.2. O *habitat* natural

O *Arbutus unedo* L. constitui uma das poucas espécies com porte arbóreo que após a degradação da floresta primitiva conseguiu instalar-se em matos perenes, orlas de bosques e encostas que anteriormente estavam cobertas de carvalhos. Assim sendo, esta é uma espécie facilmente identificável em áreas de matagal, matas, pinhais e orla de bosques, dispendo-se em populações uniformes ou associadas a outras espécies como a família *Fagaceae*, mais especificamente o *Quercus suber*, vulgarmente designado de sobreiro (Nepi, 2001).

Em Portugal, esta espécie é parte integrante dos solos povoados por sobreiros e azinheiras, mas cresce espontaneamente em matos, bosques e pinhais, encontrando-se em todo o território desde o nível do mar até aos 1.200 metros de altitude (Ferreira e Gonçalves, 2001; Correia e Oliveira, 2002; Godinho-Ferreira *et al.*, 2005 e González, 2006).

O seu *habitat* natural são locais de invernos pouco rigorosos, ou seja, climas temperados nos quais as temperaturas médias anuais são superiores a 12,5°C, as temperaturas médias mínimas variam entre os -12°C e os 6°C e a precipitação média anual situa-se entre os 500 e os 1.400 milímetros. Este tipo de clima garante a sobrevivência da espécie pois as chuvas intensas (de Janeiro a Março) destroem as flores e as chuvas fora de época (de Junho a Agosto) provocam lesões nas folhas e a queda prematura dos frutos, ficando o *Arbutus unedo* L. susceptível a invasões por

agentes patogénicos. Consequentemente, a sua existência em locais mais termófilos e secos do Mediterrâneo é rara ou inexistente (Ferreira e Gonçalves, 2001; Correia e Oliveira, 2002 e Celikel *et al.*, 2008).

No que diz respeito à constituição físico-química do solo, esta espécie é praticamente indiferente, pois possui uma capacidade de adaptação a condições adversas que faz do *Arbutus unedo* L. uma planta extremamente competitiva nas comunidades mediterrâneas (Correia e Oliveira, 2002; Paraskevopoulos *et al.*, 1994 e Vitale e Manes, 2005). Depois de uma devastação por fogo ou pastoreio o *Arbutus unedo* L. tem a capacidade de desenvolver rapidamente estratégias de crescimento a partir dos escassos recursos que tem à sua disposição, na medida em que, sujeito a altas temperaturas e/ou ausência de água, consegue ajustar o seu processo fotossintético de modo a evitar perdas de água, o que garante uma manutenção dos balanços de carbono e hídricos positiva (Vitale e Manes, 2005).

No entanto, e apesar de ser por excelência uma planta dominante, prefere solos com determinadas propriedades físico-químicas. Dessa forma, no que respeita às características físicas elege solos frescos, arenosos, siliciosos, feldspáticos, graníticos e calcários (Ferreira e Gonçalves, 2001; Correia e Oliveira, 2002; Torres *et al.*, 2002 e González, 2006), embora também se desenvolva bem em solos áridos (Martínez-Vilalta *et al.*, 2002). No que se refere às características químicas prefere solos ácidos, embora também consiga crescer em solos alcalinos, sendo a sua gama de pH entre 5 a 8,5 (Ferreira e Gonçalves, 2001; Correia e Oliveira, 2002; Mereti *et al.*, 2002; Mereti *et al.*, 2003; González, 2006 e Cabral e Telles, 2007).

2.1.3. Fitologia do *Arbutus unedo* L.

O *Arbutus unedo* L. (Figura 2) é uma árvore ou arbusto de pequenas dimensões sendo a sua altura média compreendida entre 6 a 8 metros, podendo no entanto atingir os 12 metros de altura (Mereti *et al.*, 2002; Cabral e Telles, 2007 e Brosse, 2010).



Figura 2. *Arbutus unedo* L.

Fonte: Fotografia tirada no Parque Natural de Peneda Gerês em Junho de 2010.

O tronco desta planta lenhosa (Figura 3) possui um ritidoma pardo-avermelhado/pardo-acinzentado, fendilhado, escamoso, com pequenas placas que se desprendem facilmente nos exemplares mais antigos (González, 2006).



Figura 3. Tronco de um exemplar antigo de *Arbutus unedo* L.

Fonte: Adaptado de

<http://arvoresdeportugal.free.fr/IndexArborem/Ficha%20MedronheiroArbutusunedo.htm>.

As suas folhas (Figura 4) são persistentes, dispõem-se alternadamente e possuem 4 a 11 centímetros de comprimento. Apresentam contorno oblongo-lanceolado com pecíolo curto, são coriáceas e glabras excepto na base, lustrosas, verde-escuro intenso e brilhante na página superior mas mais claras na página inferior e possuem uma margem serrilhada muito semelhante às folhas de loureiro (González, 2006 e Brosse, 2010).



Figura 4. Folhas de *Arbutus unedo* L.

Fonte: Fotografia tirada no Parque Natural de Peneda Gerês em Junho de 2010

O *Arbutus unedo* L. possui flores pequenas, reunidas em panículas ou ramalhetes compostos, bracteados, terminais, pendentes e nutantes (Figura 5). A corola é de cor branca mas surge frequentemente rosada ou esverdeada e tem uma forma em jarro ou de campainha (Nápoles e Branco, 2001; González, 2006).



Figura 5. Flores de *Arbutus unedo* L.

Fonte: Adaptado de <http://profs.ccems.pt/Palma/Flores%20Silvestres/Cores/Brancas.htm>.

O fruto (medronho) possui 2 a 3 centímetros de diâmetro, é carnoso, esférico, baciforme, de cor verde no início, passando por tons de amarelo a vermelho à medida que amadurece (Figuras 6 e 7). Os frutos quando maduros apresentam a polpa amarela (Núñez e Castro, 1991; Nápoles e Branco, 2001 e González, 2006) e contêm numerosas sementes pequenas, angulares e de cor castanha (Castro-Díez *et al.*, 2003).



Figura 6 e 7: Fruto de *Arbutus unedo* L. nas suas diversas fases de maturação.

Fonte: Adaptado de: <http://www.asturnatura.com/especie/arbutus-unedo.html> e http://www.naturamediterraneo.com/forum/topic.asp?TOPIC_ID=2431, respectivamente.

Os processos de floração e de frutificação do *Arbutus unedo* L. ocorrem de Outubro a Fevereiro, podendo uma mesma população apresentar uma reprodução “sincronizada”, desde que coexistam flores e frutos (Figura 8). Esta reprodução pode verificar-se também no próprio exemplar e pode ocorrer devido à variabilidade fisiológica ou ao polimorfismo bioquímico desta espécie (Castro-Díez *et al.*, 2003).



Figura 8: Pormenor da coexistência de flores e frutos de *Arbutus unedo* L.

Fonte: Adaptado de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Arbutus_unedo.jpg.

2.2. Interesse da espécie *Arbutus unedo* L.

O *Arbutus unedo* L., tal como já foi referido anteriormente, desenvolve-se espontaneamente a Sul do rio Tejo, especialmente nas encostas das Serras do Caldeirão e de Monchique, uma vez que nestas áreas encontra excelentes condições de vegetação às quais está perfeitamente adaptado (Correia e Oliveira, 2002).

A nível económico e social, a actividade mais importante associada a esta espécie nessas zonas é a produção de bebidas alcoólicas como vinhos, licores, brandies e aguardentes a partir do seu fruto. Os frutos também são utilizados na produção de conservas, compotas, geleias, marmeladas, iogurtes ou usados na doçaria tradicional na confecção de tartes e recheios (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001; Pawlowska *et al.*, 2006; Pallauf *et al.*, 2008).

A madeira desta planta apresenta características de homogeneidade, densidade e dureza que proporcionam uma facilidade de manuseio adequada para o torneamento, podendo desta forma ser usada para esculturas ou fabrico de móveis (Ferreira e Gonçalves, 2001). Por outro lado, a sua madeira pode ser utilizada como combustível pois origina lenha e carvão vegetal de excelente qualidade (Núñez e Castro, 1991).

Na Antiguidade, esta espécie foi utilizada pelos Romanos para ornamentar jardins (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001) mas, actualmente, o seu mercado tem-se expandido sendo utilizada cada vez mais como adorno através da crescente procura da sua folhagem para arranjos florais e decorações (Metaxas *et al.*, 2004; González, 2006). Noutra perspectiva de decoração, os ramos mais jovens podem utilizar-se na cestaria, as quais podem ser revestidas/forradas com as folhas. Outra das aplicações desta planta é na indústria de curtumes na qual se utilizam as suas folhas e cascas (Núñez e Castro, 1991; González, 2006).

O *Arbutus unedo* L. como possui uma floração abundante é especialmente interessante do ponto de vista apícola, na medida em que as abelhas procuram o néctar das suas flores para produzirem o mel tornando-a uma excelente planta melífera (Núñez e Castro, 1991).

Sob o ponto de vista geológico e fitoecológico o seu interesse é irrefutável, pois é uma das espécies que enquadra a preservação e protecção da flora e do património paisagístico (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001), já que possui uma excelente acção a nível da fixação, melhoria e protecção dos solos. Esta acção assenta no seu sistema radicular que é extremamente ramificado, na densidade da sua copa e na preponderante libertação de matéria orgânica pela decomposição da sua vasta folhagem (Correia e Oliveira, 2002). Para além disto, como é tolerante à ausência de água e ao frio e possui uma grande capacidade de regeneração, é especialmente importante nas regiões em que os fogos são frequentes como no sul da Europa (Mereti *et al.*, 2002), contribuindo desse modo para a colonização de solos marginais e conseqüentemente para o combate da sua erosão, permitindo a manutenção da biodiversidade da fauna (Piotto *et al.*, 2001; Godinho-Ferreira *et al.*, 2005).

Os frutos e folhas da espécie *Arbutus unedo* L. têm sido amplamente utilizados na medicina tradicional e quanto mais se pesquisa sobre esta espécie mais se fundamenta esse seu uso.

2.2.1. Actividades biológicas

Os frutos do *Arbutus unedo* L. são utilizados na medicina popular como anti-sépticos, diuréticos e laxativos (Pawlowska *et al.*, 2006). Estudos realizados com o medronho mostraram que o seu alto conteúdo em ácido quínico e sua conversão no organismo humano a ácido hipúrico, o qual se pensa ser detentor de efeitos antibacterianos (Ayaz *et al.*, 2000; Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001 e Hancock *et al.*, 2003), pode, provavelmente, explicar a sua utilidade no tratamento de infecções urinárias (Ayaz *et al.*, 2000 e Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001).

No que concerne ao uso das folhas do *Arbutus unedo* L. na medicina tradicional verifica-se uma aplicação muito mais ampla que a dos frutos, tendo sido evidenciadas nas folhas propriedades adstringentes, diuréticas, anti-sépticas urinárias, anti-diarreicas, depurativas e, mais recentemente, são usadas no tratamento da hipertensão, diabetes e doenças inflamatórias como a blenorragia (Ziyyat *et al.*, 1997; Ziyyat & Boussairi, 1998; Ziyyat *et al.*, 2002; Pabuçcuoglu *et al.*, 2003; Legssyer *et al.*, 2004; Pawlowska *et al.*, 2006; Mariotto *et al.*, 2008; Afkir *et al.*, 2008 e Bnouham *et al.*, 2010).

2.3. Caracterização química

Estudos fitoquímicos realizados na espécie *Arbutus unedo* L. demonstraram que os extractos metanólicos e etanólicos obtidos das folhas apresentam actividade antioxidante e possuem diversos compostos fenólicos, principalmente taninos, flavonóides, glicosídeos fenólicos, entre outros, cujas estruturas apresentam vários grupos hidroxilo (Pabuçcuoglu *et al.*, 2003; Males *et al.*, 2006; Fiorentino *et al.*, 2007 e Pavlović *et al.*, 2009).

É já bem conhecido que diversas plantas que possuem na sua composição compostos fenólicos possuem uma potente acção antioxidante *in vitro*, podendo deter um papel protector em diversas patologias humanas. Por esta razão, os taninos, flavonóides e glicosídeos fenólicos poderão ser os princípios activos responsáveis pela actividade antioxidante das folhas do *Arbutus unedo* L. (Pabuçcuoglu *et al.*, 2003).

Para além da actividade antioxidante, os taninos e os polifenóis relacionados têm sido referidos como anti-agregantes plaquetários, embora outras classes possam estar também envolvidas nesta actividade (Mekhfi *et al.*, 2006).

Entre os compostos fenólicos especificamente identificados nas folhas de *Arbutus unedo* L. encontram-se o arbutósido (arbutina), fenóis simples e derivados de arbutósido: arbutina *p*-hidroxibenzoil e o galhoilarbutina (Pawlowska *et al.*, 2006 e Fiorentino *et al.*, 2007). O galhato de etilo, composto hidrófilo derivado do ácido gálgico, é muito representativo nas folhas de *Arbutus unedo* L. (Rogosic *et al.*, 2006 e Fiorentino *et al.*, 2007), assim como a β -D-glucogalhina (Pawlowska *et al.*, 2006). A presença de flavonóides, nomeadamente glicosídeos derivados do canferol: afzelina (canferol 3-ramnósido), juglanina (canferol 3-arabinósido); glicosídeos da quercetina: quercitina (quercetina 3-ramnósido), hiperina (quercetina 3-galactósido), avicularina (quercetina 3-arabinofuranósido); glicosídeos de miricetina (miricetina 3-*O*- α -L-ramnopiranosido e miricetina 3-*O*- β -D-arabinofuranósido); e ainda a catequina, epicatequina e galhocatequina é considerável (Legssyer *et al.*, 2004 e Fiorentino *et al.*, 2007). Foi também detectada a presença de taninos condensados (Legssyer *et al.*, 2004).

Noutros tipos de extractos de folha de *Arbutus unedo* L. foram identificados outros compostos, sendo que no óleo essencial identificou-se predominantemente o α -tocoferol, o trans-2-decenal, o ácido hexadecanóico e o trans-2-undecenal (Kivçak e Mert, 2001) e nos extractos orgânicos identificou-se essencialmente iridóides glicosídicos (Fiorentino *et al.*, 2007).

A composição química dos frutos de *Arbutus unedo* L. é relativamente bem conhecida quando comparada à das folhas. Conforme Alarcão-E-Silva *et al.* (2001) e Garcia-Alonso *et al.* (2004), os frutos demonstram uma forte actividade antioxidante, razão suficientemente válida para que sejam utilizados regularmente na alimentação.

Os estudos fitoquímicos realizados com o fruto do *Arbutus unedo* L. revelaram a presença de vários açúcares, nomeadamente da frutose, glucose, sacarose e maltose; vitaminas (vitamina A, C, E e niacina (B₃)); carotenóides; ácidos orgânicos e compostos

fenólicos, principalmente flavonóides (Ayaz *et al.*, 2000; Alarcão-e-Silva *et al.*, 2001; Males *et al.*, 2006; Pawlowska *et al.*, 2006 e Pallauf *et al.*, 2008).

De acordo com os resultados obtidos por Alarcão-e-Silva *et al.* (2001), o teor em glucose e frutose aumenta com a maturação dos frutos, enquanto que o de sacarose mantém-se inalterado. Em relação aos ácidos orgânicos, o ácido quínico e o ácido málico apresentam valores semelhantes nos frutos verdes e maduros, enquanto o ácido fumárico foi apenas detectado na fase madura. Quanto às vitaminas, verificou-se uma duplicação do conteúdo de niacina e de β -caroteno na fase madura, enquanto a vitamina dominante, o ácido ascórbico, diminuiu, apresentando no entanto uma taxa superior à verificada em muitos frutos mais comuns.

A classe das antocianidinas tem uma presença significativa na constituição do medronho, podendo referir-se as proantocianidinas, entre as quais, a cianidina 3-*O*-galactoglucósido, a delphinidina 3-*O*-galactósido, a cianidina 3-*O*-galactósido, a cianidina 3-*O*-arabinósido e a cianidina 3-*O*-glucósido, sendo este último o composto mais abundante (Pawlowska *et al.*, 2006). O arbutósido também se encontra presente nos frutos de *Arbutus unedo* L. (Legssyer *et al.*, 2004), tendo ainda sido identificados ácidos fenólicos, nomeadamente, o ácido gálgico (mais abundante) e seus derivados, tais como o ácido 5-*O*-galhoilquínico, o ácido gálgico 4-*O*- β -D-glucopiranósido, o ácido 5-*O*-galhoilchiquímico e o ácido 3-*O*-galhoilchiquímico em extractos metanólicos de medronho (Pawlowska *et al.*, 2006).

O elevado teor de açúcares (42%) juntamente com o conteúdo em ácidos (8,62%) pode provavelmente explicar o sabor azedo-adocicado destes frutos. Por outro lado, o sabor adstringente do fruto imaturo poderá ser explicado pelo alto teor de taninos, visto que os fenóis totais diminuem até à fase madura, entre os quais os taninos (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001).

Atendendo à composição química da folha e fruto da espécie *Arbutus unedo* L. será de prever que esta espécie possua um considerável potencial antioxidante.

**III. O ERITRÓCITO COMO MODELO *IN VITRO* PARA A AVALIAÇÃO
DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE**

3.1. Características gerais do sangue

O sangue é o líquido contido num compartimento fechado, o aparelho circulatório, que o mantém em movimento regular e unidireccional, devido essencialmente às contracções rítmicas do coração sendo composto por células e fragmentos celulares envolvidos numa matriz líquida. As células e os fragmentos celulares são denominados de elementos figurados e a matriz líquida de plasma. O volume total de sangue num adulto é de 4 a 5 litros nas mulheres e 5 a 6 litros nos homens, ocupando os elementos figurados cerca de 45% e o plasma cerca de 55% desse volume (Figura 9) (Seeley *et al.*, 2003 e Junqueira e Carneiro, 2004).

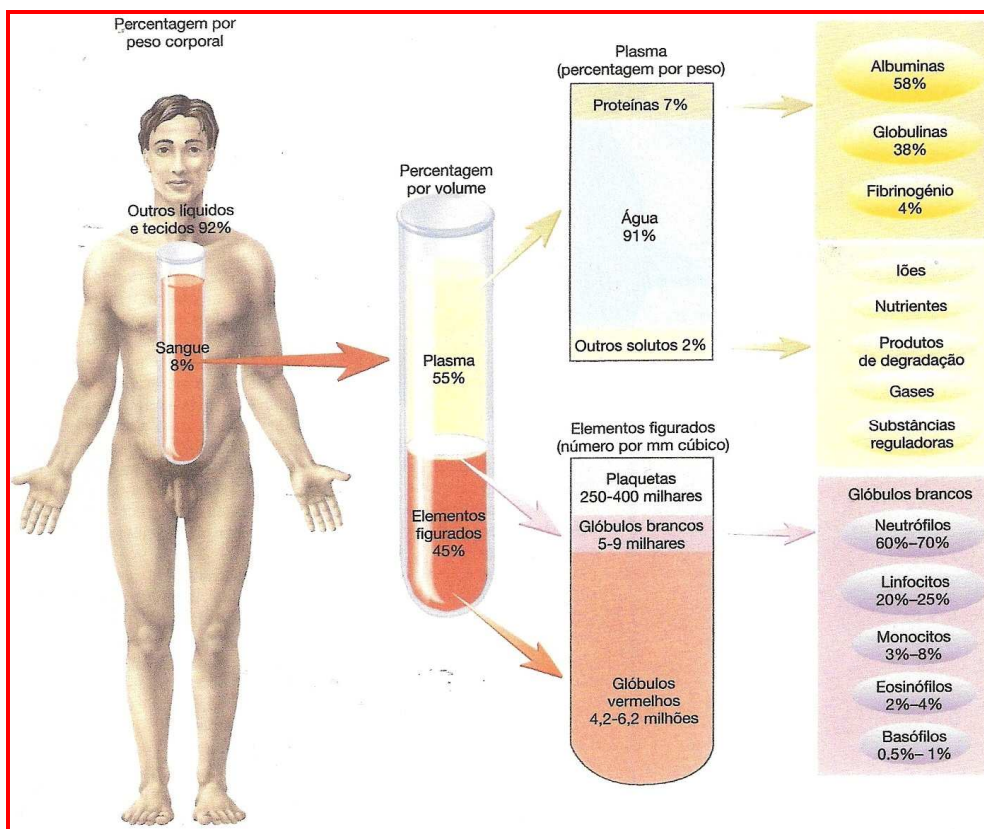


Figura 9. Composição do sangue e seus valores aproximados num adulto normal.

Fonte: Adaptado de Seeley *et al.*, 2003.

Aquando da centrifugação do sangue ocorre a separação dos vários constituintes, chamando-se hematócrito ao resultado obtido por essa sedimentação. No hematócrito, o plasma corresponde ao sobrenadante translúcido e amarelado, a camada inferior (35 a 50% do volume total do sangue) possui cor vermelha e corresponde aos eritrócitos, a

camada imediatamente superior à anterior (1% do volume de sangue) tem uma cor acinzentada e contém os leucócitos que são menos densos que os eritrócitos e sobre os leucócitos assenta uma fina camada de plaquetas que não é distinguível a olho nu (Junqueira e Carneiro, 2004).

O sangue ajuda na manutenção da homeostase corporal de diversas formas nomeadamente através do transporte de gases, nutrientes, produtos de degradação, moléculas processadas e moléculas reguladores, da regulação do pH e da osmose, da manutenção da temperatura corporal, da protecção contra substâncias estranhas e mediante a formação de coágulos que protegem da perda excessiva de sangue aquando da lesão vascular (Seeley *et al.*, 2003).

O plasma sendo a parte líquida do sangue constitui-se como um fluido amarelo pálido composto por cerca de 91% de água e 9% de outras substâncias como proteínas (albumina, globulinas e fibrinogénio), iões (sódio, potássio, cálcio magnésio, ferro, entre outros), nutrientes (glicose, aminoácidos, vitaminas), produtos de degradação (ureia, ácido úrico e outros), gases (oxigénio, dióxido de carbono, azoto) e substâncias reguladoras (enzimas e hormonas) e é uma substância coloidal, ou seja, é um líquido que contém as substâncias em suspensão (Seeley *et al.*, 2003 e Junqueira e Carneiro, 2004).

Quanto aos elementos figurados cerca de 95% do seu volume consiste em eritrócitos, também denominados de glóbulos vermelhos ou hemácias, sendo os restantes 5% compostos por glóbulos brancos ou leucócitos e fragmentos de células chamadas plaquetas (Figura 10). Os leucócitos são células claras ou esbranquiçadas, sem hemoglobina, mas com núcleo existindo cinco tipos diferentes: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos, sendo eles que constituem a primeira linha de defesa do sistema imune (Seeley *et al.*, 2003 e Liew *et al.*, 2006). As plaquetas são minúsculos fragmentos de células compostos por uma pequena quantidade de citoplasma envolvido por uma membrana plasmática. Têm forma de disco, medem cerca de 3 milímetros de diâmetro e possuem um tempo de semi-vida de 5 a 9 dias. As plaquetas possuem na sua superfície glicoproteínas e proteínas que permitem a sua fixação a outras moléculas. Dessa forma, têm um papel importante na prevenção das

perdas de sangue através da formação do rolhão plaquetário que realiza a oclusão das lesões dos vasos. Estas células são produzidas na medula óssea e derivam dos megacariócitos, que são células extremamente grandes, das quais, se soltam pequenos fragmentos que entram na circulação, as plaquetas (Seeley *et al.*, 2003). Considerando que este estudo foi realizado em eritrócitos humanos, estes serão abordados mais detalhadamente.

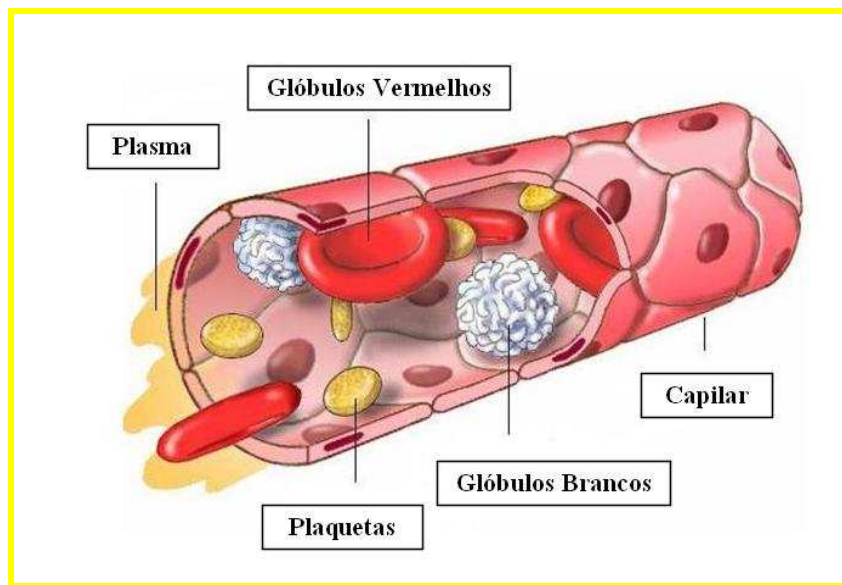


Figura 10. Vaso sanguíneo seccionado no qual aparecem os elementos figurados suspensos no plasma.

Fonte: Adaptado de www.misodor.com/SERIE%20VERMELHA.php.

3.1.1. O eritrócito

O eritrócito (Figura 11) é uma célula anucleada, apresentando uma forma em disco bicôncavo (a porção periférica é mais espessa que o centro da célula) com aproximadamente 7,5 μm de diâmetro e aproximadamente 2,6 μm de espessura na sua borda e 0,8 μm no centro quando presente numa solução isotónica, que não altera a sua conformação (Junqueira e Carneiro, 2004). Segundo Seeley *et al.* (2003), a sua forma bicôncava aumenta a área superficial do glóbulo vermelho, quando comparado a um disco plano do mesmo tamanho, o que facilita uma rápida entrada e saída dos gases na célula e ao mesmo tempo, esta configuração permite que se dobre sobre o seu centro, diminuindo o seu tamanho e tornando possível a sua passagem pelos vasos sanguíneos de pequeno calibre.



Figura 11. Eritrócito humano.

Fonte: Adaptado de http://www.netxplica.com/Verifica/EM_sangue.htm.

Estas células são cerca de 700 vezes mais numerosas que os leucócitos e 17 vezes mais que as plaquetas, tendo origem a partir de células altamente especializadas que perdem o núcleo e quase todos os seus organelos durante a maturação. Assim, o principal componente do eritrócito é a hemoglobina. A hemoglobina é uma proteína transportadora de oxigénio, que ocupa cerca de um terço do volume total da célula e é pigmentada, sendo, por isso, responsável pela cor vermelha dos eritrócitos. Na constituição destas células encontram-se também lípidos, adenosina trifosfato (ATP) e a enzima anidrase carbónica (Seeley *et al.*, 2003 e Junqueira e Carneiro, 2004).

A principal função dos eritrócitos é o transporte de oxigénio dos pulmões para os vários tecidos do corpo e do dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões. O transporte de oxigénio no sangue é 98,5% efectuado através da hemoglobina existente nos glóbulos vermelhos e 1,5% encontra-se dissolvido na água do plasma. O dióxido de carbono é transportado no sangue dissolvido no plasma (cerca de 7%), nas proteínas principalmente na hemoglobina (cerca de 23%) e sob a forma de iões de bicarbonato que representa cerca de 70% do transporte. Quando a membrana do eritrócito rompe, fenómeno designado de hemólise, a hemoglobina espalha-se para o plasma perdendo a sua função.

A hemoglobina é composta por quatro cadeias de polipeptídeos e quatro grupos heme, sendo cada cadeia polipeptídica denominada globina e ligada a um grupo heme (Figura 12). Cada grupo heme é uma molécula pigmentada de vermelho que contém um átomo de ferro, necessário para o funcionamento normal da hemoglobina, pois cada

molécula de oxigénio é transportada em associação com o átomo de ferro. O dióxido de carbono, por sua vez não se combina com os átomos de ferro para ser transportado pela hemoglobina, mas sim com os grupos amina presentes na molécula de globina (Seeley *et al.*, 2003).

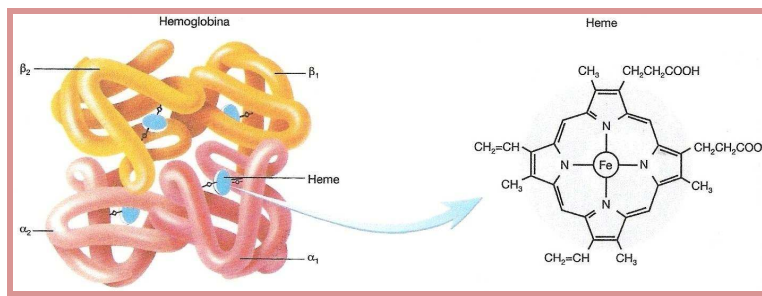


Figura 12. Representação das quatro cadeias polipeptídicas, cada uma com um grupo heme (realçado para se evidenciar o seu átomo de ferro), que formam a molécula de hemoglobina.

Fonte: Adaptado de Seeley *et al.* (2003).

A membrana eritrocitária é essencialmente constituída por lípidos (principalmente ácidos gordos insaturados) e proteínas e é fundamental para a manutenção da forma do eritrócito. Apresenta-se numa bicamada fosfolipídica que delimita a barreira entre o meio intracelular e extracelular, e que representa cerca de 50% da massa total do eritrócito. Deste modo, a membrana celular é uma barreira selectiva através da qual se processa a troca de substâncias e energia entre a célula e o meio externo (Murador e Deffune, 2007). A estrutura da membrana do eritrócito é baseada no modelo proposto e descrito por Singer e Nicolson em 1972 (Figura 13).

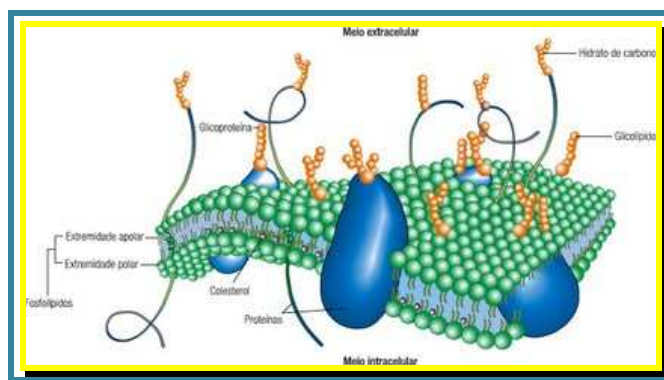


Figura 13. Estrutura e composição das membranas segundo o modelo do mosaico líquido.

Fonte: Adaptado de <http://sites.google.com/site/adescobertadacelula/que-mecanismos-garantem-a-obtencao-de-materia-pelos-seres-vivos/como-mobilizar-materia-do-meio-externo-para-o-meio-interno>.

A função e a integridade dos eritrócitos são afectadas pelo stress oxidativo, dessa maneira, estas células são utilizadas em diversos estudos relacionados com a composição e comportamento da membrana pois são células de fácil acesso, disponibilidade e preservação. A membrana eritrocitária é rica em ácidos gordos insaturados, sendo desta forma muito susceptível à peroxidação lipídica (Shiva *et al.*, 2007). Segundo Rohn *et al.* (1998) constata-se que uma mudança na permeabilidade da membrana eritrocitária leva ao aumento da peroxidação lipídica, à alteração da morfologia da célula (Shinar *et al.*, 1989) e à hemólise (Vissers *et al.*, 1994 e Zou *et al.*, 2001), diminuindo o tempo de semi-vida do eritrócito. Do mesmo modo, qualquer alteração à membrana destas células, quer seja a nível da sua composição ou estabilidade, pode constituir uma ferramenta de diagnóstico para diversas doenças, permitindo avaliar o comportamento da célula a alterações como o envelhecimento, o exercício físico, a alimentação, a exposição a pesticidas, entre outras situações (Ko *et al.*, 1997; Caprari *et al.*, 1999; Rabini *et al.*, 2002; Sivilotti, 2004; Kempaiah e Srinivasan *et al.*, 2006 e Batista *et al.*, 2007).

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.

IV. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Objectivo do trabalho

Este trabalho de investigação teve por objectivo avaliar a actividade antioxidante da espécie *Arbutus unedo* L. em sistemas biológicos. Para o efeito, o eritrócito humano foi usado como modelo *in vitro* para avaliação da actividade antioxidante, visto que a membrana dos eritrócitos é rica em ácidos gordos insaturados que são muito susceptíveis à peroxidação lipídica mediada por radicais livres (Shiva *et al.*, 2007). Pretende-se assim estudar o papel protector dos extractos aquosos obtidos de folhas e frutos de *Arbutus unedo* L. relativamente aos danos oxidativos induzidos por radicais livres em eritrócitos humanos. O 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH) foi utilizado neste estudo como sistema gerador de radicais livres (Niki, 1990). 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 (Shiva *et al.*, 2007). Os danos oxidativos foram avaliados pela percentagem de hemólise e pela extensão da peroxidação dos lípidos das membranas eritrocitárias.

4.2. Procedimento experimental

4.2.1. Preparação dos extractos

As folhas e frutos do *Arbutus unedo* L. foram colhidos no Parque Natural de Montesinho (Bragança, Nordeste de Portugal) em Janeiro de 2009. Estas amostras foram imediatamente congeladas e liofilizadas (Ly-8-FM-ULE, Snijders). Posteriormente, três subamostras (aproximadamente 5 g cada) foram extraídas em 250 mL de água a ferver durante 45 minutos. Seguidamente, os extractos foram liofilizados e armazenados num exsiccador ao abrigo da luz. O rendimento da extracção para as folhas e frutos foi de respectivamente $39,3 \pm 7,3\%$ e $57,4 \pm 1,2\%$.

4.2.2. Avaliação da actividade antioxidante usando como modelo celular os eritrócitos humanos

4.2.2.1. Preparação da suspensão de eritrócitos

O sangue venoso humano foi colhido em citrato (anticoagulante) de dadores saudáveis, não fumadores, após obtenção do consentimento informado (ver Anexo I). Para obter os eritrócitos empacotados centrifugou-se o sangue total (5 a 10 mL) a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. O plasma e a camada leucocitária (*buffy coat*) foram removidos por aspiração e os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução tampão de fosfato (PBS; pH 7,4), repetindo-se em cada lavagem a centrifugação nas condições referidas anteriormente. Após a última lavagem fez-se o volume com PBS de modo a obter uma suspensão eritrocitária com hematócrito 5,2% (0,52 mL de eritrócitos compactados + 9,48 mL de PBS).

4.2.2.2. Incubação com AAPH

Diversas substâncias oxidantes foram descritas em estudos anteriores como meio de desencadeamento do stress oxidativo em eritrócitos, sendo algumas delas: o peróxido de hidrogénio (Lii e Hung, 1997), o terc-butilhidroperóxido (Rice-Evans *et al.*, 1996 e Zou *et al.*, 2001), a primaquina (Grinberg e Samuni, 1994) e as hidrazinas (Biswas *et al.*, 2005). No entanto, a substância mais amplamente utilizada é o 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH) (Dai *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2000 e Shiva *et al.*, 2007).

O AAPH é um composto hidrossolúvel que origina radicais livres do tipo peroxilo por decomposição térmica (a 37° C) unimolecular em taxa constante (Figura 14). O AAPH origina radicais livres de modo dependente do tempo e da concentração (Zou *et al.*, 2001).

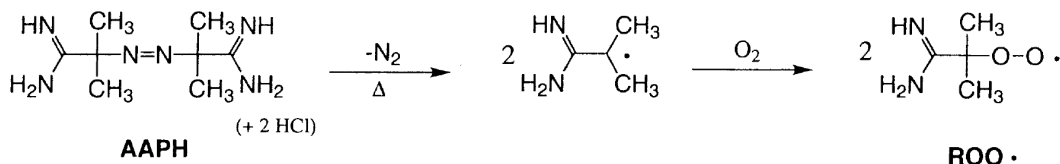


Figura 14. Reacção de oxidação do AAPH.

Fonte: Adaptado de Dunlap *et al.*, 2003.

Para avaliar o efeito protector da espécie *Arbutus unedo* L. foram estudadas várias concentrações do extracto da folha (100, 75 e 50 µg/mL) e do fruto (1600, 800 e 400 µg/mL).

Aos tubos de hemólise adicionou-se 500 µL da suspensão eritrocitária a 5,2% de modo a obter um hematócrito final de 2,0%, tendo em conta que o volume final nos tubos será de 1300 µL, sendo estes colocados a incubar a 37 °C durante 5 minutos. Após a incubação, adicionou-se os antioxidantes (extractos de folha e fruto de *Arbutus unedo* L. e ácido ascórbico) ou não, de acordo com as tabelas apresentadas abaixo, sendo os tubos pré-incubados a 37 °C durante 30 minutos.

As concentrações testadas dos extractos da folha do *Arbutus unedo* L. foram obtidas a partir de uma solução stock de 1000 µg/mL em PBS, da qual se retiraram 2,5 mL aos quais foram adicionados 7,5 mL de PBS obtendo-se assim uma solução de 250 µg/mL. A partir desta solução e, de acordo com a Tabela 2, obtiveram-se as concentrações finais nos tubos de 100, 75 e 50 µg/mL. A actividade hemolítica do extracto foi avaliada expondo as células à concentração mais alta estudada (100 µg/mL), na ausência de AAPH (controlo do extracto).

Tabela 2. Tabela usada na preparação dos tubos de hemólise para o ensaio da actividade anti-hemolítica da folha de *Arbutus unedo* L.

	Eritrócito	Extracto	PBS	AAPH	Vf
Controlo	500 µL	-----	800 µL	-----	1300 µL
AAPH	500 µL	-----	670 µL	130 µL	1300 µL
C 100 µg/mL	500 µL	520 µL	150 µL	130 µL	1300 µL
C 75 µg/mL	500 µL	390 µL	280 µL	130 µL	1300 µL
C 50 µg/mL	500 µL	260 µL	410 µL	130 µL	1300 µL
Controlo extracto	500 µL	520 µL	280 µL	-----	1300 µL

As concentrações testadas dos extractos do fruto de *Arbutus unedo* L. foram obtidas a partir de uma solução stock de 25 mg/mL em PBS, da qual se retiraram 2.000 µL aos quais foram adicionados 10.500 µL de PBS obtendo-se assim uma solução mãe de 4000 µg/mL, a partir da qual se prepararam as concentrações finais de 1600, 800 e 400 µg/mL (Tabela 3). Do mesmo modo, a actividade hemolítica do extracto de fruto foi avaliada expondo as células à concentração mais alta estudada (1600 µg/mL), na ausência de AAPH (controlo do extracto).

Tabela 3. Tabela usada na preparação dos tubos de hemólise para o ensaio da actividade anti-hemolítica do fruto de *Arbutus unedo* L.

	Eritrócito	Extracto	PBS	AAPH	Vf
Controlo	500 µL	-----	800 µL	-----	1300 µL
AAPH	500 µL	-----	670 µL	130 µL	1300 µL
C 1600 µg/mL	500 µL	520 µL	150 µL	130 µL	1300 µL
C 800 µg/mL	500 µL	260 µL	410 µL	130 µL	1300 µL
C 400 µg/mL	500 µL	130 µL	540 µL	130 µL	1300 µL
Controlo extracto	500 µL	130 µL	670 µL	-----	1300 µL

Findo o tempo de pré-incubação, adicionou-se (amostras) ou não (controlos) o oxidante AAPH, de acordo com as tabelas acima apresentadas, de modo a obter a

concentração final de AAPH de 50 mM. Os tubos de hemólise foram depois incubados durante 4 horas, a 37°C, com agitação suave e constante e ao abrigo da luz.

Neste estudo o ácido ascórbico foi utilizado como antioxidante de referência, com o qual será comparado o efeito protector das amostras de *Arbutus unedo* L. Para tal, a partir de uma solução stock de 1 mg/mL de ácido ascórbico em PBS, preparou-se uma solução de 250 µg/mL. A partir desta solução e, de acordo com a Tabela 4, foram realizadas diluições nos tubos para obter soluções com as concentrações finais de 100, 50 e 25 µg/mL.

Tabela 4. Tabela usada na preparação dos tubos de hemólise para o ensaio da actividade anti-hemolítica do ácido ascórbico

	Eritrócito	Extracto	PBS	AAPH	Vf
Controlo	500 µL	-----	800 µL	-----	1300 µL
AAPH	500 µL	-----	670 µL	130 µL	1300 µL
C 100 µg/mL	500 µL	520 µL	150 µL	130 µL	1300 µL
C 50 µg/mL	500 µL	260 µL	410 µL	130 µL	1300 µL
C 25 µg/mL	500 µL	130 µL	540 µL	130 µL	1300 µL

4.2.2.3. Avaliação da % de hemólise

Durante as 4 horas de incubação, com intervalos de 1 hora, retiraram-se duas alíquotas de 50 µL de cada tubo. Uma das alíquotas é adicionada a 950 µL de água (B) e a outra a 950 µL de soro fisiológico (A), em eppendorfs previamente colocados no gelo (4°C) de modo a parar a hemólise. De seguida, centrifugou-se os eppendorfs a 4.000 rpm durante 10 minutos, removendo-se depois cerca de 300 µL do sobrenadante para uma placa de 96 poços, de modo a proceder-se à leitura da absorvância a 545 nm no leitor de placas. A % de hemólise é calculada a partir da razão entre as duas leituras, ou seja, % hemólise = (A/B) x 100. A concentração de extracto que inibe 50% da hemólise (IC₅₀) ao fim de três horas foi calculada através do traçado do gráfico da percentagem de inibição de hemólise em função da concentração de extracto. Para estes cálculos foram realizados 4-6 ensaios independentes.

4.2.2.4. Avaliação da extensão da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é um processo mediado por radicais livres. Numa situação de stress oxidativo pode haver falência dos mecanismos de defesa antioxidantes endógenos com formação de espécies reactivas de oxigénio, capazes de desencadear o ataque oxidativo aos lípidos poliinsaturados das membranas eritrocitárias. A consequente fragmentação dá origem a hidrocarbonetos como o etanol e a aldeídos como o 4-hidroxinonal e o malonildialdeído (MDA). Este método tem como princípio a reacção de uma molécula de malonildialdeído com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) com formação de um complexo MDA-(TBA)₂ que é quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (HPLC-UV), de acordo com a técnica desenvolvida por Soares *et al.* (2004). Foram realizados ensaios para várias concentrações dos extractos da folha e fruto, assim como para o padrão 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), obtendo-se através deste a curva de calibração padrão. Os resultados foram calculados como mM equivalente a MDA. O IC₅₀ foi calculado pela curva de calibração obtida através da percentagem de peroxidação lipídica em função da concentração de extracto. Os valores percentuais de inibição foram calculados considerando como 100% o valor da peroxidação lipídica induzida pelo AAPH na ausência de extracto. Para estes cálculos foram realizados quatro ensaios independentes.

Para avaliar a extensão da peroxidação lipídica, os eritrócitos humanos foram mantidos nas condições experimentais descritas anteriormente para a determinação da % de hemólise com excepção da utilização de uma suspensão eritrocitária com um hematócrito inicial de 13,52%. Os tubos de hemólise foram incubados durante 3 horas. No final da incubação, retiraram-se alíquotas de 250 µL para eppendorfs, às quais adicionou-se 25 µL de butilhidroxitolueno (BHT) a 0,2%, e 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 1% previamente colocado no gelo (4 °C). As amostras foram agitadas no vórtex e depois centrifugadas em centrífuga refrigerada a 10.000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, retirou-se 500 µL de sobrenadante para outro eppendorf, sendo adicionado 500 µL de ácido tiobarbitúrico a 1%. Os eppendorfs foram agitados no vórtex e colocados num banho de água fervente (95 °C) durante 45 minutos.

Após este período os eppendorfs foram arrefecidos em gelo (4 °C), centrifugados em centrífuga refrigerada a 10.000 rpm durante 5 minutos e 50 µL do sobrenadante foram injectados no HPLC (Hewlett Packard 1100 series) com detector UV a 532 nm. A separação cromatográfica realizou-se através de uma coluna Spherisorb C18 ODS2 (5 µm; 4,6 x 250 mm) da Waters Corporation e a fase móvel utilizada foi acetato de amónio 0,05 M: metanol (60:40), com fluxo de 0,7 mL/min. Paralelamente, preparou-se uma curva de calibração com diferentes concentrações do padrão 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) (10, 5, 2, 1, 0,5 e 0,25 µM em etanol a 40%), procedendo-se de forma idêntica à descrita para as amostras com excepção das centrifugações que para os padrões não se executam.

V. RESULTADOS

5.1. Efeito protector da espécie *Arbutus unedo* L. na hemólise induzida pelo AAPH

5.1.1. Extracto aquoso da folha de *Arbutus unedo* L.

Na tabela seguinte são apresentados os valores da percentagem de hemólise nas células incubadas com as diferentes concentrações do extracto de folha de *Arbutus unedo* L. obtidos em 6 ensaios independentes.

Tabela 5. Resultados obtidos para a percentagem de hemólise do extracto da folha de *Arbutus unedo* L.

	Tempo (h)			
	1	2	3	4
Controlo	1,80	2,30	3,80	7,20
	1,38	7,23	1,78	4,76
	1,83	2,86	6,83	2,71
	2,06	2,43	2,22	2,12
	4,01	3,59	4,01	3,19
	3,85	3,53	5,29	4,20
Média	2,49	3,66	3,99	4,03
SD	1,14	1,83	1,89	1,83
AAPH	4,10	62,20	96,00	98,90
	2,74	43,09	88,00	90,00
	1,39	35,91	87,68	88,59
	2,36	81,46	91,36	91,00
	4,27	40,00	92,68	87,33
	4,60	68,20	87,73	89,55
Média	3,24	55,14	90,58	90,90
SD	1,27	18,21	3,39	4,12
FOLHA 100 ug/mL	4,10	11,20	18,50	31,10
	2,93	9,14	17,40	27,30
	5,58	15,82	16,61	17,09
	7,20	8,24	21,68	29,86
	6,37	10,47	36,71	43,61
	6,00	17,13	23,73	44,19
Média	5,36	12,00	22,44	32,19
SD	1,57	3,64	7,49	10,32
FOLHA 75 ug/mL	2,40	12,88	30,19	63,03
	2,40	12,88	30,19	63,03
	2,40	12,88	30,19	63,03
	5,43	7,89	23,42	65,63
	7,01	7,81	31,48	42,98
	6,03	8,39	31,23	81,07
Média	4,28	10,46	29,45	63,13
SD	2,12	2,67	3,01	12,12
FOLHA 50 ug/mL	2,40	3,70	70,80	90,00
	1,91	2,79	84,39	90,91
	1,61	19,57	81,62	86,51
	3,98	7,19	73,00	87,98
	7,00	15,57	33,84	53,85
	6,06	9,12	77,67	89,15
Média	3,83	9,66	70,22	83,07
SD	2,27	6,67	18,54	14,40
Controlo do Extracto			3,00	

Estes resultados são seguidamente apresentados na forma de gráfico (Gráfico 1). Cada valor representa a média \pm SD de seis ensaios independentes. *Representa resultados significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo AAPH, nos respectivos tempos. #Representa resultados significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controlo, nos respectivos tempos.

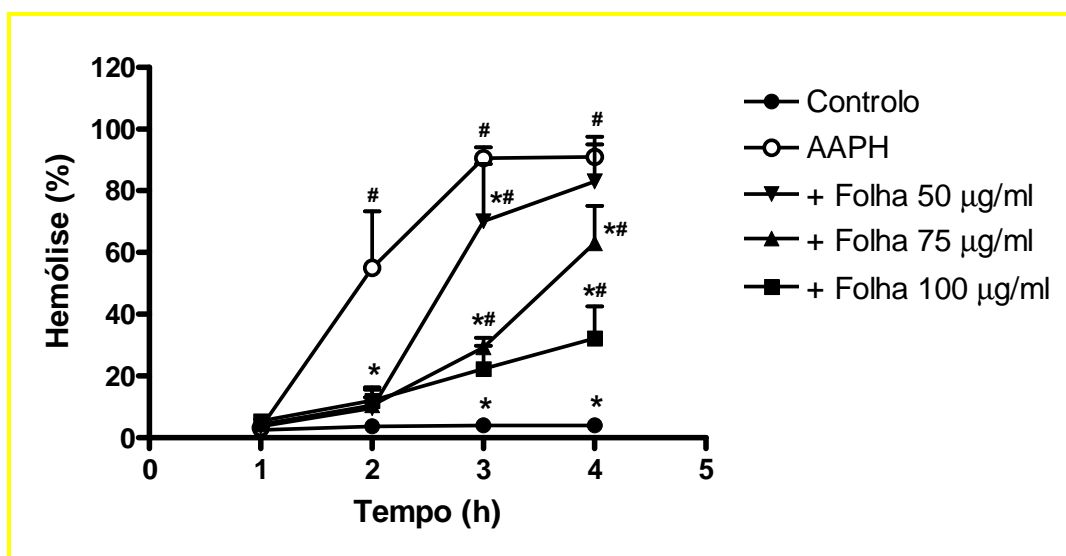


Gráfico 1. Representação gráfica do efeito protector da folha de *Arbutus unedo* L. na hemólise induzida pelo AAPH.

Para o cálculo da concentração inibitória 50 (IC_{50}), ou seja, a concentração de extracto que inibe 50% da hemólise induzida pelo AAPH, determinou-se a percentagem de inibição de hemólise para cada concentração de extracto ao tempo 3 horas, tal como apresentado na tabela seguinte.

Tabela 6. Resultados obtidos para a percentagem de inibição da hemólise do extracto da folha de *Arbutus unedo* L.

	% hemólise	-Controlo	% inibição
Controlo	3,8		
	1,8		
	6,8		
	2,2		
	4,0		
	5,3		
AAPH	96,0	92,2	
	88,0	86,2	
	87,7	80,9	
	91,4	89,1	
	92,7	88,7	
	87,7	82,4	
FOLHA 100 ug/mL	18,5	14,7	84,1
	17,4	15,6	81,9
	16,6	9,8	87,9
	21,7	19,5	78,2
	36,7	32,7	63,1
	23,7	18,4	77,6
FOLHA 75 ug/mL	30,2	26,4	71,4
	30,2	28,4	67,1
	30,2	23,4	71,1
	23,4	21,2	76,2
	31,5	27,5	69,0
	31,2	25,9	68,5
FOLHA 50 ug/mL	70,8	67,0	27,3
	84,4	82,6	4,2
	81,6	74,8	7,5
	73,0	70,8	20,6
	33,8	29,8	66,4
	77,7	72,4	12,2

Em seguida, traçou-se o gráfico da % inibição de hemólise *versus* a concentração de extracto para cada ensaio independente (Tabela 7 e Gráfico 2).

Tabela 7. Tabela representativa do IC₅₀ da folha de *Arbutus unedo* L.

	Concentração µg/mL	% inibição hemólise
	100	84,1
	75	71,4
	50	27,3
IC₅₀		
	0,062 mg/mL	

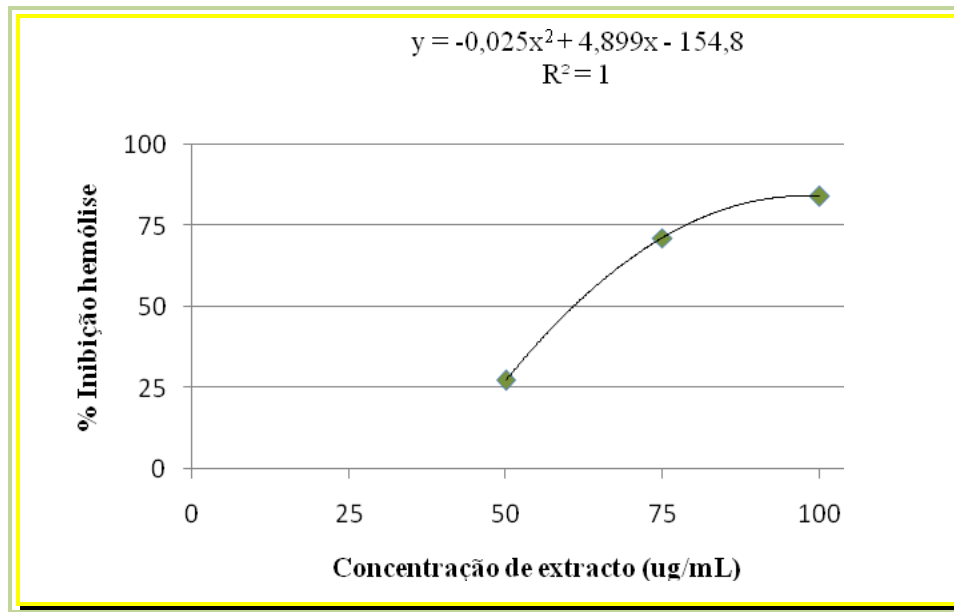


Gráfico 2. Gráfico representativo do cálculo do IC₅₀ da folha de *Arbutus unedo* L.

O valor de IC₅₀ calculado para o extracto da folha foi de $0,062 \pm 0,002$ mg/mL.

5.1.2. Extracto aquoso do fruto de *Arbutus unedo* L.

Na tabela seguinte são apresentados os valores da percentagem de hemólise nas células incubadas com as diferentes concentrações do extracto do fruto de *Arbutus unedo* L. obtidos em 4 ensaios independentes.

Tabela 8. Resultados obtidos para a percentagem de hemólise do fruto de *Arbutus unedo* L.

	Tempo (h)			
	1	2	3	4
Controlo	4,01	3,59	4,01	3,19
	3,85	3,53	5,29	4,20
	3,54	3,79	3,18	3,73
	2,39	3,96	2,39	1,62
Média	3,45	3,72	3,72	3,19
SD	0,73	0,20	1,24	1,12
AAPH	4,27	40,00	92,68	87,33
	4,60	68,20	87,73	89,55
	6,01	83,86	93,33	87,07
	5,20	68,80	91,82	86,02
Média	5,02	65,21	91,39	87,49
SD	0,76	18,30	2,52	1,48
FRUTO 1600 ug/mL	2,00	1,80	0,92	4,27
	2,70	3,26	2,55	3,93
	2,00	1,54	1,39	3,93
	2,82	1,74	3,16	3,00
Média	2,38	2,09	2,00	3,78
SD	0,44	0,79	1,03	0,55
FRUTO 800 ug/mL	2,00	1,82	10,01	60,61
	1,69	1,82	6,65	43,48
	1,21	2,07	9,57	54,49
	1,37	2,47	13,42	62,02
Média	1,57	2,05	9,91	55,15
SD	0,35	0,31	2,78	8,44
FRUTO 400 ug/mL	2,41	1,69	40,35	83,86
	3,27	4,91	50,31	86,59
	2,29	3,13	49,84	82,87
	1,81	6,01	65,80	88,51
Média	2,45	3,93	51,57	85,45
SD	0,61	1,91	10,54	2,57
Controlo do Extracto			2,40	

Estes resultados são seguidamente apresentados na forma de gráfico. Cada valor representa a média \pm SD de quatro ensaios independentes. *Representa resultados significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo AAPH, nos respectivos tempos. #Representa resultados significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controlo, nos respectivos tempos.

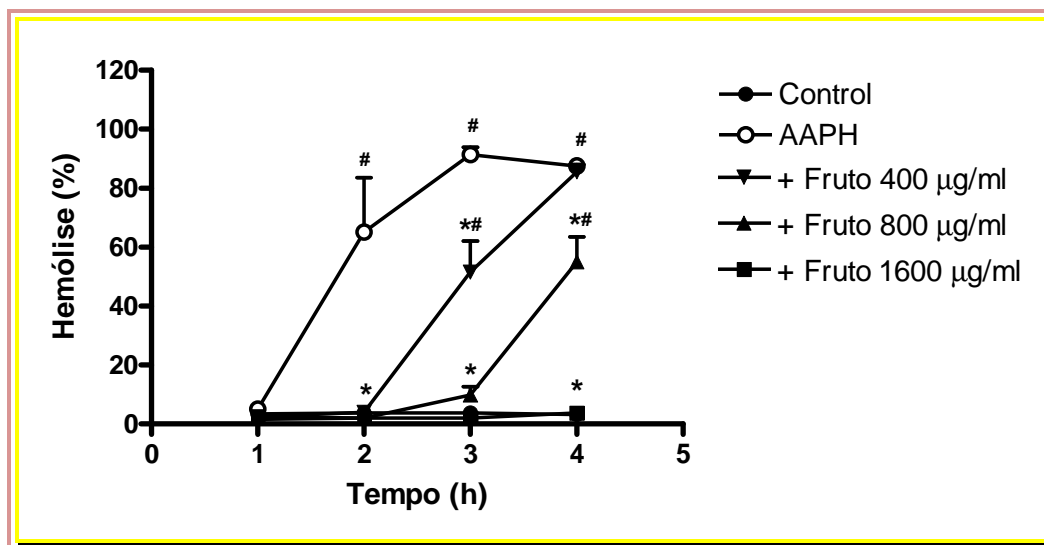


Gráfico 3. Representação gráfica do efeito protector do fruto de *Arbutus unedo* L. na hemólise induzida pelo AAPH.

Para o cálculo do IC_{50} determinou-se a percentagem de inibição de hemólise para cada concentração de extracto ao tempo 3 horas, tal como apresentado na tabela seguinte.

Tabela 9. Resultados obtidos para a percentagem de inibição da hemólise do extracto do fruto de *Arbutus unedo* L.

	% hemólise	-Controlo	% inibição
Controlo	4,0		
	4,0		
	3,2		
	2,4		
AAPH	92,7	88,7	
	87,7	83,7	
	93,3	90,2	
	91,8	89,4	
FRUTO 1600 ug/mL	0,9	0,0	100,0
	2,5	0,0	100,0
	1,4	0,0	100,0
	3,2	0,8	99,1
FRUTO 800 ug/mL	10,0	6,0	93,2
	6,6	2,6	96,8
	9,6	6,4	92,9
	13,4	11,0	87,7
FRUTO 400 ug/mL	40,3	36,3	59,0
	50,3	46,3	44,7
	49,8	46,7	48,2
	65,8	63,4	29,1

Em seguida, traçou-se o gráfico da % inibição de hemólise *versus* a concentração de extracto para cada ensaio independente (Tabela 10 e Gráfico 4).

Tabela 10. Tabela representativa do IC₅₀ do fruto do *Arbutus unedo* L.

	Concentração µg/mL	% inibição hemólise
	1600	100,0
	800	93,2
	400	59,0
IC ₅₀		
	0,337 mg/mL	

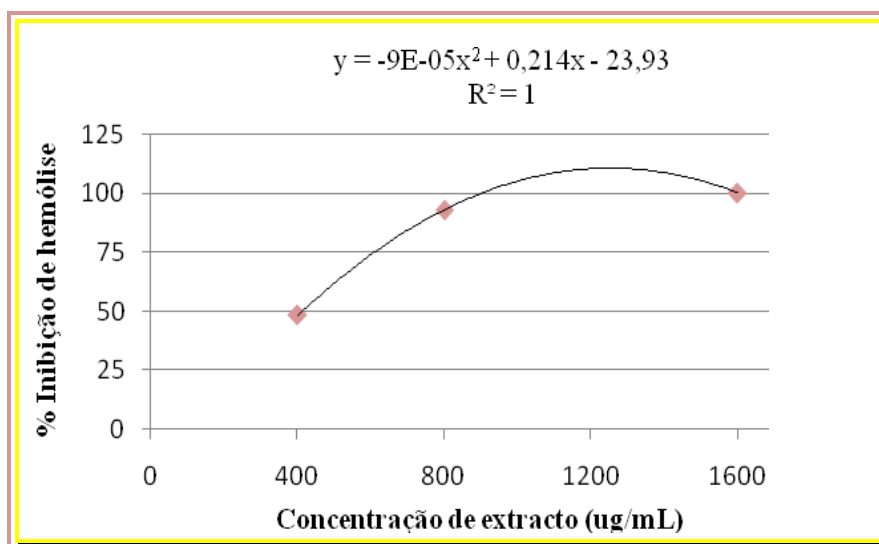


Gráfico 4. Gráfico representativo do IC₅₀ do fruto de *Arbutus unedo* L.

O valor de IC₅₀ calculado para o extracto do fruto foi de $0,337 \pm 0,047$ mg/mL.

5.1.3. Ácido ascórbico

Neste estudo, o ácido ascórbico foi usado como antioxidante de referência. Na tabela seguinte apresentam-se os valores de hemólise obtidos para as diferentes concentrações de ácido ascórbico ao tempo 3 horas, bem como os valores da % de inibição da hemólise.

Tabela 11. Resultados obtidos para a percentagem de hemólise do ácido ascórbico.

	% Hemólise	-Controlo	% Inibição
Controlo	10,1		
	5,9		
	4,3		
	11,1		
AAPH	81,1	71,0	
	81,8	75,9	
	81,5	77,1	
	76,5	65,4	
AA 100 ug/mL	12,5	2,4	96,6
	5,8	-0,1	100,1
	4,4	0,1	99,8
	9,1	-2,0	103,0
AA 50 ug/mL	10,1	0,1	99,9
	8,8	2,9	96,2
	11,1	6,8	91,2
	9,4	0,0	100,0
AA 25 ug/mL	49,5	39,4	44,5
	44,8	38,9	48,8
	67,8	63,5	17,7
	54,2	43,1	34,0

O valor do IC₅₀ determinado para o ácido ascórbico foi de 0,031 ± 0,005 mg/mL.

6.2. Efeito protector da espécie *Arbutus unedo* L. na peroxidação lipídica induzida pelo AAPH

Na tabela seguinte são apresentados os valores da área do pico para as diferentes concentrações do padrão TEP testadas.

Tabela 12. Valores obtidos de área de pico para os padrões de TEP.

TEP (uM)	Área pico
10	643,4
5	320,5
2	99,8
1	57,5
0,5	43,7
0,25	26,1

Em seguida, traçou-se o gráfico da área do pico *versus* a concentração de padrão TEP (Gráfico 5).

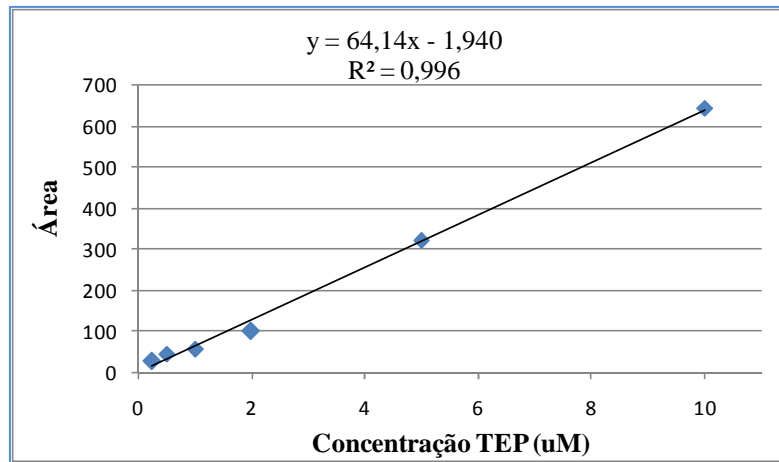


Gráfico 5. Representação gráfica da área do pico em função da concentração do padrão TEP.

Na tabela 13 apresentam-se as áreas obtidas após integração dos picos cromatográficos e o cálculo das concentrações de MDA com base na curva de calibração anteriormente apresentada.

Tabela 13. Resultados obtidos para a concentração de MDA.

	Área	Área (-branco)	uM	% Inibição
Controlo	41,80	2,10	0,02	
	44,80	5,10	0,07	
	42,00	2,30	0,02	
	42,87	3,17	0,03	
MÉDIA			0,03	
SD			0,02	
AAPH	130,80	91,10	1,45	
	124,30	84,60	1,35	
	122,40	82,70	1,32	
	125,83	86,13	1,37	
MÉDIA			1,37	
SD			0,06	
Folha (100 µg/mL)	70,20	30,50	0,48	67,302
	72,20	32,50	0,51	62,364
	72,90	33,20	0,52	60,630
	71,77	32,07	0,50	63,551
MÉDIA			0,50	
SD			0,02	
Folha (75 µg/mL)	83,50	43,80	0,69	52,531
	84,50	44,80	0,71	47,641
	74,60	34,90	0,55	58,548
	80,87	41,17	0,65	52,855
MÉDIA			0,65	
SD			0,07	
Folha (50 µg/mL)	87,90	48,20	0,76	47,644
	95,40	55,70	0,88	34,593
	91,50	51,80	0,82	37,848
	91,60	51,90	0,82	40,239
MÉDIA			0,82	
SD			0,05	
Fruto (1600 µg/mL)	77,20	37,50	0,59	59,528
	78,50	38,80	0,61	54,823
	74,30	34,60	0,54	58,916
	76,67	36,97	0,58	57,792
MÉDIA			0,58	
SD			0,03	
Fruto (800 µg/mL)	83,20	43,50	0,68	52,864
	87,60	47,90	0,76	43,930
	72,90	33,20	0,52	60,630
	81,23	41,53	0,65	52,424
MÉDIA			0,65	
SD			0,10	
Fruto (400 µg/mL)	89,40	49,70	0,78	45,978
	89,10	49,40	0,78	42,134
	80,30	40,60	0,64	51,567
	86,27	46,57	0,73	46,508
MÉDIA			0,73	
SD			0,07	

Estes resultados são seguidamente apresentados na forma de gráfico (Gráfico 6). Cada valor representa a média \pm SD de três ensaios independentes. *Representa resultados significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo AAPH, nos respectivos tempos. #Representa resultados significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controlo, nos respectivos tempos.

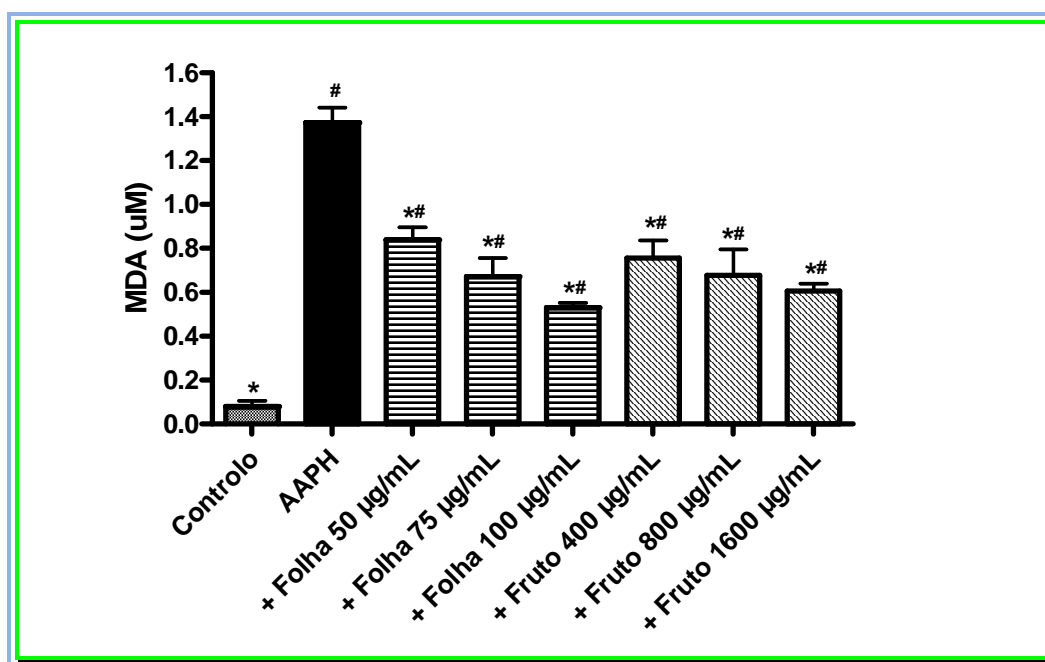


Gráfico 6. Representação gráfica da extensão da peroxidação lipídica versus a concentração de extracto.

Para o cálculo do IC_{50} determinou-se a percentagem de inibição da peroxidação lipídica para cada concentração de extracto ao tempo 3 horas, tal como apresentado na tabela 14.

Tabela 14. Resultados obtidos para a % de inibição da peroxidação lipídica para os extractos da folha e fruto de *Arbutus unedo* L.

Concentração (µg/mL)	% Inibição da peroxidação lipídica				Média	SD
FOLHA 50	40,03	47,64	34,59	37,85		
FOLHA 75	52,91	52,53	47,64	58,55		
FOLHA 100	63,43	67,30	62,36	60,63		
IC₅₀	62,20	83,21	83,40	58,50	75,04	14,32
FRUTO 400	46,56	45,98	42,13	51,57		
FRUTO 800	52,47	52,86	43,93	60,63		
FRUTO 1600	57,76	59,53	54,82	58,92		
IC₅₀	617,96	611,42	1232,98	353,64	732,68	452,04

Os valores de IC_{50} , definida como a quantidade de extracto que inibe 50% da peroxidação lipídica causada pelo AAPH, calculados para os extractos da folha e fruto de *Arbutus unedo* L. foram de $0,075 \pm 0,014$ e $0,732 \pm 0,452$ mg/mL, respectivamente.

VI. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os compostos antioxidantes da dieta têm particular interesse devido à “teoria do stress oxidativo”, a qual assume que os danos oxidativos nas células causados pelos radicais livres e outros oxidantes são responsáveis pela iniciação e progressão do envelhecimento e de doenças degenerativas como o cancro, aterosclerose, diabetes, anemia hemolítica, doença de Alzheimer, catarata, entre outras (Sorg, 2004; Atoui *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007; Negre-Salvayre *et al.*, 2008).

De forma a elucidar a importância biológica da actividade antioxidante da espécie *Arbutus unedo* L. foi usado neste estudo um modelo celular baseado no eritrócito humano. O dano oxidativo induzido pelo AAPH nos eritrócitos humanos tem sido extensivamente estudado como modelo para a danificação peroxidativa nas membranas biológicas (Zou *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2009; Magalhães *et al.*, 2009 e Carvalho *et al.*, 2010). O AAPH gera radicais livres do tipo peróxido ($\text{ROO}\cdot$) no meio extracelular, os quais atacam a membrana eritrocitária causando várias alterações oxidativas, as quais foram avaliadas neste estudo pela percentagem de hemólise e pela peroxidação dos lípidos da membrana dos eritrócitos.

Os eritrócitos humanos foram incubados com os extractos aquosos da folha e fruto de *Arbutus unedo* L. na presença e ausência de AAPH. Os gráficos 2 e 3 mostram o efeito anti-hemolítico dos extractos da folha (50-100 $\mu\text{g/mL}$) e do fruto (400-1600 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Verificou-se que o grupo controlo (suspensão eritrocitária em tampão fosfato sem adição de AAPH e incubada a 37°C) manteve-se estável, com uma percentagem de hemólise reduzida ($3,5 \pm 0,7\%$) ao longo das quatro horas de incubação. No entanto, 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 os antioxidantes endógenos do eritrócito, principalmente 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 que induzem a hemólise (Zou *et al.*, 2001). Quanto ao grupo controlo do extracto (eritrócitos incubados com a maior concentração testada de cada extracto na ausência de AAPH) verificou-se que a percentagem de hemólise obtida foi semelhante à do grupo controlo ($3,0 \pm 0,0\%$ para o extracto da folha e $2,4 \pm 0,0\%$ para o extracto do fruto).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que ambos os extractos protegem significativamente a membrana dos eritrócitos da hemólise induzida pelo AAPH, de um modo dependente da concentração de extracto e do tempo de incubação. No entanto, o extracto da folha apresentou um efeito anti-hemolítico significativamente superior ao do fruto, sendo o valor de IC₅₀ determinado para o extracto da folha após três horas de incubação de $0,062 \pm 0,002$ mg/mL e de $0,377 \pm 0,047$ mg/mL para o fruto. Dada a reconhecida actividade antioxidante do ácido ascórbico, a actividade anti-hemolítica dos extractos de *Arbutus unedo* L. foi comparada com a do ácido ascórbico (IC₅₀ de $0,031 \pm 0,005$ mg/mL), tendo-se verificado um efeito antioxidante menos potente para os extractos. Tanto quanto sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar o potencial antioxidante da espécie *Arbutus unedo* L. neste modelo celular.

Os polifenóis são sobejamente reconhecidos como eficientes sequestradores de radicais livres (Bors *et al.*, 1990 e Nanjo *et al.*, 1996). Estes fitoquímicos 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 e Arora *et al.*, 1998). Portanto, os compostos fenólicos da espécie *Arbutus unedo* L. presentes na suspensão eritrocitária muito provavelmente sequestram os radicais peróxido formados durante a incubação, interrompendo desta forma a propagação em cadeia dos radicais peróxido e evitando o ataque destes às membranas dos eritrócitos, ricas em ácidos gordos poliinsaturados, e com isto inibindo a peroxidação lipídica e conseqüente hemólise. Os nossos resultados encontram-se de acordo com outros estudos que mostram a capacidade dos polifenóis de proteger os eritrócitos do stress oxidativo ou o aumento da resistência dos eritrócitos aos danos causados pelos oxidantes (Youdim *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2009; Magalhães *et al.*, 2009 e Carvalho *et al.*, 2010). Esta actividade antioxidante da folha e fruto de *Arbutus unedo* L. pode não se dever apenas aos compostos fenólicos, mas ao resultado de diferentes fitoquímicos presentes que poderão ter efeito aditivo ou sinérgico.

A membrana lipídica dos eritrócitos quando sujeita a um considerável stress oxidativo perde um átomo de hidrogénio da cadeia de ácidos gordos insaturados iniciando-se a peroxidação lipídica que se propaga numa reacção em cadeia. Neste

estudo, a extensão da peroxidação lipídica foi avaliada pela formação de malonildialdeído (MDA), que é conhecido como um produto carbonilo do dano lipídico oxidativo (Esterbauer *et al.*, 1991). Verificou-se que a quantidade de MDA no grupo controlo ao tempo três horas foi baixa ($0,049 \pm 0,014$ mM) (Gráfico 6). Como esperado, o nível de MDA aumentou significativamente (de 1638%) após incubação com AAPH quando comparado ao respectivo controlo. Sob a acção oxidativa do AAPH, os eritrócitos humanos tratados com os extractos desta planta diminuíram significativamente a acção do AAPH ($P < 0,05$) de um modo dependente da concentração de extracto. O tratamento com os extractos da folha e do fruto na maior concentração testada após três horas de incubação reduziu os níveis de MDA em 61% e 56%, respectivamente, nos eritrócitos expostos ao AAPH. Os valores de IC_{50} para os extractos da folha e do fruto de *Arbutus unedo* L. foram de $0,075 \pm 0,014$ e $0,732 \pm 0,452$ mg/mL, respectivamente.

Em conclusão, os nossos resultados indicam que a espécie *Arbutus unedo* L., particularmente a folha, apresenta um considerável potencial antioxidante e sequestrador de radicais livres, o que sugere a sua eventual aplicação na prevenção e/ou tratamento de diversas situações patológicas em que os radicais livres estão envolvidos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afkir, S., Nguielefack, T. B., Aziz, M., Zoheir, J., Cuisinaud, G., Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer A., Lahlou, S. e Ziyat, A. (2008). *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats: Part I: Cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME-induced hypertensive rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 116 (2), pp. 288-295.

Alarcão-E-Silva, M. L. C. M. M., Leitão, A. E. B., Azinheira, H. G. e Leitão, M. C. A. (2001). The *Arbutus* Berry: Studies on its Color and Chemical Characteristics at Two Mature Stages, *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, pp. 27-35.

Arora, A., Nair, M. G. e Strasburg, G. M. (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.

Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G. e Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, pp 27-36.

Ayaz, F. A., Kucukislamoglu, M. e Reunanen, M. (2000). Sugar, Non-volatile and Phenolic Acids Composition of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) Fruits, *Journal of Food Composition and Analysis*, 13 (2), pp. 171-177.

Batista, M. T. A., Rodrigues, H. G., Fonseca, L. C., Bonetti, A. M., Penha-Silva, N., Neres, A., C. e Aversi-Ferreira, T. A. (2006). Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3 (2), pp. 22-24.

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.

Bors, W., Heller, W., Michel, C. e Saran, M. (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymology*, 186, pp. 343-355.

Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Ziyat, A., Aziz, M., Legssyer, A. e Mekhfi, H. (2010). Antidiabetic effect of some medicinal plants of Oriental Morocco in neonatal non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. *Human Experimental Toxicology* (in press).

Bourne, L. C. e Rice-Evans, C. A. (1999). Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in human: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. *Methods in Enzymology*, 299, pp. 91-106.

Brickell, C. (1999). *The Royal Horticultural Society: New Encyclopedia of plants and flowers*. 3ª Edição. London, Dorling Kindersley, pp. 93.

Brosse J. (2010) *Larousse des Arbres: Dictionnaire des arbres et des arbustes*. Larousse.

Burnie, G., Forrester, S. e et al. (2004). *Botanica: The illustrated A-Z of over 10,000 garden plants and how to cultivate them*. 4ª Edição. Könemann, pp. 105-106.

Cabral, F., C. e Telles, G., R. (2007). *A Árvore em Portugal*. Assirio & Alvim.

Caprari, P., Scuteri, A., Salvati, A., Bauco, C., Cantafora, A., Masella, R., Modesti, D., Tarzia, A. e Marigliano, V. (1999). Aging and red blood cell membrane: a study of centenarians. *Experimental Gerontology*, 34, pp. 47-57.

Carvalho, M., Ferreira, P. J., Mendes, V. S., Silva, R., Pereira, J. A., Jerónimo, C. e Silva, B. M. (2010). Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food Chemical Toxicology*, 48, pp. 441–447.

Castro-Díez, P., Montserrat-Martí, G. e Cornelissen, J. H. C. (2003). Trade-offs between phenology, relative growth rate, life form and seed mass among 22 Mediterranean woody species. *Plant Ecology*, 166, pp. 117-129.

Celikel, G., Demirsoy, L. e Demirsoy, H. (2008). The Strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 118 (2), pp. 115-119.

Correia, A. V. e Oliveira, A. C. (2002). Principais espécies florestais com interesse para Portugal: zonas de influência Mediterrânica. 2ª Edição. Lisboa, Direcção Geral das Florestas, pp. 67-69.

Costa, R. M., Magalhães, A. S., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Carvalho, M. e Silva, B. M., Evaluation of free radical scavenging and antihemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: a comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). *Food and Chemical Toxicology*, 47, pp. 860–865.

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.

Diplock, A. T., Charleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Viña-Ribes, J. (1998). Functional food science and defense against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80, pp. 77-112.

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..

El-Agamey, A., Lowe, G. M., McGarvey, D. J., Mortensen, A., Phillip, D. M., Truscott, T. G., Young, A. J. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430, pp. 37-48.

Esterbauer, H., Schaur, R. J. e Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radadical Biology & Medicine*, 11, pp. 81-128.

Ferreira, A. G. e Gonçalves, A. C. (2001). *Plano Específico de Ordenamento Florestal para o Alentejo*. Évora, Universidade de Évora, pp. 53-55.

Fiorentino, A., Castaldi, S., D'Abrosca, B., Natale, A., Carfora, A., Messere, A. e Monaco, P. (2007). Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland, *Biochemical Systematics and Ecology*, 35 (11), pp. 809-811.

Garcia-Alonso, M., Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C. Rivas, G. J. C. (2004). Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry*, 84, pp. 13-18.

Godinho-Ferreira, P., Azevedo, A. M. e Rego F. (2005). *Carta da Tipologia Florestal de Portugal Continental*. Lisboa, Silva Lusitana, 13 (1), pp. 1-34.

González, G. L. (2006). *Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares: especies silvestres y las principales cultivadas*. 2ª Edição. Madrid, Mundi-Prensa.

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. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Review*, 55, pp. 44-49.

Hancock, J. F., Beaudry, R. M. e Luby, J. J. (2003). Fruits of temperate climates: Fruits of the Ericaceae. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, pp. 2762-2768.

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.

Heywood, V. H., Brummitt, R. K., Culham, A. e Seberg, O. (2007). *Flowering Plant Families of the World*. Firefly Books, pp. 124-127.

Junqueira, L. C. e Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica*. 10ª Edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 223-228.

Kaur, C. e Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science & Technology*, 36 (7), pp. 703-725.

Kempaiah, R. K. e Srinivasan, K. (2006). Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17 (7), pp. 471-478.

Kivçak, B. e Mert, T. (2001). Quantitative determination of α -tocopherol in *Arbutus unedo* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*, 72 (6), pp. 656-661.

Ko, F. N., Hsiao, G. e Kuo, Y. H. (1997) Protection of oxidative hemolysis by demethyl-diisoeugenol in normal and beta-thalassemic red blood cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, pp. 215–222.

Legssyer, A., Ziyat, A., Mekh, H., Bnouham, M., Herrenknecht, C., Roumy, V., Fourneau, C., Laurens, A., Hoerter, J., Fischmeister, R. (2004). Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta. *Phytotherapy Research*, 18 (11), pp. 889-894.

Liew, C., Ma, J., Tang, H., Zheng, R. e Dempsey A. A. (2006). The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potencial diagnostic tool. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 147, pp. 126-132.

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.

Magalhães, A. S., Silva, B. M., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Carvalho, M. (2009). Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food Chemical Toxicology*, 47, pp. 1372–1377.

Males, Z., Plazibat, M., Vundać, V. B. e Zuntar, I. (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree - *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharmaceutical*, 56 (2), pp 245-250.

Mariotto, S., Esposito, E., Di Paola, R., Ciampa, A., Mazzon, E., Carcereri de Prati, A., Darra, E., Vincenzi, S., Cucinotta, G., Caminiti, R., Suzuki, H. e Cuzzocrea S. (2008). Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacological Research*, 57 (2), pp. 110-124.

Martínez-Vilalta, J., Prat, E., Oliveras, I. e Piñol, J. (2002). Xylem hydraulic properties of roots and stems of nine Mediterranean woody species. *Ecophysiology*, 133, pp. 19-29.

Mekhfi, H., ElHaouari. M., Bnouham, M., Aziz, M., Ziyat, A., Legssyer, A. (2006). Effects of extracts and tannins from *Arbutus unedo* leaves on rat platelet aggregation. *Phytotherapy Research*, 20 (2), pp. 135-139.

Mereti, M., Grigoriadou, K. e Nanos, G. D. (2002). Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. *Scientia Horticulturae*, 93 (2), pp. 143-148.

Mereti, M., Grigoriadou, K., Levantakis, N. e Nanos, G. D. (2003). *In vitro* rooting of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in médium solidified by peat: perlite mixture in combination with agar. *Acta Horticulturae*, 616, pp. 207-210.

Metaxas, D. J., Syros, T. D., Yupsanis, T. e Economou, A. S. (2004). Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. *Plant Growth Regulation*, 44 (3), pp. 257-266.

Murador, P. e Deffune, E. (2007). Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 29 (2), pp. 168-178.

Nápoles, A. M. e Branco, M. C. (2001). *Técnicas Laboratoriais de Biologia – Bloco III*. Didáctica Editora, pp. 12-68.

Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M. e Hara, Y. (1996) Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.

Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C. e Salvayre, R. (2008). Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal Pharmacology*, 153, pp. 6-20.

Nepi, M. (2001) Alberi ed arbusti della flora mellifera della regione mediterrânea. In: Piotto, B., Noi, A. (Ed.) *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterrânea*. Dipartimento Prevenzione e Risanamento Ambientali, Manuale ANPA, pp. 44-49.

Niki, E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals, *Methods in Enzymology* 186 (1990), pp. 100–108.

Núñez, D. R. e Castro, O. (1991) *La guía de infaco de las plantas útiles y venenosas de la Península Ibérica y Baleares (excluidas medicinales)*. 1ª Edição. Madrid, Infaco S. A., pp 508-511.

Omoni, A. O., Aluko, R. E. (2005). The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (8), pp. 344-350.

Pabuçcuoglu, A., Kivçak, B., Ba, M. e Mert, T. (2003). Antioxidant activity of *Arbutus unedo* leaves, *Fitoterapia*, 74 (6), pp. 597-599.

Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J.C., Castillo, M.D., Cano, M.P. e Pascual-Teresa S. (2008). Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (4), pp. 273-281.

Pavlović, R. D., Lakusić, B., Doslov-Kokorus, Z. e Kovacević N. (2009) Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species. *Die Pharmazie*, 64, pp. 656-659.

Pawlowska, A. M., Leo, M. e Braca, A., (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (26), pp. 10234-10238.

Paraskevopoulos, S. P., Iatrou, G. D. e Pantis, J. D. (1994). Plant growth strategies in evergreen-sclerophyllous shrublands (Maquis) in central Greece. Kluwer Academic Publishers, *Vegetatio*, 115, pp. 109-114.

Piotto, B., Piccini, C. e Arcadu, P. (2001) La ripresa della vegetazione dopo gli incendi nella region mediterrânea. In: Piotto, B., Noi, A. (Ed.) *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterrânea*. Dipartimento Prevenzione e Risanamento Ambientali, Manuale ANPA, pp. 32-38.

Rabini, R. A., Moretti, N., Staffolani, R., Salvolini, E., Nanetti, L., Franceschi, C. e Mazzanti, L. (2002). Reduced susceptibility to peroxidation of erythrocyte plasma membranes from centenarians. *Experimental Gerontology*, 37 (5), pp. 657-663.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. e Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (7), pp. 933-956.

Rohn, T. T., Nelson, L. K., Waeg, G. e Quinn, M. T. (1998). U-101033E (2,4-diaminopyrrolopyrimidine), a potent inhibitor of membrane lipid peroxidation as assessed by the production of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, and 4-hydroxynonenal – protein adducts. *Biochemical Pharmacology*, 56 (10), pp. 1371-1379.

Rogosic, J., Estell, R. E., Skobic, D., Martinovic A. e Maric, S. (2006). Role of species diversity and secondary compound complementarity on diet selection of Mediterranean shrubs by goats. *Journal Chemistry Ecology*, 32 (6), pp. 1279-1287.

Seeley, R. R., Stephens, T. D. e Tate, P. (2003). Anatomia & Fisiologia. 6^a Edição. Loures, Lusociência, pp. 651-658.

Shiva, S. R. C. S., Subramanyam, M. V., Vani, R. e Asha, D. S. (2007). *In vitro* models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements. *Toxicology In Vitro*, 21 (8), pp. 1355–1364.

Shinar, E., Rachmilewitz, E. A., Shifter, A., Rahamin, E. e Saltman, P. (1989). Oxidative damage to human red cells induced by copper and iron complexes in the presence of ascorbate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, 1014, pp. 66-72.

Singer, S. J. e Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of structure of cell membranes. *Science*, 175 (23), pp. 720-731.

Sivilotti, M.L. (2004). Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte. *Toxicology Review*, 23 (3), pp. 169–188.

Soares, M. E., Carvalho, M., Remião, F., Carvalho, F. e Bastos, M. (2004). Implementation of HPLC methodology for the quantification of malondialdehyde in cell suspensions and liver. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27, pp. 2357–2369.

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

Torres, J. A., Valle, F., Pinto, C., García-Fuentes, A., Salazar, C. e Cano, E. (2002). *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. Kluwer Academic Publishers, *Plant Ecology*, 160, pp. 207-223.

Valko, M., Leibfritz ,D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. e Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, pp. 44-84.

Vissers, M. C. M., Stern, A., Kuypers, F. Berg, J e Winterbourn, C. C. (1994). Membrane changes associated with lysis of red blood cells by hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 16 (6), pp. 703-712.

Vitale, M. e Manes, F. (2005). Role of changing environmental parameters in leaf gas exchange of *Arbutus unedo* L. assessed by field and laboratory measurements. *Photosynthetica*, 43, pp. 99-106.

Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B., MacKinnon, S., Kalt, W. e Joseph, J. A. (2000). Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: *in vitro* and *in vivo*. *Biochimica Biophysica Acta*, 1523, pp. 117-122.

Ziyyat, A., Boussairi, E. (1998). Cardiovascular effects of *Arbutus unedo* L. in spontaneously hypertensive rats. *Phytotherapy Research*, 12 (2), pp. 110-113.

Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M. e Benjelloun, W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, *Journal of Ethnopharmacology*, 58 (1), pp.45-54.

Ziyyat, A., Mekhfi H., Bnouham, M., Tahri, A., Legssyer, A., Hoerter, J. e Fischmeister, R. (2002) *Arbutus unedo* induces endothelium-dependent relaxation of the isolated rat aorta. *Phytotherapy Research*, 16 (6), pp. 572-575.

Zou, C., 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, pp. 75-86.

Anexos

Anexo 1. Modelo da Declaração de Consentimento preenchida e assinada por todos os voluntários que doaram sangue durante o decurso do trabalho laboratorial.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

*Considerando a "Declaração de Helsinquia" da Associação Médica Mundial
(Helsinquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996 e Edimburgo 2000)*

Designação do Estudo (em português):

.....
.....

Eu, abaixo-assinado, (nome completo do doente ou voluntário são)

....., compreendi a explicação que me foi fornecida acerca da minha participação na investigação que se tenciona realizar, bem como do estudo em que serei incluído. Foi-me dada oportunidade de fazer as perguntas que julguei necessárias e de todas obtive resposta satisfatória.

Tomei conhecimento de que, de acordo com as recomendações da Declaração de Helsinquia, a informação ou explicação que me foi prestada versou os objectivos e os métodos e, se ocorrer uma situação de prática clínica, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto. Além disso, foi-me afirmado que tenho o direito de recusar a todo o tempo a minha participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo pessoal.

Por isso, consinto que me seja aplicado o método ou o tratamento, se for caso disso, propostos pelo investigador.

Data: ____/____/200__

Assinatura do doente ou voluntário são:

O Investigador responsável:

Nome:

Assinatura:

Comissão de Ética da Universidade Fernando Pessoa

Anexo II. Artigo “Antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit: a comparative study” submetido à revista *Journal of Functional Foods*.