

ROSSANA MARINA SOARES DA COSTA

Avaliação do Potencial Antioxidante da Folha de *Cydonia oblonga* Miller

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, 2009

ROSSANA MARINA SOARES DA COSTA

Avaliação do Potencial Antioxidante da Folha de *Cydonia oblonga* Miller

UNIVERSIDADE FENANDO PESSOA

FACULDADE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, 2009

ROSSANA MARINA SOARES DA COSTA

Avaliação do Potencial Antioxidante da Folha de *Cydonia oblonga* Miller

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

Orientadores:

Prof. Doutora Branca Silva

Prof. Doutora Márcia Carvalho

Sumário

Neste trabalho é feita uma revisão da literatura no que concerne aos fundamentos teóricos e à importância dos antioxidantes na saúde humana, especialmente dos compostos fenólicos, e aos estudos fitoquímicos previamente realizados na espécie *Cydonia oblonga* Miller. O objectivo do trabalho de investigação realizado no âmbito desta monografia foi o de estudar o potencial antioxidante da folha de *Cydonia oblonga* Miller, em comparação com do chá verde (*Camellia sinensis*).

Para a prossecução do trabalho experimental foram analisadas doze amostras de folha de marmeleiro provenientes do Norte e do Centro de Portugal (Carrazeda de Ansiães e Covilhã, respectivamente), colhidas em Junho e Outubro de 2006. A preparação das amostras consistiu numa extracção com metanol (40°C). As propriedades antioxidantes foram avaliadas através do poder redutor determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e da capacidade sequestrante dos extractos para o radical livre 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Os resultados deste estudo revelaram que, no que diz respeito ao poder redutor, a folha do marmeleiro possui uma capacidade redutora significativamente superior à do chá verde (valor médio de $227,8 \pm 34,9$ e $112,5 \pm 1,5$ g/kg de folha seca, respectivamente; $P \leq 0,001$).

As amostras provenientes de Carrazeda de Ansiães apresentaram um índice de Folin-Ciocalteu significativamente superior às da Covilhã (valor médio de $252,6 \pm 23,7$ e $203,0 \pm 25,4$ g/kg de folha seca, respectivamente; $P \leq 0,005$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos índices de Folin-Ciocalteu de acordo o mês de colheita.

A capacidade sequestrante dos extractos da folha de marmeleiro para o radical DPPH foi semelhante com um EC_{50} médio de $21,6 \pm 3,5$ µg/ml, mas significativamente superior ao do extracto de chá verde (EC_{50} médio de $12,7 \pm 0,1$ µg/ml; $P \leq 0,005$). Estes resultados indicam que a actividade anti-radicalar da folha do marmeleiro é significativamente inferior à do extracto de chá verde.

Não foram encontradas diferenças significativas no potencial anti-radicalar de acordo com a origem geográfica ou o estado de maturação.

Neste trabalho de monografia demonstra-se que a folha de *C. oblonga* é uma fonte excelente e económica de antioxidantes, podendo ser utilizada na prevenção e/ou tratamento de doenças nas quais os radicais livres estão envolvidos.

Agradecimentos

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

À Professora Doutora Branca Maria Cardoso Monteiro da Silva expresso o meu sentido e profundo agradecimento pela orientação dada para esta monografia, para a qual sugeriu o tema, pela sua paciência demonstrada, e pelo facto de ter ajudado ao meu crescimento a nível científico e espírito crítico.

À Professora Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho expresso o meu sentido e profundo agradecimento por toda a orientação dada para esta monografia e ensinamentos facultados e toda a disponibilidade demonstrada.

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

Aos meus pais agradeço pelo apoio constante e pela oportunidade que me foi dada.

A todos os que tornaram possível ou deram o seu contributo, o meu muito obrigada.

Índice

I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Enquadramento.....	2
1.2 Objectivos	3
1.3 Plano geral.....	4
II. COMPOSTOS FENÓLICOS	5
2.1 Generalidades.....	6
2.1.1 Ácidos fenólicos.....	6
2.1.2 Flavonóides	8
2.2 Análise qualitativa de compostos fenólicos	10
2.2.1 Métodos cromatográficos.....	10
2.2.2 Métodos espectrofotométricos	13
2.2.3. Métodos espectrométricos.....	14
2.2.4 Métodos degradativos	16
2.3 Análise quantitativa de compostos fenólicos	16
2.4 Perfil fenólico da espécie <i>Cydonia oblonga</i> Miller.....	17
III. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE	22
3.1 Generalidades.....	23
3.2 Espécies reactivas de oxigénio.....	23
3.3 Espécies reactivas de azoto	28
3.4 Danificação oxidativa.....	29
3.5 Defesas antioxidantes.....	30
3.5.1 Antioxidantes enzimáticos	32
3.5.2 Antioxidantes não enzimáticos.....	34
3.5.3 Compostos fenólicos	39
3.6 Actividade antioxidante da espécie <i>Cydonia oblonga</i> Miller.....	44
IV. PARTE EXPERIMENTAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA FOLHA DE <i>CYDONIA OBLONGA</i> MILLER	46
“Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (<i>Cydonia oblonga</i>) leaf: A comparative study with green tea (<i>Camellia sinensis</i>)”.....	47
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	53
VI. BIBLIOGRAFIA	57

Índice de Figuras

Figura 1 - Estruturas dos principais ácidos hidroxibenzóicos.....	07
Figura 2 - Estruturas dos principais ácidos hidroxicinâmicos.....	07
Figura 3 - Estrutura do ácido 5-O-cafeoilquínico.....	08
Figura 4 - Estrutura geral dos flavonóides.....	08
Figura 5 - Principais classes de flavonóides	09
Figura 6 - Estrutura da quercetina	09
Figura 7 - Perfil cromatográfico da polpa, casca e semente de marmelo (350 nm)	18
Figura 8 - Compostos fenólicos presentes nos frutos e nas folhas de <i>Cydonia oblonga</i> Miller.....	19
Figura 9 - Perfil fenólico quantitativo da polpa e casca de marmelo (%).....	20
Figura 10 - Formação de espécies reactivas de oxigénio	24
Figura 11 - Formação de espécies reactivas de azoto	28
Figura 12 - Representação esquemática do ataque de ROS ou RNS aos lípidos das membranas celulares.....	30
Figura 13 - Estrutura da glutatona.....	34
Figura 14 - Ciclo oxidativo do ácido ascórbico	36

Figura 15 - Representação esquemática da protecção do α -tocoferol e ácido ascórbico no processo de peroxidação lipídica induzida por ROS ou RNS	38
Figura 16 - Estrutura do β -caroteno	38
Figura 17 - Relação estrutura-actividade antioxidante dos ácidos fenólicos	40
Figura 18 - Relação estrutura-actividade antioxidante dos flavonóides	41
Figura 19 - Sequestração de radicais livres por flavonóides	42
Figura 20 - Representação dos locais de ligação dos flavonóides a iões metálicos	43
 Figuras inseridas na publicação Costa et al. 2009	
Figure 1 - HPLC phenolic of quince leaf methanolic extract (sample 1).	49
Figure 2 - Antiradicalar activity of the methanolic extracts from quince leaf (sample 1) and green tea.....	50
Figure 3 - Effects of quince leaf (sample 1) and green tea methanolic extracts on AAPH-induced hemolysis in erythrocytes.....	50

Índice de Tabelas

Tabelas inseridas na publicação Costa et al. 2009

Table 1. HPLC/UV quantification of phenolic compounds present in quince leaf methanolic extract (sample 1) (Costa et al., 2009).....49

Table 2. Total reducing capacity of quince leaf samples as determined by Folin- Ciocalteu assay (Costa et al., 2009).....49

Table 3. Extraction yields and EC₅₀ values found in the DPPH assay of quince leaf samples (Costa et al., 2009).....49

Abreviaturas

CC	Cromatografia em Coluna
CCF	Cromatografia em Camada Fina
3-CQA	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico
4-CQA	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico
5-CQA	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico
3,5-diCQA	Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico
DAD	Diode Array Detector
DPPH	2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo
EC ₅₀	Concentração Efectiva 50
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Concentração Inibitória 50
K-3-Glu	3- <i>O</i> -glucosilcampferol
K-3-Gly	Glicósido do campferol
K-3-Rut	3- <i>O</i> -rutinosilcampferol
K-Gly-pC1	Glicósido do campferol acilado com ácido <i>p</i> -cumárico (parcialmente identificado)
K-Gly-pC2	Glicósido do campferol acilado com ácido <i>p</i> -cumárico (parcialmente identificado)
MS	Mass Spectrometry
P	Probabilidade
Q-3-Gal	3- <i>O</i> -galactosilquercetina
Q-3-Rut	Rutina (ou 3- <i>O</i> -rutinosilquercetina)
Q-Gly-pC1	Glicósido da quercetina acilado com ácido <i>p</i> -cumárico (parcialmente identificado)
Q-Gly-pC2	Glicósido da quercetina acilado com ácido <i>p</i> -cumárico (parcialmente identificado)
R _f	Factor de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNS	Espécies Reactivas de Azoto
ROS	Espécies Reactivas de Oxigénio
SD	Standard deviation
UV	Ultra – Violeta

Vis

Visível

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

I. INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento

Actualmente verifica-se que, nos países menos desenvolvidos, as plantas medicinais constituem a principal forma de resposta às necessidades de cuidados de saúde. Contudo, este não é um fenómeno característico dos países mais pobres, uma vez que na Europa, América do Norte e Austrália as estatísticas mostram um crescente recurso à fitoterapia (Valentão, 2002). No entanto, a utilização de plantas medicinais baseia-se com frequência apenas no conhecimento tradicional das suas acções. A inexistência de um suporte científico para a actividade que lhes é atribuída levou a que começassem a ser desenvolvidos ensaios biológicos dessas espécies de origem vegetal.

A presença de agentes antioxidantes a nível alimentar é indispensável, não só para a preservação dos alimentos, mas também porque constituem um suplemento de defesa para o organismo (Shi et al., 2001; Valentão, 2002; Silva, 2005). De facto, muitas das acções terapêuticas exibidas pelas plantas medicinais decorrem precisamente da sua actividade antioxidante. De entre os diferentes tipos de compostos naturais, o grupo dos compostos fenólicos e dos ácidos orgânicos é, talvez, dos mais estudados, com actividade antioxidante comprovada em diversos sistemas. Os fenóis, tais como os ácidos fenólicos e os flavonóides, e o ácido L-ascórbico (vitamina C), especialmente em associação com o ácido cítrico, são reconhecidos como poderosos antioxidantes, prevenindo os danos provocados pelos radicais livres (du Toit et al., 2001; Silva et al., 2004 e 2008; Silva, 2005; Oliveira et al., 2007 e 2008) e, conseqüentemente, conferindo protecção contra doenças degenerativas cerebrais, como Alzheimer, vários tipos de cancro, doenças cardiovasculares, infecções e sistema imunitário debilitado, envelhecimento precoce, doenças ósseas, entre outras (Fattouch et al., 2007; Giada e Filho, 2006; Silva et al., 2004 e 2008; Silva, 2005; Yildirim, 2006).

Quando submetidas a decocção, as folhas de *Cydonia oblonga* Miller são utilizadas pela medicina popular devido às suas actividades sedativa, calmante, antipirética, antidiarreica, antitússica, entre outras. No entanto, até à data existem muito poucos estudos fitoquímicos realizados nas folhas de marmeleiro. Oliveira et al. (2007) verificaram que as folhas de marmeleiro contêm um perfil fenólico característico, constituído por diversos ésteres do ácido cafeico com o ácido quínico e heterósidos da quercetina e do campferol, alguns deles acilados com ácido *p*-cumárico. Em 2008, os mesmos autores determinaram o perfil em ácidos orgânicos desta planta medicinal, o qual é constituído pelos ácidos oxálico, cítrico, málico,

quínico, shiquimico e fumárico (Oliveira et al., 2008). Destes estudos concluiu-se que a folha de *C. oblonga* é uma fonte excelente e muito económica de compostos bioactivos, especialmente de compostos fenólicos (Oliveira et al., 2007 e 2008; Oliveira, 2008).

Tendo em consideração a grande abundância de compostos fenólicos presente na folha de marmeleiro é de prever que a mesma tenha um considerável potencial anti-radicalar, podendo intervir na prevenção de doenças nas quais os radicais livres estão envolvidos.

1.2 Objectivos

Nesta monografia pretendeu-se efectuar o estudo do potencial antioxidante da folha de *C. oblonga*. Assim, os principais objectivos foram:

- Proceder a uma revisão na literatura científica sobre os compostos fenólicos e respectiva actividade antioxidante;
- Adaptar o método extractivo e as técnicas de determinação da actividade antioxidante (método de Folin-Ciocalteu e microensaio do sequestro do DPPH) à folha de marmeleiro;
- Aplicar as referidas metodologias às doze amostras de folha de marmeleiro, provenientes de duas zonas do Norte e Centro de Portugal (Carrazeda de Ansiães e Covilhã, respectivamente), colhidas em dois meses distintos (Junho e Outubro de 2006);
- Comparar o poder redutor e a actividade anti-radicalar da folha *C. oblonga* com os do chá verde (*Camellia sinensis*);
- Proceder à análise estatística dos resultados obtidos de forma a avaliar a possível influência da região geográfica de origem e do mês de colheita na actividade antioxidante desta folha.

1.3 Plano geral

A monografia encontra-se estruturada em seis Capítulos.

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

Nos Capítulos 2 e 3, “Compostos Fenólicos” e “Actividade Antioxidante”, faz-se uma revisão da literatura, no que concerne aos fundamentos teóricos e à importância dos antioxidantes na saúde humana, nomeadamente dos compostos fenólicos, e aos estudos fitoquímicos previamente realizados no marmelo e na folha de marmeleiro.

A “parte experimental” é apresentada no Capítulo 4 na forma de uma publicação. De salientar que os resultados apresentados na referida publicação, referentes à avaliação do potencial antioxidante da folha de marmeleiro, através da determinação do seu poder redutor e da sua actividade anti-radicalar, foram obtidos no âmbito do trabalho de investigação realizado na presente monografia.

No Capítulo 5, “Considerações Finais e Conclusões”, faz-se a sinopse deste trabalho.

Por último, no Capítulo 6 é apresentada uma listagem de todas as referências bibliográficas citadas ao longo do texto.

II. COMPOSTOS FENÓLICOS

2.1 Generalidades

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de, pelo menos, um anel benzénico ligado directamente a um grupo hidroxilo livre (ou mais) ou envolvido numa outra função (éter, éster, heterosídica) (Harbone, 1989; Bruneton, 1999). Podem existir sob formas hidrossolúveis (quando associados a glucose, galactose, arabinose, ramnose, apiose, ácidos glucorónico e galacturónico) situando-se em vacúolos celulares, ou sob formas poliméricas menos polares (lenhinas) situadas na parede celular (Harbone, 1989).

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários presentes em todos os tecidos vegetais. As substâncias encontradas em maior quantidade pertencem à classe dos ácidos fenólicos, flavonóides e taninos. Existem também isoflavonóides, antraquinonas e xantonas mas em quantidades mais baixas (Ribéreau-Gayon, 1968a; Harbone, 1989; Waterman e Mole, 1994a).

Pela sua ubiquidade e, simultaneamente pela sua composição característica dentro dos grupos botânicos, alguns compostos fenólicos podem ser considerados marcadores químicos de produtos fitoterápicos e de géneros alimentícios de origem vegetal, sobretudo de derivados de frutos (Macheix et al., 1990; Spanos & Wrolstad, 1990 e 1992; Spanos et al., 1990; Simón et al., 1992; van Gorsel et al., 1992; Tomás-Lorente et al., 1992; Tomás-Barberán et al., 1993; Oleszek et al., 1994; Vallés et al., 1994; Ooghe et al., 1994a,b; Garcia-Viguera & Bridle, 1995; Ooghe & Datavernier, 1997; Bengoechea et al., 1997; Larrauri et al., 1997; Andrade et al., 1998 e 2000; Silva, 1999a,b; Silva et al., 2000a,b,c).

2.1.1 Ácidos Fenólicos

Qualquer composto orgânico que possua, pelo menos, uma função carboxílica e um hidroxilo fenólico é geralmente denominado de “ácido fenólico” (Bruneton, 1999). Dentro dos ácidos fenólicos podemos encontrar os ácidos hidroxibenzóicos (Figura 1) com sete átomos de carbono e os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 2) com nove átomos de carbono.

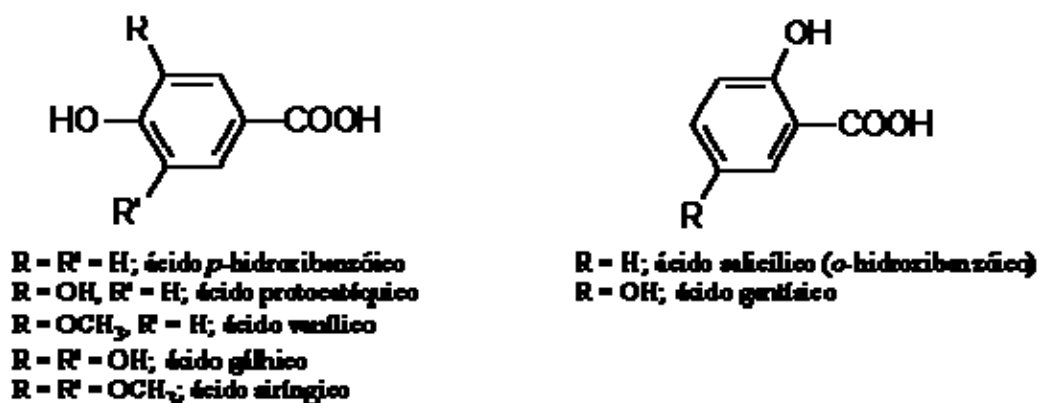


Figura 1 - Estruturas dos principais ácidos hidroxibenzoicos.

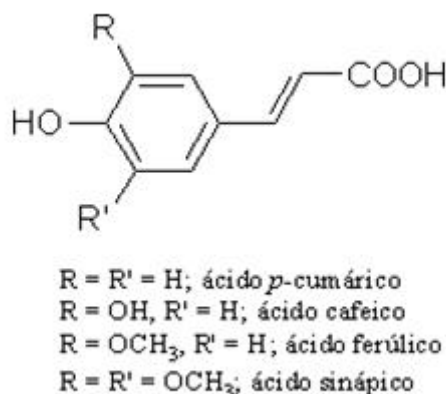


Figura 2 - Estruturas dos principais ácidos hidroxicinâmicos.

Os ácidos hidroxicinâmicos podem existir sob a forma *cis* e *trans* devido à presença da ligação dupla na cadeia lateral. Os ácidos hidroxicinâmicos naturais são isômeros *trans*. Por influência da luz, e até obtenção de um equilíbrio, os dois isômeros podem facilmente converter-se um no outro quando em solução (Ribéreau-Gayon, 1968; Valentão, 2002). Estes encontram-se normalmente na forma combinada. Um dos tipos de ligação mais frequente corresponde à ligação éster entre a função carboxílica do ácido fenólico e uma função álcool de um composto orgânico (Macheix et al, 1990). A combinação mais comum na natureza é o éster do ácido cafeico e do ácido quínico, denominado de ácido 5-*O*-cafeoilquínico, também conhecido por ácido clorogénico (Figura 3) (Ribéreau-Gayon, 1968a; Valentão, 2002).

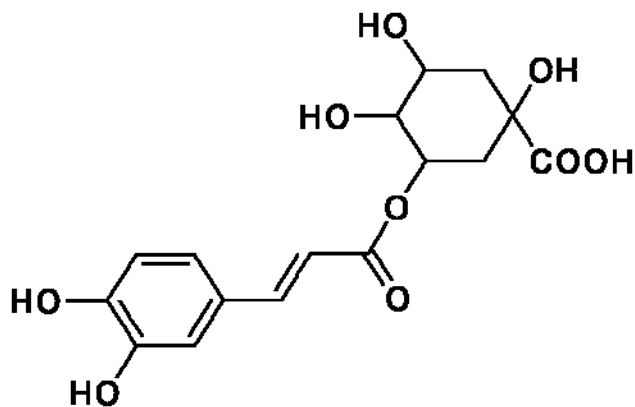


Figura 3 - Estrutura do ácido 5-O-cafeoilquínico.

2.1.2 Flavonóides

Os flavonóides são caracterizados pela presença de quinze átomos de carbono e dois anéis benzênicos que se encontram ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, podendo ou não formar-se um terceiro anel (Figura 4). Como se pode observar na Figura 4, os anéis denominam-se por A, B e C, sendo o anel A formado “via acetato” e os anéis B e C pela “via shiquimato” (Ribéreau-Gayon, 1968a, 1968c; Markham, 1989; Bruneton, 1999).

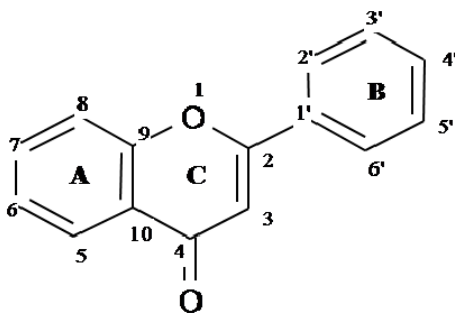


Figura 4 - Estrutura geral dos flavonóides.

Conforme a natureza da cadeia de ligação dos três átomos de carbono, surgem diferentes classes de flavonóides apresentadas na Figura 5.

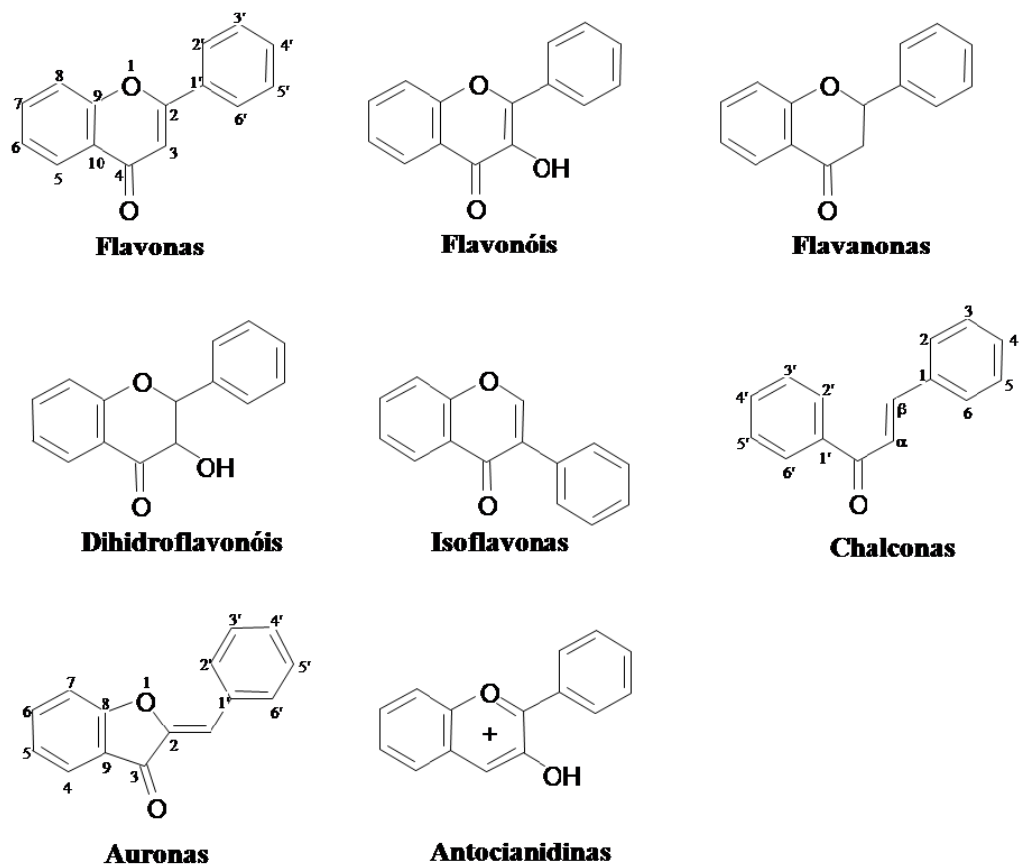


Figura 5 – Principais classes de flavonóides.

Os flavonóis são os compostos mais abundantes, sendo a quercetina o seu principal representante (Figura 6) (Ribéreau-Gayon, 1968c; Harbone, 1989).

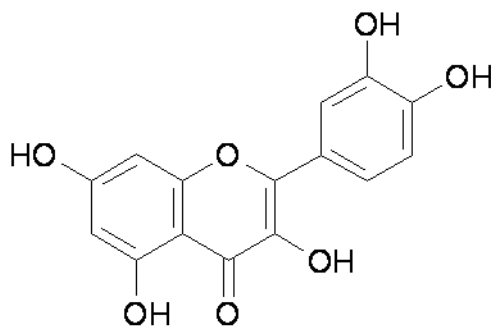


Figura 6 - Estrutura da quercetina

A forma heterosídica dos flavonóides confere à molécula propriedades menos reactivas e maior solubilidade no suco vacuolar. Nos *O*-heterósidos a ligação entre a genina e o açúcar pode ser realizada a partir de qualquer grupo hidroxilo da genina. No entanto, geralmente o hidroxilo da aglícona que efectua mais ligações é o da posição 7 nas flavonas e das posições 3 e 7 nos flavonóis e flavononóis.

A ocorrência de *C*-heterósidos é menos frequente. Nestes as ligações são do tipo carbono-carbono. A molécula de açúcar liga-se ao carbono da posição 6 ou 8 da genina (normalmente flavonas). A parte glicosídica da molécula pode ser constituída por mono-, di- ou trissacáridos lineares ou ramificados, sendo a D-glucose o principal açúcar envolvido na glicosilação. Muito raramente esta porção pode sofrer acilação com várias moléculas (ácidos cinâmicos, ácido acético) formando-se uma ligação do tipo éster com um hidroxilo glucídico do heterósido (Ribéreau-Gayon, 1968a, 1968c; Bruneton, 1999).

2.2 Análise qualitativa de compostos fenólicos

A identificação de um composto deve ser realizada tendo em consideração vários critérios, que incluem resultados obtidos em processos cromatográficos e determinações espectrofotométricas e espectrométricas (Valentão, 2002).

2.2.1 Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos podem ser utilizados com fins analíticos ou de isolamento, fornecendo dados bastante relevantes para a identificação de compostos fenólicos. As técnicas cromatográficas mais usadas são a cromatografia em camada fina (CCF), a cromatografia em coluna (CC) e a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

A CCF pode ser utilizada, a nível preparativo, na separação de qualquer tipo de composto fenólico. Neste tipo de cromatografia, apesar da diversidade de fases estacionária e móvel que se podem usar, as mais utilizadas são a sílica e celulose (fases estacionárias) e o butanol acético e o ácido acético diluído (Harbone, 1989; Waterman e Mole, 1994b; Valentão, 2002).

Através da CCF é possível identificar compostos através da relação do seu valor de R_f (que traduz a sua mobilidade na fase móvel), encontrado para um determinado desenvolvimento, com a estrutura em causa. Espera-se que esse valor seja uma característica reprodutível da substância. No caso dos flavonóides algumas relações foram já estabelecidas (Ribéreau-Gayon, 1968d; Valentão, 2002):

- O aumento do número de grupos hidroxilo diminui o R_f , quer em solvente alcoólico (butanol acético) quer em solvente aquoso;
- A metilação de grupos hidroxilo aumenta o R_f ;
- A glicosilação diminui o R_f em solvente alcoólico e aumenta-o em solvente aquoso; a posição do açúcar influencia o R_f ; geralmente os heterósidos de flavonóis com um grupo hidroxilo livre na posição 3 têm um R_f nulo em água;
- A acilação com um ácido cinâmico aumenta o R_f .

A partir da observação do cromatograma à luz natural e à luz UV (366 nm) pode-se também chegar a algumas conclusões. Assim, à luz natural, caso se observe uma cor azul estamos perante um ácido cinâmico, enquanto que se observarmos uma fluorescência amarelada estamos na presença de um flavonóide. Quando se expõe o cromatograma à luz UV, caso ocorra fluorescência azul estamos perante um ácido cinâmico e fluorescência amarela intensa na presença de um flavonóide (Valentão, 2002).

No que diz respeito à CC, esta técnica é amplamente usada para separar compostos fenólicos. O enchimento da coluna é normalmente de celulose ou sílica, podendo também ser usadas em alguns casos colunas de Sephadex, de resinas poliméricas ou de fase reversa. Neste tipo de cromatografia a eluição é feita a baixa pressão havendo uma grande variedade de solventes. A detecção neste caso pode ser realizada do mesmo modo que na CCF (Markham, 1989; Waterman e Mole, 1994b; Valentão, 2002).

O HPLC é em tudo semelhante à CC, mas desenvolve-se a pressão elevada. Este tipo de cromatografia possui um elevado nível de resolução, o que a leva a que seja usada em investigações taxonómicas e definições de perfis químicos de plantas e derivados (Macheix et al., 1990; Spanos & Wrolstad, 1990 e 1992; Spanos et al., 1990; Simón et al., 1992; van Gorsel et al., 1992; Tomás-Lorente et al., 1992; Tomás-Barberán et al., 1993; Oleszek et al.,

1994; Vallés et al., 1994; Ooghe et al., 1994a,b; Garcia-Viguera & Bridle, 1995; Ooghe & Datavernier, 1997; Bengoechea et al., 1997; Larrauri et al., 1997; Andrade et al., 1998 e 2000; Silva, 1999a,b; Silva et al., 2000a,b,c; Silva, 2005).

Para a sua elevada resolução são usadas fases estacionárias com partículas de sílica (enchimento mais empregue) de pequeno diâmetro (5µm) e revestidas com cadeias carbonadas de 8 a 18 carbonos (fase reversa). A pressão desenvolvida vai depender do tamanho da partícula e do comprimento da coluna. A sequência de eluição é determinada pela adsorção na fase estacionária hidrofóbica e subsequente eluição com a fase móvel (Ferrerres *et al.*, 1989; Valentão, 2002). As eluições podem ser desenvolvidas em gradiente ou em modo isocrático, sendo a fase móvel constituída por misturas de água e solventes orgânicos. O solvente mais usado é o metanol, mas geralmente também são incluídas nas fases móveis pequenas quantidades de ácidos (acético e fórmico) de maneira a impedir a ionização de grupos acídicos existentes na amostra e a melhorar a simetria dos picos (Ferrerres *et al.*, 1989; Valentão, 2002). Nestas condições, os compostos mais polares são os primeiros a eluírem. Logo, os tempos de retenção são inversamente proporcionais ao aumento da glicosilação, ou seja, os diglicósidos saem primeiro, depois os monoglicósidos e, por fim, os compostos não glicosilados (Markham, 1989; Van Sumere, 1989). Mas o facto de ser um *O*-heterósido ou *C*-heterósido e a posição da glicosilação nos flavonóides leva a interferências na sua mobilidade (Ferrerres *et al.*, 1989).

Uma vez que todos os compostos fenólicos absorvem na zona do UV, o detector de UV é considerado como universal para este tipo de compostos. No entanto, a disponibilidade de um detector de matriz de diodos aumenta largamente a possibilidade de identificação destes compostos, permitindo ainda o registo de cromatogramas a diferentes comprimentos de onda. Adicionalmente, este tipo de detectores faculta o espectro de UV de cada composto que, juntamente com o tempo de retenção, contituem dois parâmetros importantes no processo de identificação (Van Sumere, 1989; Waterman e Mole, 1994b; Valentão, 2002).

Por ser um método analítico sensível, exacto e rápido, o HPLC constitui o processo de eleição para a análise qualitativa e quantitativa de compostos fenólicos.

2.2.2 Métodos espectrofotométricos

Os compostos fenólicos são substâncias que contêm núcleos aromáticos, muitas vezes conjugados, levando a que apresentem um espectro de UV característico. Todos os compostos exibem um ou mais picos de absorção entre 230 a 290 nm e a ionização provocada por uma base induz um desvio batocrômico (15-50 nm) acompanhado por um aumento de absorvência (Harbone, 1989). Normalmente os espectros são obtidos a partir de soluções metanólicas de um composto puro (Markham, 1982; Waterman e Mole, 1994c).

Os ácidos hidroxicinâmicos absorvem em duas zonas, observando-se um primeiro máximo entre 225 e 235 nm e dois outros entre 290 e 330 nm. A dupla absorção na segunda zona aparece devido ao isomerismo *cis* e *trans* e a sua absorvência relativa depende da proporção de cada isómero. Os diferentes ésteres de um mesmo ácido hidroxicinâmico apresentam espectros de absorção semelhantes, seja qual for a molécula com função álcool da sua estrutura. Já no caso dos heterósidos, os espectros de absorção são modificados em função da natureza da ligação, mostrando espectros diferentes do ácido hidroxicinâmico correspondente (Ribéreau-Gayon, 1968b; Harbone, 1989; Valentão, 2002).

O espectro UV relativo aos ácidos hidroxibenzóicos varia em função da hidroxilação dos anéis benzénicos e possui apenas um máximo de absorção entre os 235 e os 325 nm. Apenas os ácidos benzóicos di-hidroxilados possuem dois máximos de absorção.

Em relação aos flavonóides, estes possuem duas zonas de absorção máxima: entre 300 e 380 nm (banda I relacionada com os anéis B e C) e entre 240 e 280 nm (banda II associada ao anel A). A posição e a intensidade de cada um dos máximos fornecem dados importantes para conhecer o tipo de flavonóide e o seu esquema de oxigenação. O espectro é afectado principalmente pela oxigenação, isto é, um aumento da oxigenação provoca um desvio das bandas de absorção para maiores comprimentos de onda (Mabry *et al.*, 1970; Markham, 1982; Markham, 1989). As modificações relacionadas com a oxigenação são apresentadas, de forma resumida em seguida (Markham, 1982; Valentão, 2002):

- Alterações no anel A reflectem-se na banda II, enquanto que as modificações nos anéis B e C são reflectidas na banda I;

- Um aumento de oxigenação, especialmente a hidroxilação, leva a um desvio batocrômico da banda correspondente;
- A metilação e a glicosilação (especialmente dos hidroxilos em 3,5,7,4') levam a desvios das bandas de absorção para menores comprimentos de onda; nos glucósidos, o tipo de açúcar não tem influência;
- A presença de ácidos cinâmicos como funções acilo num flavonóide pode ser detectada pela existência de um máximo de absorção a 320 nm, característico dos ácidos;
- A presença do sistema 3',4'-di-hidroxilo nas flavonas e flavonóis é geralmente evidenciado por um segundo pico (por vezes uma inflexão) na banda II.

Pode-se ainda obter informação adicional (localização de hidroxilos livres e suas substituições) após adição de reagentes específicos ionizantes e quelantes que induzem desvios nos espectros de UV (Valentão, 2002).

2.2.3. Métodos espectrométricos

2.2.3.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear de protão (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C) são dois métodos importantes na análise estrutural de compostos fenólicos. A RMN de ^1H fornece várias informações que permitem elucidar a estrutura dos flavonóides, através dos valores de desvio químico (δ), da integração dos sinais obtidos e do valor das constantes de acoplamento (J) (Markham, 1982; Markham, 1989; Valentão, 2002):

- Definição de relação entre os protões do núcleo flavónico e, portanto, do esquema de oxigenação;
- Determinação do número de grupos metoxilo;

- Determinação do número de açúcares presentes, da posição da sua ligação à genina e da forma anomérica em que se encontram;
- Detecção de cadeias hidrocarbonadas, cujos valores de desvio químico são distintos dos encontrados para os restantes protões da molécula flavónica.

Os dados são normalmente registados entre 0 e 14 ppm, mas a parte mais informativa do espectro corresponde à região dos protões aromáticos, 6-8 ppm, cujos valores de δ e J irão geralmente definir o esquema de substituição flavonóide (Valentão, 2002).

Quanto à RMN de ^{13}C as suas principais aplicações são as seguintes:

- Determinação do número e natureza dos carbonos da molécula;
- Identificação dos açúcares e determinação da natureza da sua ligação à genina;
- Determinação dos locais de ligação interglicosídica;
- Identificação e localização de substituintes acilo.

Os desvios químicos dos carbonos flavónicos são influenciados principalmente pela sua densidade electrónica. Assim, carbonos com uma densidade electrónica relativamente baixa, tais como carbonos carbonílicos e carbonos aromáticos oxigenados, apresentam sinais a 130-185 ppm, enquanto carbonos alifáticos mostram sinais entre os 0 e 110 ppm (Valentão, 2002).

2.2.3.2 Espectrometria de massa (EM)

A principal aplicação da EM é a determinação da massa molecular de um composto. A massa exacta do ião molecular permite calcular a composição elementar da substância em análise. Da análise dos sinais resultantes da fragmentação do composto obtêm-se importantes informações para o esclarecimento da sua estrutura. Apesar de haver destruição da amostra, a grande vantagem deste método reside na reduzida quantidade de composto necessária para análise.

Em geral o ião molecular apresenta um pico de maior intensidade. Além deste, é frequente a observação dos sinais $M^+ -1$ correspondente à perda de hidrogénio, $M^+ -17$ devido à perda do hidroxilo, $M^+ -18$ originado pela perda de água e $M^+ -28$ e $M^+ -29$, indicando a perda de CO e CHO a partir da função carbonílica. A existência de outros radicais na molécula (metilo, metoxilo ou isopentenilo) também pode ser detectada pela presença dos sinais correspondentes à massa molecular subtraída da massa desses radicais (Hostettmann e Hostettman, 1989; Markham, 1989; Valentão, 2002).

2.2.4 Métodos degradativos

Estes métodos ajudam na determinação estrutural de compostos. Para esse efeito citam-se diferentes processos de hidrólise: ácida, alcalina e enzimática.

Na hidrólise ácida há ruptura das ligações hemiacetálicas, o que permite a distinção de *O*- e *C*-heterósidos, uma vez que estes últimos possuem maior resistência à hidrólise ácida. O tempo de hidrólise depende de vários factores, tais como a concentração de ácido, a natureza e a posição do açúcar no flavonóide. Na hidrólise alcalina há ruptura das ligações tipo éster (entre um ácido aromático e um hidroxilo fenólico de uma genina ou um hidroxilo de um açúcar).

Por fim, a hidrólise enzimática é útil para estabelecer a natureza da ligação do açúcar à genina (ligação α ou β). Apenas os açúcares acilados e *C*-glicósidos são resistentes à hidrólise por este método (Ribéreau-Gayon, 1968c e 1968d; Markham, 1982; Valentão, 2002).

2.3 Análise quantitativa de compostos fenólicos

A análise quantitativa de compostos fenólicos baseia-se nas suas propriedades gerais, nomeadamente na sua capacidade de sofrer oxidação, quelatar metais e absorver na zona do UV-Vis (Macheix *et al.*, 1990; Valentão, 2002).

A determinação dos fenóis totais é efectuada através da quantificação dos grupos hidroxilo fenólicos que existem no extracto, recorrendo, por exemplo, ao reagente de Folin-Ciocalteu. Este método envolve uma reacção de oxidação-redução, em meio alcalino, na qual o ião

fenolato é oxidado e o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico proveniente do reagente é reduzido a uma mistura de óxidos de tungsténio e de molibdénio, de cor azul. A intensidade da cor que se desenvolve é proporcional ao teor de compostos fenólicos (absorção máxima a 725-750 nm) (Ribéreau-Gayon, 1968e; Waterman e Mole, 1994d; Valentão, 2002).

Este método, muito utilizado, apresenta algumas limitações (Harbone, 1989; Macheix *et al.*, 1990; Waterman e Mole, 1994d; Valentão, 2002), tais como:

- Inespecificidade - qualquer composto fenólico presente no extracto pode sofrer oxidação mas com reactividade distinta;
- Qualquer substância com capacidade para sofrer oxidação pelo reagente (ácido ascórbico, açúcares, ...) irá contribuir para a formação da cor azul, embora este problema possa ser diminuído através da prévia purificação do extracto.

O HPLC revela-se o método mais indicado para a quantificação de compostos fenólicos pois permite quantificar individualmente cada composto atendendo ao seu factor de resposta e à área do seu pico cromatográfico. Por vezes, a inexistência de substâncias de referência, que permitam definir as características de absorção do composto, constitui um factor limitante (Harbone, 1989; Macheix *et al.*, 1990; Valentão, 2002).

2.4 Perfil fenólico da espécie *Cydonia oblonga* Miller

No que diz respeito à espécie *Cydonia oblonga* Miller, o perfil fenólico dos seus frutos (Andrade *et al.*, 1998 e 1999; Ferreres *et al.*, 2003; Silva, 1999a e 2005; Silva *et al.*, 2000a,b,c, 2001, 2002a,b, 2003, 2004a,b,c, 2005a,b e 2006) e das suas folhas (Oliveira, 2008; Oliveira *et al.*, 2007) já foi estudado.

Os compostos fenólicos foram determinados por HPLC/DAD/MS, uma técnica que ainda é pouco aplicada em Portugal, tendo-se verificado que o perfil das várias partes do fruto, polpa, casca e semente, é bastante distinto (Figura 7): as polpas apresentam cinco compostos fenólicos: os ácidos 3-*O*-, 4-*O*- e 5-*O*-cafeoilquínicos e 3,5-*O*-dicafeoilquínico e a rutina (Silva *et al.*, 2002a, 2005a e 2008); as cascas contêm treze compostos fenólicos: os cinco

presentes nas polpas e ainda a 3-*O*-galactosilquercetina, o 3-*O*-glucosilcampferol, o 3-*O*-rutinosilcampferol e cinco compostos parcialmente identificados (um glicósido do campferol, dois glicósidos da quercetina acilados com ácido *p*-cumárico e dois glicósidos do campferol também acilados com ácido *p*-cumárico) (Silva *et al.*, 2002a, 2005a e 2008); as sementes apresentam um perfil característico, composto pelos mesmos ácidos cafeoilquínicos e por diversas flavonas *C*-glicosiladas (Figura 8) (Ferrerres *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005b e 2008).

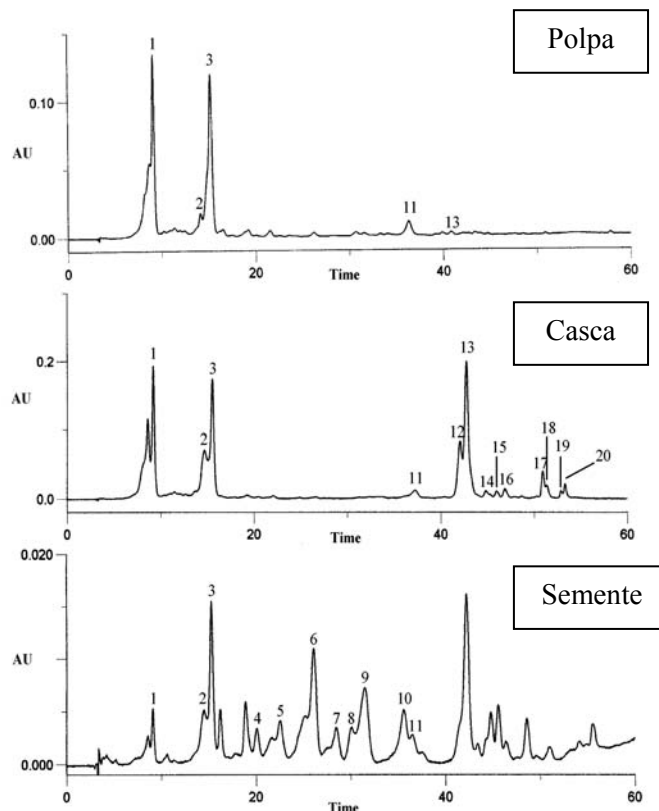
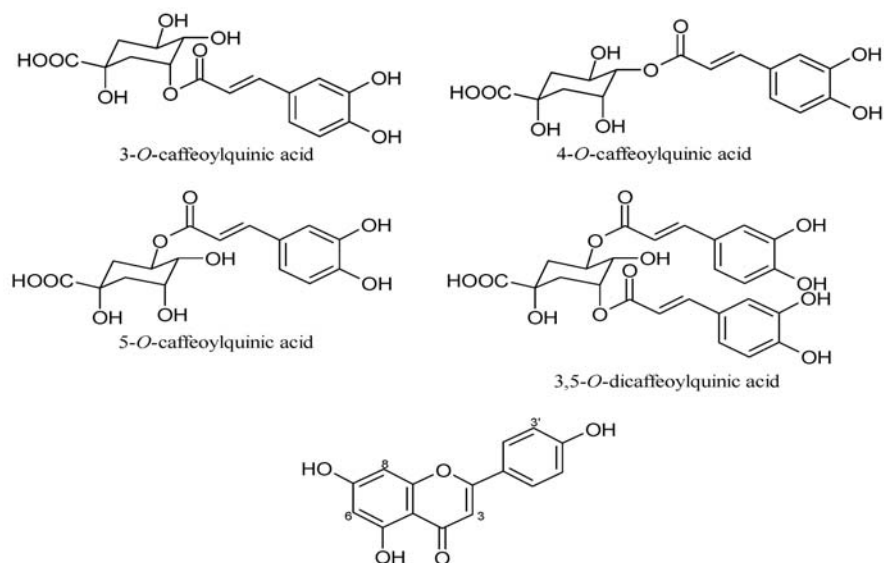


Figura 7. Perfil cromatográfico da polpa, casca e semente de marmelo (350 nm) (adaptado de Silva *et al.*, 2008). (1) ácido 3-*O*-cafeoilquínico, (2) ácido 4-*O*-cafeoilquínico, (3) ácido 5-*O*-cafeoilquínico, (4) lucenina-2, (5) vicenina-2, (6) estelarina-2, (7) isoschaftósido, (8) schaftósido, (9) 6-*C*-pentosil-8-*C*-glucosil crisoeriol, (10) 6-*C*-glucosil-8-*C*-pentosil crisoeriol, (11) ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico, (12) 3-*O*-galactosilquercetina, (13) rutina, (14) glicósido do campferol, (15) 3-*O*-glucosilcampferol, (16) 3-*O*-rutinosilcampferol, (17) e (18) glicósidos da quercetina acilados com ácido *p*-cumárico, (19) e (20) glicósidos do campferol acilados com ácido *p*-cumárico.



Composto	3	6	8	3'
3-O-galactosilquercetina	O-Galactose	H	H	OH
Rutina	O-Rutinese	H	H	OH
3-O-glucosilcampferol	O-Glucose	H	H	H
3-O-rutinosilcampferol	O-Rutinese	H	H	H
Vicenina-2	H	Glucose	Glucose	H
Isoschaftósido	H	Arabinose	Glucose	H
Schaftósido	H	Glucose	Arabinose	H
Lucenina-2	H	Glucose	Glucose	OH
Estelarina-2	H	Glucose	Glucose	OCH ₃
6-C-pentosil-8-C-glucosil crisoeriol	H	Pentose	Glucose	OCH ₃
6-C-glucosil-8-C-pentosil crisoeriol	H	Glucose	Pentose	OCH ₃

Figura 8 - Compostos fenólicos presentes nos frutos e nas folhas de *Cydonia oblonga* Miller (adaptado de Silva et al., 2008).

Em termos quantitativos, verificou-se uma maior abundância do ácido 5-*O*-cafeoilquínico na polpa e de rutina na casca (Figura 9). Esta última apresentou um conteúdo fenólico bastante superior ao da polpa. Adicionalmente, verificaram-se diferenças muito significativas no teor de todos os compostos fenólicos determinados na polpa e na casca de marmelo (Silva *et al.*, 2005a e 2008). Os ácidos fenólicos foram mais abundantes nas polpas e os flavonóides nas cascas (Figura 9).

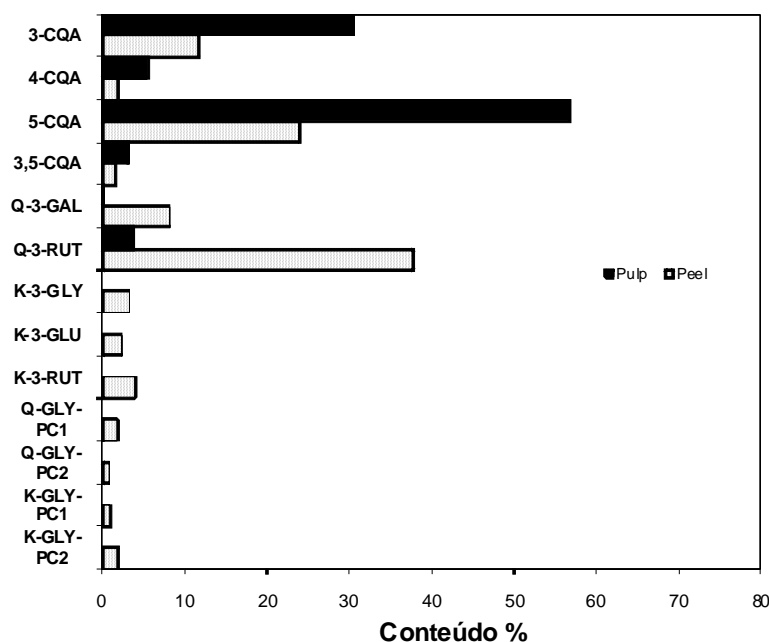


Figura 9. Perfil fenólico quantitativo da polpa e casca de marmelo (%) (adaptado de Silva *et al.*, 2008). 3-CQA - ácido 3-*O*-cafeoilquínico, 4-CQA - ácido 4-*O*-cafeoilquínico, 5-CQA - ácido 5-*O*-cafeoilquínico, 3,5-diCQA - ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico, Q-3-GAL - 3-*O*-galactosilquercetina, Q-3-RUT - rutina, K-3-GLY - glicósido do campferol, K-3-GLU - 3-*O*-glucosilcampferol, K-3-RUT - 3-*O*-rutinosilcampferol, Q-GLY-PC1 e Q-GLY-PC2 - glicósidos da quercetina acilados com ácido *p*-cumárico, K-GLY-PC1 e K-GLY-PC2 - glicósidos do campferol acilados com ácido *p*-cumárico.

Nas folhas de marmeleiro foram efectuados estudos por Polónia (1957), tendo sido isolado o metilarbutósido. Posteriormente, De Tomasi *et al.* (1996b) isolaram e identificaram, juntamente com os glicósidos do α - e do β -ionol, quatro glicosil flavonóis: os 7-*O*- β -D-

glucopiranosídeos do 7-hidroxi-5'-metoxi-3',4'-metilenedioxiflavonol, do 5',7-di-hidroxi-3',4'-metilenedioxiflavonol e do 4',7-di-hidroxi-3',5'-dimetoxiflavonol e o 7-O- β -D-galactopiranosídeo do 4',7-di-hidroxi-3',5'-dimetoxiflavonol.

Recentemente, o perfil fenólico das folhas de *C. oblonga* foi caracterizado pela presença de nove compostos: os ácidos 3-O-, 4-O- e 5-O-cafeoilquínicos e 3,5-O-dicafeoilquínico, a 3-O-galactosilquercetina, a rutina (3-O-rutinosilquercetina), o 3-O-glicosilcampferol, o 3-O-glucosilcampferol e o 3-O-rutinosilcampferol (Oliveira, 2008; Oliveira et al., 2007).

Em termos quantitativos, o conteúdo fenólico total das folhas oscilou entre 4,9 e 16,5 g/Kg de peso seco. Os compostos fenólicos predominantes foram o ácido 5-O-cafeoilquínico e a rutina, cujos valores médios rondaram os 36,2% e os 21,1%, respectivamente (Oliveira, 2008; Oliveira et al., 2007).

Os mesmos autores observaram diferenças significativas nos teores em ácidos 3-O-cafeoilquínico e 3,5-O-dicafeoilquínico de acordo com a zona geográfica de origem e o mês de colheita, sugerindo a possível utilização destes compostos fenólicos como marcadores químicos de origem geográfica e/ou de maturação (Oliveira, 2008; Oliveira et al., 2007).

Estes estudos demonstraram que a espécie *C. oblonga* é uma excelente fonte de compostos fenólicos, sobretudo de derivados do ácido cafeico e da quercetina, compostos bioactivos com reconhecida actividade antioxidante.

III. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

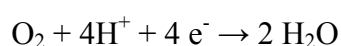
3.1 Generalidades

O organismo humano está sujeito ao stresse oxidativo causado por espécies oxidantes formadas nas células por agentes exógenos ou geradas pelo próprio organismo. Entre as biomoléculas alvo dessas espécies encontram-se os lípidos, proteínas e DNA. Os danos oxidativos nestes componentes celulares podem resultar em alterações estruturais e/ou funcionais de ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e membranas celulares. Se a lesão for suficientemente extensa pode levar à morte da célula. No entanto, as células do organismo estão protegidas em parte por antioxidantes de origem endógena ou obtidos directamente da dieta. A protecção enzimática baseia-se quase que exclusivamente na decomposição de peróxido de hidrogénio ou dismutação do radical superóxido. Cabe aos antioxidantes não enzimáticos, tais como tocoferóis, carotenóides e compostos fenólicos, entre outros, o papel de impedir o ataque de radicais livres ou regenerar os danos causados em sistemas biológicos essenciais. O mecanismo complexo de actividade anti e pró-oxidante destas substâncias é alvo de extensos estudos científicos contemporâneos, tendo em vista que o sucesso destas investigações está directamente relacionado com a melhoria da qualidade de vida do ser humano.

Actualmente as espécies reactivas são divididas em dois grandes grupos, as espécies reactivas de oxigénio (ROS) e as espécies reactivas de azoto (RNS).

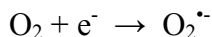
3.2 Espécies reactivas de oxigénio

O oxigénio pode ser considerado um bi-radical uma vez que possui um electrão desemparelhado em cada orbital mais externa. Normalmente, cerca de 95 a 98% do oxigénio molecular consumido na cadeia respiratória mitocondrial é reduzido pela adição simultânea de quatro electrões formando-se água:



No entanto, aproximadamente 2 a 5% do oxigénio utilizado nas mitocôndrias sofre redução univalente, ou seja, uma molécula recebe apenas um electrão, o qual vai ocupar uma das

orbitais externas, ao mesmo tempo que o outro continua desemparelhado, produzindo intermediários altamente reactivos. O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é formado pela adição de um electrão à molécula de oxigénio no estado fundamental (Acworth et al, 1997):



Com apenas mais um electrão adicionado a este radical, surge o anião peróxido (O_2^{2-}), que aquando a adição de outro electrão forma o radical hidroxilo (HO^{\cdot}). Por sua vez, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) aparece como produto da redução do oxigénio por dois electrões em sistemas biológicos.

Denominam-se “radicais livres” as espécies químicas que possuem um ou mais electrões desemparelhados. É esta configuração que os torna altamente instáveis, quimicamente muito reactivos e com um tempo de semi-vida curto (Ternay e Sorokin, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1990). O conceito de “espécies reactivas de oxigénio” é mais amplo e abrange não apenas os radicais livres de oxigénio mas também espécies químicas não radicalares com potencial oxidante. As espécies reactivas de oxigénio que apresentam maior relevância em sistemas biológicos são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (HO^{\cdot}), peróxido (ROO^{\cdot}) e alcóxido (RO^{\cdot}) e as espécies não radicalares oxigénio singuleto (1O_2), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO) (Halliwell e Gutteridge, 1999). A interconversão entre estas espécies reactivas de oxigénio está esquematizada na Figura 10.

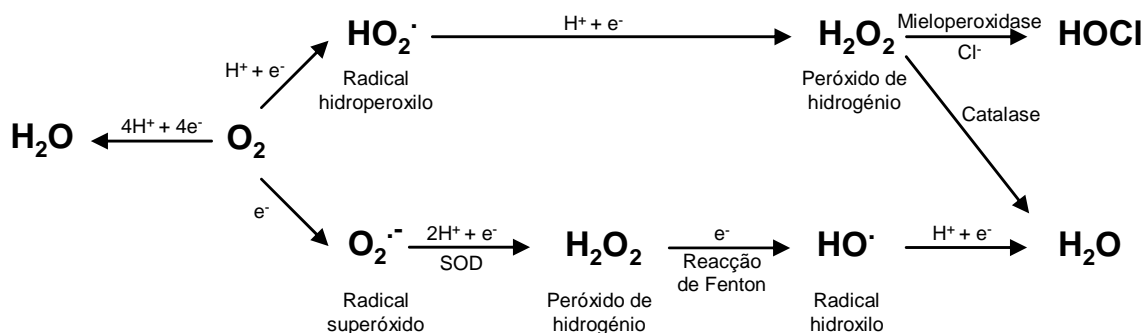


Figura 10 – Formação de espécies reactivas de oxigénio (adaptado de Acworth et al, 1997)

Cada ROS tem um tempo de semi-vida diferente, sabendo-se que o radical hidroxilo é o mais reactivo e o que possui um menor tempo de semi-vida (10^{-9} segundos). Dada a sua elevada reactividade e baixa capacidade de difusão, o radical hidroxilo ataca moléculas próximas ao local onde é formado, essencialmente lípidos. Este radical é capaz de abstrair um hidrogénio das duplas ligações dos ácidos gordos presentes nas membranas celulares, iniciando-se assim o processo de peroxidação lipídica. No caso do radical peroxilo, este tem um tempo de semi-vida mais longo, o que significa que poderá sair do local onde é produzido e exercer o seu efeito tóxico noutros locais na célula (Myers, 1997).

Oxigénio singuleto

Quando o oxigénio absorve energia pode passar ao estado de oxigénio singuleto (1O_2). Esta espécie pode ser formada nos alimentos ou na pele através de reacções de fotossensibilização ou formada no olho associada ao desenvolvimento de cataratas. Pode também ser produzida durante a fagocitose, através da reacção entre o ião hipoclorito e o peróxido de hidrogénio (Acworth et al, 1997)

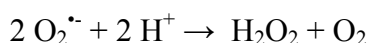
Radical superóxido

Como já foi referido, este radical é formado pela adição de um electrão à molécula de oxigénio. Esta espécie é gerada em vários processos no nosso organismo, nomeadamente na cadeia respiratória mitocondrial, via xantina oxidase (que forma este radical através da conversão de hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico), via NADPH oxidase em células fagocíticas, tendo um papel importante na protecção do organismo contra certas estirpes bacterianas, via síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso e no sistema enzimático citocromo P450 (Myers, 1997; Acworth et al, 1997).

Apesar de não ser um radical muito reactivo, é considerado tóxico uma vez que está envolvido na formação de outras ROS bastante reactivas, nomeadamente o radical hidroxilo (reacção de Haber-Weiss) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) por reacção com o monóxido de azoto (NO^{\cdot}).

Peróxido de hidrogénio

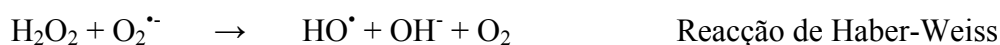
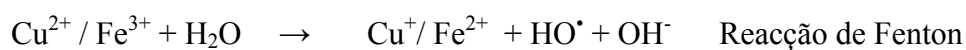
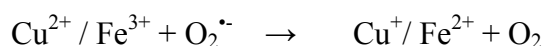
Uma outra espécie reactiva de oxigénio é o peróxido de hidrogénio. Esta espécie é formada *in vivo* através da dismutação do radical superóxido catalizada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Acworth et al, 1997):



O peróxido de hidrogénio embora seja uma espécie pouco reactiva, é capaz de inactivar enzimas, principalmente por oxidação de grupos tíóis essenciais. No entanto, o seu maior poder oxidante é indirecto, como gerador do radical hidroxilo (reacção de Fenton) e pela interacção com o radical superóxido (reacção de Haber-Weiss) (Acworth et al, 1997).

Radical hidroxilo

Este radical pode ser gerado nas células através das reacções de Fenton e de Haber-Weiss, na presença de metais de transição, sendo o ferro e o cobre os mais importantes *in vivo*:



O radical hidroxilo pode também ser formado pela reacção do anião superóxido com o monóxido de azoto. O produto desta reacção, o anião peroxinitrito (ONOO^-), é protonado e decompõe-se a dióxido de azoto e radical hidroxilo (Acworth et al, 1997).

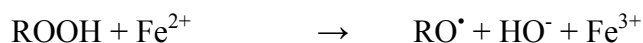
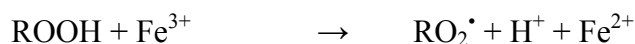
Outra via possível para a formação deste radical envolve a redução univalente do ácido hipocloroso pelo anião superóxido (Koppenol, 1997):



O radical HO[•] mostra uma pequena capacidade de difusão e é considerado o mais reactivo na indução de danos oxidativos nos componentes celulares. Este radical reage prontamente, podendo levar a um efeito de extrema toxicidade, via, por exemplo, peroxidação dos lípidos das membranas celulares e quebra e modificação das bases de DNA levando a alterações na expressão genética (Richter, 1997).

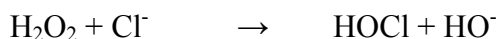
Radicais peroxilo e alcoxilo

A decomposição dos peróxidos, seja por aquecimento ou na presença de iões metálicos, gera radicais peroxilo (ROO[•]) e alcoxilo (RO[•]):



Ácido hipocloroso

O ácido hipocloroso pode ser formado a partir da reacção do peróxido de hidrogénio com ião cloro catalizada pela enzima mieloperoxidase existente nos neutrófilos (Halliwell, 1991).



É um agente antibacteriano com forte actividade oxidante. Nos fluidos humanos oxida o resíduo de metionina da α_1 -antiproteínase (responsável pela inibição da elastase). Mesmo em concentrações baixas tem capacidade para danificar e induzir a destruição celular através da oxidação do grupo tiol das proteínas da membrana plasmática levando à alteração das suas funções (Cochrane, 1991).

As ROS são formadas a partir do oxigénio, o que constitui um verdadeiro paradoxo, pois ao mesmo tempo que é indispensável à vida, pode, todavia, ser causa da morte ou do desenvolvimento de doenças, uma vez que se trata de um dos mais importantes geradores de radicais livres no organismo (Halliwell e Gutteridge, 1999). As ROS podem ser altamente

tóxicas quando em excesso, causando a oxidação de biomoléculas tais como proteínas, lípidos, DNA e a ruptura da homeostasia celular. As ROS por reagirem com a maioria das moléculas do organismo, são capazes de interferir nos processos biológicos, causando diversas doenças, mutações, envelhecimento, entre outras alterações (Halliwell e Gutteridge, 1999).

3.3 Espécies reactivas de azoto

A designação “espécies reactivas de azoto” inclui espécies radicalares como o monóxido de azoto (NO^\bullet) e o radical dióxido de azoto (NO_2^\bullet), mas também compostos não radicalares como o trióxido de diazoto (N_2O_3), tetróxido de diazoto (N_2O_4), anião nitrito (NO_2^-), anião nitrato (NO_3^-), anião nitrocarbonato ($\text{O}_2\text{NOCO}_2^-$), anião nitrosoperoxicarbonato ($\text{ONOO}_2\text{CO}_2^-$) e anião peroxinitrito (ONOO^-) (Halliwell e Gutteridge, 1999). A interconversão entre estas espécies reactivas está esquematizada na Figura 11.

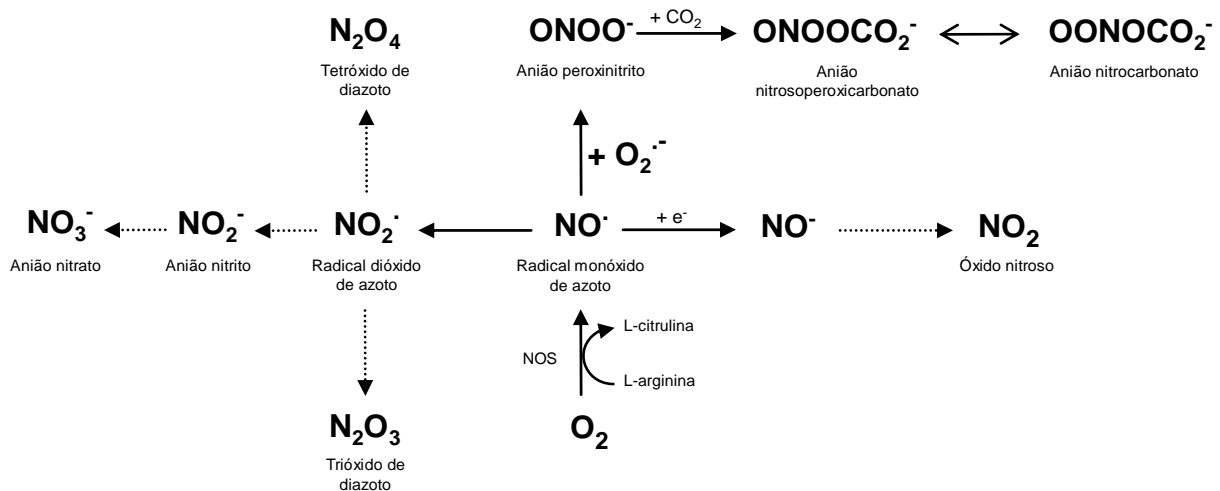


Figura 11- Formação de espécies reactivas de azoto (adaptado de Acworth et al, 1997)

Como mostra a Figura 11, o radical NO^\bullet pode ser produzido a partir da L-arginina por acção da enzima sintetase do monóxido de azoto (NOS) (Acworth et al, 1997). O NO^\bullet também pode ser formado na reacção do ácido nitroso com a água. O ácido nitroso promove a desaminação das bases do DNA que contêm o grupo NH_2 livre. O monóxido de azoto não ataca directamente o DNA, mas pode reagir com o radical superóxido formando o anião

peroxinitrito. É o peroxinitrito que pode sofrer reacções secundárias, formando compostos capazes de nitrar aminoácidos aromáticos e as bases do DNA, em particular a guanina (Eiserich et al., 1996; Halliwell et al., 2000).

3.4 Danificação oxidativa

A condição fisiológica da célula exige o equilíbrio entre as condições pró-oxidante e antioxidante. A formação de espécies oxidantes *in vivo* ocorre durante os processos de transferência de electrões que ocorrem no metabolismo celular, e pela exposição a factores exógenos, tais como as radiações gama e ultravioleta, poluentes do ar, medicamentos, dieta e tabaco. Contudo, a concentração destas espécies pode aumentar devido a um aumento de produção intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (Cerutti et al., 1994). Quando o balanço normal é deslocado a favor da condição oxidante, a célula entra numa situação denominada de stresse oxidativo, tendo como consequência que as ROS e RNS formadas nas células podem causar danos nos lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (Liebler e Reed, 1997; Sies, 1993). Dessa forma, os radicais livres e o stresse oxidativo encontram-se envolvidos numa série de fenómenos fisiológicos e patológicos do nosso organismo, tais como o envelhecimento, o cancro, a aterosclerose, a diabetes, a anemia hemolítica e doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer (Halliwell e Gutteridge, 1999; Loo, 2003; Giasson et al., 2002).

A peroxidação lipídica é a consequência mais estudada do stresse oxidativo. O radical hidroxilo é capaz de abstrair um hidrogénio das duplas ligações dos ácidos gordos presentes nas membranas celulares, iniciando-se assim o processo de peroxidação lipídica (Figura 12). O radical lipídico (L^{\bullet}) formado é convertido sucessivamente a radical peroxilo (LOO^{\bullet}) pela entrada de O_2 , a hidroperóxido ($LOOH$) e a radical alcóxido (LO^{\bullet}) pela reacção de Fenton. A consequente fragmentação dá origem a hidrocarbonetos como o etanol e a aldeídos como o 4-hidroxinonenal e o malonildialdeído. Este processo propaga-se cíclica e continuamente, dado que estão constantemente a formar-se radicais lipídicos (L^{\bullet}). O termo do processo ocorre quando há uma condensação de radicais ou a intervenção de sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Como consequências da peroxidação lipídica ocorre alteração da fluidez das membranas (devido à modificação dos locais de insaturação) e cross-linking (alteração das proteínas das membranas celulares). Além destas alterações, os produtos da

fragmentação dos lípidos das membranas são considerados tóxicos às células (Ternay e Sorokin, 1997; Sevanian e McLeod, 1997).

Os danos no DNA causados por ROS envolvem a clivagem da ligação fosfodiéster, alteração da ribose e oxidação de bases. Deste modo, o stress oxidativo parece estar envolvido em processos de mutagénese, carcinogénese e envelhecimento, entre outras alterações.

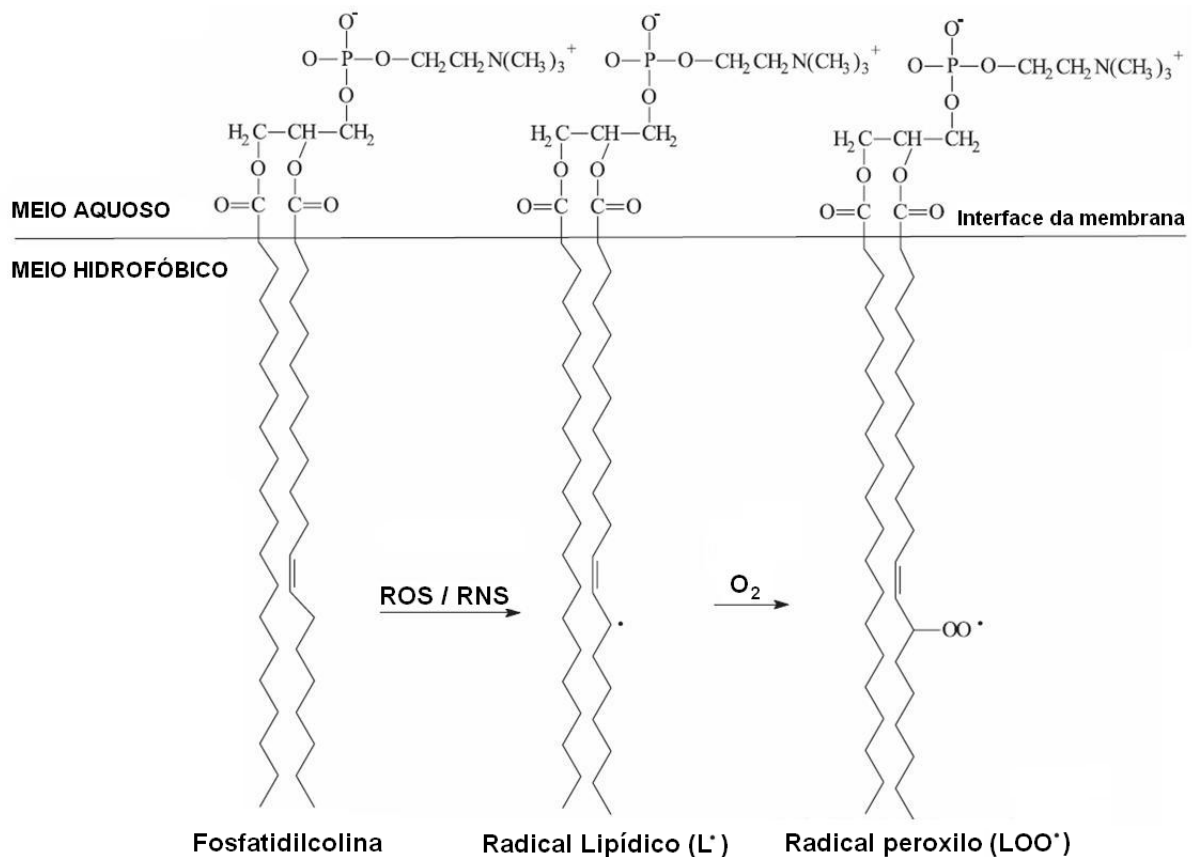


Figura 12– Representação esquemática do ataque de ROS ou RNS aos lípidos das membranas celulares (adaptado de Barreiros et al., 2006)

3.5 Defesas antioxidantes

Qualquer organismo aeróbio tem a capacidade de criar sistemas de protecção de maneira a tentar minimizar os estragos causados por agentes oxidantes que podem ser resultantes, por exemplo, do metabolismo celular do oxigénio.

Um antioxidante é definido como uma substância que, quando presente em baixas concentrações comparativamente às de um substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse substrato (Halliwell e Gutteridge, 1995). Como exemplos de substratos oxidáveis nas células temos as proteínas, os lípidos, os hidratos de carbono e o DNA.

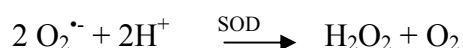
Os antioxidantes que representam a defesa dos organismos contra as ROS são divididos em dois tipos principais, os enzimáticos e os não enzimáticos. As enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase representam a principal defesa enzimática nos organismos superiores. Os antioxidantes não enzimáticos incluem moléculas hidrossolúveis, como a glutatona e o ácido ascórbico, moléculas lipossolúveis, como o α -tocoferol e o β -caroteno, compostos fenólicos, entre outros (Halliwell e Gutteridge, 1999; Liebler e Reed, 1997). Os antioxidantes podem também ser divididos em quatro categorias, mediante o seu modo de actuação *in vivo* (Sies, 1993):

- (i) Antioxidantes preventivos que previnem a formação dos radicais livres mediante a quelatação de metais ou inibição de enzimas geradoras de radicais livres. Como exemplo cita-se a quelatação de iões metálicos pela ferritina, transferrina e ceruloplasmina, evitando desta forma a ocorrência da reacção de Fenton;
- (ii) Antioxidantes sequestradores de radicais que interceptam os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, formando um produto estável, impedindo o início da peroxidação lipídica e interrompendo a propagação da cadeia de radicais. São exemplo disso o ascórbico e o α -tocoferol.
- (iii) Antioxidantes que reparam as lesões causadas pelos radicais, particularmente os danos oxidativos do DNA;
- (iv) Há ainda antioxidantes que proporcionam uma adaptação do organismo em resposta à geração desses radicais, com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes.

3.5.1 Antioxidantes enzimáticos

Superóxido dismutase (SOD)

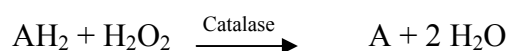
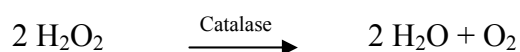
A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima que protege as células aeróbias da acção do radical superóxido, catalisando a conversão deste em peróxido de hidrogénio (Somani et al, 1997):



A SOD encontra-se presente em todos os tecidos, sendo a sua actividade particularmente elevada no fígado e rim. Pode conter diferentes grupos prostéticos metálicos, sendo os mais comuns: o cobre e o zinco presentes na enzima citoplasmática (Cu,Zn-SOD) e o manganês presente na enzima mitocondrial (Mn-SOD) (Somani *et al.*, 1997).

Catalase

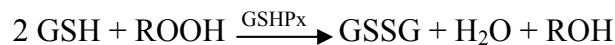
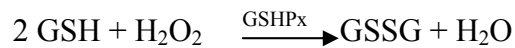
A catalase exerce uma dupla função: (i) catalisa a decomposição do H_2O_2 em água e oxigénio molecular e (ii) a oxidação de doadores de hidrogénio com consumo de peróxido (acção peroxídica) (Somani *et al.*, 1997).



A catalase é uma enzima citoplasmática normalmente presente nos peroxissomas. Encontra-se no fígado e rim em níveis relativamente elevados (Somani *et al.*, 1997). Tem a mesma acção que a glutationa peroxidase ao metabolizar o peróxido de hidrogénio, mas é mais activa que esta quando o H_2O_2 está presente em elevadas concentrações (ordem dos milimolar).

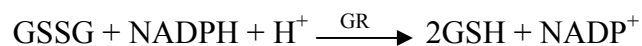
Glutationa peroxidase (GSHPx)

A glutatona peroxidase dependente do selénio catalisa a redução de peróxido de hidrogénio e de hidroperóxidos orgânicos em água. Nesta acção, a GSHPx utiliza a glutatona (GSH) como cofactor (Somani *et al.*, 1997).



Esta enzima encontra-se em grande quantidade quer no citoplasma quer na mitocôndria. É importante realçar que a nível mitocondrial não existe catalase e, por isso, a glutatona peroxidase exerce aí um papel fundamental na metabolização do peróxido de hidrogénio (Halliwell e Gutteridge, 1999). No citoplasma a GSHPx é mais activa que a catalase quando as concentrações de peróxido de hidrogénio são da ordem dos micromolar (Kaul *et al.*, 1993).

A glutatona redutase (GR) regenera a glutatona na forma reduzida a partir da sua forma oxidada, utilizando o NADPH como cofactor (Somani *et al.*, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999):



A GR é uma enzima citosólica essencial na manutenção da razão de GSH/GSSH num nível elevado, para que a célula possa ser capaz de combater situações de stresse oxidativo.

As enzimas antioxidantes apresentam cooperação sinérgica para manter os níveis de ROS dentro de limites fisiológicos. A catalase e a SOD actuam principalmente em regiões hidrofílicas, enquanto o sistema GSHPx protege regiões hidrofóbicas, com especificidade para peróxidos lipídicos (Michiels *et al.*, 1994).

3.5.2 Antioxidantes não enzimáticos

Há uma variedade de moléculas que protegem alvos biológicos da oxidação, incluindo algumas do próprio organismo e outras exógenas, sintéticas ou naturais (Sies, 1993). Vários antioxidantes exógenos, componentes da dieta, são essenciais na protecção contra as ROS e RNS de compartimentos apolares e polares do meio biológico. Como exemplo citam-se o ácido ascórbico, o α -tocoferol, carotenóides e compostos fenólicos encontrados em alimentos de origem animal e vegetal, os quais constituem um grupo heterogéneo de antioxidantes.

Glutathiona

A glutathiona (γ -glutamilcisteinilglicina) é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos (Sies, 1999). Encontra-se presente em praticamente todas as células de mamíferos, onde a sua concentração intracelular é relativamente alta (entre 0,5 e 10 mM), sendo o fígado o órgão mais rico neste tripeptídeo (Kretzschmar e Klinger, 1990).

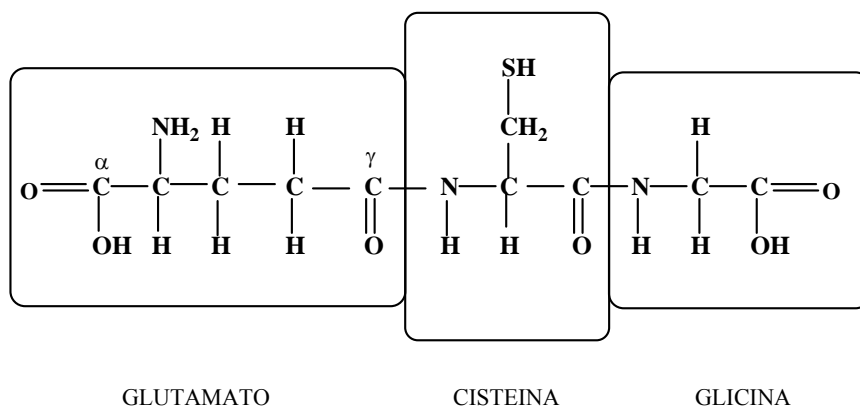
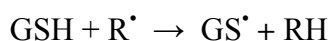


Figura 13- Estrutura da glutathiona

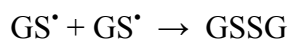
Pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou dimerizada (GSSG; forma oxidada da GSH). Em situações normais, a GSSG representa apenas uma pequena fracção da glutathiona total (5%). No entanto, em situações de stresse oxidativo, a razão GSH/GSSG pode estar diminuída, uma vez que a GSH é consumida com formação de GSSG. A glutathiona na forma oxidada pode ser reduzida a GSH por acção da enzima glutathiona redutase.

Em virtude da sua reactividade devida ao grupo SH presente no resíduo de cisteína, a GSH tem um papel importante na homeostase celular e na protecção contra vários agressores celulares (DeLeve e Kaplowitz, 1991). A glutatona pode reagir com espécies reactivas de oxigénio de duas formas (Sciuto, 1997):

- actuar como redutor, originando GSSG, mediante reacção catalisada pela glutatona peroxidase, ou
- reagir directamente com os radicais, com transferência do electrão livre para a GSH, levando à formação do radical livre glutationilo (GS[•]):



Posteriormente, o radical GS[•] pode dimerizar e formar GSSG:



Adicionalmente, a GSH é também importante para a manutenção do equilíbrio sulfidrilo-dissulfureto proteico e do potencial redox celular que é essencial para a funcionalidade de certas proteínas, nomeadamente enzimas, como as ATPases dependentes de Ca²⁺ (vitais para a manutenção dos níveis plasmáticos de cálcio livre).

A GSH funciona ainda como sequestrador nucleofílico de vários compostos e dos seus metabolitos, através de mecanismos químicos e enzimáticos (mediado pela glutatona-S-transferase), ligando-se covalentemente a centros electrofílicos. Está igualmente envolvida na regeneração do ácido ascórbico e do α -tocoferol e na inibição da peroxidação lipídica (Sciuto, 1997).

Ácido ascórbico

O ácido ascórbico ou vitamina C é frequentemente encontrado no nosso organismo na forma de ascorbato. Por ter características hidrofílicas, está localizado nos compartimentos aquosos

dos tecidos. É um composto que o organismo humano não consegue sintetizar, logo é necessário incluir na dieta (Salem e Baskin, 1997).

Por ser um bom agente redutor, o ácido ascórbico pode ser oxidado pela maioria das ROS e RNS geradas nos compartimentos aquosos dos tecidos (Somani et al, 1997). A sua oxidação produz inicialmente o radical semidesidroascorbato, que é pouco reactivo (Figura 14). Este radical pode ser regenerado a ascorbato ou a partir de duas moléculas pode haver formação de ácido desidroascórbico, que poderá ser posteriormente reduzido a ácido ascórbico através da glutathiona (Ternay e Sorokin, 1997; Liebler e Reed, 1997; Barreiros et al., 2006). A vitamina C está igualmente envolvida na regeneração da vitamina E. Por outro lado, dada a sua capacidade para reduzir metais de transição, o ácido ascórbico pode actuar como pró-oxidante quando em baixa concentração.

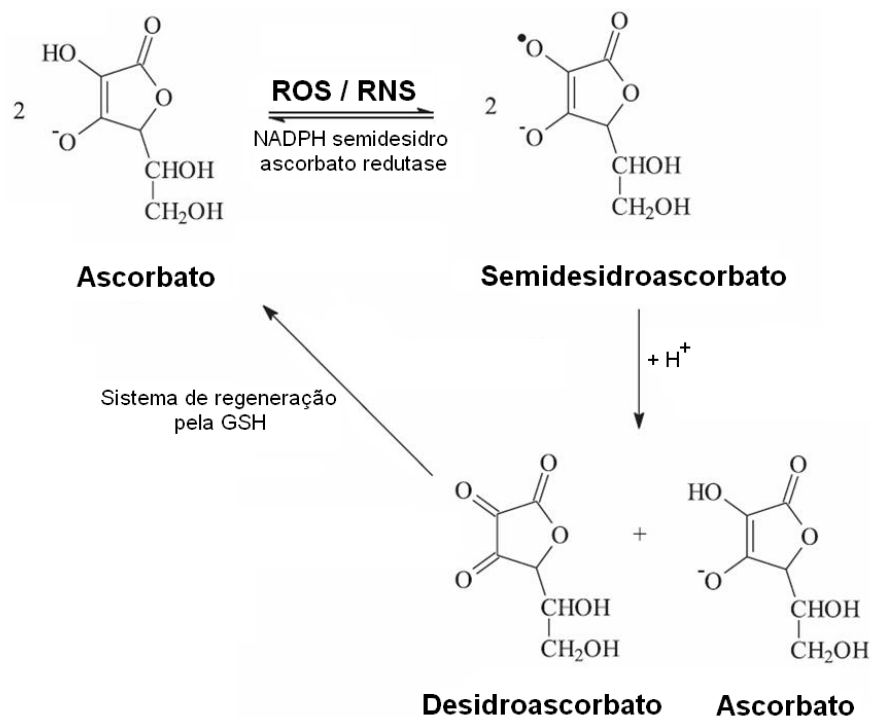
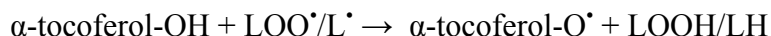


Figura 14 – Ciclo oxidativo do ácido ascórbico (adaptado de Barreiros et al., 2006)

Vitamina E

A vitamina E é constituída por uma mistura de quatro tocoferóis, sendo o alfa-tocoferol o mais activo (Halliwell e Gutteridge, 1999; Liebler e Reed, 1997). O α -tocoferol é o principal antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares e actua na protecção contra a peroxidação lipídica (Salem e Baskin, 1997).

Como se pode ver na Figura 15, o α -tocoferol possui um grupo hidroxilo na sua estrutura. Este grupo perde facilmente o hidrogénio, tornando-se a molécula de eleição para os radicais peroxilo e alcóxido formados durante a peroxidação dos lípidos das membranas. Há então formação de um novo radical α -tocoferilo (α -tocoferol-O \cdot) que é pouco reactivo.



Este radical, após migrar para a superfície membranar, é regenerado a α -tocoferol pelo ácido ascórbico ou glutatona (Liebler e Reed, 1997) (Figura 15).

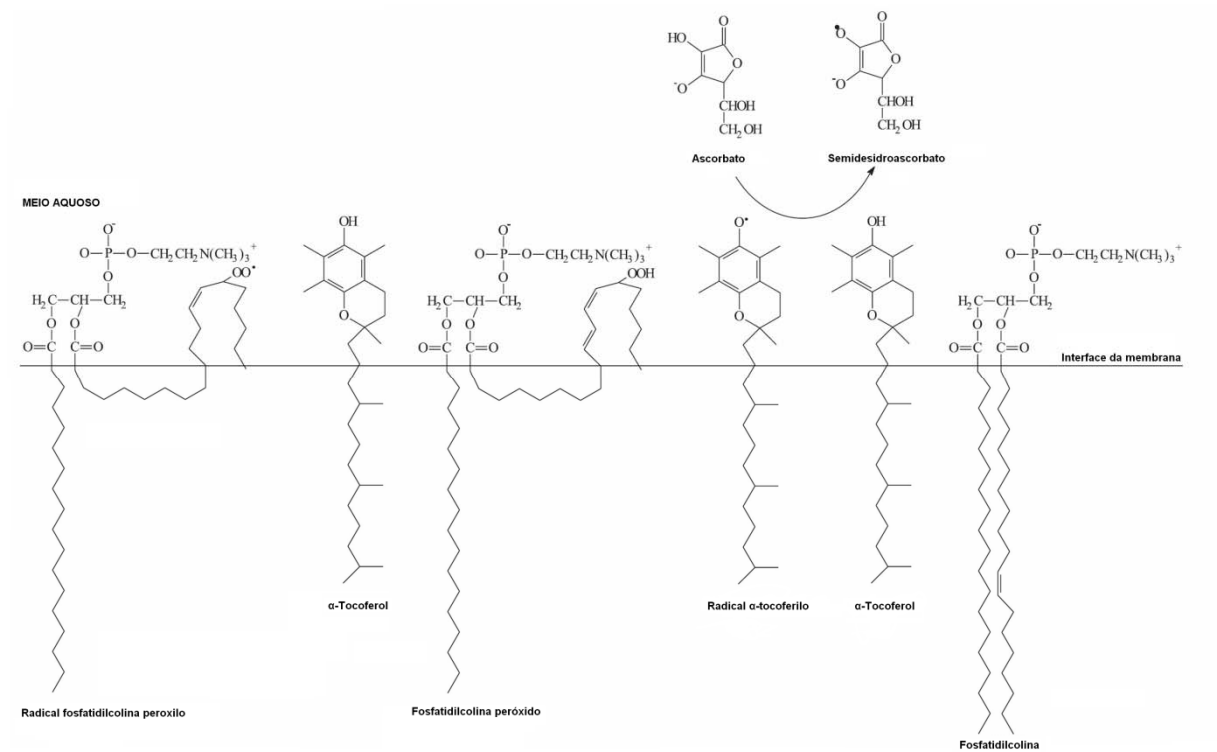


Figura 15 – Representação esquemática da protecção do α -tocoferol e ácido ascórbico no processo de peroxidação lipídica induzida por ROS ou RNS (adaptado de Barreiros et al., 2006).

Carotenóides

Os carotenóides que incluem o α , β , γ e δ -caroteno são antioxidantes lipossolúveis abundantes em plantas verdes, cenouras e outros vegetais. O β -caroteno (Figura 16) é o mais importante precursor da vitamina A (Ternay e Sorokin, 1997).

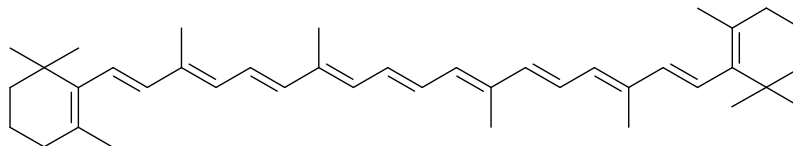


Figura 16- Estrutura do β -caroteno (adaptado de Seabra et al., 2006)

A vitamina A tem fraca acção antioxidante e é incapaz de actuar sobre o oxigénio singuleto, mas o β -caroteno diminui a formação desta espécie *in vivo* e ajuda a remover outras ROS já formadas.

3.5.3 Compostos fenólicos

A acção antioxidante dos compostos fenólicos assenta essencialmente no elevado potencial que apresentam para sequestrar radicais livres, tais como, os radicais superóxido, hidroxilo e peróxido (Halliwell, 2000; Yanishlieva-Maslarova, 2001). Os compostos fenólicos não reagem rapidamente com o peróxido de hidrogénio mas são capazes de sequestrar o oxigénio singuleto e o ácido hipocloroso (Payá et al. 1992; Halliwell, 2000).

Uma outra propriedade dos compostos fenólicos é a possibilidade de quelatarem iões metálicos (Rice-Evans et al., 1995; Decker, 1997; Brown et al., 1998; Croft, 1998). Os compostos fenólicos podem ainda interagir sinergicamente com outros antioxidantes como o ácido ascórbico e o α -tocoferol (Croft 1998; Liao e Yin, 2000, Shi et al., 2001).

Na natureza são numerosos os compostos de natureza fenólica, sendo os mais abundantes os ácidos fenólicos e flavonóides, estando ambos presentes em frutos e legumes (Silva, 1999a; Silva et al., 2000; Shi et al., 2001; Degáspari e Waszczynskyj, 2004).

Ácidos fenólicos como antioxidantes

Os ácidos fenólicos estão divididos em dois grupos: (i) os derivados do ácido hidroxicinâmico, que possuem um anel aromático com uma cadeia lateral constituída por 3 carbonos e (ii) os derivados do ácido hidroxibenzóico, que possuem grupo carboxílico ligado ao anel aromático. Os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, cafeico e sináptico são os hidroxicinâmicos mais comuns na natureza. Estes ácidos existem nas plantas, usualmente na forma de ésteres, como por exemplo o ácido clorogénico (ácido 5-*O*-cafeoilquínico) cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado com o ácido cafeico. Também são encontrados na forma de glicósidos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres (Tapiero et al., 2002).

No grupo dos ácidos hidroxibenzóicos, destacam-se os ácidos protocatéuico, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálgico (Silva, 1999a; Silva et al., 2000a; Valentão, 2002; Degáspari e Waszczynskyj, 2004).

A posição e o número de grupos hidroxilo presentes na molécula são determinantes na actividade antioxidante destes compostos (Figura 187). O hidroxilo do ácido ferúlico existente na posição *orto* com o grupo metoxilo, dador de electrões, é um factor que aumenta a estabilidade do radical fenoxilo e aumenta a eficiência antioxidante do composto (Cuvelier et al, 1992). A presença de um segundo hidroxilo na posição *orto* ou *para* também aumenta a actividade antioxidante. O ácido cafeico, que apresenta essa característica, possui uma actividade antioxidante maior do que o ferúlico (Chen e Ho, 1997). O efeito sequestrante do radical hidroxilo parece estar directamente relacionado aos grupos hidroxilo localizados na posição *para* no anel aromático.

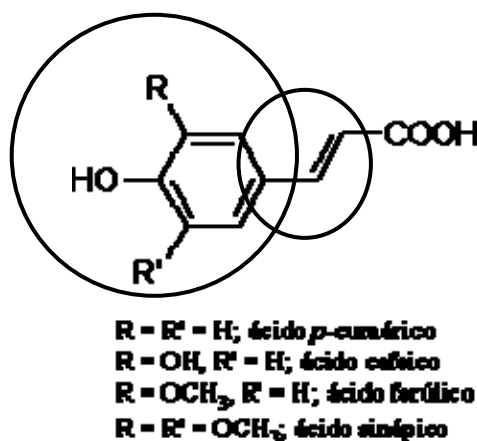


Figura 17- Relação estrutura-actividade antioxidante dos ácidos fenólicos (adaptado de Valentão, 2002).

Os ácidos sinápico, ferúlico e *p*-cumárico são antioxidantes mais eficazes do que os derivados do ácido benzóico, tais como ácido procatéuico, siríngico e vanílico. Isso deve-se à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico (-HC=CHCOOH) (Silva, 2005; Silva et al., 2004b; Valentão, 2002) (Figura 17), que participa da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do electrão desemparelhado, enquanto que os

derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica (Natella et al., 1999; Wanasundara et al., 1994).

Flavonóides como antioxidantes

A actividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura química, estando associada às seguintes características estruturais: (i) padrão de substituição *orto*-di-hidroxi no anel B (grupo catecol), (ii) ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 e grupo carbonilo em 4, no anel C, e (iii) grupos hidroxilo em 3, no anel C, e em 5 e 7, no anel A (Valentão, 2002, Silva, 2005; Silva et al., 2004b) (Figura 18).

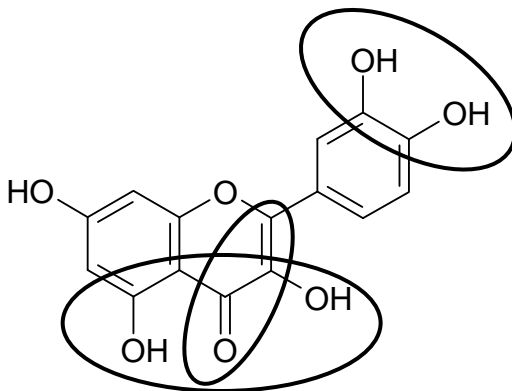


Figura 18- Relação estrutura-actividade antioxidante dos flavonóides (adaptado de Valentão, 2002).

A actividade sequestradora de radicais está directamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonóides e das espécies a serem sequestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonóide, maior é sua actividade como sequestrador de radicais livres. Flavonóides com potencial de oxidação menor que o do Fe^{3+} e Cu^{2+} e seus complexos podem reduzir esses metais, sendo potencialmente pró-oxidantes, tendo em vista que o Fe^{2+} e o Cu^+ participam da reacção de Fenton geradora de radicais livres. Por outro lado, quanto maior for o número de grupos hidroxilo, maior será a actividade como agente dador de prótons e de electrões. Flavonóides monohidroxilados apresentam actividade muito baixa, por exemplo a 5-hidroxi-flavona tem actividade abaixo dos limites de detecção. As flavonas que possuem apenas um hidroxilo em 6, 3' ou 4', assim como as flavanonas que apresentam apenas um hidroxilo em

2', 3', 4' ou 6 também mostram fraca actividade. Nos estudos realizados verificou-se que para haver protecção das membranas contra o stresse oxidativo é necessário no mínimo dois grupos hidroxilo fenólicos no flavonóide, tendo sido demonstrando que os monohidroxi flavonóides não são efectivos. Entre os flavonóides dihidroxilados, aqueles que contêm o grupo catecol (3',4'-diidroxido) no anel B possuem maior actividade sequestradora de radicais livres (Fukumoto e Mazza, 2000; Burda e Oleszek, 2001). Como mostra a Figura 19, a oxidação do flavonóide ocorre no anel B quando o catecol está presente, originando um radical *orto*-semiquinona relativamente estável devido à estabilização do electrão desemparelhado. Este radical semiquinona pode reagir com um segundo radical (R[•]) e originar uma quinona (Rice-Evans *et al.*, 1996, Pietta, 2000, Seabra *et al.*, 2006).

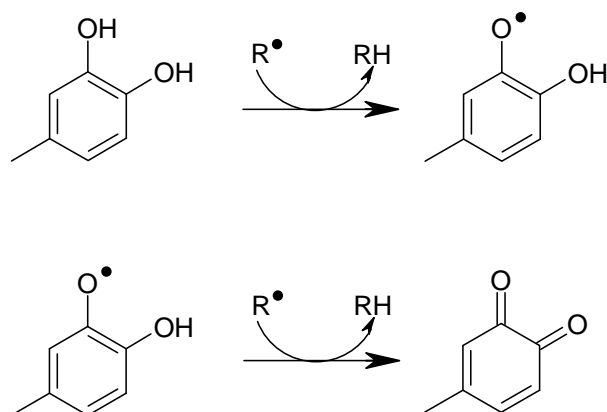


Figura 19 – Sequestração de radicais livres por flavonóides (adaptado de Seabra *et al.*, 2006).

A estabilidade do radical do flavonóide formado depende da habilidade do flavonóide em deslocalizar o electrão desemparelhado. A presença de um grupo hidroxilo em 3 (anel C) é um factor determinante na estabilidade do radical. Assim, flavonóis e flavonas contendo um catecol no anel B possuem forte actividade, sendo os flavonóis mais potentes que as respectivas flavonas devido à presença do grupo hidroxilo em 3 (Pietta, 2000).

Outros factores importantes para a actividade antioxidante são a presença de insaturação no anel C conjugada com o grupo carbonilo e hidroxilo em 4' (anel B); o ângulo do anel B do flavonóide e do radical formado em relação à restante estrutura, sendo que esse ângulo é regulado pela presença ou ausência de hidroxilo em 3; a presença de duas insaturações em C; conjugação do carbonilo em 4 (anel C) com hidroxilo em 5 (anel A) e, presença de hidroxilo em 7 (anel A). A doação do H[•] ocorre principalmente nas posições 7-OH > 4'-OH > 5-OH,

seguindo a sequência das constantes de dissociação. Os flavonóides com múltiplos hidroxilos como a miricetina, quercetina, luteolina, fustina, eriodictiol e taxifolina possuem forte actividade antioxidante quando comparados ao α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno, glutathiona, ácido úrico e bilirrubina.

A remoção de metais de transição livres no meio biológico é fundamental para a protecção antioxidante do organismo, visto que esses catalisam as reacções de Fenton e de Haber-Weiss. Para a actividade de quelatação de metais de transição é fundamental a presença de grupos *orto*-difenílicos, onde o mais comum é o sistema 3',4'-diidroxil (grupo catecol) no anel B e/ou estruturas cetol como 4-ceto-3-hidroxi no anel heterocíclico e 4-ceto-5-hidroxi no anel C (Figura 20) (Rice-Evans *et al.*, 1996, Pietta, 2000).

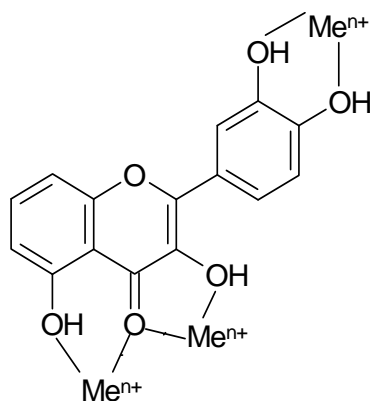


Figura 20- Representação dos locais de ligação dos flavonóides a iões metálicos (adaptado de Seabra *et al.*, 2006).

O último factor importante que influencia a actividade antioxidante destes compostos fenólicos é a sua interacção com as biomembranas. A lipofilia do flavonóide indica a incorporação desse pela membrana, que é alvo da maioria das ROS e RNS. Assim, deve haver uma concentração mínima do flavonóide por ácido gordo, de modo a assegurar a presença de uma das suas moléculas próxima ao local de ataque do radical. Flavonóides que possuem uma cadeia de açúcares ligada na sua estrutura são muito polares, não sendo assimilados pela membrana, porém, nesta forma eles podem ser armazenados em vesículas, possuindo um tempo maior de permanência no organismo. Os flavonóides que são assimilados pelas membranas exercem a função de moduladores de fluidez. Restringindo essa fluidez os flavonóides geram um impedimento físico para a difusão das ROS e RNS, de modo que

decrece a cinética das reacções responsáveis pelo stresse oxidativo. Esse tipo de actividade antioxidante é similar ao descrito para o α -tocoferol e o colesterol.

3.6 Actividade antioxidante da espécie *Cydonia oblonga* Miller

O potencial anti-radicalar de extractos metanólicos de polpa, casca e semente de marmelo foi avaliado por Silva *et al.* (2004b e 2008), recorrendo a um microensaio com o radical DPPH. Os extractos foram divididos em duas fracções: a fracção fenólica e a fracção de ácidos orgânicos.

A fracção fenólica apresentou sempre uma actividade antioxidante superior à do extracto metanólico total, o que parece indicar que esta fracção é a principal responsável pelo potencial antioxidante do marmelo. De entre os extractos metanólicos totais, o da casca foi o que apresentou uma capacidade antioxidante superior. Relativamente às fracções fenólicas, a das sementes foi a que exibiu uma actividade anti-radicalar mais forte (Silva, 2005; Silva *et al.*, 2004b e 2008).

Os valores de EC₅₀ das fracções fenólicas de polpa, casca e marmeladas estiveram fortemente correlacionados com os conteúdos totais em ácidos cafeoilquínicos e em fenóis (Silva, 2005; Silva *et al.*, 2004b e 2008).

A presença do grupo catecol, que confere grande estabilidade aos radicais fenoxilo, participando na deslocalização electrónica, explica a actividade antioxidante dos ácidos cafeoilquínicos (Laranjinha *et al.*, 1994, Silva, 2005, Silva *et al.*, 2004b e 2008). Adicionalmente, a presença da ligação dupla conjugada na cadeia lateral, tem um efeito estabilizador do radical fenoxilo, o que melhora a actividade antioxidante (Silva, 2005; Silva *et al.*, 2004b e 2008).

Nos estudos realizados por Silva *et al.* (2004b, 2008) não foi encontrada qualquer correlação entre a actividade antioxidante dos extractos metanólicos de marmelo e marmelada e o conteúdo em glicosil flavonóis, o que não é de estranhar, tendo em consideração os resultados obtidos por Burda & Oleszek (2001). Estes autores compararam a actividade antioxidante de

agliconas e glicósidos de flavonóis e verificaram que a ligação de um açúcar pelo hidroxilo em C-3 resulta na perda total da referida actividade (Burda & Oleszek, 2001).

A fracção fenólica das sementes teve um comportamento diferente provavelmente devido à presença das C-glicosil flavonas. Estes compostos são caracterizados pela presença de um grupo hidroxilo na posição 4' do anel B, de uma dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 em conjugação com o grupo oxo no carbono C-4 do anel C e de dois grupos hidroxilo nos carbonos C-5 e C-7 do anel A. Esta estrutura química determina o efeito sequestrador de radicais livres dos flavonóides (Rice Evans *et al.*, 1995; Burda & Oleszek, 2001; Silva, 2005; Silva *et al.*, 2004b e 2008). A presença de substituição *o*-dihidroxi no anel B, tal como acontece nos derivados da luteolina, também é importante para a sua actividade antioxidante (Rice Evans *et al.*, 1995; Silva, 2005). Aliás, Rice Evans *et al.* (1995) e Burda & Oleszek (2001) já descreveram a actividade antioxidante da luteolina e da apigenina e de alguns dos seus derivados. Além disso, a presença de substituições com grupos metoxilo em certas posições, como ocorre no crisoeriol, também pode aumentar a actividade anti-radicalar dos flavonóides (Burda & Oleszek, 2001; Silva, 2005; Silva *et al.*, 2004b e 2008)

A actividade antioxidante dos extractos analisados não pode ser atribuída unicamente aos seus compostos fenólicos e/ou ácidos orgânicos, mas sim ao resultado da acção global dos compostos presentes nestes extractos de fruto e de marmelada e a possíveis efeitos sinérgicos e antagónicos ainda desconhecidos. Contudo, os resultados sugerem que os compostos fenólicos são os principais antioxidantes do marmelo. Por isso, o marmelo e a marmelada podem ser usados como boas fontes de antioxidantes na nossa dieta, na prevenção de doenças nas quais os radicais livres estão envolvidos. Adicionalmente, os resíduos da indústria da marmelada (cascas e sementes) poderão ser reaproveitados, uma vez que são fontes boas e económicas de antioxidantes (Silva, 2005; Silva *et al.*, 2004b e 2008).

**IV. PARTE EXPERIMENTAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE DA FOLHA DE *CYDONIA OBLONGA*
MILLER**

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Neste trabalho de monografia realizou-se um estudo aprofundado da folha de *C. oblonga*, com vista à avaliação do seu potencial antioxidante. Para atingir esse objectivo, o método extractivo, bem como os ensaios para a avaliação do poder redutor, determinado pelo Método de Folin-Ciocalteu, e da actividade anti-radicalar relativa ao sequestro do radical DPPH previamente desenvolvidos (Wang et al., 1997; Silva et al., 2004b e 2008, Silva, 2005) foram adaptados a esta planta medicinal.

As referidas metodologias foram aplicadas a doze amostras de folhas de marmeleiro, provenientes do Norte e Centro de Portugal (Carrazeda de Ansiães e Covilhã, respectivamente), colhidas em Junho e Outubro de 2006, e ainda a uma amostra comercial de chá verde. É de salientar, que o chá verde foi escolhido como uma planta de referência, uma vez que é reconhecido pela comunidade científica internacional como um antioxidante de origem natural extremamente eficaz (Cao et al., 1996; Li et al., 2008; Pokorný, 2007; Stewart et al., 2005; Wheeler and Wheeler, 2004).

Após a avaliação do poder redutor e da actividade anti-radicalar das várias amostras foi efectuado o tratamento estatístico dos resultados, no sentido de verificar se a folha de marmeleiro pode ser considerada uma planta medicinal com um potencial antioxidante semelhante ao do chá verde. Foi também nosso intuito avaliar a possível influência de factores como a origem geográfica e a época de colheita na actividade antioxidante desta folha.

O poder redutor da folha do marmeleiro, determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, variou entre 164,5 e 294,6 g de ácido 5-*O*-cafeoilquínico / kg de folha seca (valor médio de $227,8 \pm 34,9$ g de ácido 5-*O*-cafeoilquínico/kg folha seca). No chá verde encontrou-se um valor médio de $112,5 \pm 1,5$ g de ácido 5-*O*-cafeoilquínico / kg de folha seca, o que indica que o poder redutor da folha do marmeleiro é significativamente superior ($P \leq 0,001$) ao observado para a planta medicinal de referência. Tendo em consideração estudos anteriores (Oliveira et al., 2007; Oliveira, 2008; Silva et al., 2004b e 2008), os ácidos cafeoilquínicos são provavelmente os principais responsáveis pelo grande poder redutor apresentado pela folha de marmeleiro.

As amostras de Carrazeda de Ansiães apresentaram um índice de Folin-Ciocalteu significativamente superior às da Covilhã (valor médio de $252,6 \pm 23,7$ e $203,0 \pm 25,4$ g/kg de

folha seca, respectivamente; $P \leq 0,005$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos índices de Folin-Ciocalteu de acordo o mês de colheita.

Neste estudo verificou-se igualmente que tanto o extracto metanólico da folha do marmeleiro como o do chá verde apresentaram uma actividade anti-radicalar fortemente dependente da concentração, ou seja, quanto maior a concentração do extracto, maior foi a actividade anti-radicalar observada. Apesar do extracto da folha do marmeleiro possuir uma considerável actividade anti-radicalar, esta foi mais baixa ($P \leq 0,005$) que a demonstrada pelo extracto do chá verde. Os valores de EC_{50} da folha do marmeleiro variaram entre 14,5 e 27,6 $\mu\text{g/ml}$ (valor médio de $21,6 \pm 3,5 \mu\text{g/ml}$), enquanto que no chá verde foi encontrado um valor de $12,7 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$. Esta actividade também deve ser devida aos compostos fenólicos desta folha, em particular aos ácidos cafeoilquínicos (Oliveira et al., 2007; Oliveira, 2008; Silva et al., 2004b e 2008). Tal como já foi referido anteriormente, a presença do grupo catecol, que confere grande estabilidade aos radicais fenoxilo, participando na deslocalização electrónica, explica a actividade antioxidante dos ácidos cafeoilquínicos (Laranjinha et al., 1994; Silva, 2005; Silva et al., 2004b e 2008). Para além disso, a presença da ligação dupla conjugada na cadeia lateral, tem um efeito estabilizador do radical fenoxilo, o que melhora a actividade antioxidante (Silva, 2005; Silva et al., 2004b e 2008).

Não foram encontradas diferenças significativas no potencial anti-radicalar de acordo com a origem geográfica ou a data de colheita da folha.

Tal como seria de esperar, tendo em consideração o conteúdo fenólico das várias partes do marmeleiro (Oliveira et al., 2007; Oliveira, 2008; Silva et al., 2004b e 2008), a folha apresentou um EC_{50} médio muito inferior ao do fruto (EC_{50} médios de 1700, 600 e 2000 $\mu\text{g/ml}$ para polpa, casca e semente de marmelo, respectivamente), o que indica que se trata de um antioxidante muito mais eficaz. Na verdade, as folhas estão mais expostas às radiações UV do que os frutos, por isso é natural que apresentem uma actividade anti-radicalar superior. Muitos antioxidantes, como os compostos fenólicos, absorvem as radiações UV, actuando como filtros solares, protegendo assim algumas estruturas celulares frágeis como os cloroplastos (clorofilas). Devido às suas propriedades antioxidantes, os polifenóis protegem as células de processos de foto-oxidação causados pelas radiações UV (Macheix et al., 1990; Harborne, 2000; Silva et al., 2004a e 2008; Silva, 2005; Oliveira et al., 2007; Oliveira, 2008).

Neste estudo não foi encontrada uma correlação linear entre a actividade anti-radicalar e o poder redutor. De acordo com outros autores (Yildirim *et al.*, 2001; García-Alonso *et al.*, 2004), nem sempre se verifica a referida correlação, uma vez que podem ocorrer sinergismos e/ou antagonismos entre os diferentes fitoquímicos existentes no extracto.

Este trabalho de Monografia revelou que a folha de marmeleiro constitui uma fonte natural de fitoquímicos muito promissora e com um potencial antioxidante semelhante ao do chá verde. Este conhecimento pode incentivar a utilização desta planta medicinal em Fitoterapia, bem como a extracção dos seus constituintes/princípios activos para produzir novos medicamentos e cosméticos ou servir de base para semissíntese de novos fármacos que poderão vir a ser usados na prevenção de várias doenças crónicas devidas à acção dos radicais livres no nosso organismo.

VI. BIBLIOGRAFIA

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

Andrade, P.B., Carvalho, A.R.F., Seabra, R.M. e Ferreira, M.A. (1998). A previous study of phenolic profiles of quince, pear, and apple purees by HPLC diode array detection for the evaluation of quince puree genuineness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, pp. 968-972.

Andrade, P.B., Silva, B.M., Carvalho, A.R.F., Seabra, R.M. e Ferreira, M.A. (1999). Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of sodium benzoate and phenolic compounds in quince jam. In: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 22, pp. 1069-1075.

Andrade, P.B., Silva, B.M., Valentão, P., Seabra, R.M. e Ferreira, M.A. (2000). *El membrillo en Portugal*. In *El membrillo y su dulce*. Carlos A. Andrada – Editorial La Colmena, Buenos Aires, Argentina.

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

Belitz, D., e W. Grosch. (1999). *Food Chemistry*, 2nd ed., Springer, New York.

Bengochea, M.L., Sancho, A.I., Bartolomé, B., Estrella, I., Gómez-Córdovés. C. e Hernández, M.T. (1997). Phenolic composition os industrially manufactured purées and concentrates from peach and apple fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp. 4071-4075.

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

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

Bruneton, J. (1999). Composés phénoliques, shikimates, acétates. In *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris: Editions TEC & DOC.

Burda, S. e Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pp. 2774-2779.

Cao, G., Sofic, E. e Prior, R. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, pp. 3426-3431.

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

Chen, J. H. e Ho, C. T. (1997) Antioxidant activities of acid caffeic and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 45, pp. 2374-2378.

Cochrane, C.G. (1991). Cellular injury by oxidants. *American Journal Medicine*, 91, pp. 23S-30S.

Costa, R., Magalhães, A., Pereira, J., Andrade, P., Valentão, P., Carvalho, M. e Silva, B. (2009). Evaluation os 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.

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

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

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

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

Du Toit, R., Volsteedt, Y. e Apostolides, Z. (2001). Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology*, 166, pp. 63-69.

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

Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C.I.G., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N. e Cabras, P. (2007). Antimicrobial activity of tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, pp. 963-969.

Ferreres, F., Silva, B.M., Andrade, P.B., Seabra, R.M. e Ferreira, M.A. (2003). Approach to the study of C-glycosyl flavones by Ion Trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). In: *Phytochemical Analysis*, 14, pp. 352-359.

Ferreres, F.; Tomás-Lorent, F. e Tomás-Barberán, F.A. (1989). Current trends in plant flavonoid analysis. In *Studies in natural products chemistry*. Atta-ur-Rahman (ed). Amsterdam: Elsevier.

Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Mastellone, C., Picoella, S. e Monaco, P. (2007). Isolation, structure elucidation and evaluation of cydonioside A, an unusual terpenoid from the fruits of *Cydonia vulgaris*. *Chemistry and Biodiversity*, 4, pp. 973-979.

Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Mastellone, C., Piscopo, V., Caputo, R. e Monaco, P. (2008). Isolation and structure elucidation of antioxidant polyphenols from quince (*Cydonia vulgaris*) peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 2660-2667.

Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Mastellone, C., Piscopo, V. e Monaco, P. (2006). Spectroscopic identification and antioxidant activity of glucosylated carotenoid metabolites from *Cydonia vulgaris* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp. 9592-9597.

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

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

Garcia-Viguera, C. e Bridle, P. (1995). Analysis of non-coloured phenolics in red wines. A comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*, 54, pp. 349-352.

Giada, M. L. e Filho, J. M. (2006). The importance of dietary phenolic compounds in the promotion of human health. *Biological and Health Science*, 12 (4), pp. 7-15.

Giasson, B.I., Ischiropoulos, H., Lee, V. M. e Trojanowski, J. Q. (2002). The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, 32, pp. 1264-1275.

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

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

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

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

Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford University Press*.

Hamauzu, Y., Hisako, Y., Takaroni, I., Kume, C. e Omanyuda, M. (2005). Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.) and apple (*Mallus domestica* Mill.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 928–934.

Hamauzu, Y., Takaroni, I., Kume, C., Irie, M. e Hiramatsu, K. (2006). Antioxidant and antiulcerative properties of phenolics from Chinese quince, quince, and apple fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp. 765–772.

Harbone, J.B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. In *Methods in plant biochemistry*, vol. 1: plant phenolics. Dey, P.M. e Harbone, J.B. (ed). London: *Academic press*.

Harborne, J. (2000). Chemistry of the flavonoids pigments. In: *Wake up to flavonoids*; Rice-Evans, C., Ed., *The Royal Society Of Medicine Press Limited*: London, U.K., pp. 9-11.

Hostettmann, K. e Hostettmann, M. (1989). Xanthones. In *Methods in plant biochemistry – Plant phenolics*, vol. 1. Harbone, J.B. (ed). London: *Academic press*.

Huang, D., Ou, B. e Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, pp. 1841–1856.

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

Kim, M.Y., Seguin, P., Ahn, J.K., Kim, J.J., Chun, S.C., Kim, E.H., Seo, S.H., Kang, E.Y., Kim, S.L., Park, Y.J. e Ro, H.M., Chung, I.M. (2008). Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 7265–7270.

Koppenol, W. H. (1997). The chemical reactivity of radicals. *In*: Wallace, K. B. (Ed.). *Free Radical Toxicology*. Taylor & Francis, pp. 3-24.

Laranjinha, J.A., Almeida, L.M. e Madeira, V.M. (1994). Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 3, pp. 487–494.

Laranjinha, J.A.; Rupérez, P. e Calixto, F.S. (1997). Pineapple shell as source of dietary fiber with associated polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp. 4028-4031.

Larrauri, J.A., Rupérez, P. e Xalixo, F.S. (1997). Pineapple shell as source of dietary fiber with associated polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp. 4028-4031.

Li, F., Wang, F., Yu, F., Fang, Y., Xin, Z., Yang, F., Xu, J., Zhao, L. e Hu, Q. (2008). In vitro antioxidant and anticancer activities of ethanolic extract of selenium-enriched green tea. *Food Chemistry*, 111, pp. 165–170.

Li, W., Shan, F., Sun, S., Corke, H. e Beta, T. (2005). Free radical scavenging properties and phenolic content of Chinese black-grained wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 8533–8536.

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

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

Loo, G. (2003) Redox sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, pp. 63-73.

Mabry, T.J.; Makham, K.R. e Thomas, M.B. (1970). *The systematic identification of flavonoids*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Macheix, J.J; Fleuriet, A. e Billot, J. (1990). The main phenolics of fruits. In *Fruit phenolics*. Boca Raton, Florida: *CRC Press, Inc.*

Markham, K.R. (1982). Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. In *Techniques of flavonoid identification*. Theherne, J.E. e Rubery, P.H. (ed). London: *Academic Press*.

Markham, K.R. (1989). Flavones, flavonols and their glycosides. In *Methodes in plant biochemistry*, vol. 1: plant phenolics. Dey, P.M. e Harbone, J.B. (Ed). London: *Academic Press*.

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

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

- Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M. e Hara, Y. (1996). Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 21, pp. 895–902.
- Natella F, Nardini M, Di Felice, M. e Scaccini C. (1999) Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp.1453-1459.
- Ohnishi, M., Morishita, H., Iwahashi, H., Toda, S., Shirataki, Y., Kimura, M. e Kido, R. (1994). *Phytochemistry*, 36, pp. 579–583.
- Oleszek, W., Amiot, M.J. e Aubert, S.Y. (1994). Identification of some phenolic compounds in pear fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, pp. 1261-1265.
- Oliveira, A. (2008). Caracterização Química de Folhas de *Cydonia oblonga* Miller: Perfil em Compostos Fenólicos e Ácidos Orgânicos. Monografia. Porto, Universidade Fernando Pessoa.
- Oliveira, A. P., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Seabra, R. M. e Silva, B. M. (2007). Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 7926-7930.
- Oliveira, A. P., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Seabra, R. M. e Silva, B. M. (2008). Organic acids composition of *Cydonia oblonga* Miller leaf. *Food Chemistry*, 111, pp. 393-399 .
- Oliveira, A. P. e Silva, B. M. (2007). Marmelo (*Cydonia oblonga* Miller): Fonte de Compostos Biologicamente activos. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*.
- Ooghe, W.C. e Detavernier, C.M. (1997). Detection of the addition of Citrus reticulata and hybrids to Citrus sinensis by flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp. 1633-1637.

Ooghe, W.C., Ooghe, S.J., Detavernier, C.M. e Huyghebaert, A. (1994a). Characterization of orange juice (*Citrus sinensis*) by flavonone glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, pp. 2183-2190.

Ooghe, W.C., Ooghe, S.J., Detavernier, C.M. e Huyghebaert, A. (1994b). Characterization of orange juice (*Citrus sinensis*) by polymethoxylated flavones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, pp. 2191-2195.

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

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

Pokorný, J. (2007). Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, pp. 629–642.

Psotová, J., Lasovsky, J. e Vicar, J. (2003). Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomedical Papers* 147, pp. 147–153.

Ribéreau-Gayon, P. (1968a). Notions generals sur les composés phénoliques. In *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod.

Ribéreau-Gayon, P. (1968b). Les acides-phénols et leurs dérivés. In *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod.

Ribéreau-Gayon, P. (1968c). Les flavones, les flavonols et les composés voisins. In *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod.

Ribéreau-Gayon, P. (1968d). Méthodes generals d'étude des composes phénoliques, In *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod.

Ribéreau-Gayon, P. (1968e). Propriétés chimiques des phenols. Applications aux produits naturels. In *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M. e Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, pp. 375-383.

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

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

Salem, H. e Baskin, S. I. (1997). The toxicology of antioxidants. In: Baskin, S. I. and Salem, H. (Ed.). *Oxidants, Antioxidants, and free radicals*. Taylor & Francis, pp. 207-225.

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

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

Sevanian, A. e McLeod (1997). Formation and biological reactivity of lipid peroxidation products. In: Baskin, S. I. and Salem, H. (Ed.). *Oxidants, Antioxidants, and free radicals*. Taylor & Francis, pp. 47-69.

Shi, X., Mao, Y., Saffiotti, U., Wang, L., Rojanasakul, Y., Leonard, S. S. e Vallyathan, V. (1995). Antioxidant activity of tetrandrine and its inhibition of quartz-induced lipid peroxidation. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 46, pp. 233-48.

Shi, H., Nogushi, N. e Niki, E. (2001). *Introducing natural antioxidants*. In *Antioxidants in food- practical applications*. Ed. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. – Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.

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

Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, pp. 916-921.

Silva, B. M. (1999a). *Avaliação da autenticidade de derivados de marmelo através do perfil fenólico*. Tese de Mestrado em Controlo de Qualidade. Porto, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Silva, B.M. (1999b). Parâmetros de autenticidade de derivados de alguns frutos: popas, doces, compotas, geleias, sumos e néctares. Seminário do Mestrado em Controlo de Qualidade. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

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

Silva, B.M., Andrade, P.B., Ferreres, F., Domingues, A.L., Seabra, R.M. e Ferreira, M.A. (2002a). Phenolic profile of quince fruit (*Cydonia oblonga* Miller) (pulp and peel). In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 4615-4618.

Silva, B.M., Andrade, P.B., Gonçalves, A.C., Seabra, R.M., Oliveira, M.B. e Ferreira, M.A. (2004a). Influence of jam processing upon the contents of phenolics, organic acids and free

amino acids in quince fruit (*Cydonia oblonga* Miller). In: *European Food Research and Technology*, 218, pp. 385-389.

Silva, B.M., Andrade, P.B., Martins, R.C., Seabra, R.M. e Ferreira, M.A. (2006). Principal Component Analysis as tool of characterization of quince (*Cydonia oblonga* Miller) jam. In: *Food Chemistry*, 94, pp. 504-512.

Silva, B.M., Andrade, P.B., Martins, R.C., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R.M. e Ferreira, M.A. (2005a). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit characterization using principal component analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 111–122.

Silva, B.M., Andrade, P.B., Mendes, G.C., Seabra, R.M. e Ferreira, M.A. (2002b). Study of the organic acids composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit and jam. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 2313-2317.

Silva, B. M., Andrade, P. B., Mendes, G.C., Valentão, P., Seabra, R. M. e Ferreira, M. A. (2000b). Analysis of phenolic compounds in the evaluation of commercial quince jam authenticity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pp. 2853-2857.

Silva, B.M., Andrade, P.B., Seabra, R.M. e Ferreira, M.A. (2001). Determination of selected phenolic compounds in quince jams by solid-phase extraction and HPLC. In: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24, pp. 2861-2872.

Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Oliveira, M. B. e Ferreira, M. A. (2000a). Marcadores químicos de genuinidade de derivados de frutos: perfil de compostos fenólicos. *Revista Portuguesa de Farmácia*, XLX, pp. 25-35.

Silva, B.M., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, M.A. e Ferreres, F. (2005b). Composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) seeds: phenolics, organic acids and free amino acids. *Natural Products Research*, 19, pp. 275–281.

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

Silva, B.M., Andrade, P.B., Valentão, Mendes, G.C., Seabra, R.M. e Ferreira, M.A. (2000c). Phenolic profile in the evaluation of commercial quince jellies authenticity. *Food Chemistry*, 71, pp. 281-285.

Silva, B.M., Casal, S., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Oliveira, M.B. e Ferreira, M.A. (2003). Development and evaluation of a GC/FID method for the analysis of free amino acids in quince fruit and jam. In: *Analytical Sciences*, 19, pp. 1285-1290.

Silva, B.M., Casal, S., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Oliveira, M.B. e Ferreira, M.A. (2004c). Free amino acid composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp and peel) and jam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 1201-1206.

Silva, B.M., Valentão, P., Seabra, R.M. e Andrade, P.B. (2008). Quince (*Cydonia oblonga* Miller): an interesting dietary source of bioactive compounds. In: Papadopoulos, K.N. (Ed.), *Food Chemistry Research Developments*. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 243–266.

Simón, B.F., Pérez-Illarbe, J., Hernández, T., Gómez-Cordovés, C. e Estela, I. (1992). Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, pp. 1531-1535.

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

Spanos, G.A. e Wroslad, R.E. (1990). Influence of variety, maturity, processing and storage on the phenolic composition of pear juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, pp. 817-824.

Spanos, G.A. e Wrosltd, R.E. (1992). Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage – a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, pp. 1478-1487.

Spanos, G.A., Wrosltd, R.E. e Heatherbell, D.A. (1990). Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, pp. 1572-1579.

Stewart, A., Mullen, W. e Crozier, A. (2005). On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, pp. 52–60.

Tapiero, H., Tew, K. D., Nguyen, G. e Mathé, G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, pp. 200-207.

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

Tomás-Barberán, F.A., Garcia-Viguera, C., Nieto, J.L., Ferreres, F. e Tomás-Lorente, F. (1993). Dihydrochalcones from apple juices and jams. *Food Chemistry*, 46, pp. 33-36.

Tomás-Lorente, F., Garcia-Viguera, C., Ferreres, F. e Tomás-Barberán, F.A. (1992). Phenolic compounds analysis in the determination of fruit jam genuineness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, pp. 1800-1804.

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

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. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, pp. 44–84.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. e Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, pp. 1–40.

Vallés, B.S., Victorero, J.S., Alonso, J.J.M. e Gomis, D.B. (1994). High-performance liquid chromatography of the natural phenolic compounds of low molecular weight in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, pp. 2732-2736.

van Acker, S.A., van Balen, G.P., van den Berg, D.J., Bast, A. e van der Vijgh, W.J. (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 56, pp. 935–943.

van Gorsel, H., Li, C., Kerbel, E.L., Smits, M. e Kader, A.A. (1992). Compositional characterization of prune juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, pp. 784-789.

Van Sumere, C.F. (1989). Phenols and phenolic acids. In *Methods in plant biochemistry*, vol. 1: plant phenolics. Dey. P.M. e Harbone, J.B. (Ed). London: Academic Press.

Wanasundara, U.; Amarowicz, R. e Shahidi, F. (1994). Isolation and identification of an antioxidative component in canola. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, pp. 1285-1290.

Wang, C. K., Lee, W.-H. e Peng, C.-H., 1997. Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp. 1185–1188.

Wang, X., Jia, W., Zhao, A. e Wang, X. (2006). Anti-influenza agents from plants and traditional Chinese medicine. *Phytotherapy Research*, 20, pp. 335–341.

Waterman, P.G. e Mole, S. (1994a). Patterns in the distributions of phenolic secondary metabolites. In *Analysis of phenolic plant metabolites*. Lawton, J.H.; Likens, G.E. (ed). Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Waterman, P.G. e Mole, S. (1994b). Qualitative and quantitative separation methods. In *Analysis of phenolic plant metabolites*. Lawton, J.H.; Likens, G.E. (ed). Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Waterman, P.G. e Mole, S. (1994c). Structure elucidation of phenolics. In *Analysis of phenolic plant metabolites*. Lawton, J.H.; Likens, G.E. (ed). Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Waterman, P.G. e Mole, S. (1994d). Extraction and chemical quantification. In *Analysis of phenolic plant metabolites*. Lawton, J.H.; Likens, G.E. (ed). Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Wheeler, D. e Wheeler, W. (2004). The medicinal chemistry of tea. *Drug Development Research*, 61, pp. 45–65.

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

Yildirim, H.T. (2006). Evaluation of colour parameters and antioxidant activities of fruit wines. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57, pp. 47–63.

Yildirim, H.T., Oktay, M. e Bilaloglu, V. (2001). Antioxidant activity of the leaf of *Cydonia vulgaris*. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 21, pp. 23–27.