

**Isis Sofia Norinho Santos**

**Avaliação do potencial antioxidante dos compostos fenólicos de  
extractos de plantas da flora portuguesa**



**Universidade Fernando Pessoa**

**Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto, 2011**



**Isis Sofia Norinho Santos**

**Avaliação do potencial antioxidante dos compostos fenólicos de  
extractos de plantas da flora portuguesa**



**Universidade Fernando Pessoa**

**Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto, 2011**

**Isis Sofia Norinho Santos**

**Avaliação do potencial antioxidante dos compostos fenólicos de  
extractos de plantas da flora portuguesa**

Assinatura

.....

(Isis Sofia Norinho Santos)

“Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de licenciado em Ciências Farmacêuticas”

Orientador:

Professora Doutora Carla Moutinho

Co-orientador:

Professora Doutora Carla Matos

## Sumário

Alguns extractos de plantas são ricos em substâncias com poder antioxidante, como os compostos fenólicos, os quais desempenham um papel importante na homeostase celular dos vegetais e do Homem que as utiliza. A medicina popular portuguesa é muito rica em terapias desenvolvidas com base em extractos de partes de plantas, entre elas, as folhas de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita*, ou seja, castanheiro e menta, respectivamente. Ambos os exemplares revelam uma razoável fracção de compostos fenólicos na sua composição, os quais são apontados como os responsáveis pelas propriedades antioxidantes das plantas.

Neste estudo apresentam-se os resultados referentes à avaliação do potencial antioxidante de extractos metanólicos de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita*, recolhidas na região de Trás-os-Montes. A capacidade antioxidante foi testada pelo método de DPPH\*, tendo sido também efectuada a quantificação de compostos fenólicos totais nos extractos pelo método de Folin-Ciocalteu.

Adicionalmente, apresentam-se os resultados relativos à avaliação de citotoxicidade dos mesmos extractos através dos testes de citotoxicidade *in vitro*, utilizando-se como organismo modelo a *Artemia salina*.



## Abstract

Some plant extracts are rich in antioxidant substances, such as the phenolic compounds, which play an important role in cellular homeostasis, both in vegetables and Humans that use them. Portuguese folk medicine is rich in therapies based on plant extracts, including the leaves of *Castanea sativa* and *Mentha piperita*, usually known as sweet chestnut and peppermint, respectively. Both species reveal a reasonable fraction of phenolic compounds in its composition, which are pointed out as responsible for plant antioxidant properties.

This study reveals the results about the antioxidant potential evaluation of methanolic extracts of *Castanea sativa* and *Mentha piperita*, collected in the region of Trás-os-Montes. The antioxidant capacity was tested with the DPPH<sup>•</sup> method and the quantification of total phenolic compounds were carried out using the Folin-Ciocalteu method.

Additionally, the research work presented herein seeks to assess the effects of both methanolic extracts of *Castanea sativa* and *Mentha piperita* through a series of *in vitro* cytotoxicity tests, using *Artemia salina* as model organism.



Aos meus Pais que são tudo para mim.

Aos meus Irmãos, Fernando e Rui, que eram a minha alegria.

A Deus.



## Agradecimentos

Agradeço a todos que me acompanharam ao longo da minha vida académica: professores, colegas e amigos, que me fizeram quem eu sou hoje, em especial ao Tiago.

Manifesto a minha gratidão à Universidade Fernando Pessoa que me possibilitou as melhores condições e docentes ao longo da minha licenciatura, que me faz sentir muito privilegiada. Em especial à minha orientadora Prof. Doutora Carla Moutinho e Co-orientadora Prof. Doutora Carla Matos.

Agradeço a todos da Farmácia das Antas, que me acolheram e ensinaram a prática da Farmácia de Oficina.

Por fim, agradeço do fundo do meu coração à minha Família, que muito amo, sobretudo ao meu Pai, que sinto muita falta, e minha Mãe e melhor amiga que me ajudou nesta luta.

## Índice geral

Sumário .....	II
Abstract .....	III
Lista de figuras.....	VIII
Lista de tabelas.....	IX
Lista de abreviaturas .....	X
0. Plano geral e enquadramento do trabalho .....	1
I. Introdução .....	2
II. Características de <i>Castanea sativa</i> e de <i>Mentha piperita</i> .....	5
II.1. Aplicações terapêuticas de <i>Castanea sativa</i> .....	8
II.2. Aplicações terapêuticas de <i>Mentha piperita</i> .....	8
III. Efeito do <i>stress</i> oxidativo .....	10
IV. Compostos fenólicos como antioxidantes.....	13
IV.1. Ácidos fenólicos.....	15
IV.2. Compostos flavonóides.....	16
IV.3. Poder antioxidante dos compostos fenólicos .....	18
IV.4. Relação estrutura/actividade antioxidante dos compostos fenólicos.....	19
IV.4.i. Estrutura/actividade antioxidante dos ácidos fenólicos.....	19
IV.4.ii. Estrutura/actividade antioxidante dos flavonóides .....	20
IV.5. Factores limitantes dos compostos fenólicos .....	23
V. Extractos de folhas de <i>Castanea sativa</i> e de <i>Mentha piperita</i> .....	25
V.1. Composição das folhas de <i>C. sativa</i> e de <i>M. piperita</i> .....	25
V.2. Farmacologia e actividade biológica.....	29
VI. Materiais e métodos.....	33
VI.1. Reagentes e materiais.....	33
VI.2. Equipamento analítico.....	33
VI.3. Preparação dos extractos metanólicos .....	34
VI.4. Avaliação da capacidade de sequestrar radicais livres com DPPH' .....	35
VI.5. Determinação dos compostos fenólicos totais .....	36
VI.6. Pesquisa de actividade citotóxica.....	37
VII. Resultados.....	38



VII.1. Avaliação da capacidade de sequestrar de radicais livres com DPPH' .....	38
VII.2. Determinação dos compostos fenólicos totais.....	39
VII.3. Pesquisa de actividade citotóxica.....	40
VIII. Discussão.....	41
VIII.1. Actividade antirradical de DPPH' dos extractos de castanheiro e menta... 44	
VIII.2. Quantidade de compostos fenólicos totais.....	45
VIII.3. Toxicidade dos extractos de <i>C. sativa</i> e <i>M. piperita</i> .....	46
IX. Conclusões .....	48
Referências Bibliográficas .....	50

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Imagens de exemplares das folhas, flores e frutos de castanheiro.....	6
<b>Figura 2:</b> Representação das folhas de <i>Castanea sativa</i> Miller.....	6
<b>Figura 3:</b> Representação do caule, folha e flor de <i>Mentha piperita</i> .....	7
<b>Figura 4:</b> Imagem de um exemplar de menta.....	7
<b>Figura 5:</b> Estrutura geral dos derivados do ácido hidroxicinâmico.....	16
<b>Figura 6:</b> Estrutura geral dos flavonóides. ....	17
<b>Figura 7:</b> Representação das zonas com maior influência na capacidade de sequestro de radicais livres nos derivados do ácido hidroxicinâmico. ....	20
<b>Figura 8:</b> Representação das zonas com maior influência na capacidade sequestrante de radicais livres no núcleo flavânico.....	21
<b>Figura 9:</b> Comportamento de actividade antirradical do extracto metanólico de <i>Castanea sativa</i> .....	38
<b>Figura 10:</b> Comportamento de actividade antirradical de extracto metanólico do <i>Mentha piperita</i> .....	39
<b>Figura 11:</b> Representação gráfica do comportamento das artémias face à exposição a diferentes concentrações de extractos de <i>Castanea sativa</i> e <i>Mentha piperita</i> .....	40



## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Classificação e estrutura dos compostos fenólicos presentes nas folhas de <i>Castanea sativa</i> e de <i>Mentha piperita</i> .....	26
<b>Tabela 2:</b> Compostos fenólicos e a sua acção biológica e terapêutica.....	30
<b>Tabela 3:</b> Dados estatísticos relativos aos valores de $CI_{50}$ (mg/ml) dos extractos metanólicos das folhas de <i>Castanea sativa</i> e de <i>Mentha piperita</i> .....	39
<b>Tabela 4:</b> Valores obtidos no ensaio de quantificação de compostos fenólicos totais dos extractos metanólicos das folhas de <i>Castanea sativa</i> e <i>Mentha piperita</i> .....	40
<b>Tabela 5:</b> Valores obtidos no ensaio de avaliação da toxicidade dos extractos metanólicos das folhas de <i>Castanea sativa</i> e <i>Mentha piperita</i> .....	40
<b>Tabela 6:</b> Efeito da estrutura química sobre os compostos fenólicos presentes no extracto de folha de <i>Castanea sativa</i> .....	42
<b>Tabela 7:</b> Efeito da estrutura química sobre os compostos fenólicos presentes no extracto de folha de <i>Mentha piperita</i> .....	42
<b>Tabela 8:</b> Actividade antirradicalar dos antioxidantes sintéticos BHA e BHT e dos extractos aquosos das folhas de <i>Castanea sativa</i> e de <i>Mentha piperita</i> .....	45



## Lista de abreviaturas

Aa - Antialérgico

Ab - Antibacteriano

A<sub>amostra</sub> - Absorvância amostra

A<sub>controlo</sub> - Absorvância controlo

a.C. - Antes de Cristo

Ác. Hidroxic - Derivado do ácido hidroxicinâmico

Ác. rosm - Ácido rosmarínico

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

ARN - Ácido Ribonucleico

Ads - Adstringente

Ae - Antiespasmódico

Aglic - aglicona

AgP - Agregação plaquetária

AH - Anti-hipertensivo

AI - Anti-inflamatório

An - Antineoplásico

AOx - Antioxidante

Ap - Antiperoxidante

As - Antisséptico

At - Antitrombótico

Ats - Aterosclerose



Au - Antiúlcero

Av - Antivírico

BHA - Hidroxianisol de butil

BHT - Hidroxitolueno de butil

c - Concentração

Cd - Cardiotónico

CH<sub>3</sub> - Metilo

CI<sub>50</sub> - Concentração que causa 50% de inibição

CL<sub>50</sub> - Concentração letal média

CMT - Captação de metais de transição

Col - Colesterol

Cu - Cobre

Cv - Cardiovascular

DOP - Denominação de Origem Protegida

DPPH<sup>\*</sup> - 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

e<sup>-</sup> - Electrões

ERO - Espécie reactiva de oxigénio

Fe - Ferro

FRE - Formação de radical estável

Glic - Glicosídeo

GPx - Glutathione peroxidase

H - Átomos de hidrogénio

Hepap - Hepatoprotector



HO<sup>•</sup> - Radical hidroxilo

HO<sup>-</sup> - Anião hidróxido

HO - Substituinte hidroxilo

HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogénio

I% - Percentagem de inibição

k - constante

M<sup>n</sup> - Representação metal de transição

MeOH - Metanol

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> - Singleto oxigénio

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - Radical superóxido

OCH<sub>3</sub> - Substituinte metoxilo

P - Permeabilidade

PG - Prostaglandinas

Polifenol (O<sup>•</sup>) - Composto fenólico após doar electrões

PPG - Propilgalhato

PL - Peroxidação lipídica

PR - Poder redutor

R<sup>•</sup> - Radical livre reactivo

Radiop - Radioprotector

RC - Resistência capilar

RL - Radical livre

SOD - Superóxido dismutase



TBHQ - Butilhidroquinona terciária

TLC - Cromatografia de camada fina



## **0. Plano geral e enquadramento do trabalho**

Este trabalho de investigação foi realizado no âmbito da conclusão final da licenciatura em Ciências Farmacêuticas da Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde.

Declara-se o interesse da investigação científica como uma forma de alargar o saber científico, em que o observador adquire e aprofunda conhecimentos que lhe permitem tomar decisões adequadas sustentadas cientificamente. Um dos seus propósitos principais é justamente o de facultar meios farmacológicos que impulsionem a melhoria da qualidade de vida. É um estudo de investigação, à luz de uma metodologia qualitativa e quantitativa que, do ponto de vista da estrutura, está dividido em duas partes.

A primeira parte do trabalho faz referência a uma análise do contexto bibliográfico inerente ao tema de investigação. A segunda parte do trabalho, a execução prática e os resultados alcançados são debatidos. Por último, ainda se apresenta uma secção de conclusões, destinada a reflectir sobre a investigação do processo e dos resultados obtidos neste trabalho de investigação em relação à actividade antioxidante de origem natural.



## I. Introdução

Desde sempre que se reconhece o potencial terapêutico no uso adequado das plantas, e o que este pode representar para a qualidade de vida das populações.

“O conhecimento sobre o valor terapêutico das plantas tem acompanhado a evolução do Homem através dos tempos” (Proença da Cunha *et alli*, 2007).

Algumas evidências do uso medicinal de plantas remontam a cerca de 60 000 anos. Dos documentos mais antigos conhecidos, destaca-se a farmacopeia do imperador chinês Shen Nung, escrito por volta de 3000-2730 a.C., no qual se encontra descrito o uso terapêutico de várias plantas como a *Ephedra sinica* L., de onde é extraído o alcalóide efedrina usado como estimulante energético ou em problemas nas vias respiratórias (Silva, 2007).

Desde então, foram escritas inúmeras obras sobre o uso das plantas medicinais, como o *Papiro de Ebers*, datado de 1500 a.C., cujo nome se deve ao arqueólogo que o descobriu, e onde se pode ler a seguinte frase introdutória:

“Aqui começa o livro relativo à preparação dos remédios para todas as partes do corpo humano” (Proença da Cunha *et alli*, 2007).

Ou mesmo *Corpus Hipocraticum*, escrito no Século III a.C., da autoria de Hipócrates, o “pai da medicina”, constituído por 53 livros que descrevem o uso de plantas para o alívio e cura de algumas doenças (Silva, 2007).

Ao longo dos séculos, a terapia natural era constituída apenas pelos conhecimentos empíricos adquiridos através de mera observação e, por sua vez, esta era parte representativa dos escassos recursos disponíveis de então (Büyükbalei e Nehir El, 2008). Contudo, apenas era conhecido parte do efeito esperado das plantas, enquanto a sua composição e mecanismos de acção ainda permaneciam na penumbra. Os avanços tecnológicos e científicos adquiridos no século XIX auxiliaram os cientistas na identificação e isolamento de moléculas farmacologicamente activas, permitindo a observação e a determinação dos mecanismos de acção dessas estruturas. Este progresso levou a que os diferentes grupos químicos que faziam parte da constituição das plantas dessem origem a diversas categorias terapêuticas como a atropina, desenvolvida a partir



da *Atropa belladonna* L., usada em tratamentos de problemas cardíacos (Barreiro e Fraga, 2001; Silva, 2007), a salicilina da *Salix alba* L., analgésico muito popular, que deu origem ao ácido acetilsalicílico, conhecido comercialmente como Aspirina<sup>®</sup> do laboratório Alemão BAYER<sup>®</sup>, entre outros (Silva, 2007), ou a vincristina e a vinblastina isoladas a partir de *Vinca rósea* L., usadas no tratamento de leucemias, especialmente em crianças (Barreiro e Fraga, 2001).

Recentemente, os medicamentos naturais ocupam sensivelmente 40 % do mercado, onde cerca de 25 % desta quota pertence a moléculas desenvolvidas a partir de extractos de plantas (Coutinho *et alli*, 2002).

Aproximadamente dois terços da flora do planeta possuem propriedades terapêuticas (Krishnaiah *et alli*, 2010). Na busca de novas moléculas naturais bioactivas, dá-se preferência ao estudo de plantas que já provaram exibir actividade farmacológica pela medicina popular (Montanher *et alli*, 2002; Krishnaiah *et alli*, 2010). Parte deste poder medicinal advém do elevado potencial destes exemplares em reduzir os radicais livres responsáveis pelos danos celulares (Mantle *et alli*, 2000).

A avaliação científica de plantas usadas em formulações com fins terapêuticos, características na medicina popular, pode representar um ponto de partida no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de muitos problemas infecciosos e crónicos, como doenças respiratórias e neurodegenerativas (Tawaha *et alli*, 2007). Em Portugal, a medicina tradicional permanece bem presente na população e consequentemente pode ser considerada parte do património cultural Nacional.

Extractos naturais de origem vegetal ricos em moléculas bioactivas têm se revelado bastante benéficos, o que influencia o crescente interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de pesquisas e criação de novas alternativas terapêuticas naturais de qualidade (Capecka *et alli*, 2005). No entanto, nem todos os efeitos atribuídos às plantas são positivos (Büyükbalei e Nehir El, 2008), pois mesmo a terapêutica natural, aparentemente segura, não é totalmente inócua. Estes factos suscitam um interesse científico em comprovar as acções atribuídas às terapias naturais, assim como avaliar o risco associado, de forma a certificar a segurança do uso destes preparados, e seus derivados, na população.



É de fundamental interesse o estudo da composição das plantas e a actividade antioxidante e farmacológica, sobretudo a parte relativa à fracção em compostos fenólicos (Wojdylo *et alli*, 2007). Espécies vegetais como o castanheiro ou a menta são exemplares comuns da flora característica de Trás-os-Montes, mais concretamente em Bragança, e muito usadas em preparados populares com fins terapêuticos (Gonçalves *et alli*, 2010). Sob esse pretexto que este trabalho pretende estudar as folhas de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita* e relacionar as propriedades a elas atribuídas pela medicina popular portuguesa.



## II. Características de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita*

A complexa rede de moléculas que compõem as plantas é notória, sobretudo estruturas químicas com capacidade antioxidante. Os compostos fenólicos ocupam a maior parte da fracção de moléculas com potencial antioxidante presente no reino vegetal. De facto, nas plantas vasculares já foram identificados mais de 4 000 fenóis e polifenóis (Tawaha *et alli*, 2007). Na sua generalidade, estas estruturas estão inseridas em grupos compostos por moléculas dotadas de diferentes níveis de actividade antirradicalar, o que leva a que o poder antioxidante dos extractos das plantas seja normalmente mais forte, quando em comparação com a acção das suas congéneres isoladas, o que torna mais interessante o uso de extractos de plantas para o tratamento de vários problemas de saúde (Calliste *et alli*, 2005).

Algumas pesquisas confirmam um poder antioxidante elevado nas folhas de muitas espécies vegetais, onde se salienta a família Labiatae (Kähkönen *et alli*, 1999). Outras destacam algumas árvores da família Fagaceae por possuírem quantidades razoáveis de compostos fenólicos (Almeida *et alli*, 2008).

Suplementos alimentares com base em substâncias antioxidantes há muito que se encontram disponíveis no mercado. No entanto, segundo Neves *et alli* (2009a), não existe uma evidência clara que estas formulações possuam uma actividade antioxidante efectiva. Tal pode ser justificado pelo facto destes suplementos apenas apresentarem um número reduzido de antioxidantes, quando em comparação com o largo espectro fornecido pelos extractos de origem natural. Neste aspecto, a medicina popular pode demonstrar ser uma valiosa fonte de recursos naturais eficazes, dotados de efeito terapêutico e preventivo, adequados para aplicações dietéticas e farmacêuticas (Cai *et alli*, 2004).

O castanheiro, ou *Castanea sativa* Miller é uma árvore de grande porte e de copa arredondada. Das 12 espécies de castanheiros distribuídos pelo mundo, esta é uma das mais consumidas (Živković *et alli*, 2009; Salgueiro, 2010). A *Castanea sativa* é natural do Sudoeste Europeu e da Ásia Menor (Almeida *et alli*, 2008). As melhores condições de desenvolvimento para este tipo de castanheiro são em altitudes acima dos 500 metros e a temperaturas características de Inverno, que se encontram reunidas a Nordeste do

território Português, mais concretamente na região de Bragança, onde cerca de 12 500 hectares são usados no cultivo desta árvore (Barreira *et alli*, 2008). Por este motivo que esta região produtora de castanhas tem Denominação de Origem Protegida (DOP), sendo o fruto conhecido por “castanha da Terra Fria” (Ribeiro *et alli*, 2007).

Esta espécie é predominante em Portugal e tem um papel importante a nível socioeconómico, visto que atinge uma produção anual de 20 000 toneladas de castanhas (Barreira *et alli*, 2008). Quase a totalidade do castanheiro é explorado para variados fins: a madeira é usada para carpintaria, papel ou combustível, o fruto é usado na alimentação (Calliste *et alli*, 2005), e as suas folhas são aplicadas em formulações medicinais (Calliste *et alli*, 2005; Almeida *et alli*, 2008; Živković *et alli*, 2009; Salgueiro, 2010).



**Figura 1:** Imagens de exemplares das folhas, flores e frutos de castanheiro. Disponível: [http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/thome/band2/tafel\\_001.html](http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/thome/band2/tafel_001.html) (22/04/2011).



**Figura 2:** Representação das folhas de *Castanea sativa* Miller. Disponível: <http://www.uni-graz.at/~oberma/baum-dias/castanea-sativa.htm> (22/04/2011).

A folha do castanheiro é caduca, oblonga, lanceolada, com bordos serrados e extremidade aguda. Esta pode variar entre 10 a 25 cm de comprimento e de 5 a 8 cm de largura. Normalmente, a coloração da página superior desta folha é verde-escura e a inferior é verde-claro. O seu pecíolo, de cerca de 2,5 cm de comprimento, tem uma coloração que alterna entre os tons de amarelo e vermelho. As suas flores podem ser brancas ou amareladas, posicionadas nas extremidades das hastes. As castanhas estão envolvidas por um invólucro espinhoso verde conhecido por ouriço.

A menta, hortelã-pimenta ou *Mentha piperita* é um arbusto que pertence à família Labiatae oriunda do leste do continente Asiático (Salgueiro, 2010). De aspecto

ligeiramente aveludado, esta planta possui uma altura média de 30 a 90 cm, e é própria de zonas húmidas e sombrias, onde persiste por longos períodos de tempo (Akdogan *et alli*, 2004).



**Figura 3:** Representação do caule, folha e flor de *Mentha piperita*.

Disponível:

[http://species.wikimedia.org/wiki/Mentha\\_piperita](http://species.wikimedia.org/wiki/Mentha_piperita)  
(22/04/2011).



**Figura 4:** Imagem de um exemplar de menta.

Disponível:

<http://www.naturoverda.com.br/site/?p=472>  
(22/04/2011).

As folhas da *Mentha piperita* são opostas, de pecíolos curtos, de forma oval alongada, lanceolada e bordos com forma de serra. Estas possuem uma coloração verde-escura e superfície rugosa, algo aveludada. A sua haste é erecta, quadrangular, avermelhada e dotada de numerosos ramos erectos e opostos, de uma forma quase simétrica.

Estas são bem conhecidas pelas suas propriedades aromatizante e perfumante. O óleo essencial extraído da *Mentha piperita* é usado na área alimentar e em produtos farmacêuticos (McKay e Blumberg, 2006).

Nos países Árabes, a infusão preparada a partir das folhas de menta é muito usada pelas suas características refrescantes e digestivas. Este arbusto também está bem implantado na cultura da medicina popular pelas suas propriedades terapêuticas (Akdogan *et alli* 2004).

Ambas folhas de castanheiro e de menta demonstram aplicações tanto na terapia médica como na etnomédica, o que evidencia que são dotados de um razoável potencial farmacológico.



## II.1. Aplicações terapêuticas de *Castanea sativa*

As folhas de castanheiro são reconhecidas pelos seus atributos terapêuticos, razão pela qual são conhecidos alguns registos referentes às suas aplicações, tanto na medicina convencional, como na popular.

Parte das propriedades terapêuticas atribuídas às folhas de *Castanea sativa* devem-se à sua composição em polifenóis, os quais são responsáveis pela sua actividade antirradicalar contra os radicais hidroxilo e superóxido (Almeida *et alli*, 2008), o que revela um forte carácter antioxidante. Os extractos de folhas de *C. sativa* demonstram um efeito antibacteriano bastante pronunciado em alguns testes *in vitro*, o que justifica a sua aplicação terapêutica contra a bronquite (Calliste *et alli*, 2005; Almeida *et alli*, 2008; Živković *et alli*, 2009). Além de possuírem acção antibacteriana, a folha de castanheiro também é usada na medicina convencional como antifúngico, antitússico e mucolítico (Basile *et alli*, 2000; Calliste *et alli*, 2005; Živković *et alli*, 2009; Salgueiro, 2010).

Na medicina popular ou etnomédica, infusões e macerados da folha de *Castanea sativa* são aplicadas em problemas no tubo digestivo (diarreia aguda e hemorróidas), em problemas respiratórios (tosse), problemas reumáticos e como base de soluções capilares contra a caspa (Calliste *et alli*, 2005; Salgueiro, 2010).

Os diferentes tecidos que compõem a *Castanea sativa* (folhas, madeira, fruto e casca) demonstram um elevado potencial como fonte de compostos fenólicos bioactivos (Vasconcelos *et alli*, 2010). Apesar de tudo, até à data, pouco se sabe sobre o real potencial antioxidante das folhas desta espécie (Almeida *et alli*, 2008; Živković *et alli*, 2009).

## II.2. Aplicações terapêuticas de *Mentha piperita*

A folha de *Mentha piperita* apresenta uma elevada versatilidade pois, além de ser muito usada nas indústrias alimentar e cosmética, tem múltiplas aplicações na área da saúde, tanto a nível etnomédico, como médico, onde são usadas preferencialmente sob a forma de infusões. A sua parte aérea é constituída por cerca de 0,02 % de compostos



fenólicos (Olennikov e Tankhaeva, 2007). Destes, cerca de 75 % podem ser extraídos pelo meio de infusões (McKay e Blumberg, 2006).

Na terapia etnomédica, a folha de menta demonstra ter actividade carminativa e ser fortificante, estimulante e auxiliar na digestão (Ribeiro Nunes, 1999; Salgueiro, 2010). Também é usado na resolução de dores de cabeça, nervos, ansiedade, parasitoses, cólicas, náuseas, problemas alérgicos, doenças do tracto urinário, tratamentos contra a disfunção erétil, e em cálculos de rins e da vesícula (Ribeiro Nunes, 1999; Neves *et alli*, 2009b; Salgueiro, 2010).

Na medicina convencional, a *Mentha piperita* é muito usada em crianças no tratamento de cólicas, com efeitos comprovados cientificamente (Akdogan *et alli* 2004).

Nesta área, a folha de menta também demonstra propriedades antioxidante, antiperoxidante, antibacteriana, quimiopreventiva, antivírica, analgésica, sedativa, antiasténica, antialérgica, anti-inflamatória, antifúngica, antitabágica, e pode ser aplicada em tratamentos contra enxaquecas, nevralgias, halitose, ou em problemas no tracto urinário (Akdogan *et alli*, 2004; Arora *et alli*, 2005; Romero-Jiménez *et alli*, 2005; Fecka e Turek, 2007; Neves *et alli*, 2009b; Olennikov e Tankhaeva, 2010). Na Alemanha, o uso da folha de *Mentha piperita* está devidamente autorizado como chá medicinal para a dispepsia (onde, a própria comissão alemã aprova o uso interno das folhas de menta) para o combate de problemas espasmódicos do tracto gastrointestinal ou para a resolução de patologias na vesícula (McKay e Blumberg, 2006).



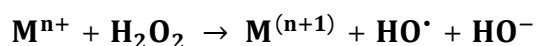
### III. Efeito do *stress* oxidativo

O oxigénio é indispensável para a vida Humana. Em contrapartida, este mesmo elemento participa em processos de oxidação, dando origem a espécies reactivas de oxigénio (ERO's) que, pela sua instabilidade, interferem com o equilíbrio celular (Barreiros *et alli*, 2006; Machado *et alli*, 2008; Neves *et alli*, 2009a; Pereira *et alli*, 2009).

Estes radicais livres são subprodutos metabólicos de sistemas intracelulares quando sujeitos a exposição à radiação ionizante, tabaco, fumo, reacções de produção de energia ou a processos de fagocitose, entre outros (Barreiros *et alli*, 2006; Patthamakanokporn *et alli*, 2007; Tawaha *et alli*, 2007).

Os ERO's são compostos por um cerne de oxigénio com um ou mais electrões ( $e^-$ ) desemparelhados, o que os torna radicais livres muito reactivos (Barreiros *et alli*, 2006). Dentro deste grupo de espécies reactivas destacam-se o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ), e o singlete oxigénio ( $^1O_2$ ) (Tawaha *et alli*, 2007).

O  $H_2O_2$ , por si só, quase não apresenta actividade radical; no entanto, a sua facilidade em atravessar as membranas celulares faz com que entre em contacto com metais de transição ou com  $^1O_2$ , produzindo radicais  $HO^{\cdot}$  que, pelo seu curto tempo de semi-vida, são muito nocivos pela impossibilidade de serem sequestrados *in vivo* (Barreira *et alli*, 2008). Desta forma, considera-se que os metais de transição possuem um comportamento semelhante aos radicais livres, visto que desempenham uma actividade vital na iniciação de processos mediados por estas espécies reactivas (Balasundram *et alli*, 2006; Cai *et alli*, 2006; Barreira *et alli*, 2008), como descrito na equação global seguinte:



Os metais de transição mais biodisponíveis são o cobre ( $Cu^+$ ) e o ferro ( $Fe^{2+}$ ), os quais são capazes de participar em reacções geradoras de mais radicais livres, como as demonstradas pela equação de Fenton, a seguir esquematizada (Balasundram *et alli*, 2006; Cai *et alli*, 2006; Barreira *et alli*, 2008):



A reacção de Fenton é caracterizada pela interacção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com os metais de transição  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$ , que estão em permanente contacto com o organismo, dando-se a formação do radical  $\text{HO}^\bullet$ , responsável por danos no ADN, ARN, proteínas, lípidos, membranas celulares, núcleo e mitocôndrias (Barreiros *et alli*, 2006).

Para contrariar o efeito nocivo destes radicais, o organismo tem à sua disposição mecanismos biológicos de protecção. Entre eles, salientam-se certas hormonas (estrogénios, angiotensina), algumas enzimas (superóxido dismutase - SOD, a glutaciona peroxidase - GPx e a catalase), ou mesmo os antioxidantes fornecidos pela dieta ( $\alpha$ -tocoferol, carotenóides, ácido ascórbico e compostos fenólicos), dotados da capacidade de anular ou remover os radicais livres presentes no ambiente celular, de forma a proteger o organismo (Tawaha *et alli*, 2007).

O excesso de ERO's no organismo leva a um desequilíbrio denominado por *stress* oxidativo (Mi Yoo *et alli*, 2008; Neves *et alli*, 2009a). Sob esta condição, o organismo produz mais ERO's que antioxidantes (Krishnaiah *et alli*, 2010). Este excesso de espécies reactivas é também responsável pela inibição de enzimas com capacidade antioxidante, o que provoca a oxidação celular e, como tal, dá início a um conjunto de reacções em cadeia que, por sua vez, perpetuam a produção desmesurada de radicais (Mesa-Vargas *et alli*, 2010). Assim, o efeito dos radicais livres no metabolismo celular depende do balanço entre a sua produção e os sistemas de citoprotecção disponíveis (Akdogan *et alli*, 2004).

Alguns dados denunciam os ERO's como parte responsável pela morte celular (Mosca *et alli*, 2002; Barreiros *et alli*, 2006; Machado *et alli*, 2008; Pereira *et alli*, 2009). De facto, o desequilíbrio no sistema antioxidante endógeno pode modular a multiplicação celular, tanto de forma positiva como negativa, o que leva, respectivamente, a uma estimulação da proliferação celular em níveis reduzidos de peroxidação ou à morte celular por apoptose/necrose em elevadas concentrações (Mosca *et alli*, 2002). Como tal, o *stress* oxidativo é parte responsável pela génese ou agravamento de uma série de patologias, como artrite, choque hemorrágico, doenças coronárias, cataratas, disfunções cognitivas (como Alzheimer e Parkinson), cancro, aterosclerose, enfraquecimento do sistema imune, além de participarem em processos de



doenças degenerativas e no envelhecimento (Barreiros *et alli*, 2006; Giada e Mancini Filho, 2006; Tawaha *et alli*, 2007; Jung *et alli*, 2008; Mesa-Vargas *et alli*, 2010).

Para contrariar esta condição é fundamental inactivar o maior número possível de espécies reactivas presentes no meio celular, de forma a neutralizá-las ou eliminá-las, como modo de prevenção ou atenuação das patologias inerentes. Uma estratégia para anular a reactividade dos radicais livres é doar os electrões em falta, recorrendo-se a compostos antioxidantes (Sousa *et alli*, 2007). Estas moléculas também demonstram capacidade em interagir com metais de transição, pela formação de complexos ou quelatos com essas espécies, com o objectivo de neutralizar a sua acção (Balasundram *et alli*, 2006; Cai *et alli*, 2006).

Existem alimentos com propriedades funcionais para a saúde, conhecidos por nutracêuticos, onde os mais valorizados são os dotados da capacidade de sequestrar radicais livres (Cevallos-Casals *et alli*, 2003; Pinto, 2010). Alguma da informação disponível sustenta a existência de uma relação inversa entre a ingestão diária de alimentos ricos em antioxidantes e a incidência de doenças no Homem, o que reforça a importância de suplementos antioxidantes, sobretudo derivados de plantas, pelo seu potencial em sequestrar electrões (Krishnaiah *et alli*, 2010).

Pereira e seus colaboradores (2009) salientam a insuficiência dos sistema de defesa antioxidante endógenos quando na ausência de antioxidantes exógenos, o que reforça a importância do consumo destas moléculas na implementação de uma vida saudável. Dietas equilibradas são compostas por múltiplos antioxidantes, o que leva à possibilidade destes compostos actuarem de forma sinérgica ou complementar. Neste sentido, a aplicação de extractos naturais ricos em substâncias antioxidantes tem potencial de providenciar uma protecção significativamente melhor contra o *stress* oxidativo do que o uso de suplementos com uma fracção antioxidante limitada (Mosca *et alli*, 2002). Por tudo isto, qualquer investigação que revele novas moléculas dotadas de um efeito eficaz contra o *stress* oxidativo pode ter um impacto clínico relevante (Mosca *et alli*, 2002).



#### IV. Compostos fenólicos como antioxidantes

A propriedade de doar electrões, característica dos antioxidantes, permite a modulação do processo oxidativo no organismo, pois proporciona um ambiente celular redutor, de forma a inibir o efeito dos radicais livres e, conseqüentemente impedir o aparecimento de danos nas estruturas celulares (Mosca *et alli*, 2002; Sousa *et alli*, 2007; Neves *et alli*, 2009a). Para isso, estes compostos são dotados da capacidade de actuar através de diversos mecanismos, dos quais se destaca a supressão da formação de ERO's por inibição enzimática ou por formação de quelatos com elementos envolvidos na produção de radicais livres, por captação de espécies reactivas e por regulação ou protecção das defesas antioxidantes (Montoro *et alli*, 2005).

Existem várias classes de moléculas com capacidade em sequestrar radicais livres as quais podem ser classificadas, de forma geral, em antioxidantes sintéticos e naturais. Os primeiros foram amplamente usados, por muito tempo, sobretudo na indústria alimentar para a preservação de alimentos contra os processos oxidativos. Dos antioxidantes sintéticos podem se destacar o propilgalhato (PPG), butilhidroquinona terciária (TBHQ), hidroxianisol de butil (BHA) e o hidroxitolueno de butil (BHT) (Saad *et alli*, 2007; Sousa *et alli*, 2007). No entanto, alguns estudos responsabilizam estas moléculas sintéticas por possuírem algum efeito tóxico para o organismo humano, ao induzir a carcinogénese e problemas hepáticos (Zheng e Wang, 2001; Ramalho e Jorge, 2006; Krishnaiah *et alli*, 2010).

Em função dos efeitos nocivos dos antioxidantes sintéticos, foram desenvolvidas novas pesquisas no sentido de encontrar produtos naturais com poder antioxidante para substituir os sintéticos (Sousa *et alli*, 2007).

Os antioxidantes naturais representam uma alternativa viável; são dotados de efeitos indesejáveis limitados e possuem a flexibilidade necessária para serem usados na indústria alimentar e cosmética (Krishnaiah *et alli*, 2010). Nas últimas três décadas, estes compostos têm conquistado grande visibilidade na medicina preventiva sob a forma de formulações/medicamentos (Krishnaiah *et alli*, 2010; Phapale e Misra-Thakur, 2010). Dentro deste grupo de compostos destacam-se o ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, carotenóides e os compostos fenólicos (Tawaha *et alli*, 2007).



A forte vertente antioxidante das plantas confere-lhes a propriedade de restringir os danos provocados pelo *stress* oxidativo nos sistemas celulares (Ligor e Buszewski, 2007). Em planos alimentares que prevalece o consumo de frutas e vegetais ricos em vitaminas, minerais e compostos fenólicos, como é exemplo a dieta mediterrânica, revelam-se eficazes para a prevenção de doenças relacionadas com o excesso de radicais livres (Calliste *et alli*, 2005; Phapale e Misra-Thakur, 2010), o que está em conformidade com a relação inversa estabelecida entre a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes e a incidência de problemas de saúde na população (Krishnaiah *et alli*, 2010).

Como antioxidantes, os compostos fenólicos são moléculas bioactivas e multifuncionais que ocorrem de forma natural nos vegetais, com propriedades que lhes permitem actuar como agentes redutores, antioxidantes dadores de átomos de hidrogénio (H), e captadores do singlete oxigénio, com capacidade em intervir tanto na etapa inicial, como durante a propagação do processo oxidativo (Rice-Evans *et alli*, 1996; Zheng e Wang, 2001; Dicko *et alli*, 2006; Matsubara e Rodriguez-Amaya, 2006; Ramalho e Jorge, 2006; Sousa *et alli*, 2007; Barreira *et alli*, 2008; Pereira *et alli*, 2009; Phapale e Misra-Thakur, 2010).

O poder antioxidante das plantas está intrinsecamente ligado à quantidade de polifenóis nelas presentes (Barreira *et alli*, 2008). Nestes seres vivos, estes compostos desempenham um papel de defesa contra danos e infecções a que são sujeitas, pelo que se encontram distribuídos por toda a sua estrutura, especialmente nas folhas, tecidos florais, cascas do tronco ou nos estames (Kähkönen *et alli*, 1999).

As moléculas polifenólicas são resultado do metabolismo secundário (Balasundram *et alli*, 2006; Proença da Cunha *et alli*, 2007), e na sua estrutura base encontra-se, pelo menos, um anel fenólico que comporta vários substituintes hidroxilo ou metoxilo, proporcionando-lhes variadas conformações, desde o fenol mais simples até moléculas altamente polimerizadas (Proença da Cunha *et alli*, 2007; Aberoumand e Deokule, 2008; Samarth *et alli* 2008).

O seu versátil desempenho antioxidante e enorme diversidade estrutural própria dos compostos fenólicos concede-lhes uma multiplicidade de efeitos farmacológicos, em que se destaca a capacidade em estimular o sistema imune, ou mesmo as suas



atividades anticarcinogénica, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória (Cai *et alli*, 2006; Tawaha *et alli*, 2007).

Alguns estudos epidemiológicos realizados na Holanda, em torno do efeito farmacológico dos flavonóides, evidenciaram o seu efeito cardioprotector, visto que existe uma relação inversa de doença coronária em idosos e a prática de uma dieta rica em flavonóides (Rice-Evans *et alli*, 1996). Outros testes levados a cabo por Narayana *et alli* (2001), comprovaram o poder de alguns flavonóides em inibir *in vitro* o crescimento de variadas linhas celulares tumorais, e conseqüentemente, reduzir o desenvolvimento tumoral nos animais testados.

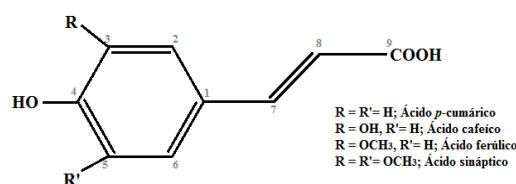
A ingestão de compostos fenólicos recomendada é de 1 g por dia, o que corresponde a 10 vezes mais que a vitamina C e 100 vezes mais que as vitaminas E e carotenóides (Lemos, 2008).

#### IV.1. Ácidos fenólicos

Designa-se por ácidos fenólicos as moléculas com um anel aromático fenólico de baixo peso molecular que possuem, pelo menos, um grupo funcional carboxílico e um ou mais grupos substituintes hidroxilo e metoxilo que conferem propriedades antioxidantes (Valentão, 2002; Ramalho e Jorge, 2006; Estevinho *et alli*, 2008). Nos últimos anos têm sido realizadas várias pesquisas em torno dos ácidos fenólicos como modelos para o desenvolvimento de novos antioxidantes primários, pela sua capacidade de prevenir ou adiar os processos de oxidação *in vitro* e/ou *in vivo* (Barreira *et alli*, 2008).

Os ácidos fenólicos dividem-se em três classes, definidas segundo a sua estrutura: os derivados do ácido hidroxibenzóico, os derivados do ácido hidroxicinâmico e as cumarinas ou derivados do ácido *o*-cumárico (Ramalho e Jorge, 2006; Estevinho *et alli*, 2008).

Os ácidos hidroxibenzóicos possuem uma configuração de C<sub>6</sub> - C<sub>1</sub>, enquanto o esqueleto dos ácidos hidroxicinâmicos está organizado sob a forma C<sub>6</sub> - C<sub>3</sub> (Balasundram *et alli*, 2006; Volp *et alli*, 2008).



**Figura 5:** Estrutura geral dos derivados do ácido hidroxicinâmico.

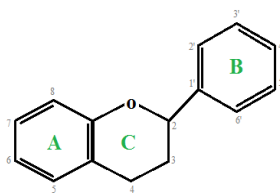
Na conformação geral dos derivados do ácido hidroxibenzóico, o grupo funcional (-COOH) está unido à estrutura principal por uma ligação simples. Por sua vez, os ácidos hidroxicinâmicos têm o grupo funcional ácido carboxílico aliado a uma cadeia insaturada de dois carbonos, a qual se une com a cadeia principal sob uma ligação simples (-CH=CH-COOH) (Balasundram *et alli*, 2006).

Nos derivados dos ácidos hidroxibenzóicos estão incluídos os ácidos elágico e gálgico, enquanto os ácidos rosmarínico e cafeico inserem-se no grupo dos derivados do ácido hidroxibenzóico (Volp *et alli*, 2008). O ácido rosmarínico é um dos ésteres do ácido cafeico mais frequentes na natureza (Ellis e Towers, 1970).

## IV.2. Compostos flavonóides

Os flavonóides são estruturas de baixo peso molecular largamente distribuídos em frutos e vegetais (López *et alli*, 2003). Sempre existiu alguma controvérsia em relação ao efeito atribuído a esta classe de compostos (Samarth *et alli*, 2006). Por muito tempo a comunidade científica considerava os flavonóides como mero desperdício metabólico depositado nos vacúolos vegetais. No entanto, novas pesquisas revelaram os seus verdadeiros potenciais antioxidante e farmacológico (Ligor e Buszewski, 2007).

No grupo dos compostos fenólicos, os flavonóides são a classe que apresenta um maior número de estruturas. A sua conformação base é composta por 15 átomos de carbono distribuídos por uma configuração de difenilpropano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), onde o anel central pirano possui diferentes estados de oxidação (Balasundram *et alli*, 2006; Cai *et alli*, 2006).



**Figura 6:** Estrutura geral dos flavonóides.

Pela análise da figura 6, é possível observar um conjunto de 3 anéis aromáticos, onde o anel A (C<sub>6</sub>) está ligado ao anel B (C<sub>6</sub>) por meio de uma ponte de três átomos de carbono, a qual toma a forma de um anel heterocíclico ou anel C (C<sub>3</sub>) e que, em conjunto, criam o núcleo flavânico (Balasundram *et alli*, 2006; Cruz, 2008).

De uma forma geral, os flavonóides podem-se apresentar na natureza sob as formas aglicona, que corresponde à sua forma mais simples, e glicosídeos, os quais se podem apresentar como derivados metilados e/ou derivados acilados (Coutinho *et alli*, 2009). A estrutura aglicona é constituída por um anel de benzeno (A) condensado com um anel de 6 carbonos (C), o qual na posição dois está um anel fenilo como substituinte (Narayana *et alli*, 2001; Coutinho *et alli*, 2009). Por sua vez, os glicosídeos são formados por flavonóides ligados a resíduos de açúcares. A configuração mais frequente é constituída por uma molécula de D-glucose unida com a cadeia principal flavonóide nas posições 3 ou 7, mas também é possível encontrar estes compostos associados a outros açúcares, como a D-galactose, L-ramnose, L-arabinose, D-xilose ou o ácido D-glucorónico (Rice-Evans *et alli*, 1996; Narayana *et alli*, 2001; Matsubara e Rodriguez-Amaya, 2006).

Os anéis A e B podem sofrer um conjunto de reacções de substituição (Balasundram *et alli*, 2006; Coutinho *et alli*, 2009). No entanto, as substituições que ocorrem no anel C são determinantes para a classificação dos flavonóides em subclasses, como é o caso dos flavonóis, flavonas ou flavanonas, entre outras (Valentão, 2002; Balasundram *et alli*, 2006; Dicko *et alli*, 2006; Matsubara e Rodriguez-Amaya, 2006; Cruz, 2008; Coutinho *et alli*, 2009; Pereira *et alli*, 2009).

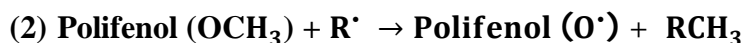
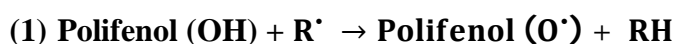
Alguns testes realizados por Cai *et alli* (2006) demonstraram que a capacidade de captação dos radicais livres das flavanonas, flavonas e flavonóis podem ser organizadas, pela seguinte ordem decrescente de potência: flavonol > flavona > flavanona.



### IV.3. Poder antioxidante dos compostos fenólicos

Uma das características mais importantes dos polifenóis é sua capacidade em gerar compostos intermediários relativamente estáveis, seja a sequestrar espécies reactivas ou a formar quelatos com metais de transição (Sousa *et alli*, 2007; Aberoumand e Deokule, 2008; Pereira *et alli*, 2009).

Tanto os ácidos fenólicos como os flavonóides possuem a capacidade de doar H. De uma forma geral, a acção dadora de H do grupo -OH e -OCH<sub>3</sub> pode ser esquematizada pelas seguintes equações químicas (Machado *et alli*, 2008).



Onde, R<sup>•</sup> representa o radical livre reactivo, e polifenol (O<sup>•</sup>) caracteriza o composto fenólico após doar os electrões para o radical livre.

Na equação 1, o grupo -OH do polifenol reage com radical livre, doando-lhe um H de forma a neutralizar o radical.

Na equação 2, o grupo -OCH<sub>3</sub> presente no composto fenólico reage com o radical livre, e transfere o metilo -CH<sub>3</sub> para o radical para o estabilizar.

Entre os compostos fenólicos, os flavonóides conseguem inactivar os radicais livres em ambos os compartimentos celulares lipofílicos e hidrofílicos (Pereira *et alli*, 2009). Os flavonóides mais lipofílicos possuem maior capacidade de serem incorporadas pelas membranas biológicas, as quais são alvo de grande parte das espécies reactivas. Ao serem assimiladas pelas membranas, estas moléculas exercem uma função de modulação de fluidez de forma a restringi-la, o que resulta num impedimento físico para os radicais que tentam atravessar as membranas (Barreiros *et alli*, 2006).

Na sua generalidade, os compostos fenólicos possuem um poder antioxidante superior a antioxidantes de outra natureza, como o  $\alpha$ -tocoferol, o ácido ascórbico e os carotenóides. No entanto, conseguem actuar de forma sinérgica com estes compostos (Dicko *et alli*, 2006).



#### IV.4. Relação estrutura/actividade antioxidante dos compostos fenólicos

De forma a ser considerado um bom antioxidante, os polifenóis devem reunir algumas características para satisfazer duas condições básicas, mais concretamente: (i) ser capaz de poder evitar, retardar ou prevenir processos de oxidação, mesmo em concentrações reduzidas e, (ii) como resultado da reacção de transferência de  $e^-$  ou H, promover a formação de um radical estável (Rice-Evans et alli, 1996).

A estrutura química própria dos compostos fenólicos é um dos factores fundamentais que conferem a estas moléculas a sua elevada actividade antioxidante e consequentes benefícios farmacológicos (Aberoumand e Deokule, 2008). Tal como já foi referido, os polifenóis são constituídos por um conjunto de moléculas que possuem pelo menos um anel aromático, em que se encontra um ou vários substituintes hidroxilo e metoxilo (Proença da Cunha *et alli*, 2007; Aberoumand e Deokule, 2008; Samarth *et alli* 2008).

A ressonância do anel aromático, característico dos compostos fenólicos, é responsável pela estabilidade dos produtos intermediários resultantes da sua interacção com os radicais livres (Ramalho e Jorge, 2006; Sousa *et alli*, 2007; Aberoumand e Deokule, 2008; Pereira *et alli*, 2009).

O número de grupos hidroxilos e metoxilos fenólicos influencia de forma positiva aspectos como: o potencial redox, a capacidade em quelatar metais de transição e a habilidade em sequestrar radicais (Balasundram *et alli*, 2006; Cai *et alli*, 2006; Barreira *et alli*, 2008; Mi Yoo *et alli*, 2008; Pereira *et alli*, 2009).

Por fazerem parte da composição das folhas de *Castanea sativa* e *Mentha piperita*, neste trabalho apenas se vai aprofundar os grupos dos ácidos fenólicos e dos compostos flavonóides.

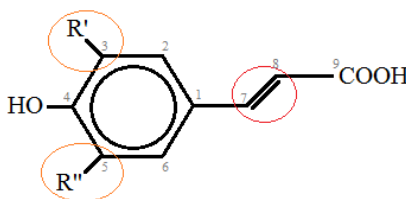
##### IV.4.i. Estrutura/actividade antioxidante dos ácidos fenólicos

Ao analisar as diferentes classes de ácidos fenólicos, é possível observar que o grupo funcional carboxílico está disposto de forma diferente. No entanto, os derivados do ácido hidroxicinâmico distinguem-se na sua actividade antioxidante pela presença de

uma cadeia insaturada ligada ao grupo carboxílico ( $-\text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$ ), a qual confere uma ressonância que é responsável pelo seu elevado poder dador de prótons e estabilizador de radicais livres, em relação aos restantes grupos de ácidos fenólicos (Balasundram *et alli*, 2006).

O poder em sequestrar radicais destes compostos também depende do número e posição dos grupos hidroxilo em relação ao grupo funcional carboxílico (Balasundram *et alli*, 2006; Aberoumand e Deokule, 2008). A capacidade de sequestro de radicais livres dos ácidos fenólicos cresce com o aumento do grau de hidroxilação. Por sua vez, permutas do grupo  $-\text{OH}$  nos carbonos 3 e 5 por grupos  $-\text{OCH}_3$  leva à redução da actividade antioxidante (Aberoumand e Deokule, 2008; Barreira *et alli*, 2008).

As zonas da estrutura que influenciam a actividade antioxidante dos derivados do ácido hidroxicinâmico encontram-se assinaladas na figura 7.



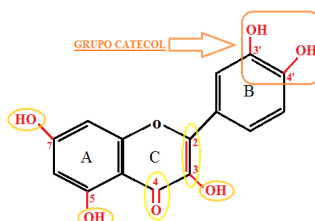
**Figura 7:** Representação das zonas com maior influência na capacidade de sequestro de radicais livres nos derivados do ácido hidroxicinâmico.

#### ***IV.4.ii. Estrutura/actividade antioxidante dos flavonóides***

Os flavonóides são uma das mais vastas classes de compostos fenólicos, em que as estruturas que os compõem são caracterizadas pela variedade de conformações que apresentam.

A estrutura base destas moléculas, como supramencionado, é constituída por anéis que formam o núcleo flavânico. Certas alterações na configuração química dos flavonóides exercem alguma influência sobre a sua capacidade em sequestrar radicais livres (Yang *et alli*, 2009). Algumas das conformações estruturais que contribuem de forma positiva para o seu desempenho no sequestro de radicais livres pelos flavonóides são: (i) o núcleo flavânico com *o*-di-hidroxilo (3',4'-OH), ou grupo catecol, no anel B (Balasundram *et alli*, 2006; Barreiros *et alli*, 2006; Lemos, 2008; Yang *et alli*, 2009);

(ii) a presença do grupo carbonilo no carbono 4 conjugado com uma ligação dupla nas posições 2,3 (Silva *et alli*, 2002; Balasundram *et alli*, 2006; Barreiros *et alli*, 2006; Lemos, 2008); e (iii) o substituinte -OH nas posições 3, 5 e 7 (Silva *et alli*, 2002; Barreiros *et alli*, 2006). Estas características estruturais encontram-se assinaladas na figura 8.



**Figura 8:** Representação das zonas com maior influência na capacidade de sequestro de radicais livres do núcleo flavânico.

Parte da capacidade dos flavonóides em sequestrar radicais livres deve-se ao seu potencial de oxidação que, por sua vez, é um factor determinante para o poder redox. De uma forma geral, quanto menor o potencial de oxidação, maior é a sua actividade como sequestrador de radicais livres (Rice-Evans *et alli*, 1996; Barreiros *et alli*, 2006; Lemos, 2008). Em contrapartida, esta condição tem algumas limitações, as quais se encontram descritas mais adiante. Assim, o potencial redox é influenciado pelo número e posição dos substituintes -OH e -OCH<sub>3</sub> fenólicos (Rice-Evans *et alli*, 1996; Balasundram *et alli*, 2006; Cai *et alli*, 2006; Barreira *et alli*, 2008; Lemos, 2008; Mi Yoo *et alli*, 2008; Pereira *et alli*, 2009).

O poder redox, ou capacidade de sequestro de radicais livres, depende das suas respectivas constantes de dissociação, que ocorrem pela ordem decrescente a seguir representada: 7-OH > 4'-OH > 5-OH (Barreiros *et alli*, 2006), ou pela presença do grupo catecol no anel B (Balasundram *et alli*, 2006; Barreiros *et alli*, 2006; Yang *et alli*, 2009). Por sua vez, apesar da presença de -OCH<sub>3</sub> na estrutura potenciar o seu poder redox, este não é tão eficaz como o conferido pelo grupo -OH, tal como para os ácidos fenólicos (Rice-Evans *et alli*, 1996; Balasundram *et alli*, 2006).

Na sua generalidade, os flavonóides monohidroxilados apresentam valores de actividade de sequestro de radicais muito baixos, por vezes indetectáveis, com excepção da 7-hidroxi flavona, pela elevada predisposição atribuída ao carbono 7 em doar protões (Barreiros *et alli*, 2006). Por este motivo considera-se necessário a presença de pelo



menos dois -OH fenólicos na estrutura flavonóide para proteger, de forma eficaz, o ambiente celular contra o *stress* oxidativo (Balasundram *et alli*, 2006; Barreiros *et alli*, 2006; Cai *et alli*, 2006; Machado *et alli*, 2008).

A capacidade que o flavonóide possui em mover o electrão desemparelhado é imprescindível para a estabilidade dos produtos da reacção, visto que no momento em que o flavonóide cede um H, este torna-se num radical. No entanto, o novo radical tem de ser estável para contrariar o comportamento nocivo dos radicais livres (Barreiros *et alli*, 2006). De forma a promover a estabilidade do radical final, a presença de -OH nas posições 3, 5 e 7 permite uma melhor deslocação do electrão entre si (Silva *et alli*, 2002; Barreiros *et alli*, 2006; Lemos, 2008), assim como a existência de uma ligação dupla nas posições 2 e 3 (Silva *et alli*, 2002; Lemos, 2008), ou a formação do grupo catecol no anel B (Cao *et alli*, 1996; Silva *et alli*, 2002; Balasundram *et alli*, 2006; Lemos, 2008).

O poder antioxidante também é influenciado pela capacidade da estrutura flavonóide formar complexos com os metais de transição. O grupo catecol, a insaturação entre os carbonos 2 e 3, o grupo carbonilo funcional em 4, e os substituintes -OH nas posições 3 e 5 são condições que favorecem a captura de metais de transição presentes no organismo (Rice-Evans *et alli*, 1996; Balasundram *et alli*, 2006; Barreiros *et alli*, 2006). No entanto, é preciso ter em conta que a substituição de qualquer um dos hidroxilos envolvidos na quelatação de metais tem como consequência um impedimento estérico na estrutura, o que leva a redução da actividade (Barreiros *et alli*, 2006).

A configuração da molécula flavonóide em aglicona ou glicosídeo também influencia a sua capacidade antioxidante. Segundo Cai *et alli* (2006), a glicosilação das moléculas flavonóides pode interferir na actividade antioxidante, pois estas estruturas apresentam uma reactividade mais reduzida na neutralização dos radicais livres em relação à aglicona correspondente, bem como uma hidrossolubilidade mais elevada. Estas características determinam a capacidade dos flavonóides em atravessar as membranas biológicas e o seu poder em modular a fluidez da membrana que impede a entrada de radicais livres na célula. Segundo Barreiros e seus colaboradores (2006), deve haver pelo menos um flavonóide por ácido gordo para assegurar a protecção celular contra o ataque destas espécies reactivas. Os flavonóides mais polares são os que apresentam uma cadeia de moléculas de açúcares ligada na sua estrutura, o que impede



que sejam assimilados pela membrana. No entanto, os glicosídeos são passíveis de serem armazenados em vesículas o que faz com que permaneçam por muito mais tempo no organismo (Barreiros *et alli*, 2006; Cai *et alli*, 2006).

#### IV.5. Factores limitantes dos compostos fenólicos

Existe uma tendência em desvalorizar a existência de efeitos negativos nos derivados naturais. Porém nenhum composto é totalmente inócuo.

Apesar dos compostos fenólicos exibirem uma toxicidade reduzida em mamíferos (Coutinho *et alli*, 2009) e das pesquisas *in vitro* sobre essas moléculas apresentarem evidências claras sobre a sua capacidade em interagir com os radicais livres, subsistem algumas circunstâncias em que os polifenóis desenvolvem efeitos pro-oxidantes (Sousa *et alli*, 2006). Alguns dados sustentam que o mesmo flavonóide pode possuir uma dualidade de resultados, antioxidante e pro-oxidante, dependente da sua concentração e da fonte de radicais livres (Cao *et alli*, 1996).

Assim, um dos efeitos menos desejáveis dos compostos fenólicos é o seu efeito pro-oxidante, comprovados em ensaios *in vitro*, o qual pode levar à mutagénese e carcinogénese, e que varia com o tipo de polifenol (Cao *et alli*, 1996; Dicko *et alli*, 2006). Como tal, a relação destes efeitos com o *stress* oxidativo mediado pelos flavonóides tem levantado algumas preocupações (Heim *et alli*, 2002).

Segundo algumas pesquisas, o efeito pro-oxidante dos flavonóides deriva da capacidade destes compostos em sofrerem oxidação. Este efeito envolve a interacção dos polifenóis com os metais de transição, a qual induz a produção de ERO's (Cao *et alli*, 1996; Halliwell, 2008).

O potencial de oxidação dos flavonóides é um factor importante na determinação da sua capacidade sequestrante. Quanto menor o potencial de oxidação, maior é a sua actividade de sequestro. Em contrapartida, segundo Barreiros e colaboradores (2006), quando o potencial é inferior ao do  $\text{Fe}^{3+}$  ou ao do  $\text{Cu}^{2+}$ , e ao dos complexos correspondentes, ocorre a redução destes metais, o que leva a formação de substâncias potencialmente pro-oxidantes.



Um estudo desenvolvido por Cao e colegas (1996) demonstra que, independentemente do seu potencial de redução, os flavonóides apresentam um efeito pro-oxidante quando em contacto com o  $\text{Cu}^{2+}$ , em ambientes isentos de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os mesmos autores referem que este efeito é tanto maior quanto mais elevada for a concentração de flavonóide no ambiente celular.

No entanto, o efeito pro-oxidante pode ter um lado positivo visto que, na prática, este comportamento eleva os níveis de defesa antioxidante e de enzimas metabolizadoras de xenobióticos por imposição de um grau médio de *stress* oxidativo, o que contribui para uma citoproteção mais eficaz (Halliwell, 2008).



## V. Extractos de folhas de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita*

Os extractos de folhas são muito usados em medicina pela sua composição rica em compostos dotados de efeitos terapêuticos.

Muito se tem especulado sobre os compostos fenólicos, suas características antioxidantes e qual a sua influência sobre os efeitos terapêuticos que são atribuídos aos extractos de plantas. Deste modo, parte das pesquisas realizadas estão relacionadas com a distinção das actividades farmacológica e biológica destas moléculas, de forma a prever qual o efeito terapêutico esperado nos extractos de plantas. No entanto, a maioria dos dados disponíveis sobre os compostos fenólicos foi obtido do estudo de extractos aquosos de plantas, enquanto parte significativa e potencialmente activa dos polifenóis pode-se encontrar em extractos não aquosos (Saura-Calixto *et alli*, 2007).

Outro factor a ter em conta quando se determina a quantidade de polifenóis num extracto de planta é a altura do ano em que esta foi recolhida, pois o seu desempenho antioxidante está dependente do tempo da maturação e da época de colheita do material usado para a amostra (Plizka *et alli*, 2009).

### V.1. Composição das folhas de *C. sativa* e de *M. piperita*

Como supramencionado neste trabalho, os compostos fenólicos próprios dos extractos das plantas raramente se encontram isolados. Muito pelo contrário, estes formam redes complexas onde está presente um considerável número de moléculas de natureza fenólica.

É fundamental compreender os efeitos das substâncias que fazem parte da estrutura do castanheiro e de menta, para a facilitar a interpretação das consequências atribuídas aos derivados destes exemplares.

O potencial antioxidante das folhas de *Castanea sativa* reconhecido até agora pode ser atribuído ao elevado nível de compostos fenólicos totais e à actividade antioxidante correspondente (Vasconcelos *et alli*, 2010). Alguma bibliografia disponível referencia a leitura de alguns ensaios, pelo método de HPLC (Cromatografia líquida de alta pressão)

e TLC (Cromatografia de camada fina), o qual reconhece que a fracção polifenólica da folha de castanheiro é resultado de uma combinação de flavonóides como a rutina, a hesperidina, a apigenina, a quercetina, a morina, a naringina, a galangina e o campferol (Basile *et alli*, 2000).

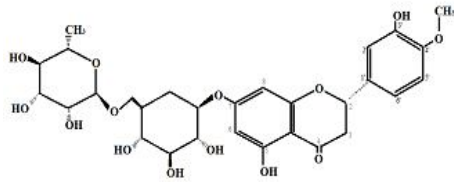
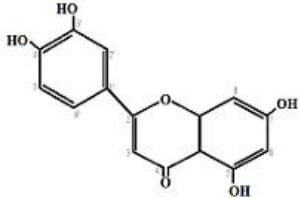
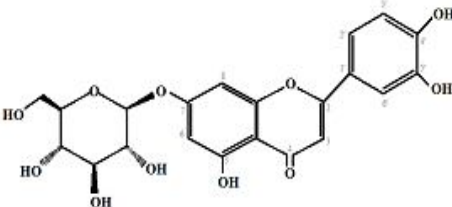
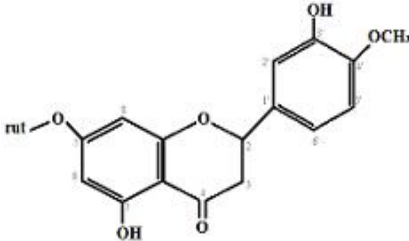
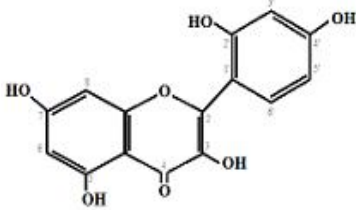
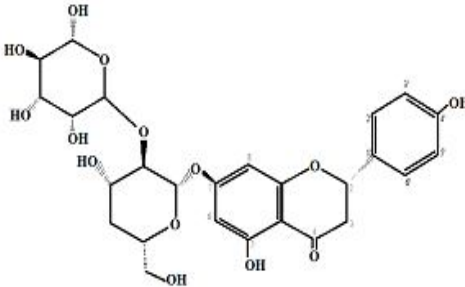
Por sua vez, este mesmo método demonstrou que os extractos da folha de *Mentha piperita* são organizados por uma combinação constituída em parte por ácidos fenólicos, como o ácido rosmarínico e o ácido cafeico, e por flavonóides como a narirutina, eriodictiol, eriodictiol 7-*O*- $\beta$ -glucosídeo, eriocitrina, hesperidina, apigenina 7-*O*-rutinosídeo, luteolina 7-*O*- $\beta$ -glucosídeo, luteolina 7-*O*-rutinosídeo e diosmina (Fecka e Turek, 2007). As folhas de menta também revelam a presença de eugenol e  $\alpha$ -tocoferol na sua composição (Arora *et alli*, 2005).

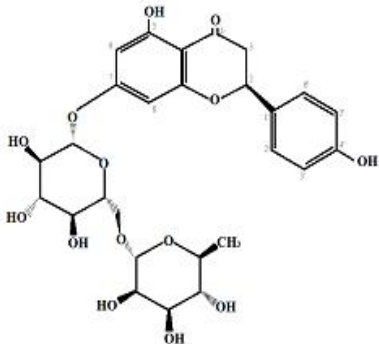
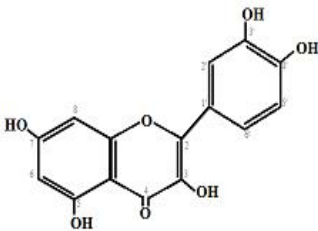
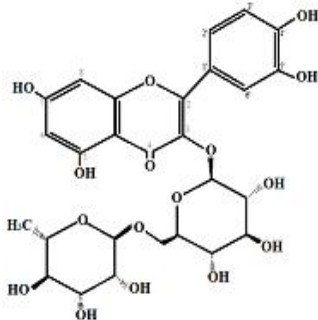
As estruturas das moléculas polifenólicas que fazem parte das folhas de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita* estão ilustradas na tabela 1.

**Tabela 1:** Classificação e estrutura dos compostos fenólicos presentes nas folhas de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita*.

Compostos Fenólicos	Classe / Subclasse. Características	Estrutura química
Ácido cafeico ( <i>M. piperita</i> )	Ác. fenólico / Ác. hidroxicinâmico. Grupo -OH nas posições 3 e 4.	
Ácido rosmarínico ( <i>M. piperita</i> )	Ác. fenólico / Ác. hidroxicinâmico. Grupo -OH nas posições 3, 4, 15 e 16.	
Apigenina ( <i>C. sativa</i> )	Flavonóide / Flavona. Grupo -OH em 4', 5 e 7; ligação dupla entre 2 e 3 e um carbonilo em 4; forma: aglicona.	

Compostos Fenólicos	Classe / Subclasse. Características	Estrutura química
<b>Apigenina 7-O-rutinosídeo</b> ( <i>M. piperita</i> )	<b>Flavonóide / Flavona.</b> Grupo-OH em 4', 5 e 7; ligação dupla entre 2 e 3 e um carbonilo em 4; forma: glicosídeo.	
<b>Campferol</b> ( <i>C. sativa</i> )	<b>Flavonóide / Flavonol.</b> Grupo -OH em 4', 3, 5 e 7; ligação dupla entre 2 e 3 e um carbonilo em 4; forma: aglicona.	
<b>Diosmina</b> ( <i>M. piperita</i> )	<b>Flavonóide / Flavona.</b> Grupo -OH em 3' e 5 -OCH <sub>3</sub> em 4'; ligação dupla entre 2 e 3 e um carbonilo em 4; forma: glicosídeo.	
<b>Eriocitrina</b> ( <i>M. piperita</i> )	<b>Flavonóide / Flavanona.</b> Grupo catecol no anel B e -OH em C-5; forma: glicosídeo.	
<b>Eriodictiol</b> ( <i>M. piperita</i> )	<b>Flavonóide / Flavanona.</b> Grupo -OH em 4', 5', 5, 7; forma: aglicona.	
<b>Eriodictiol 7-O-beta-glucosídeo</b> ( <i>M. piperita</i> )	<b>Flavonóide / Flavanona.</b> Grupo catecol no anel B; forma: glicosídeo.	
<b>Galangina</b> ( <i>C. sativa</i> )	<b>Flavonóide / Flavonol.</b> Grupo -OH em 3, 5 e 7; o anel C; ligação dupla entre 2 e 3 e um carbonilo em 4; forma: aglicona.	

Compostos Fenólicos	Classe / Subclasse. Características	Estrutura química
<b>Hesperidina</b> ( <i>C. sativa</i> e <i>M. piperita</i> )	<b>Flavonóide / Flavanona.</b> Grupo -OH em 3' e 5; um -OCH <sub>3</sub> em 4'; forma: glicosídeo.	
<b>Luteolina</b> ( <i>M. piperita</i> )	<b>Flavonóide / Flavona.</b> Grupo catecol no anel B; -OH em 5 e 7; ligação dupla entre 2 e 3 conjugado com grupo carbonilo em 4; forma: aglicona.	
<b>Luteolina 7-O-β-glucosídeo</b> ( <i>M. piperita</i> )	<b>Flavonóide / Flavona.</b> Grupo -OH em 4', 5' e 5; ligação dupla entre 2 e 3 conjugado com grupo carbonilo em 4; forma: glicosídeo.	
<b>Luteolina 7-O-rutinosídeo</b> ( <i>M. piperita</i> )	<b>Flavonóide / Flavona.</b> Grupo -OH em 3' e 5; -OCH <sub>3</sub> em 4'; forma: glicosídeo.	
<b>Morina</b> ( <i>C. sativa</i> )	<b>Flavonóide / Flavonol.</b> Grupo -OH em 2', 4', 3, 5 e 7; ligação dupla entre 2 e 3 e um carbonilo em 4; forma: aglicona.	
<b>Naringina</b> ( <i>C. sativa</i> )	<b>Flavonóide / Flavanona.</b> Grupo -OH em 4' e 5; forma: glicosídeo.	

Compostos Fenólicos	Classe / Subclasse. Características	Estrutura química
<b>Narirutina</b> ( <i>M. piperita</i> )	<b>Flavonóide / Flavanona.</b> Grupo -OH em 4' e 5; forma: glicosídeo.	
<b>Quercetina</b> ( <i>C. sativa</i> )	<b>Flavonóide / Flavonol.</b> Grupo catecol em anel B, -OH em 3, 5 e 7; ligação dupla entre 2 e 3 e um carbonilo em 4; forma: aglicona.	
<b>Rutina</b> ( <i>C. sativa</i> )	<b>Flavonóide / Flavonol.</b> Grupo -OH em 4', 5', 5 e 7; ligação dupla entre 2 e 3 e um carbonilo em 4; forma: glicosídeo.	

## V.2. Farmacologia e actividade biológica

Pesquisas realizadas em torno da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos demonstram que o seu potencial em neutralizar o *stress* oxidativo é de tal forma elevado, que se sobrepõem aos restantes antioxidantes conhecidos (Balasundram *et alli*, 2006). Além de reconhecida capacidade antioxidante, também lhes são atribuídas actividades biológicas específicas que afectam a expressão genética, a sinalização e adesão celular, o que justifica parte do crescente interesse na pesquisa e aplicação destas moléculas como meio de prevenção de doenças relacionadas com o envelhecimento (Saura-Calixto *et alli*, 2007; Pereira *et alli*, 2009).



Na sua generalidade, os compostos fenólicos apresentam um amplo espectro de características fisiológicas e bioquímicas que, pelas suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antialérgicas, anticancerígenas, anti-hemorrágicas, antitrombóticas, cardioprotectoras e vasodilatadoras, se podem revelar úteis nas áreas da saúde (López *et alli*, 2003; Polydoro *et alli*, 2004; Aberoumand e Deokule, 2008; Benhammou *et alli*, 2009; Pereira *et alli*, 2009). Estas características são resultantes das múltiplas configurações que os polifenóis podem assumir (Pereira *et alli*, 2009).

Como já foi referido, o poder antirradicalar próprio dos polifenóis deve-se à sua habilidade em sequestrar espécies reactivas, em formar complexos com os iões metálicos, na sua capacidade em interagir com algumas enzimas e na possibilidade dos seus efeitos funcionarem em sinergia (Dicko *et alli*, 2006; Sousa *et alli*, 2007). Desta forma, muitos dos resultados benéficos atribuídos aos flavonóides estão relacionados com o seu desempenho antioxidante e quelante (Heim *et alli*, 2002).

Os compostos de natureza fenólica presentes em extractos de plantas de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita* possuem diferentes mecanismos antioxidantes e terapêuticos. Alguns desses efeitos estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2:** Compostos fenólicos e a sua acção biológica e terapêutica.

Composto fenólico	Actividade biológica e terapêutica	Bibliografia
Ácido cafeico	AOx; colerético; ↓Col; Hepap; As; Ap; Ab; Av; AI; vasodilatador	Arora <i>et alli</i> , 2005; Luís e Johnson, 2005; Proença da Cunha <i>et alli</i> , 2007; Aberoumand e Deokule, 2008; Proença da Cunha <i>et alli</i> , 2009; Pinto, 2010
Ácido gálgico	Hemostático; Ads	Proença da Cunha <i>et alli</i> , 2007
Ácido rosmarínico	At; Aa; Av; Hepap; AOx e ↓PL; Ap; AI; Ab; vasodilatador	Arora <i>et alli</i> , 2005; Luís e Johnson, 2005; McKay e Blumberg, 2006; Fecka e Turek, 2007; Aberoumand e Deokule, 2008; Proença da Cunha <i>et alli</i> , 2009; Pinto, 2010
Apigenina	AOx; AI; ↓P; ↑RC; Ab	Basile <i>et alli</i> 2000; Narayana <i>et alli</i> , 2001; Proença da Cunha <i>et alli</i> , 2007
Apigenina 7-O-rutinosídeo	AOx; Aa	McKay e Blumberg, 2006
Campferol	AOx; Av; Au; AI; ↓P e ↑RC	Narayana <i>et alli</i> , 2001; Proença da Cunha <i>et alli</i> , 2007



Composto fenólico	Actividade biológica e terapêutica	Bibliografia
<b>Diosmina</b>	AOx; Aa	Narayana <i>et alli</i> , 2001; McKay e Blumberg, 2006
<b>Eriocitrina</b>	AOx	Fecka e Turek, 2007
<b>Eriodictiol</b>	AOx e Cd	Narayana <i>et alli</i> , 2001
<b>Eriodictiol 7-O-<math>\beta</math>-glucosídeo</b>	AOx e analgesia	Elhabazi <i>et alli</i> , 2008
<b>Galangina</b>	Av	Narayana <i>et alli</i> , 2001
<b>Hesperidina</b>	AOx; AI; Aa; Hepap; Ae; $\downarrow$ P e $\uparrow$ RC	Narayana <i>et alli</i> , 2001; McKay e Blumberg, 2006; Proença da Cunha <i>et alli</i> , 2009
<b>Luteolina</b>	AOx; AI; AH; Ab; Cd; Radiop; $\downarrow$ P e $\uparrow$ RC	Narayana <i>et alli</i> , 2001; Arora <i>et alli</i> , 2005; Proença da Cunha <i>et alli</i> , 2007
<b>Luteolina 7-O-<math>\beta</math>-glucosídeo</b>	AOx; Aa; Ab e AH	Basile <i>et alli</i> , 2000; Narayana <i>et alli</i> , 2001; Fecka e Turek, 2007
<b>Luteolina 7-O-rutinosídeo</b>	AOx; Aa e Ab	Basile <i>et alli</i> , 2000; McKay e Blumberg, 2006; Fecka e Turek, 2007;
<b>Morina</b>	AOx; An; AI; Aa e Ab	Narayana <i>et alli</i> , 2001; Degáspari <i>et alli</i> 2004
<b>Naringina</b>	Ab; Au; $\downarrow$ Col	Narayana <i>et alli</i> , 2001; Pinto, 2010
<b>Narirutina</b>	AOx; Aa	McKay e Blumberg, 2006
<b>Quercetina</b>	AOx; Radiop; AI; Ab; Au; $\downarrow$ AgP; $\downarrow$ PL; $\downarrow$ P e $\uparrow$ RC	Narayana <i>et alli</i> , 2001
<b>Rutina</b>	AOx; Hepap; Ab; Au; $\downarrow$ PL; $\uparrow$ RC; $\uparrow$ Col HDL; $\downarrow$ Ats e Cv	Narayana <i>et alli</i> , 2001; Proença da Cunha <i>et alli</i> , 2007; Pereira <i>et alli</i> , 2009

Aa- antialérgico; Ab- antibacteriano; Ads- adstringente; Ae- antiespasmódico; AgP- agregação plaquetária; AH- anti-hipertensivo; AI- anti-inflamatório; An- antineoplásico; AOx- antioxidante; Ap- antiperoxidante; As- antisséptico; At- antitrombótico; Ats- aterosclerose; Au- antiúlceroso; Av- antivírico; Cd- cardiotónico; Col- colesterol; Cv- cardiovascular; Hepap- hepatoprotector; P- permeabilidade; PL- peroxidação lipídica; Radiop- radioprotector; RC- resistência capilar; RL- radical livre.



Uma das principais características farmacológicas atribuídas aos compostos fenólicos é a sua capacidade anti-inflamatória. Este efeito, por sua vez, é consequência do seu poder inibidor de sistemas enzimáticos, como a lipoxigenase, a cicloxigenase, a monoxigenase, a xantina oxidase, a succinoxidase mitocondrial, a NADH-oxidase, a fosfolipase A<sub>2</sub> e a proteína cinase (Cao *et alli*, 1996; Proença da Cunha *et alli*, 2007; Sousa *et alli*, 2007; Coutinho *et alli*, 2009; Pereira *et alli*, 2009; De Pauli, 2010).

Por outro lado, os compostos fenólicos também conseguem promover a actividade de enzimas com capacidade antioxidante, como é o caso da rutina que, ao elevar a actividade da enzima superóxido dismutase, reduz o risco de desenvolvimento de doenças, como a aterosclerose e problemas cardiovasculares (Pereira *et alli*, 2009), estimulando o sistema imunitário.

As actividades cardiotónica, antiúlcerosa, antialérgica, antitumoral, hepatoprotectora, antibacteriana, antivírica, anti-inflamatória, antineoplásica, anti-squémica, antiplaquetária, antitumoral e antioxidante, assim como o seu poder em actuar no sistema circulatório e na redução do colesterol LDL, são resultantes dos diferentes mecanismos antioxidantes que os flavonóides assumem (Rice-Evans *et alli*, 1996; Vázquez *et alli*, 2008; Coutinho *et alli*, 2009).



## VI. Materiais e métodos

Os seguintes procedimentos foram realizados nos laboratórios da Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde, segundo a metodologia escolhida a seguir descrita.

### VI.1. Reagentes e materiais

Todos os reagentes (DPPH<sup>•</sup>-1,1-difenil-2-picril-hidrazil; metanol; ácido gálico; carbonato de sódio e reagente de Folin-Ciocalteu) foram usados sem qualquer purificação adicional e obtidos da Sigma.

No ensaio de citotoxicidade usou-se uma solução salina (água do mar) e cistos de *Artémia salina*, gentilmente cedidos pelo Professor Doutor José Neves.

A água ultra-fina foi obtida através de purificação de água desionizada, utilizando o sistema Milli-Q Plus 185 (Molsheim, França), possuindo uma condutividade final de 18,2  $\mu\Omega\text{cm}^{-1}$ .

A solução metanólica de DPPH<sup>•</sup> foi sempre preparada diariamente, imediatamente antes da preparação das diluições nas microplacas.

### VI.2. Equipamento analítico

Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica. Numa primeira fase, na avaliação da actividade antirradical dos extractos, as pesagens do exemplar de *Castanea sativa* foram realizadas na balança Acculab sartorius group ALC. As restantes pesagens foram efectuadas na balança Scaltec SBA 31.

As soluções foram dissolvidas com o auxílio de um banho de ultra-sons Bandelin Sonorex RK 156.



As soluções foram medidas por meio de micropipetas: Thermo Finnpipette (10 - 100  $\mu$ l), Socorex Acura 825 (100 - 1000  $\mu$ l), Gilson pipetman P1000 (100 - 1000  $\mu$ l).

Nos ensaios de avaliação de actividade antioxidante por sequestro de DPPH<sup>\*</sup>, as soluções foram aplicadas com apoio de uma pipeta multicanal VWR Signature Pipetton, 8 channel (50 - 300  $\mu$ l) nas microplacas de 96 poços. Nestes estudos, utilizou-se um leitor de placas Statfax 3200.

Todas as leituras espectrofotométricas foram realizadas num espectrofotómetro UV-Vis Spectronic Unicam Helios  $\gamma$ .

Nos ensaios citotóxicos utilizou-se uma lupa Leicca EZ4D para a contagem de artémias.

### VI.3. Preparação dos extractos metanólicos

Tanto a *Castanea sativa* como a *Mentha piperita* foram colhidas na região transmontana do Larouco e do Brunheiro, área pertencente aos concelhos de Montalegre e Chaves (Junho de 2007) e identificada no Departamento de Biologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, o qual forneceu o *voucher* respectivo.

A planta foi seca à sombra, à temperatura ambiente durante o tempo necessário. O extracto metanólico foi obtido por extracção em Soxhlet. Assim, a quantidade de 5 g de folhas trituradas foi colocada num cartuxo de papel de filtro e este foi introduzido no sistema Soxhlet. Posteriormente, adicionou-se 150 ml de metanol no balão de destilação e deixou-se decorrer a extracção durante 3 horas. Os extractos metanólicos foram liofilizados e armazenados a 4 °C até serem utilizados.

As soluções mais concentradas de extracto foram obtidas por pesagem rigorosa do liofilizado, seguida de dissolução. As soluções mais diluídas foram preparadas a partir das anteriores por diluição rigorosa com metanol.

#### VI.4. Avaliação da capacidade de sequestrar radicais livres com DPPH<sup>•</sup>

Encontram-se disponíveis diversos métodos de avaliação da capacidade antioxidante de extractos de plantas. No entanto, por uma questão de tempo e da quantidade de amostra utilizada é importante seleccionar e aplicar um processo de avaliação estável e rápido para a determinação da actividade antirradical.

A actividade antirradical, referente aos extractos metanólicos de *Castanea sativa* e *Mentha piperita*, foram determinadas segundo Cai *et alli* (2004) e Wei e Shibamoto (2007). Num leitor de microplacas, monitorizou-se a concentração de DPPH<sup>•</sup> a 515 nm. Uma série de diluições, em que as concentrações estão ajustadas dentro de intervalos adequados a cada extracto (6,16 x10<sup>-6</sup> g/ml a 2,47 x10<sup>-3</sup> g/ml de *Castanea sativa* e 5,06 x10<sup>-6</sup> g/ml a 2,02 x10<sup>-3</sup> g/ml de *Mentha piperita*) foram preparadas em microplacas de 96 poços, contendo cada um, 25 µl de extracto e 200 µl de DPPH<sup>•</sup> a 150 µM. O controlo (solução de DPPH<sup>•</sup> sem extracto) foi sujeito às mesmas condições experimentais.

Após este passo, as soluções foram reservadas ao abrigo da luz por um período de 30 minutos, para dar tempo suficiente para se dar a reacção total entre a amostra e o DPPH<sup>•</sup>. Posteriormente, foi realizada a leitura das soluções preparadas ao comprimento de onda especificado.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição (I%) de redução do DPPH<sup>•</sup> relativamente ao controlo e calculado através da seguinte equação:

$$I \% = \left[ \frac{(A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controlo}}} \right] \times 100$$

Onde  $A_{\text{controlo}}$  e  $A_{\text{amostra}}$  são as absorvâncias do controlo e da amostra, respectivamente. A execução dos ensaios com diversas concentrações para cada amostra permitiu determinar graficamente a concentração que causa 50 % de inibição (CI<sub>50</sub>) em ambas espécies de castanheiro e de menta.

O valor de CI<sub>50</sub> foi obtido por análise de regressão linear e/ou não linear. Recorrendo à análise de regressão linear, o valor de CI<sub>50</sub> foi obtido por interpolação gráfica da % de inibição em função da concentração (c) do extracto da planta em estudo. Pela regressão não linear, foi utilizado a aplicação do programa Solver (Excel),



recorrendo-se à seguinte equação:  $I\% = I_0\% - I_0\% \times e^{(-Kc)}$ , onde  $I_0\%$  é a percentagem de inibição final e  $K$  é uma constante.

No ensaio de *Castanea sativa* realizaram-se 3 experiências e para a *Mentha piperita* 5, todas em triplicado.

### VI.5. Determinação dos compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi efectuada pelo do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965) e Salcedo *et alli*, (2010). É uma técnica que assenta na quantificação dos grupos hidroxilo fenólicos presentes num extracto, recorrendo 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 presente no reagente é reduzido a uma mistura de óxidos de tungsténio e de molibdénio, de cor azul. A coloração desenvolvida (absorção máxima entre 725 e 750 nm) é proporcional ao teor de compostos fenólicos.

Adicionaram-se a 300  $\mu$ l de cada solução metanólica de liofilizado de castanheiro ou de menta (1,00 mg/ml), em balão volumétrico de 10 ml, sucessivamente as seguintes substâncias (i) 2 ml de água, (ii) 1 ml de reagente de Folin-Ciocalteu, (iii) 5 ml de solução de carbonato de sódio a 20 % (m/v) e completou-se o volume com água. Agitou-se vigorosamente a solução reaccional à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 735 nm, após um período de incubação de 30 minutos. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância contra uma curva de calibração construída com recurso a padrões de ácido gálgico (0,001 - 0,100 mg/ml), submetidos às mesmas reacções e condições experimentais.

As determinações foram realizadas em duplicado e os resultados foram apresentados em miligramas de fenóis totais, expressos em equivalente de ácido gálgico, por miligrama de liofilizado, de *Castanea sativa* ou de *Mentha piperita*.



## VI.6. Pesquisa de actividade citotóxica

Ao longo dos últimos anos, tem sido efectuada uma intensa investigação sobre a toxicidade de vários compostos através de testes simples e reprodutíveis. O bioteste de citotoxicidade através da *Artemia salina* é escolhido pois é pouco dispendioso, eficiente, rápido e necessita apenas de uma amostra de extracto relativamente pequena (2 - 20 mg) (Pimenta *et alli*, 2003).

Os cistos de *A. salina* foram incubados em água do mar sintética sob iluminação artificial, por 24 horas e à temperatura de  $\pm 25$  °C, condições ideais para a eclosão das larvas e seu desenvolvimento para os estágios II - III.

O ensaio foi feito em microplacas de 96 poços (12 x 8). Os poços foram marcados como linhas de 1 a 12 e como colunas de H a A. Deu-se início à distribuição das soluções teste pelo controlo (coluna H, esquerda) em direcção à concentração mais elevada (coluna A, direita). A cada poço da coluna 1 adicionou-se 1 ml de água do mar (controlo) e repetiu-se o procedimento para as outras colunas com a solução teste à concentração desejada (*Castanea sativa*: de 0,780 a 15,60 mg/ml; *Mentha piperita*: de 0,842 a 16,84 mg/ml). De seguida, transferiu-se à lupa binocular (ampliação 10 - 12x) cerca de 50 estados larvares II-III da caixa de Petri para cada um dos poços da linha 12 (poços de lavagem) da microplaca. Após a lavagem, foram transferidas cerca de 10 larvas do poço de lavagem da coluna 1 para cada um dos 3 poços desta coluna, tendo-se repetido a operação para as colunas 2 a 6. As placas foram então postas a incubar a 25 °C durante 24 horas.

Após o período de incubação fez-se a contagem das larvas mortas. Considerou-se morta toda a larva que não apresentava qualquer movimento normal em 10 segundos de observação.

Por fim, adicionou-se pequenas quantidades de metanol absoluto, suficiente para matar as artémias que permaneciam vivas e facultar a contagem do número total destes pequenos crustáceos em cada poço. A concentração letal média (CL<sub>50</sub>) foi calculada por regressão linear (Costa *et alli*, 2009).

O ensaio foi realizado em triplicado para cada extracto.

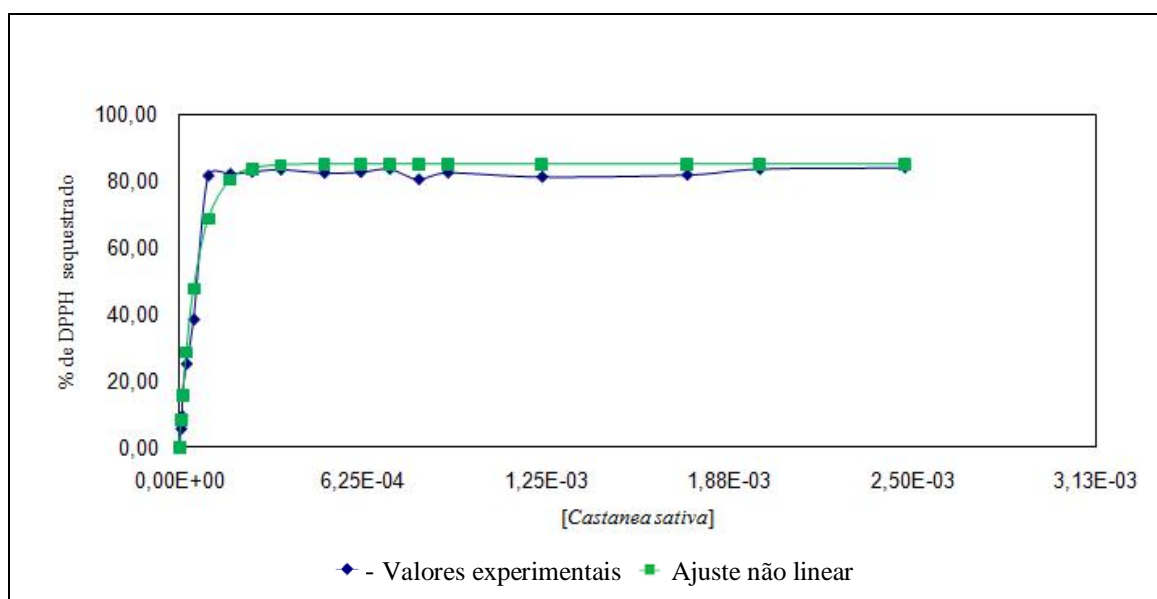
## VII. Resultados

Os resultados obtidos pela análise dos extractos metanólicos de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita* encontram-se representados nos pontos VII.1., VII.2 e VII.3.

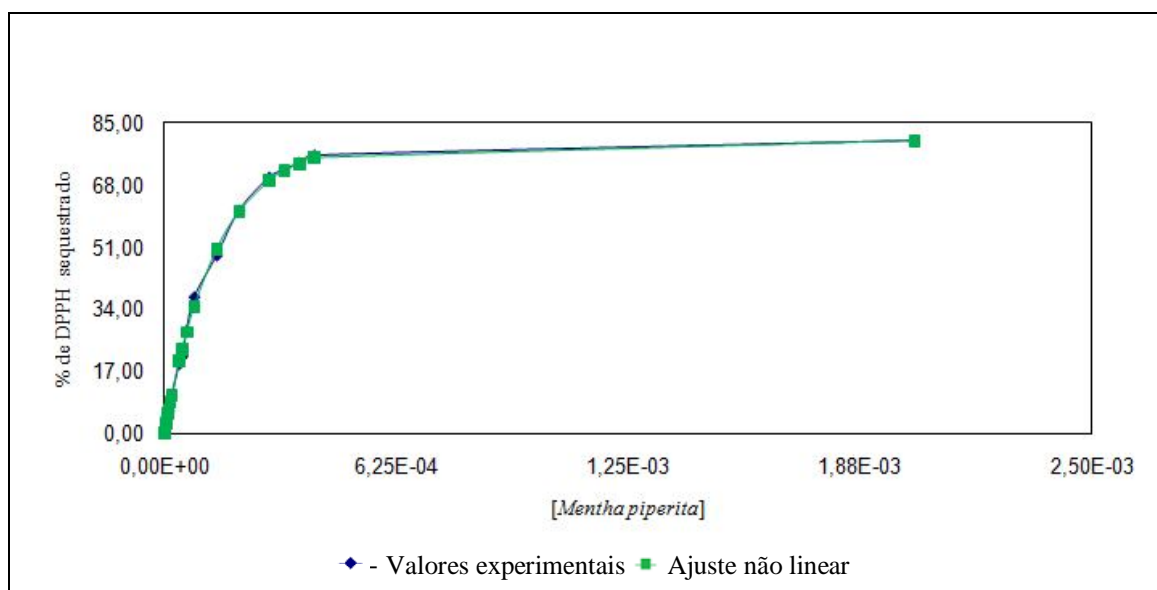
### VII.1. Avaliação da capacidade de sequestrar de radicais livres com DPPH\*

Após a execução do procedimento laboratorial, onde se procede à avaliação da capacidade de captação de radicais livres com o DPPH\* dos extractos metanólicos das folhas de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita*, foram obtidos os resultados a seguir apresentados.

Os dados experimentais do comportamento antirradicalar dos extractos de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita* estão representados nos gráficos das figuras 9 e 10, respectivamente.



**Figura 9:** Comportamento de actividade antirradicalar do extracto metanólico de *Castanea sativa*.



**Figura 10:** Comportamento de actividade antirradicalar do extracto metanólico de *Mentha piperita*.

O tratamento estatístico dos resultados obtidos nestes ensaios está expresso na tabela 3.

**Tabela 3:** Dados estatísticos relativos aos valores de  $CI_{50}$  (mg/ml) dos extractos metanólicos das folhas de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita*.

Análise		<i>C. sativa</i>	<i>M. piperita</i>
DPPH <sup>•</sup> (linear)	$CI_{50}$ (mg/ml)	$6,19 \times 10^{-5}$ ( $R^2=0,9971$ )	$1,27 \times 10^{-4}$ ( $R^2=0,9968$ )
	DP	$2,39 \times 10^{-6}$	$1,72 \times 10^{-5}$
	CV (%)	3,86	13,50
DPPH <sup>•</sup> (não linear)	$CI_{50}$ (mg/ml)	$5,48 \times 10^{-5}$	$1,38 \times 10^{-4}$
	DP	$3,64 \times 10^{-6}$	$1,65 \times 10^{-5}$
	CV (%)	6,64	11,91

DP - Desvio Padrão; CV - Coeficiente de variação.

## VII.2. Determinação dos compostos fenólicos totais

Para quantificar os compostos fenólicos totais presentes nos extractos metanólicos das folhas de *Castanea sativa* e *Mentha piperita*, foram realizados os procedimentos descritos anteriormente, onde foram alcançados os resultados registados na tabela 4.

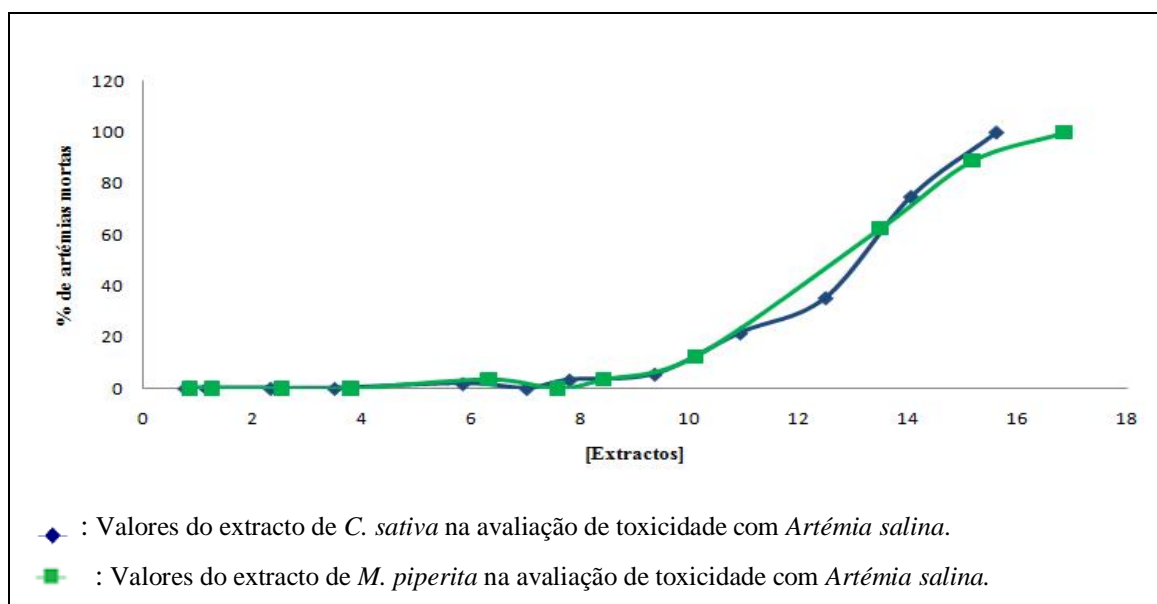
**Tabela 4:** Valores obtidos no ensaio de quantificação de compostos fenólicos totais dos extractos metanólicos das folhas de *Castanea sativa* e *Mentha piperita*.

Análise		<i>Castanea sativa</i>	<i>Mentha piperita</i>
Teor em compostos fenólicos	[Média] (mg AG/mg liofilizado)	$9,315 \times 10^{-3}$	$1,092 \times 10^{-2}$
	DP	0,001	0,002
	CV (%)	6,037	14,690

DP - Desvio Padrão; CV - Coeficiente de variação.

### VII.3. Pesquisa de actividade citotóxica

Para a avaliação da toxicidade dos extractos metanólicos das folhas de *Castanea sativa* e *Mentha piperita* recorreu-se ao procedimento descrito em VI.5. Os valores obtidos estão descritos no gráfico da figura 11, e tratados estatisticamente na tabela 5.



**Figura 11:** Representação gráfica do comportamento das artémias face à exposição a diferentes concentrações de extractos de *Castanea sativa* e *Mentha piperita*.

**Tabela 5:** Valores obtidos de  $CL_{50}$  no ensaio de avaliação da toxicidade dos extractos metanólicos das folhas de *Castanea sativa* e *Mentha piperita*.

Extracto	$CL_{50}$ (mg / ml)	CV (%)
<i>Castanea sativa</i>	$12,45 \pm 0,19$	1,24
<i>Mentha piperita</i>	$12,06 \pm 0,10$	1,25

CV - Coeficiente de variação



## VIII. Discussão

A pesquisa que se desenvolveu neste trabalho foi direccionada aos extractos metanólicos de folhas de *Castanea sativa* e *Mentha piperita*.

Optou-se por se estudar as folhas, por ser a parte da planta mais usada, devido à sua disponibilidade, acessibilidade e propriedades terapêuticas, motivos que justificam o seu elevado número de aplicações na medicina popular, além de que a sua recolha cuidada não provoca danos significativos à planta. Muitos estudos apontam as folhas como um dos componentes das plantas com maior potencial farmacológico, em grande parte atribuído à hipótese de os compostos fenólicos se apresentarem em maior quantidade nas partes folhosas (Kähkönen *et alli*, 1999).

Para uma melhor compreensão da actividade dos compostos fenólicos presentes nos extractos dos exemplares estudados é necessário extraí-los de forma a reduzir o maior número possível de interferentes, o que torna fundamental encontrar um solvente de extracção adequado. Ensaio desenvolvidos por Goli e seus colegas (2005) evidenciam que para além da água, o metanol é um dos métodos mais eficazes para a extracção de polifenóis. A escolha do solvente de extracção para o presente trabalho, teve como base os resultados positivos obtidos em diversas pesquisas científicas.

Se se comparar a informação recolhida sobre as propriedades terapêuticas referente às folhas de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita*, tanto a nível da medicina convencional como popular, com a tabela 2, é possível verificar que algumas destas características coincidem com os efeitos atribuídos aos compostos fenólicos nelas presentes. Esta observação suporta a hipótese de que as propriedades farmacológicas das folhas são resultado dos polifenóis presentes nessa estrutura.

É indiscutível a importância da conformação química de cada composto sobre a sua actividade, o que leva a colocar em questão qual o factor mais decisivo para o poder terapêutico dos extractos vegetais, se a quantidade total de compostos fenólicos ou a qualidade antioxidante dessas estruturas. Algumas das interacções estrutura/actividade observados nos compostos fenólicos presentes nas folhas de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita* encontram-se descritos nas tabelas 6 e 7, respectivamente.

**Tabela 6:** Efeito da estrutura química sobre os compostos fenólicos presentes no extracto de folha de *Castanea sativa*.

	Compostos fenólicos	Flavonóides			Estado		Mecanismo de acção		
		Flavanona	Flavona	Flavonol	Aglic	Glic	FRE	CMT	PR
<i>Castanea sativa</i>	Apigenina		✓		✓			✓	✓
	Campferol			✓	✓		✓	✓	✓
	Galangina			✓	✓		✓	✓	✓
	Hesperidina	✓				✓			✓
	Morina			✓	✓		✓	✓	✓
	Naringina	✓				✓			✓
	Quercetina			✓	✓		✓	✓	✓
	Rutina			✓		✓	✓	✓	✓

FRE- formação de radical estável; CMT- captação de metais de transição; PR- poder redutor; Aglic- aglicona; Glic- glicosídeo.

**Tabela 7:** Efeito que a estrutura química tem sobre os compostos fenólicos presentes no extracto de folha de *Mentha piperita*.

	Compostos fenólicos	Ác. Fenólico	Flavonóides		Estado		Mecanismo de acção		
		Ác. Hidroxic	Flavanona	Flavona	Aglic	Glic	FRE	CMT	PR
<i>Mentha piperita</i>	Ác. Cafeico	✓					✓		✓
	Ác. Rosm	✓					✓		✓
	Apig-7-O-rut			✓		✓	✓	✓	✓
	Diosmina			✓		✓	✓	✓	✓
	Eriocitrina		✓			✓	✓	✓	✓
	Eriodictiol		✓			✓			✓
	Erio-7-O- $\beta$ -gli		✓				✓	✓	✓
	Hesperidina			✓			✓		✓
	Luteolina			✓			✓	✓	✓
	Lut-7-O- $\beta$ -glic			✓			✓	✓	✓
	Lut-7-O- $\beta$ -rut			✓			✓		✓
	Narirutina			✓			✓		✓

FRE- formação de radical estável; CMT- captação de metais de transição; PR- poder redutor; Aglic- aglicona; Glic- glicosídeo; Ác. Hidroxic (Derivado do Ácido hidroxicinâmico); Ác. Rosm (Ác. rosmarínico); Apig-7-O-rut (Apigenina-7-O-rutinosídeo); Erio-7-O- $\beta$ -gli (Eriodictiol-7-O- $\beta$ -glicosídeo); Lut-7-O- $\beta$ -glic (Luteolina-7-O- $\beta$ -glicosídeo); Lut-7-O- $\beta$ -rut (Luteolina-7-O- $\beta$ -rutinosídeo).



Ao observar as tabelas 6 e 7, que associam as alterações químicas com os mecanismos de sequestro de radicais, é possível constatar que cada composto pode desenvolver mais do que um processo de acção antioxidante.

Um traço comum a todos os compostos fenólicos presentes nos extractos de folhas de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita*, é o facto de todas as estruturas conterem mais que um grupo -OH fenólico, o que lhes proporciona a capacidade de proteger as membranas celulares contra o *stress* oxidativo. Pela análise das tabelas 6 e 7, pode verificar-se que o extracto de folha de castanheiro apresenta um grande aporte de flavonóis e flavonas, ao contrário da folha de menta, que tem maioritariamente flavanonas e flavonas. Ao levar em conta que o poder antioxidante destas subclasses (flavonol > flavona > flavanona: onde os flavonóis são os que possuem maior capacidade de sequestrar radicais livres), é fácil verificar que, apesar da folha de *Mentha piperita* ser mais rica em compostos fenólicos, os polifenóis presentes na *Castanea sativa* podem ser considerados mais eficazes pela subclasse de compostos que prevalece na sua composição.

Outro factor importante a ter em conta nestes extractos é que na folha de *Castanea sativa* prevalece compostos fenólicos na sua forma livre (aglicona), ao contrário da folha de *Mentha piperita* onde os polifenóis glicosilados ocupam a maior fracção. Estas características podem influenciar a acção destes extractos no organismo, pois a forma glicosídeo apresenta uma actividade mais reduzida. Por sua vez, a lipofilidade das agliconas permite que estas moléculas atravessem a membrana celular, restringindo a sua fluidez para impedir a entrada de radicais livres no ambiente celular (Barreiros *et alli*, 2006; Cai *et alli*, 2006).

O efeito dos compostos fenólicos também pode ser influenciado quando em associação a outras moléculas antioxidantes, sejam ou não de natureza fenólica. A folha de menta possui compostos com actividade antioxidante, como o  $\alpha$ -tocoferol e os ácidos cafeico e rosmarínico (Samarth *et alli*, 2008), que actuam em sinergia e proporcionam um poder antioxidante superior ao observado nesses mesmos compostos isolados.

Ao considerar todos estes parâmetros, prevê-se que a *Castanea sativa* apresente uma actividade antirradicalar superior que a *Mentha piperita*.



### VIII.1. Actividade antirradical de DPPH<sup>•</sup> dos extractos de castanheiro e menta

Para verificar qual o extracto com maior poder antirradicalar, é importante determinar a capacidade sequestrante de DPPH<sup>•</sup>. Neste trabalho prático, o ensaio de DPPH<sup>•</sup> foi tratado de forma linear e não linear.

No caso do tratamento com ajuste linear, os valores de CI<sub>50</sub> obtidos foram de  $6,19 \times 10^{-5}$  mg/ml e de  $1,27 \times 10^{-4}$  mg/ml para *C. sativa* e *M. piperita* respectivamente. Estes valores estão de acordo com os calculados no tratamento não linear, que foram, respectivamente  $5,48 \times 10^{-5}$  mg/ml e  $1,38 \times 10^{-4}$  mg/ml.

O gráfico referente ao comportamento de percentagem de inibição de DPPH<sup>•</sup> na presença do extracto metanólico de *Castanea sativa* demonstra que o comportamento obtido não apresenta desvios significativos dos extrapolados pela equação não linear, onde se observa um poder máximo de inibição do radical próximo de 85 %, atingido a partir de  $4,94 \times 10^{-4}$  mg/ml de castanheiro. Para o extracto de *Mentha piperita*, o comportamento inibitório de DPPH<sup>•</sup> obtido sobrepõe-se ao esperado pela equação não linear, e o valor máximo de percentagem de inibição do radical foi de 75 %, a partir da concentração de  $4,05 \times 10^{-4}$  mg/ml.

Ensaio de avaliação da capacidade de sequestrar radicais livres desenvolvidos para os extractos aquosos de *Castanea sativa* atribuem uma percentagem máxima de inibição de DPPH<sup>•</sup> de aproximadamente 94,4 %, obtida a uma concentração de 0,50 mg/ml (Barreira *et alli*, 2008). Para o extracto aquoso de *Mentha piperita*, este mesmo parâmetro foi de cerca 93,9 %, obtido a partir de uma concentração de 1,00 mg/ml (Samarth *et alli*, 2008).

Para quantificar a actividade de inibição de radicais livres avalia-se o valor de CI<sub>50</sub> de cada exemplar, em que quanto mais reduzido for este valor, mais elevado é o poder antioxidante (Mujić *et alli*, 2011). Alguns resultados são apresentados na tabela 8.



**Tabela 8:** Actividade antirradicalar dos antioxidantes sintéticos BHA e BHT e dos extractos aquosos das folhas de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita*.

Análise		<i>C. sativa</i> (aquoso)	<i>M. piperita</i> (aquoso)	BHT	BHA
DPPH <sup>*</sup> (linear)	CI <sub>50</sub> (mg/ml)	0,170 <sup>(*1)</sup>	0,273 <sup>(*2)</sup> 0,0490 <sup>(*3)</sup>	0,0210 <sup>(*3)</sup>	-
DPPH <sup>*</sup> (não linear)	CI <sub>50</sub> (mg/ml)	-	0,0480 <sup>(*3)</sup>	0,0181 <sup>(*3)</sup>	0,0053 <sup>(*3)</sup>

Referências bibliográficas: (\*1)- Barreira *et alli*, 2008; (\*2)- Samarth *et alli*, 2008; (\*3)- Neves *et alli*, 2009a.

Ao comparar os valores de CI<sub>50</sub> obtidos com os valores publicados de BHT, BHA, e dos extractos aquosos de *C. sativa* e *M. piperita*, observa-se que o poder em sequestrar radicais segue a seguinte razão decrescente: *Castanea sativa*<sub>(meOH)</sub> > *Mentha piperita*<sub>(meOH)</sub> > BHA > BHT > *Castanea sativa*<sub>(aquoso)</sub> > *Mentha piperita*<sub>(aquoso)</sub>.

É de salientar que o resultado da actividade antioxidante do extracto de menta pode não estar próximo do real, visto que nele se encontram outros antioxidantes não fenólicos, designadamente o  $\alpha$ -tocoferol que actua em sinergia com os ácidos fenólicos, e que não é quantificado por este método. É importante também ter em conta que o DPPH<sup>\*</sup> não é um radical livre com presença natural no organismo humano. Por isso o ensaio de determinação da capacidade antioxidante com recurso desse composto pode apresentar algumas limitações (Cao *et alli*, 1996).

## VIII.2. Quantidade de compostos fenólicos totais

É importante quantificar os compostos fenólicos presentes nas folhas dos exemplares a estudar, de forma a relacionar a fracção polifenólica com o seu comportamento antioxidante. Como tal, para se quantificar os compostos fenólicos que estão presentes nos extractos metanólicos recorreu-se ao método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, o qual determina a fracção fenólica total. Os resultados obtidos atribuem aos extractos metanólicos da folha de *Castanea sativa*  $9,315 \times 10^{-3}$  mg de ácido gálgico por mg de liofilizado e de *Mentha piperita*  $1,092 \times 10^{-2}$  mg de ácido gálgico por mg de liofilizado.



Até à data, foram realizados outros ensaios para determinar a fracção de compostos fenólicos totais dos extractos aquosos de castanheiro e menta, através do método de Folin-Ciocalteu. Segundo Almeida *et alli* (2008), o extracto aquoso da folha de *Castanea sativa* demonstra um aporte fenólico de aproximadamente 0,284 mg de ácido gálgico por mg de liofilizado. Por sua vez, segundo os ensaios realizados por Neves *et alli* (2009a), o teor de compostos fenólicos no extracto aquoso da folha de *Mentha piperita* é de, aproximadamente, 0,467 mg de ácido gálgico por mg liofilizado.

Ao ter em conta o teor em compostos fenólicos obtidos neste ensaio realizado com extractos metanólicos, com os valores dos extractos aquosos disponíveis na bibliografia, pode-se fazer a seguinte relação, de compostos fenólicos totais,  $Castanea sativa_{(meOH)} < Mentha piperita_{(meOH)} < Castanea sativa_{(aquoso)} < Mentha piperita_{(aquoso)}$ , onde o extracto metanólico de castanheiro é o mais pobre em compostos fenólicos e o extracto aquoso de menta apresenta o teor mais elevado em polifenóis.

Estes valores podem indicar que os extractos aquosos apresentam um teor mais elevado em compostos fenólicos em relação aos metanólicos e, por sua vez, as folhas de *Mentha piperita* são mais ricas em polifenóis, como seria de esperar pela sua multiplicidade de compostos dessa natureza.

Porém, segundo os ensaios realizados por Olennikov e Tankhaeva (2010), é preciso considerar que as flavanonas, como a hesperidina (presente no castanheiro e na menta) e a eriocitrina (presente na menta), apresentam uma fraca reacção com o reagente de Folin-Ciocalteu, o que pode comprometer a exactidão dos resultados obtidos nestes ensaios.

### VIII.3. Toxicidade dos extractos de *C. sativa* e *M. piperita*

Todos os extractos testados de *C. sativa* mostraram baixa toxicidade com valores de  $CL_{50}$  de  $12,45 \pm 0,19$  mg/ml. Idêntico resultado foi obtido para *M. piperita* que teve valores de  $CL_{50}$  de  $12,06 \pm 0,10$  mg/ml.

Meyer *et alli* (1982) estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a  $CL_{50}$ , apresentada por extractos de plantas sobre larvas de *A. salina*. Desde então, considera-se que quando são verificados valores acima 1,00 mg/ml, estes, são considerados atóxicos.



Sendo assim, os extractos metanólicos de quer *C. sativa* quer *M. piperita* podem ser considerado atóxicos.

No caso da toxicidade da *Castanea sativa* e *Mentha piperita* a documentação encontrada não apresenta nenhum dado que suporte a existência de toxicidade sobre os compostos fenólicos presentes nos extractos metanólicos, visto que ainda são escassos os estudos desenvolvidos sobre este tipo de extracto.



## IX. Conclusões

O comportamento antirradicalar obtido dos extractos estudados neste trabalho foi semelhante ao previsto, onde o poder antioxidante da folha de *Castanea sativa* supera o da *Mentha piperita*.

A comparação dos resultados demonstra que os extractos metanólicos possuem uma actividade antioxidante mais eficaz que os extractos aquosos e, em ambos os casos, o extracto da folha de *Castanea sativa* apresenta uma capacidade de sequestro de radicais livres mais eficaz. No entanto, os resultados obtidos por outros investigadores demonstram que os extractos aquosos das folhas de castanheiro e de menta são mais ricos em compostos fenólicos totais que os extractos metanólicos estudados neste trabalho. Ambos extractos de plantas aqui estudadas exibem um poder antioxidante superior aos antioxidantes sintéticos BHA e BHT.

O elevado desempenho antioxidante apresentado pelo extracto metanólico de *Castanea sativa* contrasta com o facto de esta amostra apresentar um teor de compostos fenólicos totais mais reduzido que o de *Mentha piperita*. Os compostos fenólicos presentes na folha de menta estão predominantemente sob a forma glicosídeo, característica que reduz a sua reactividade.

Pode-se considerar que o factor estrutura/actividade antirradicalar apresentada por cada composto poderá ser determinante para o comportamento antioxidante das plantas, independentemente da extensão da sua fracção polifenólica. Estes resultados mostram que nem sempre é linear a quantidade de compostos fenólicos e a actividade antioxidante correspondente, a qual depende do tipo de estrutura fenólica presente, o que evidencia a qualidade dos compostos sobre a quantidade.

No ensaio da *Artémia salina* ambos extractos assumiram uma actividade considerada atóxica para o Homem.

Numa perspectiva geral, os ensaios realizados neste estudo demonstraram que os extractos metanólicos de *Castanea sativa* e de *Mentha piperita* podem representar uma alternativa viável, como fonte de antioxidantes naturais.



Deve-se ter em conta as limitações presentes nos métodos aplicados neste trabalho, o que torna importante a repetição dos ensaios como meio de comparação e de confirmação dos resultados obtidos.

Numa perspectiva futura, considera-se necessário o desenvolvimento de novas pesquisas sobre este assunto para colmatar a falta de informação que ainda existe em algumas áreas aqui abordadas, sobretudo na *Castanea sativa*, e aprofundar os resultados obtidos nos ensaios aqui realizados.



## Referências Bibliográficas

- Aberoumand, A.; Deokule, S. S. (2008). Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. *Pakistan Journal of Nutrition*. Vol. 7, nº 4, pp. 582-585.
- Akdogan, M.; Ozguner, M.; Aydin, G.; Gokalp, O. (2004). Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* Labiatae and *Mentha spicata* Labiatae on liver tissue in rats. *Human & Experimental Toxicology*, Vol. 23, pp. 21-28.
- Almeida, I. F.; Fernandes, E.; Lima, J. L. F. C.; Costa, P. C.; Bahia, M. F. (2008). Protective effect of *Castanea sativa* and *Quercus robur* leaf extracts against oxygen and nitrogen reactive species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Vol. 91, pp. 87-95.
- Arora, R.; Gupta, D.; Chawla, R.; Sagar, R.; Sharma, A.; Kumar, R.; Prasad, J.; Singh, S.; Samanta, N.; Sharma, R. K. (2005). Radioprotection by plant products: Present status and future prospects. *Phytotherapy Research*, Vol. 19, pp. 1-22.
- Atanassova, M.; Georgieva, S.; Ivancheva, K. (2011). Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, Vol. 46, nº 1, pp. 81-88.
- Balassundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, Vol. 99, pp. 191-203.
- Barreira, J. C. M.; Ferreira, I. C. F. R.; Oliveira, M. B. P. P.; Pereira, J. A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food chemistry*, Vol. 107, pp. 1106-1113.
- Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. (2001). *Química Medicinal - As bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre. Artmed Editora.
- Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, Vol. 29, nº 1, pp. 113-123.



- Basile, A.; Sorbo, S.; Giordano, S.; Ricciardi, L.; Ferrara, S.; Montesano, D.; Cobianchi, R. C.; Vuotto, M. L.; Ferrara, L. (2000). Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*, Vol. 71, pp. S110-S116.
- Benhammou, N.; Bekkara, F. A.; Panovska, T. K. (2009). Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *Comptes Rendus Chimie*, Vol. 12, pp. 1259-1266.
- Büyükbalei, A.; Nehir El, S. (2008). Determination of *in vitro* antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. *Plant Foods Human Nutrition*, Vol. 63, pp. 27-33.
- Cai, Y.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, Vol. 74, pp. 2157-2184.
- Cai, Y.; Sun, M.; Xing, J.; Luo, Q.; Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, Vol. 78, pp. 2872-2888.
- Calliste, C.; Trouillas, P.; Allais, D.; Duroux, J. (2005). *Castanea sativa* Mill. leaves as new sources of natural antioxidant: An electronic spin resonance study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, pp. 282-288.
- Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. (1996). Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 22, nº5, pp. 749-760.
- Capecka, E.; Mareczek, A.; Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. *Food Chemistry*, Vol. 93, pp. 223-226.
- Cevallos-Casals, B. A.; Cisneros-Zevallos, L. (2003). Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from andean purple corn and red-fleshed sweetpotato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, pp. 3313-3319.



- Costa, J. G. M.; Sousa, E. O.; Rodrigues, F. F. G.; Lima, S. G.; Braz-Filho, R. (2009). Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana câmara* L. e *Lantana* sp. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 19, nº3, pp. 710-714.
- Coutinho, M. A. S.; Muzitano, M. F.; Costa, S. S. (2009). Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. *Revista Virtual Química*, Vol. 1, nº 3, pp. 241-256.
- Cruz, A. P. G. (2008). Avaliação do efeito da extracção e da microfiltração do açai sobre a sua composição e actividade antioxidante. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Rio-de-Janeiro, Universidade Federal do Rio-de-Janeiro.
- Degáspari, C. H.; Waszczynskyj, N. (2004). Antioxidants properties of phenolic compounds. *Visão Académica, Curitiba*, Vol. 5, nº 5, pp. 33-40.
- De Pauli, P. A. (2010). Avaliação da composição química, compostos bioactivos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis. Dissertação de Mestrado em Ciências dos Alimentos. Araraquara, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- Dicko, M. H.; Gruppen, H.; Traoré, A. S.; Voragen, A. G. J.; Van Berkel, W. J. H. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, Vol. 1, nº 1, pp. 21-38.
- Elhabazi, K.; Ouacherif, A.; Laroubi, A.; Aboufatima, R.; Abbad, A.; Benharref, A.; Ziad, A.; Chait, A.; Dalal, A. (2008). Analgesic activity of three thyme species, *Thymus satureioides*, *Thymus maroccanus* and *Thymus leptobotrys*. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 2, pp. 262-267.
- Estevinho, L.; Pereira, A. P.; Moreira, L.; Dias, L. G.; Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 46, pp. 3774-3779.
- Fecka, I.; Turek, S. (2007). Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, melissa, and sage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 55, pp. 10908-10917.



Giada, M. L. R.; Mancini Filho, J. (2006). The importance of dietary phenolic compounds in the promotion of human health. *Publicação UEPG Ciências Biologia Saúde*, Vol. 12, nº 4, pp. 7-15.

Goli, A. H.; Barzegar, M.; Sahari, M. A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, Vol. 92, pp. 521-525.

Gonçalves, B.; Borges, O.; Costa, H. S.; Bennett, R.; Santos, M.; Silva, A. P. (2010). Metabolite composition of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) upon cooking. Proximate analysis, fibre, organic acids and phenolics. *Food Chemistry*, Vol. 122, pp. 154-160.

Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 476, pp. 107-112.

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

Jung, M. J.; Heo, S.; Wang, M. (2008) Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. *Food Chemistry*, Vol. 108, pp. 482-487.

Kähkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S.; Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Vol. 47, pp. 3954-3962.

Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nithyanandam, R. (2010). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, submetido.

Lemos, A. R. (2008). Caracterização físico-química, bioquímica e avaliação da atividade antioxidante em genótipos de urucueiros (*Bixa orellana* L.). Dissertação para pós-graduação em Engenharia dos alimentos. Bahia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB.



- Ligor, M.; Buszewski, B. (2007). Thin layer chromatographic techniques (TLC, OP TLC) for determination of biological activated compounds from herb extracts. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Vol. 30, pp. 2617-2628.
- López, M.; Martínez, F.; Del Valle, C.; Ferrit, M.; Luque, R. (2003). Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescent method. *Talanta*, Vol. 60, pp. 609-616.
- Luis, J. C.; Johnson, C. B. (2005). Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their *in vitro* antiradical activity. *Spanish Journal of Agricultural Research*, Vol. 3, nº 1, pp. 106-112.
- Machado, H.; Nagem, T. J.; Peters, V. M.; Fonseca, C. S.; Oliveira, T. T. (2008). Flavonoids and potential therapeutic. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, Vol. 27, nº 1/2, pp. 33-39.
- Maimoona, A.; Naeem, I.; Sadiq, Z.; Jameel, K. (2010). A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 133, pp. 261-272.
- Mantle, D.; Eddeb, F.; Pickering, A. T. (2000). Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 72, pp. 47-51.
- Matsubara, S.; Rodriguez-Amaya, D. B. (2006). Conteúdo em miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. *Ciência Tecnológica Alimentos*, Vol. 26, nº 2, pp. 380-385.
- McKay, D. L.; Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, Vol. 20, pp. 619-633.
- Mesa-Vanegas, A. M.; Gaviria, C. A.; Cardona, F.; Sáez-Veja, J. A.; Trujillo, S. B.; Rojano, B. A. (2010). Antioxidant activity and total phenols from some species of *Calophyllum* genus. *Revista Cubana de Plantas Mediciniais*, Vol. 15, nº 2, pp. 13-26.



Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Plant Medicine*, Vol. 45, pp. 31-34.

Mi Yoo, K.; Hwan Lee, C.; Lee, H.; Moon, B.; Yong Lee, C. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, Vol. 106, pp. 929-936.

Montanher, A. B. P.; Pizzolatti, M. G.; Brighente, M. C. (2002). An application of the brine shrimp bioassay for general screening of brazilian medicinal plants. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, Vol. 21, nº3, pp. 175-178.

Montoro, P.; Braca, A.; Pizza, C.; De Tommasi, N. (2005). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry*, Vol. 92, pp. 349-355.

Mosca, L.; Marcellini, S.; Perluigi, M.; Mastroiacovo, P.; Moretti, S.; Famularo, G.; Peluso, I.; Santini, G.; De Simone, C. (2002). Modulation of apoptosis and improved redox metabolism with the use of a new antioxidant formula. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 63, pp. 1305-1314.

Mujić, A.; Grdović, N.; Mujić, I.; Mihailović, M.; Živković, J.; Poznanović, G.; Vidaković, M. (2011). Antioxidative effects of phenolic extracts from chestnut leaves, catkins and spiny burs in streptozotocin-treated rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Food Chemistry*, Vol. 125, pp. 841-849.

Narayana, K. R.; Reddy, M. S.; Chaluvadi, M. R.; Krishna, D. R. (2001). Biofavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, Vol. 33, pp. 2-16.

Neves, M. J.; Matos, C. M.; Moutinho, C. G.; Gomes, L. R.; Teixeira, T. (2009a). Actividade antioxidante e avaliação *in vitro* da citotoxicidade de extractos aquosos de folhas de *Mentha x piperita*. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, nº 6, pp. 344-354.



- Neves, J. M.; Matos, C.; Moutinho, C.; Queiroz, G.; Gomes, L. R. (2009b). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (Northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 124, pp. 270-283.
- Olennikov, D. N.; Tankhaeva, L. M. (2007). Lamiaceae carbohydrates. I. pectinic substances and hemicelluloses from *Mentha x piperita*. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 43, nº 5, pp. 501-507.
- Olennikov, D. N.; Tankhaeva, L. M. (2010). Quantitative determination of phenolic compounds in *Mentha piperita* leaves. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 46, nº 1, pp. 22-27.
- Patthamakanokporn, O.; Puwastien, P.; Nitithamyong, A.; Sirichakwal, P. P. (2008). Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 21, pp. 241-248.
- Pereira, A. L. F.; Vidal, T. F.; Constant, P. B. L. (2009). Antioxidantes alimentares: Importância química e biológica. *Journal Brazilian Society Food Nutrition*, Vol. 34, nº 3, pp. 231-247.
- Phapale, R.; Misra-Thakur, S. (2010). Antioxidant activity and antimutagenic effect of phenolic compounds in *Feronia limonia* (L) swingle fruit. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 2, nº 4, pp. 68-73.
- Pimenta, L. P. S.; Pinto, G. B.; Takahashi, J. A.; Silva, L. G. F.; Boaventura, M. A. D. (2003). Biological screening of annonaceous brazilian medicinal plant using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine*, Vol. 10, pp. 209-212.
- Pinto, J. F. (2010). *Nutracêuticos e alimentos funcionais*. Lisboa. LIDEL.
- Pliszka, B.; Ważbińska, J.; Huszcza-Ciolkowska, G. (2009). Polyphenolic compounds and bioelements in fruits of eastern teaberry (*Gaultheria Procumbens* L.) harvested in different fruit maturity phases. *Journal of Elementology*, Vol. 14, nº 2, pp. 341-348.
- Polydoro, M.; Souza, K. C. B.; Andrades, M. E.; Silva, E. G.; Bonatto, F.; Heydrich, J.; Dal-Pizzol, F.; Schapoval, E. E. S.; Bassani, V. L.; Moreira, J. C. F. (2004) Antioxidant,



a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sciences*, Vol. 74, pp. 2815-2826.

Proença da Cunha, A.; Teixeira F.; Pereira da Silva, A.; Rodrigues Roque, O. (2007). *Plantas na terapêutica farmacológica e ensaios clínicos*. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian.

Proença da Cunha, A.; Pereira da Silva, A.; Rodrigues Roque, O. (2009). *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia*. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian.

Ramalho, V. C.; Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, Vol. 29, nº 4, pp. 755-760.

Rice-Evans; C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 20, nº 7, pp. 933-956.

Ribeiro, B.; Rangel, J.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Pereira, J. A.; Bölke, H.; Seabra, R. M. (2007). Organic acids in two Portuguese chestnut (*Castanea sativa* Miller) varieties. *Food Chemistry*, Vol. 100, pp. 504-508.

Ribeiro Nunes, J. (1999) *Medicina Popular. Tratamento pelas plantas medicinais*. Lisboa. Litexa Editora.

Romero-Jiménez, M.; Campos-Sánchez, J.; Analla, M.; Muñoz-Serrano, A.; Alonso-Moraga, A. (2005). Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutation Research*, Vol. 585, pp. 147-155.

Saad, B.; Sing, Y. Y.; Nawi, M. A.; Hashim, N.; Ali, A. S. M.; Saleh, M. I.; Sulaiman, S. F.; Talib, K. M.; Ahmad, K. (2007). Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. *Food Chemistry*, Vol. 105, pp. 389-394.

Salcedo, C. L.; López de Mishima, B. A.; Nazareno, M. A. (2010). Walnuts and almonds as model systems of foods constituted by oxidisable, pro-oxidant and antioxidant factors. *Food Research International*, Vol. 43, pp. 1187-1197.

Salgueiro, J. (2010). *Ervas, Usos e saberes. Plantas medicinais no Alentejo e outros produtos naturais*. Coimbra. Edições Colibri.



- Samarth, R. M.; Panwar, M.; Kumar, M.; Soni, A.; Kumar, M.; Kumar, A. (2008). Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extracts. *Food Chemistry*, Vol. 106, pp. 868-873.
- Saura-Calixto, F.; Serrano, J.; Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, Vol. 101, pp. 492-501.
- Silva, M. M.; Santos, M. R.; Carço, G.; Rocha, R.; Justino, G.; Mira, L. (2002). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: A re-examination. *Free Radical Research*, Vol. 36, nº 11, pp. 1219-1227.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology Viticulture*, Vol. 16, pp. 144-158.
- Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr, G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. M. B.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, Vol. 30, nº 2, pp. 351-355.
- Tawaha, K.; Alali, F. Q.; Gharaibeh, M.; Mohammad, M.; El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, Vol. 104, pp. 1372-1378.
- Valentão, P. (2002). Limonete, Hipericão-do-Gerês, Cardo-do-Coalho, Fel-da-Terra: Metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica. Estudos de acção acção antioxidante e hepatoprotectora. Tese de Doutoramento. Porto, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Vasconcelos, M. C. B. M.; Bennett, R. N.; Quideau, S.; Jacquet, R.; Rosa, E. A. S.; Ferreira-Cardoso, J. V. (2010). Evaluating the potencial of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruit pericarps and integument as a source of tocopherols, pigments and polyphenols. *Industrial Crops and Products*, Vol. 31, pp. 301-311.
- Vázquez, G.; Fontenla, E.; Santos, J.; Freire, M. S.; González-Álvarez, J.; Antorrena, G. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell



and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, Vol. 28, pp. 279-285.

Volp, A. C. P.; Renhe, I. R. T.; Barra, K.; Stringueta, P. C. (2008). Flavonoids anthocyanins: characteristics and properties in nutrition and health. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, Vol. 23, nº 2, pp. 141-149.

Wei, A; Shibamoto, T. (2007). Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 55, pp. 1737-1742.

Wojdylo, A.; Oszmiański, J.; Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, Vol. 105, pp. 940-949.

Zheng, W.; Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Vol. 49, nº 11, pp. 5165-5170.

Yang, J.; Liu, B.; Liang, G.; Ning, Z. (2009). Structure-activity relationship of flavonoids active against lard oil oxidation based on quantum chemical analysis. *Journal Molecules*, Vol. 14, pp. 46-52.

Živković, J.; Mujić, I.; Zeković, Z.; Vidovic, S.; Mujić, A.; Jokić, S. (2009). Radical scavenging antimicrobial activity and phenolic content of *Castanea sativa* extracts. *Journal Central European Agriculture*, Vol. 10, nº 2, pp. 175-182.