

RESUMO

A sustentabilidade é um conceito complexo que se pode resumir na noção de desenvolvimento económico e social, sem provocar grandes danos ao ambiente e aos recursos naturais. As plantas bravias frequentemente utilizadas nas indústrias alimentar e farmacêutica compõem uma lista consideravelmente extensa da flora nacional. No entanto, muitas dessas plantas não têm sido reconhecidas pelo seu verdadeiro mérito a nível de utilidade nutricional e/ou terapêutico.

A *Crataegus monogyna* Jacq. é uma árvore fruteira silvestre e cujos frutos edíveis são fontes naturais de compostos fitoquímicos que apresentam efeitos terapêuticos na prevenção de muitas doenças crónicas não-transmissíveis. Os compostos fenólicos são substâncias produzidas pelo metabolismo secundário das plantas e caracterizam-se por apresentarem um anel aromático que contém pelo menos um grupo hidroxilo. Estes compostos apresentam uma elevada capacidade de ligarem-se aos radicais livres, sendo por isso, caracterizados como antioxidantes. A extração dos compostos fitoquímicos é uma das etapas mais críticas dado que a sua eficiência depende de múltiplos parâmetros, nomeadamente, o tipo de amostra, propriedades químicas dos analitos em estudo, tipo de solvente extrator, entre outros.

Este estudo teve como principal objetivo avaliar a capacidade extratora dos compostos fitoquímicos (fenólicos e flavonóides) recorrendo a diferentes solventes e avaliar a atividade antioxidante dos mesmos. A quantificação dos compostos fitoquímicos e as atividades antioxidantes apresentaram valores médios significativamente diferentes ($p < 0,05$) mediante natureza do solvente extrator.

Os resultados obtidos indicam, por meio de uma abordagem fitoquímica *in vitro*, que o fruto do pilriteiro é uma fonte natural rica em metabolitos secundários com propriedades terapêuticas reconhecidas e que o seu uso, na indústria farmacêutica, poderá ser potenciado.

Palavras-chave: *Crataegus monogyna* Jacq., Fenólicos, Flavonóides, Atividade antioxidante, Condições de extração.

ABSTRACT

Sustainability is complex concept that can be explain as the economic and social development without causing damages to the environment and the natural resources. Wild plants commonly used in the food and pharmaceutical industries make up a fairly lengthy list of the national flora. However, many of these plants have not been recognized for their true merit to the possible utility level of their nutritional and / or therapeutic effects.

Crataegus monogyna Jacq. is a wild fruit tree whose fruits are edible and a natural source of phytochemical compounds that present therapeutic effects in the prevention of many chronic non-transmissible diseases. The phenolic compounds are secondary metabolites synthesized by plants, presenting an aromatic ring with at least one hydroxyl group in their chemical structure. These compounds have a high capacity to bind to free radicals and are, therefore, characterized as antioxidants.

The phytochemical extraction is one of the most critical steps since the efficiency depends on multiple parameters, including, sample type, chemical properties of the analytic constituent, type of organic solvent, among others.

This study pretended to evaluate the extraction capacity of phytochemicals (phenolics and flavonoids) by using different solvents and, also, evaluates the antioxidant activity. The quantification of the phenolics and flavonoids compounds and antioxidant activity showed mean values significantly different ($p < 0.05$) considering the nature of the organic solvent.

The results indicates, by means of a phytochemical *in vitro* approach, that the fruit of “pilriteiro” is a good natural source of secondary metabolites with known therapeutic properties and their use in the pharmaceutical industry may be enhanced.

Keywords: *Crataegus monogyna* Jacq., Phenolics, Flavonoids, Antioxidant activity, Extraction conditions.

AGRADECIMENTOS

No final deste trabalho não posso deixar de expressar o meu sincero agradecimento às pessoas, que direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desta tese. Assim, as minhas palavras de gratidão vão para:

A minha orientadora, Professora Doutora Ana Cristina Vinha, pela sua dedicação, total disponibilidade e simpatia com que sempre respondeu às minhas solicitações e me recebeu, pelas suas sugestões sempre pertinentes, pelos ensinamentos e pelo incondicional apoio durante a execução desta investigação.

A minha família, especialmente à minha mãe, ao meu pai, às minhas irmãs e amigos, em particular ao Carlos e Ana pelo apoio e ajuda.

A minha amiga e companheira Paula Mendes pelo incentivo, apoio e principalmente por ter acreditado SEMPRE na finalização deste objetivo com sucesso.

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras	VI
Índice de Tabelas.....	VII
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Género <i>Crataegus</i>	3
2.1.1. <i>Crataegus monogyna</i> Jacq.....	5
2.1.2. Distribuição geográfica.....	6
2.1.3. Principais usos da <i>Crataegus monogyna</i> Jacq.....	8
2.2. Fitoquímicos.....	10
2.3. Propriedades antioxidantes do fruto do <i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	11
2.4. Métodos de avaliação da atividade antioxidante.....	13
2.4.1. Técnicas eletroquímicas	14
2.4.2. Técnicas espectrofotométricas.....	15
2.4.2.1. Método do radical DPPH [•]	15
2.4.2.2. Método do radical livre ABTS ^{•+}	16
2.4.2.3. Método de redução do íão ferro (FRAP)	17
2.4.3. Métodos cromatográficos	17
III. OBJETIVOS.....	19
IV. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Amostras.....	20
4.2. Extração de compostos bioativos.....	20
4.2.1. Preparação dos extratos da baga.....	21
4.3. Determinação de compostos bioativos.....	21
4.3.1. Compostos fenólicos totais	22
4.3.2. Flavonoides totais.....	22
4.4. Atividade antioxidante	23
4.4.1. Método DPPH [•]	24
4.4.2. Método FRAP.....	24
4.5. Análise estatística.....	24
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
VI. CONCLUSÃO.....	39

VII. BIBLIOGRAFIA 40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espécie <i>Crataegus</i>	4
Figura 2. Flor branca característica da espécie <i>Crataegus</i>	5
Figura 3. Fruto da espécie <i>Crataegus</i>	6
Figura 4. Principais áreas de distribuição da <i>Crataegus</i> a nível mundial.....	7
Figura 5. Principais áreas de distribuição da <i>Crataegus monogyna</i> no território nacional.....	8
Figura 6. Morfologia da baga de pilriteiro no momento da colheita.	20
Figura 7. Curva de calibração de ácido gálico, utilizada para determinar os compostos fenólicos totais dos extratos.....	22
Figura 8. Curva de calibração de epicatequina, utilizada para determinar os flavonoides totais dos extratos.	23
Figura 9. Teores de fenólicos totais do fruto do pilriteiro extraídos por diferentes solventes.	28
Figura 10. Teores de flavonoides do fruto do pilriteiro extraídos por diferentes solventes.	28
Figura 11. Resultados da atividade antioxidante pelo método DPPH*.....	33
Figura 12. Resultados da atividade antioxidante pelo método FRAP	33
Figura 13. Relação estatística entre métodos antioxidantes e os compostos bioativos. .	36

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação dos compostos antioxidantes recorrendo a diferentes solventes extratores.	27
Tabela 2. Quantificação dos compostos antioxidantes existentes nas quatro amostras segundos o método DPPH [*] e FRAP.	32

As plantas medicinais, bem como os seus frutos são fontes naturais reconhecidas pela sua riqueza em compostos bioativos com elevado valor terapêutico e nutricional.

No setor farmacêutico, as drogas vegetais são utilizadas como um recurso terapêutico nos serviços de saúde, no entanto, para que as mesmas possam ser utilizadas, os compostos vegetais deverão estar devidamente padronizados, isto é, com uma caracterização qualitativa e quantitativa dos seus princípios ativos devidamente fundamentadas e garantindo os requisitos necessários no que se refere ao controlo de qualidade, efetividade e segurança exigidos para a preparação farmacêutica moderna (Bandaranayake, 2006).

Os estudos científicos fundamentados sobre os compostos fitoquímicos e as atividades etnofarmacológicas das diferentes espécies vegetais nacionais e internacionais estão em desenvolvimento (Vinha *et al.*, 2012a, 2012b; Vinha *et al.*, 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece o rápido crescimento da utilização da medicina tradicional, incluindo-se a utilização de fitoterápicos e o aumento da sua utilização pela população (OMS, 2005). A facilidade de acesso aos fitoterápicos é uma das principais razões que justificam a sua ampla utilização nos países em desenvolvimento e nesse sentido a OMS tem trabalhado para desenvolver e implantar normas, pautas e metodologias que permitam garantir a eficácia, segurança e qualidade dos mesmos.

Considerando a qualidade como um fator decisivo para a aceitação e permanência desses produtos no mercado, as etapas que interferem em suas propriedades finais devem ser rigorosamente controladas e padronizadas. Durante a produção de extratos a partir de matéria-prima vegetal, pode-se considerar a padronização como uma condição em que a eficácia do produto é garantida através da constância no teor de princípios ativos (Souza, 2007). Todavia, muitas substâncias de origem natural podem sofrer transformações durante o processamento e armazenagem, ocasionando perdas e/ou inativação dos compostos ativos (Blatt *et al.*, 2002).

Assim, o estudo dos extratos obtidos pelo uso de diferentes solventes é uma alternativa promissora, em crescente expansão uma vez que, atualmente, já existe uma tendência por parte da indústria farmacêutica na substituição de solventes orgânicos por solventes não tóxicos nos processos extrativos. De entre as razões a favor dessa tendência, podem-se destacar a maior recuperação e o aumento da concentração dos compostos fitoquímicos, estabilidade e facilidade de padronização dos princípios ativos presentes nas plantas, menores riscos de contaminação microbiana, vantagens que aumentam o valor agregado do produto final, com a conseqüente minimização de custos econômicos (Oliveira e Petrovick, 2010).

O objetivo desse trabalho foi investigar a influência que os processos de extração interferem na quantificação dos compostos bioativos, recorrendo-se a diferentes solventes extratores, através da quantificação de fenólicos e de flavonóides totais presentes nas bagas do pilriteiro (*Crataegus monogyna* Jacq.). A extração das substâncias bioativas presentes nos frutos foi realizada por maceração dos mesmos, mantendo-se constantes as variáveis tempo e temperatura de extração. Foram efetuados ensaios de atividade antioxidante para avaliar a possível atividade biológica dos extratos diferentes extratos.

2.1. Género *Crataegus*

O género *Crataegus* designa um conjunto de arbustos ou árvores espinhosas de dimensões relativamente pequenas, normalmente utilizadas como sebes defensivas e de folhagem densa. Habitualmente, este género é utilizado como ornamento de parques e vias públicas. Embora possam alcançar este género possa alcançar os 12 metros, de uma forma geral, a maioria desenvolve pouca altitude (4 a 5 metros), sendo por essa razão caracterizadas como árvores rasteiras (Jalali e Hasanzadeh, 2013).

O género *Crataegus* pertencente à classe *Magnoliopsida*, ordem *Rosales* e família das *Rosaceae* (www.jb.utad.pt). A sua denominação deriva da palavra grega “*kratiegus*”, que significa “dureza da madeira”. Este género possui cerca de 280 espécies diferentes, sendo que as mais comuns são *Crataegus monogyna* e a *Crataegus oxycantha* (Jalali e Hasanzadeh, 2013; Liu *et al.*, 2010). No entanto, análises moleculares filogenéticas demonstram que a sua classificação pode ser controversa, uma vez que a sua classificação pode ser feita de forma incorreta, como pertencentes à sub-família *Pyrinae* (Bahorun *et al.*, 2008; Bernatoniene *et al.*, 2008; Edwards *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012; Reffat *et al.*, 2010; Özcan *et al.*, 2005). Estudos químicos, utilizados para inferir as relações filogenéticas entre estas espécies e as possíveis relações sugeridas pela sequência do ADN foram desenvolvidos nos últimos anos de forma a associarem-se uma relação quase que exclusiva entre a etnobotânica e os usos terapêuticos da planta na Ásia e na Europa, permitindo assim, ajustar e fundamentar a sua documentação (Edwards *et al.*, 2012; Özcan *et al.*, 2005).



Figura 1. Espécie *Crataegus* (retirado de Pickering, 2004).

As denominações sinónimas variam consoante as línguas europeias onde são utilizadas e derivam, quase inteiramente, do facto de possuírem espinhos e de serem utilizadas como sebes divisórias, uma vez que a palavra “*haw*” provém da antiga palavra inglesa “cerca” (Arya e Thakur, 2012). Na língua alemã, “*hadegon*” significa “cerca de espinhos”, o nome “*may*” está associado aos meses em que a planta fica em flor. Em Inglaterra, a denominação “*espinheiro branco*” é uma alusão à brancura da sua casca e o nome “*quickset*” relaciona-se com a rapidez com que esta se desenvolve. A sua utilização secular era usada, por exemplo, para saciar a fome dos agricultores antes do pequeno-almoço, através do consumo das folhas e flores do *Crataegus* e denominando-as por “*bread and butter tree*” ou “*cheese tree*” (Bahorun *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2012).

Atualmente não existe uma unanimidade na designação popular da maioria das plantas, quer entre as diferentes regiões de Portugal, quer, nalguns casos, dentro da mesma região. Muitas vezes encontram-se plantas diferentes com o mesmo nome popular. Assim, é imprescindível identificar cientificamente as plantas que são referidas como úteis pelos informantes. No caso concreto da espécie *Crataegus monogyna*, comumente é conhecido como pilriteiro, espinheiro, espinheiro-alvar, espinheiro-branco, abronceiro, cambrulheiro, estrapoeiro, estrepeiro, branca-espinha, escalheiro.

2.1.1. *Crataegus monogyna* Jacq.

As plantas bravias frequentemente utilizadas nas indústrias alimentar e farmacêutica compõem uma lista consideravelmente extensa. No entanto, muitas dessas plantas não têm sido reconhecidas pelo seu verdadeiro mérito a nível de utilidade nutricional e/ou terapêutico.

Esta árvore (*Crataegus monogyna* Jacq.), fruteira silvestre, é uma planta bravia que fornece frutos edíveis. Visualmente classifica-se como uma nano ou microfanerófito ramosa, cuja altura pode atingir os 10 metros e de copa arredondada. As folhas apresentam uma forma abovadas a romboidais com lobos oblongos agudos ou sub-obtusos.

As flores das plantas do género *Crataegus* são maioritariamente brancas, constituídas por 5 sépalas e 5 pétalas, e apresentam um aroma intenso (figura 2).



Figura 2. Flor branca característica da espécie *Crataegus* (retirado de Pickering, 2004).

As tonalidades das folhas podem variar entre o amarelo e o verde-escuro, o que se propaga também às suas densas flores que podem percorrer uma gama de cores, desde o branco (predominante), ao rosa e ao vermelho, agrupando-se em grupos de 5 a 12 flores. Estas florescem na primavera, dando um verdadeiro espetáculo de cor, originando pequenos frutos vermelhos, na altura do verão (Bernatoniene *et al.*, 2008; Edwards *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012; Reffat *et al.*, 2010; Özcan *et al.*, 2005).

Os frutos, pirenários, ou seja, uma espécie de pomos mais miúdos e mais rijos denominados pilritos, possuem pequenas dimensões e são arredondados. Quando maduros tem uma coloração vermelha brilhante (figura 3).



Figura 3. Fruto da espécie *Crataegus* (retirado de www.florestar.net).

A melhor época para a colheita dos frutos maduros é feita em Setembro. Os frutos maduros ou sobre-maduros podem ser utilizados para o fabrico de licores e compotas domésticas, mas sabe-se que estes frutos apresentam actividades terapêuticas.

Esta planta além de ser utilizada na horticultura como ornamento é considerada uma das plantas mais antigas para uso farmacológico, concretamente, utilizando-se as flores e os frutos. Na Europa, as preparações medicinais são feitas a partir da *C. monogyna* Jacq. e da *C. laevigata* (Bahorun *et al.*, 2008; Bernatoniene *et al.*, 2008; Ozyurek *et al.*, 2012).

2.1.2. Distribuição geográfica

O género *Crataegus* é nativo das zonas temperadas do globo, principalmente em países situados entre as latitudes 30° e 50°N – como os da região Oriental da Ásia, Europa, América do Norte e China. Tal como já foi referido anteriormente, esta planta foi inicialmente utilizada para formar cercas ou vedações em toda a Europa (Bahorun *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2012). Em 1800, os ingleses introduziram-na na Tasmânia e noutras partes da Austrália como planta para sebes e, atualmente, esta planta pode ser encontrada em diferentes zonas, citando como exemplos, Vitoria, Montes Adelaide e na Nova Escócia (Kumar *et al.*, 2012; Reffat *et al.*, 2010).

Por serem colonizadoras agressivas, ou seja, tenazes e difíceis de remover, foram consideradas pela Austrália como uma planta nociva para a flora endémica. Além do mais, apesar da sua preferência por zonas temperadas, é também vista nos Himalaias, em Kashmir e em Himachal, sob condições agrestes e a uma altitude entre os 1800 e os 3000 metros (Kumar *et al.*, 2012; Reffat *et al.*, 2010).

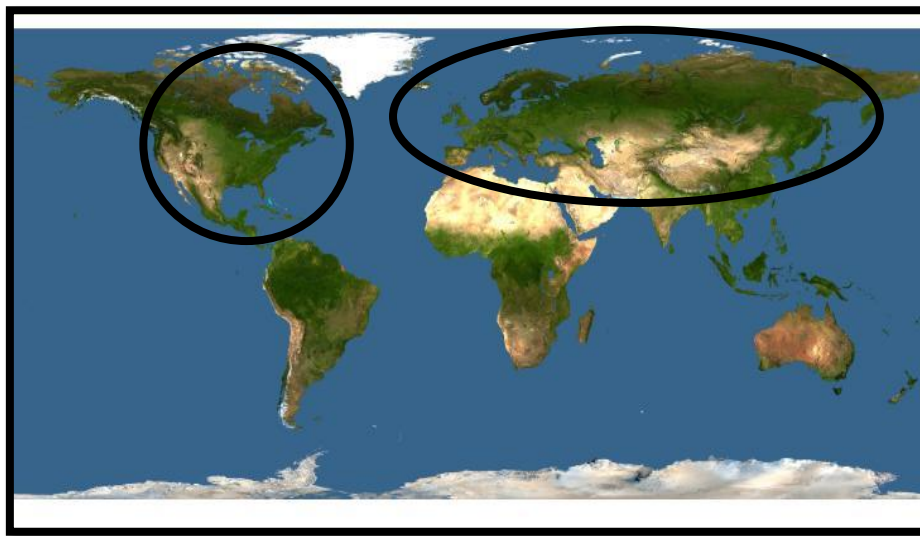


Figura 4. Principais áreas de distribuição do género *Crataegus monogyna* a nível mundial (adaptado de Pickering, 2004).

Em Portugal, o *C. monogyna* Jacq. caracteriza-se como um arbusto espontâneo comum em diversos tipos de solo, preferindo solos soltos e frescos, ocupando todo o território português. Normalmente reside em locais com baixa altitude, mas suporta temperaturas até -18°C . Relativamente à exposição solar, prefere ambientes luminosos, embora cresça em qualquer situação. Necessita de humidade no solo. Dá-se bem em climas quentes e resiste bem às geadas. Suporta poluição atmosférica. É uma importante fonte de alimento para larvas de muitas espécies de lepidópteros. No entanto, como se trata de uma espécie indiferente, ou seja, pouco exigente face às condições do solo e do clima, vegeta desde o nível do mar até os 1800 metros de altitude, pelo que pode ser encontrada um pouco por todo o território nacional, com menor representatividade na região sudeste.



Figura 5. Principais áreas de distribuição da *Crataegus monogyna* no território nacional (retirado de ICNF, 2013).

2.1.3. Principais usos da *Crataegus monogyna* Jacq.

O conhecimento das plantas é fundamental para a compreensão da vida na terra e da sua evolução. As plantas são essenciais para a nossa existência e são a base de todas as interações das comunidades terrestres. Por outro lado, as plantas são economicamente importantes porque os seus produtos, transformados ou não, são de utilização diária pelo homem.

Os usos tradicionais das espécies arbóreas e arbustivas com interesse florestal são um dos aspetos relevantes do atual interesse e estudo por parte da comunidade científica.

Apesar desta falta de concordância, a medicina com recurso a plantas é uma forma de tratamento ancestral sendo a *Crataegus* uma das espécies mais populares e é, atualmente, usada empiricamente na medicina tradicional por possuir constituintes fitoquímicos que atuam como terapêuticos num abrangente número de patologias (Edwards *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012).

Entre as subespécies mais utilizadas inclui-se a *C. pinnatifida* (espinheiro chinês), a *C. pubescens* (espinheiro mexicano), *C. cuneata* (espinheiro japonês), *C. laevigata* e *C. monogyna* (Europa), *C. oxycantha* e *C. aronica*, *C. phaenopyrum* (espinheiro americano) e a *C. ambigua* (espinheiro russo) (Kumar *et al.*, 2012).

Historicamente, as bagas são a parte da planta mais utilizada mas, recentemente, surgiu um crescente interesse pelas folhas e flores, uma vez que contêm constituintes semelhantes aos já descritos nas bagas, verificando-se apenas diferenças pouco significativas no rácio entre os diferentes compostos, nomeadamente, flavonoides e proantocianidinas presentes em cada uma das partes (Edwards *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012; Shortle *et al.*, 2013). Com base na literatura, as folhas, flores e bagas contêm uma variedade de complexos bioflavonoides (0.1% a 2%) e proantocianidinas oligoméricas (compostos por cadeias de unidades de 1% a 3% de flavan-3-ol), importantes antioxidantes, além de outros constituintes como o ácido ascórbico, taninos, cardiotónicos, e ácidos fenólicos (Kumar *et al.*, 2012). Estes compostos em conjunto com as enzimas endógenas antioxidantes presentes no metabolismo, neutralizam os radicais livres formados a partir do processo fisiológico natural, como respiração e fagocitose (Nascimento *et al.*, 2009; Shortle *et al.*, 2013).

Pelos motivos supracitados, a *Crataegus* alcançou um patamar especial como “veículo” terapêutico já que os resultados experimentais de vários estudos farmacológicos e toxicológicos mostraram um amplo espectro de ação dos seus efeitos positivos, nomeadamente na prevenção das doenças cardiovasculares (Edwards *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012). Revisões bibliográficas sobre o estado da arte da *Crataegus* confirmam os efeitos positivos na prevenção das falhas cardíacas crónicas e na redução da pressão interna cardíaca (Edwards *et al.*, 2012). A sua característica mais importante deve-se ao aumento da ativação das células do músculo cardíaco, providenciando um suplemento que aumenta a força do músculo coronário, regulando o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, a dilatação coronária, tornando-se assim um agente preventivo para as arritmias, enfarte do miocárdio e falha congestiva cardíaca (Kóctic *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012; Özyürek *et al.*, 2012).

No entanto, a sua utilização não se limita às patologias cardíacas, como primeiramente se estabeleceu. O aproveitamento das várias partes vegetais do *Crataegus* na medicina tradicional Árabe, é uma prática milenar no tratamento de patologias como a asma, dores estomacais e reumáticas e no tratamento das hemorroides (Bahorun *et al.*, 2008; Bernatoniene *et al.*, 2008; Özcan *et al.*, 2005; Özyürek *et al.*, 2012). O sumo da fruta

(bagas), verdes ou amadurecidas, é utilizado em preparações para a aplicação tópica no alívio de problemas musculares ou articulares (Özcan *et al.*, 2005).

Resumidamente, as suas capacidades como terapêutico abrangem a eliminação de triglicéridos e LDL (proteínas de baixa densidade) no plasma, ação anti-inflamatória, protetor gástrico e agente antimicrobiano. Atua como hipotensivo e diurético, ajuda na prevenção de formação de cataratas, tem atividade antiviral, é um estimulante imunitário, um antidepressivo e possui atividade citotóxica e hipoglicémica (Kóatic *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012).

Além da fitoterapia, recorre-se ainda à *Crataegus* na indústria alimentar para a produção de doces, de compotas e de algumas bebidas como vinhos, sumos e chás (por ex., a *C. pinnatifida*) (Keser *et al.*, 2012; Kóatic *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012). Incluem-se os que são produzidos a partir da espécie *Crataegus*, fortemente disponível por toda a Europa e Ásia, em tinturas, comprimidos, xaropes, chás e extratos aquosos das folhas, flores e bagas (Edwards *et al.*, 2012), embora estejam a desenvolver-se aplicações tópicas na derme (Kumar *et al.*, 2012).

2.2. Fitoquímicos

O desenvolvimento científico tem levado a uma relação cada vez mais estreita entre dieta e saúde. Tal relação surgiu com a descoberta de um grupo de substâncias com efeitos protetores contra a oxidação celular (Dauqan *et al.*, 2011; El Diwani *et al.*, 2009). As reações de oxidação estão envolvidas no processo de envelhecimento e na progressão de várias doenças. À luz do conhecimento atual, os antioxidantes podem retardar o processo de envelhecimento, a progressão da doença e prolongar o tempo de vida.

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou inibir substancialmente a oxidação do

substrato. São considerados metabolitos secundários e desempenham um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente, nomeadamente na defesa a temperaturas elevadas, falta de água, radiação intensa, exposição aos raios ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais. Constituem ainda uma defesa contra herbívoros, ataque por pestes, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos simbiotes.

Os mecanismos de defesa antioxidante nos diferentes tecidos podem ser classificados em função do seu mecanismo de ação predominante, da sua localização e da sua proveniência, seja da dieta (antioxidantes exógenos) ou da síntese endógena (antioxidantes endógenos) (Ferreira *et al.*, 2007).

Estes compostos, que se encontram naturalmente nas plantas, atuam como antioxidantes no organismo, por meio do sequestro de radicais livres, que estão relacionados com a maioria das doenças crónicas não-transmissíveis (Hamid *et al.*, 2010). As características químicas dos antioxidantes, tais como a solubilidade, capacidade de regeneração, relação estrutura/atividade e a biodisponibilidade são fatores importantes quando se considera o seu papel na saúde humana (Kaur e Kapoor, 2002). Efetivamente, as plantas são uma fonte natural de compostos bioativos eficazes, incluindo antioxidantes, como polifenóis, vitaminas, carotenóides, ácidos gordos insaturados e açúcares redutores.

2.3. Propriedades antioxidantes do fruto do *Crataegus monogyna* Jacq.

Pelo já referido anteriormente, é também suposta uma ação antioxidante destes frutos. Nos países onde são produzidos ou estão no estado selvagem, estes frutos, bem como outro tipo de extratos vegetais, são usados na medicina popular na prevenção e tratamento de vários distúrbios devidos a xenobióticos ou até questões ambientais.

De acordo com Bajorun *et al.* (1994) e Bernatoniene *et al.* (2008), os extratos etanólicos, aquosos, hidroalcoólicos e metanólicos apresentaram teores consideráveis de fenóis totais, flavonóis e proantocianidinas, tendo sido superior para os extratos

metanólicos. Foi igualmente descrita por estes mesmos autores a presença de cumarinas e triterpenóides.

Assim, os antioxidantes são um conjunto heterogéneo de substâncias formados por vitaminas, minerais, pigmentos naturais, compostos vegetais e ainda enzimas que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres no corpo. O termo antioxidante significa que estes “impedem a oxidação” que ocorre ou durante as reações metabólicas ou por fatores exógenos, como as radicações ionizantes. Estes são obtidos através dos alimentos, sendo amplamente encontrados em vegetais, o que explica parte das ações saudáveis que as frutas, legumes, hortaliças e cereais integrais exercem sobre o organismo (Messias, 2009). Das centenas de compostos propostos como inibidores da deterioração oxidativa das substâncias oxidáveis, somente alguns podem ser usados para consumo humano. Nesta seleção são desejáveis as seguintes propriedades: que tenham eficácia em baixas concentrações (0.001% e 0.01), ausência de efeitos indesejáveis na cor e no sabor, compatibilidade com o alimento e fácil aplicação, estabilidade nas condições de processo e armazenamento. Quando se referem aos suplementos farmacológicos, os compostos e os seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos, mesmo quando em doses muito superiores às que normalmente seriam ingeridas através dos alimentos (Messias, 2009).

O uso de antioxidantes exógenos tem vindo a ganhar muito interesse, sendo que os estudos confirmam o potencial das diferentes partes que constituem a *Crataegus* como planta antioxidante (Özcan *et al.*, 2005). A identificação e os estudos farmacológicos e toxicológicos extensivos sobre a ações dos extratos da *Crataegus* demonstram que compostos fenólicos como os flavonóides ou as procianidinas oligoméricas têm efeitos benéficos na captação e eliminação dos radicais livres (Kóatic *et al.*, 2012) mas, embora as diferentes partes da planta apresentem uma composição fitoquímica similar, a razão específica entre os dois compostos difere: os flavonoides parecem ter um papel determinante no que respeita à atividade antioxidante das folhas e as procianidinas oligoméricas a nível das flores e bagas (Özcan *et al.*, 2005; Özyürek *et al.*, 2012; Tadic *et al.*, 2008).

As revisões sobre o estado da arte da *Crataegus* concluem ainda que o potencial antioxidante desta varia dentro da própria espécie e da parte da planta estudada, sendo que também depende de variáveis como a genética, o ambiente circundante e a altura do ano em que é colhida, o que torna a generalização do seu conteúdo difícil, se não impossível, devido à variabilidade dos resultados obtidos pelos autores (Edwards *et al.*, 2012). Outros estudos debruçam-se ainda sobre a concentração de cada um destes antioxidantes em diferentes estágios do desenvolvimento das diferentes plantas: na *C. azarolus*, a quantidade de flavonoides e proantocianidinas diminui consoante o avançar do envelhecimento da flor (Edwards *et al.*, 2012). O mesmo padrão foi estudado nas bagas do pilriteiro e as concentrações diminuíram na progressão do amadurecimento do fruto. Nas folhas, por outro lado, a concentração mais elevada dos dois compostos foi obtida nas folhas mais velhas, quando a flor ainda se encontra em bolbo enquanto a menor em folhas onde a fruta está já madura. Os resultados são consistentes com os de Liu *et al.* (*cit in* Edwards *et al.*, 2012), que alcançaram concentrações mais altas da *C. pinnatifida* var. *major* quando esta entrava em flor e menor quando os frutos estavam já amadurecidos (Edwards *et al.*, 2012).

2.4. Métodos de avaliação da atividade antioxidante

A hipótese de que a dieta alimentar pode afetar o dano oxidativo *in vivo* é fundamentada nas características fisiológicas dos alimentos, constituintes que proporcionam tanto substâncias antioxidantes, nutrientes com capacidade para combater os radicais livres, como os substratos oxidáveis (ácidos gordos polinsaturados) e vestígios de metais com ação catalítica (Fe^{2+} e Cu^{2+}). Esta hipótese mostra-se muito simples diante da complexidade do funcionamento do organismo humano. Os diferentes compostos antioxidantes da dieta podem produzir efeitos sinérgicos difíceis de serem avaliados. A atividade antioxidante de um e qualquer alimento poderão sugerir qual a contribuição relativa da soma dos seus constituintes com tais ações. Mediante os dados publicados até à data, os polifenólicos, os carotenóides e a vitamina C (Bahorun *et al.*, 1994; Bernatoniene *et al.*, 2008; Egea *et al.*, 2010; Jalali e Hasanzadeh, 2013) parecem ser os melhores indicadores dessas ações. O desenvolvimento de novos métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante ou quantificação de antioxidantes específicos em matrizes complexas

como os extratos vegetais, frutas e alimentos em geral, pode ser justificado pela relevância comercial e farmacológica destes compostos, bem como pela necessidade de metodologias mais simples e económicas (Palanisamy *et al.*, 2011).

2.4.1. Técnicas eletroquímicas

As técnicas eletroquímicas apresentam um elevado potencial na caracterização detalhada dos antioxidantes presentes nas amostras pois fornecem parâmetros físico-químicos capazes de demonstrar não apenas o potencial de redução destes, mas também o número de eletrões envolvidos, a influência dos prótons e as constantes destas reações. Estudos que se debruçaram sobre a atividade antioxidante de 34 produtos naturais através de diversas técnicas observaram que a correlação entre as técnicas eletroquímicas e a capacidade de captação de radicais era mais proveitosa do que a utilização da eletrólise de fluxo contínuo (contagem de eletrões) associada a voltmetria cíclica (potencial de oxidação) (Borges *et al.*, 2011).

A composição heterogénea dos tecidos vegetais resulta numa grande variedade de possibilidades de interações químicas, fatores que aumentam expressivamente a complexidade deste sistema. O uso de um método eletroquímico acoplado a sistemas de injeção de fluxo foi avaliado para investigar a atividade antioxidante de extratos metabólicos de plantas. O modelo utiliza um sistema de injeção de fluxo acoplado a um detetor amperométrico, equipado com elétrodos de trabalho de carbono vítreo (vs Ag/AgCl), fluxo de 1,0 mL.min e potencial determinado por voltametria hidrodinâmica. Antes, os extratos são centrifugados para extração do sobrenadante, seco em vácuo à temperatura ambiente. Os resíduos são então preparados e injetados no sistema, e os resultados expressos consoante a capacidade antioxidante do mesmo (Borges *et al.*, 2011). Os compostos fenólicos, geralmente, produzem radicais fenoxilo instáveis que rapidamente polimerizam sobre a superfície de elétrodos sólidos, levando a uma apassivação dos mesmos. Assim, a correlação entre a atividade antioxidante e o potencial de oxidação nem sempre é simples e direta, necessitando de ensaios paralelos para uma melhor compreensão dos seus resultados. Os testes eletroquímicos podem observar resultados erróneos uma vez que os catecóis dimerizaram sob oxidação

eletroquímica, produzindo espécies eletroativas que resultam em picos de intensidade acima ou abaixo dos números reais, associados muitas vezes a processos errôneos de adsorção, com apassivação do eletrodo (Borges *et al.*, 2011). Outra limitação é a insensibilidade para compostos que exercem uma ação antioxidante através de outros mecanismos, como por exemplo, quelação, um mecanismo que não envolve o fluxo de elétrons, não sendo detetada pelos métodos eletroquímicos. No entanto, apesar das limitações decorrentes da complexidade das amostras, a aplicação dos métodos eletroquímicos é um campo bastante vasto (Borges *et al.*, 2011).

2.4.2. Técnicas espectrofotométricas

Os métodos espectrofotométricos são relativamente simples, baseando-se na capacidade descolorante da amostra. Os ensaios mais utilizados recebem o nome do reagente cuja absorção será atenuada pelo composto antioxidante, ou seja, ensaios de DPPH• e ABTS, reagentes responsáveis pelo fator que indica a capacidade antioxidante total do produto no que diz respeito a limpar os radicais livres (Bernatoniene *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2011).

2.4.2.1. Método do radical DPPH•

Este método consiste em determinar a capacidade de captura do radical livre DPPH• pelos compostos antioxidantes. O radical livre de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo apresenta um máximo de absorvência a 515 nm. Após a adição do antioxidante ocorre uma diminuição da absorvência, proporcional à concentração e à atividade antioxidante da amostra, perdendo a sua coloração (Bondet *et al.*, 1997; Magalhães *et al.*, 2008).

Uma vantagem deste método é o radical livre ser estável e estar disponível comercialmente, o que evita a sua formação por diferentes formas, como acontece com outros radicais. Por outro lado, o método DPPH• tem sido muito utilizado na análise de mecanismos de reação dos compostos polifenólicos com radicais livres (Saway *et al.*, 2005). Alguns compostos reagem rapidamente com o DPPH•, reduzindo um número de moléculas igual ao número de grupos OH disponíveis, formando as correspondentes *o*-

quinonas (Bondet *et al.*, 1997; Borges *et al.*, 2011). Atualmente é utilizado também na determinação do potencial antioxidante de compostos fenólicos e flavonoides, entre outros, isolados de plantas naturais. Muitos estudos científicos reportam este método como o mais utilizado para a determinação antioxidante em frutos e vegetais. Para além da rapidez da leitura, uma das maiores vantagens é a disponibilidade de obtenção do radical DPPH[•]. O método de DPPH[•] é muito utilizado para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como: compostos fenólicos (Sousa *et al.*, 2007), fenilpropanóides, fenólicos totais, flavonóis (Leja *et al.*, 2007), cumarinas, quitosanas com diferentes massas moleculares antocianinas, antocianidinas (Leja *et al.*, 2007) e carotenóides (Ajila *et al.*, 2007).

2.4.2.2. Método do radical livre ABTS^{•+}

Os efeitos defensivos dos antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionados com três grandes grupos: ácido ascórbico, fenólicos como antioxidantes hidrofílicos e carotenóides como antioxidantes lipofílicos. O outro método utilizado para medir a atividade antioxidante resume-se ao radical livre 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido surfónico) (ABTS^{•+}), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com esta metodologia pode-se medir a atividade dos compostos de natureza hidrofílica.

Na presença de antioxidantes doadores de hidrogénio, pode medir-se a diminuição da formação deste radical por espectrofotometria. Este radical reage de forma enérgica com os compostos doadores de hidrogénio, como os compostos fenólicos, sendo convertido numa forma não colorida de ABTS^{•+}, podendo mostrar a atividade anti-radicalar de flavonoides (Borges *et al.*, 2011). A versão comercial deste teste analítico, conhecido como protocolo TEAC, faz com que o ABTS^{•+} seja formado pela sua reação com o radical ferromioglona e H₂O₂, na presença de peroxidase. Como vantagem tem a sua relativa simplicidade, que permite a sua aplicação na rotina de qualquer laboratório. Na presença de muitos compostos fenólicos em amostras de substâncias com atividade antioxidante, isto ocorre lentamente. O resultado da determinação do TEAC depende do tempo de incubação, assim como da taxa da amostra quantificada. Esta, somada à pouca

seletividade do ABTS^{•+} na reação com átomos doadores de hidrogénio, constitui uma limitação deste método. Divergências nos resultados podem ser atribuídas a fatores limitantes como a diferença no tempo de incubação ou na estratégia de obtenção do radical ABTS^{•+} (Borges *et al.*, 2011).

2.4.2.3. Método de redução do ião ferro (FRAP)

O poder antioxidante redutor apresenta muitas aplicações na avaliação dos componentes antioxidantes polifenólicos. O ensaio FRAP é caracterizado pela redução do complexo férrico ao estado ferroso pela ação de um composto antioxidante, em meio ácido, (pH ~ 3,6), de forma a manter a solubilidade do ferro (Magalhães *et al.*, 2008). O poder redutor do composto antioxidante e portanto, do grau de redução, é medido por espectrofotometria a 593 nm. A redução do complexo férrico causa um aumento da absorvência devido à formação do complexo ferroso de cor azul intensa. Este método, embora rápido, simples e robusto, apresenta algumas limitações como o facto de qualquer composto que possua potencial redox ser capaz de reduzir o complexo férrico, mesmo que não possua atividade antioxidante. No último caso, poderão ser antioxidantes que não atuam a uma velocidade suficientemente rápida para a redução ser observada dentro dos limites de tempo estabelecidos para esta metodologia ou antioxidantes cujo mecanismo não envolve reações redox como tíóis e carotenoides (Magalhães *et al.*, 2008); produção simultânea de Fe (II) pode resultar na produção adicional de um radical nocivo a partir da água e de compostos que absorvam no mesmo comprimento de onda e que possam interferir na determinação, causando medições incorretas no valor FRAP (Subtil *et al.*, 2009).

2.4.3. Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos são um grupo de técnicas de separação de misturas, em que o mesmo instrumento faz a separação, identificação e quantificação. O tempo de retenção permite a separação das várias substâncias que compõem a amostra: analitos e interferentes.

A análise de vários produtos naturais utilizando a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) foi considerada um progresso na metodologia analítica. A maior dificuldade é a determinação de compostos fenólicos condensados e oligomerizados. O HPLC também pode ser bastante útil no tratamento com calor de compostos ativos e suas respectivas quantificações de acordo com a temperatura ou o tempo de exposição à energia térmica (Borges *et al.*, 2011).

A cromatografia gás-líquido capilar (CGLC) e CGLC/espectrometria de massa (MS), por outro lado, requer a conversão dos açúcares e dos seus ácidos nos seus derivados mas deve ser utilizada apenas em material onde se conhece a origem. Outros estudos medem os açúcares e ácidos orgânicos por HPLC, aminoácidos com um *kit* de derivação, seguido de uma fase reversa de HPLC ou métodos colométricos para a determinação de açúcares solúveis presentes (Edwards *et al.*, 2012).

Estes métodos determinam também a quantidade de polifenóis presentes, métodos para a determinação dos flavonoides, CGLC, eletroforese capilar ou cromatografia de camada fina. Métodos não validados e validados para a análise por HPLC dos constituintes fenólicos nas plantas encontram-se disponíveis na literatura, mas a discussão prende-se principalmente com a capacidade analítica da quantificação total dos flavonoides.

III. OBJETIVOS

Com o intuito de valorizar um fruto autóctone (fruto do pilriteiro) e de pouca aplicação farmacêutica, o objetivo primordial deste trabalho consistiu em otimizar métodos sustentáveis de extração para obtenção de extratos com elevado teor de compostos bioativos e/ou atividade antioxidante, com viabilidade de utilização futura na indústria alimentar (aplicação em suplementos alimentares/alimentos funcionais) e na indústria farmacêutica (por ex. suplementos, cosmética, entre outros).

Para isso, selecionaram-se três solventes, dois dos quais de baixa toxicidade e de custo reduzido (água e etanol) e o metanol foi utilizado para comparar a capacidade extratora dos outros dois supracitados, uma vez que este último é frequentemente utilizado para a extração de metabolitos secundários.

Foram desenvolvidos um conjunto de tarefas laboratoriais, articuladas entre si, procurando respostas sequenciais e cumulativas para os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito da natureza dos diferentes solventes no que respeita ao rendimento de extração dos compostos bioativos e, conseqüentemente, da atividade antioxidante dos respetivos extratos;
- Quantificar o teor em compostos fenólicos totais e flavonoides dos extratos obtidos;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos obtidos, utilizando duas metodologias diferentes e complementares (DPPH• e FRAP);
- Selecionar o método extrativo mais conveniente com base nos parâmetros avaliados.

4.1. Amostras

As amostras analisadas neste trabalho correspondem aos frutos maduros da espécie *Crataegus monogyna* Jacq. Durante a seleção da amostra teve-se o cuidado de manter controlados diversos fatores, tais como região de colheita, época de maturação do fruto e exposição à radiação solar. Durante o processo de colheita, os frutos foram colhidos de forma aleatória mas com abrangência por toda a copa da árvore.

Os frutos foram colhidos no litoral norte de Portugal, mais concretamente, no Porto em Setembro de 2012. Os frutos (figura 6) foram congelados e reservados ao abrigo da luz antes de serem devidamente triturados para a obtenção dos extratos.



Figura 6. Morfologia da baya de pilriteiro no momento da colheita (Parque da Cidade, Porto).

4.2. Extração dos compostos bioativos

De modo a estudar as condições ótimas de extração testaram-se diferentes misturas de solventes (diferentes polaridades), mantendo-se a temperatura e tempo de extração constante, ou seja, 40°C e 60 minutos, respetivamente.

Foram avaliados quatro extratos diferentes:

- extrato 100% aquoso;
- extrato 100% etanólico;
- extrato 100% metanólico;
- extrato hidroalcoólico (50% água e 50% etanol).

4.2.1. Preparação dos extratos da baga

Num estudo preliminar, procedeu-se à avaliação da melhor relação entre a massa de fruto e a quantidade de solvente. A relação 1:10 e 1:25 (m/v), não permitiram ter solvente suficiente para efetuar a extração, tendo-se optado por uma relação 1:50 (m/V) na extração dos compostos bioativos.

A extração foi efetuada em placa de aquecimento com agitação constante de 600 rpm e os extratos obtidos filtrados para posterior análise. Os extratos foram congelados a -25 °C até serem analisados.

4.3. Determinação de compostos bioativos

Na determinação dos compostos fenólicos incluíram-se os fenóis totais e os flavonoides. Na atividade antioxidante consideraram-se os métodos do DPPH• e FRAP conforme referido anteriormente.

Os métodos quantitativos apresentados neste trabalho são métodos espectrofotométricos que se baseiam em reações colorimétricas entre os compostos a quantificar e reagentes específicos. A absorvância dos cromóforos formados é proporcional à concentração dos compostos a quantificar. Para cada método, foi feita uma curva de calibração utilizando para o efeito concentrações diferentes do respectivo padrão, sendo a concentração dos compostos na amostra calculada por interpolação da recta. Os resultados são expressos em equivalentes de padrão.

4.3.1. Compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais dos diferentes extratos estudados foi efetuada por um método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin–Ciocalteu (RFC), segundo metodologia previamente descrita (Vinha *et al.*, 2013). Para elaborar a curva de calibração utilizou-se um padrão de ácido gálgico (figura 7).

Colocaram-se 500 µL de extrato num tubo de ensaio adicionando 2,5 mL de RFC diluído em água desionizada (1:10). Adicionaram-se 2,0 mL de carbonato de sódio para alcalinizar a solução e colocou-se em banho-maria a 45°C durante 15 minutos ao abrigo da luz.

Deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos. Efetuaram-se as leituras a 765 nm.

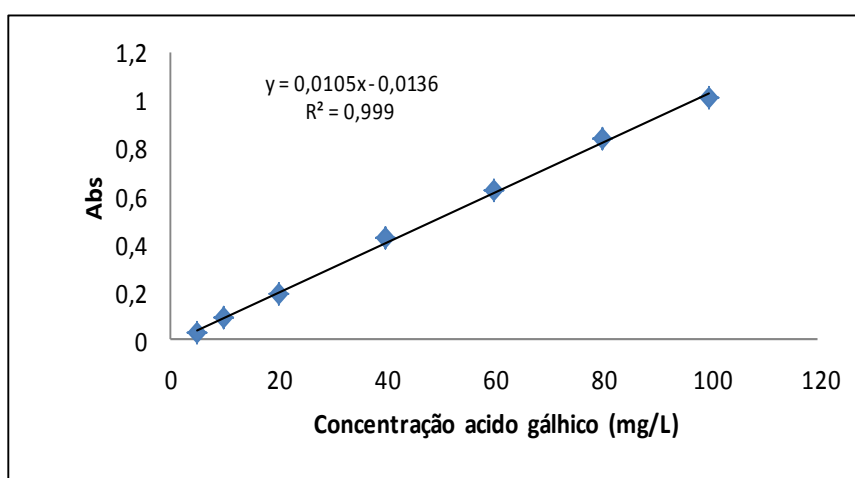


Figura 7. Curva de calibração de ácido gálgico, utilizada para determinar os compostos fenólicos totais dos diferentes extratos estudados.

4.3.2. Flavonoides totais

Os flavonoides totais foram determinados por um método espectrofotométrico seguindo uma metodologia previamente descrita (Barroso *et al.*, 2011) com ligeiras modificações. A técnica envolveu a medida da absorvência, a 510 nm, do complexo $AlCl_3$ -flavonoide,

utilizando a reta de calibração de epicatequina (figura 8), efetuada aquando das determinações.

Num tubo de ensaio colocou-se 1 mL de extrato, 4 mL de água destilada e 300 µL de nitrito de sódio a 25%. Após 5 minutos adicionaram-se 300 µL de AlCl₃ a 10% e aguardou-se 1 minuto. Adicionaram-se 2 mL de solução de hidróxido de sódio 1mol/L e 2,4 mL de água destilada. Agitou-se em vortex e efetuaram-se as leituras a 510 nm.

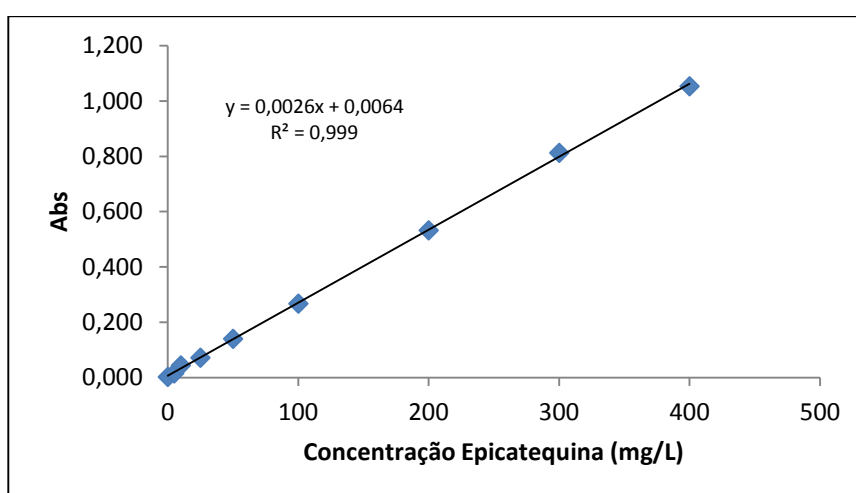


Figura 8. Curva de calibração de epicatequina, utilizada para determinar os flavonoides totais dos diferentes extratos estudados.

4.4. Atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante foram realizados dois ensaios, segundo metodologias previamente descritas (Benzie e Strain, 1996; Barroso *et al.*, 2011):

- determinação da capacidade de neutralização do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•);
- avaliação do poder antioxidante por redução do ião férrico (método FRAP).

4.4.1. Método DPPH'

Efetuar-se algumas alterações ao método descrito por Barroso et al. (2011). O método consistiu em adicionar a 14 µL de extrato, 186 µL de solução etanólica de DPPH' ($9,3 \times 10^{-5}$ mol/L), agitar e efetuar as leituras a 525 nm, de 10 em 10 minutos, até a reação estabilizar. Baixos valores de absorvência indicam maior capacidade de neutralizar radicais livres.

4.4.2. Método FRAP

O método consiste na redução do complexo Fe(III)/ferricianeto [$\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] a Fe(II), forma ferrosa, pela presença do composto antioxidante na solução.

Assim, determinou-se o poder antioxidante por redução do íon férrico, segundo metodologia previamente descrita (Benzie e Strain, 1996), utilizando-se uma curva de calibração de sulfato ferroso.

Num tubo de ensaio, colocaram-se 90 µl de extrato, 270 µl de água destilada e 2,7 ml de reagente FRAP (750 ml de tampão acetato 0,3 M, 75 ml solução TPTZ 10 mM e 75 ml cloreto férrico 20 mM).

Homogeneizou-se e colocou-se em banho-maria a 37 °C. Após 30 minutos efetuaram-se as leituras a 595 nm.

4.5. Análise estatística

Todas as análises químicas foram efectuadas em triplicado sendo o resultado final apresentado na forma de média \pm desvio padrão. A análise estatística foi efetuada usando o programa SPSS v. 21 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Na comparação estatística das amostras usou-se o teste análise de variância (ANOVA) seguido do teste post-hoc Tukey's HSD. Foram ainda utilizados testes de correlação de Pearson para avaliar a existência de relações entre os conteúdos de compostos bioativos e a atividade

antioxidante das diversas amostras. O nível de significância de todos os testes de hipóteses (p) foi de 0,05.

Os compostos bioativos existentes no reino vegetal possuem funções e ações biológicas importantes sendo, por isso, reconhecidos como compostos promotores para a saúde humana. Em diferentes regiões de Portugal, o fruto do pilriteiro é reconhecido por apresentar propriedades de prevenção e controlo de doenças crónicas, tais como, doenças cardiovasculares, arteriosclerose, artrite ou hipertensão. Alguns estudos documentam a utilização das flores e dos frutos no tratamento de doenças cardiovasculares e gastrointestinais. Os frutos são também utilizados em produtos alimentares processados, nomeadamente, enlatados, compotas, geleias e bebidas (Barros *et al.*, 2011).

Neste trabalho foram utilizados frutos maduros e cujo estágio de maturação se adequa para o seu consumo. As características da qualidade dos frutos está diretamente relacionada com o estado de maturação, condições de armazenamento e, acima de tudo, das condições edafo-climáticas existentes em cada área geográfica (Ahmed *et al.*, 2010; Vinha *et al.*, 2012). Para avaliar a relação entre os compostos bioativos (fenólicos e flavonóides) e o potencial antioxidante, foram feitas diferentes extrações recorrendo a solventes de baixa toxicidade (água e etanol). O metanol foi usado como solvente extrator de controlo uma vez que muitos dos estudos referem este solvente com maior capacidade extractiva, embora seja tóxico (Barros *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos referentes à quantificação dos fenólicos totais e flavonóides, extraídos por diferentes solventes encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1. Quantificação dos compostos antioxidantes (fenólicos e flavonóides) obtidos por diferentes solventes extractores.

Extratos	Fenólicos totais (mg/g)*	Flavonoides totais (mg/g)*
Aquoso	0,55±0,01 ^d	1,02±0,04 ^d
Hidroalcoólico	1,33±0,03 ^a	1,80±0,01 ^a
Etanólico	1,22±0,01 ^b	1,66±0,03 ^b
Metanólico	0,69±0,01 ^c	1,42±0,01 ^c

*Valores expressos em média ± desvio padrão, para n=3. **Valores com letras iguais na mesma coluna, considerando-se o solvente extrator, indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores das médias ($p>0,05$).

Os resultados mostraram diferenças significativas entre todos os solventes extractores para cada um dos compostos fitoquímicos estudados ($p < 0,05$). No entanto, e para uma melhor visualização e interpretação dos resultados, os teores de compostos bioactivos foram representados graficamente (figuras 9 e 10).

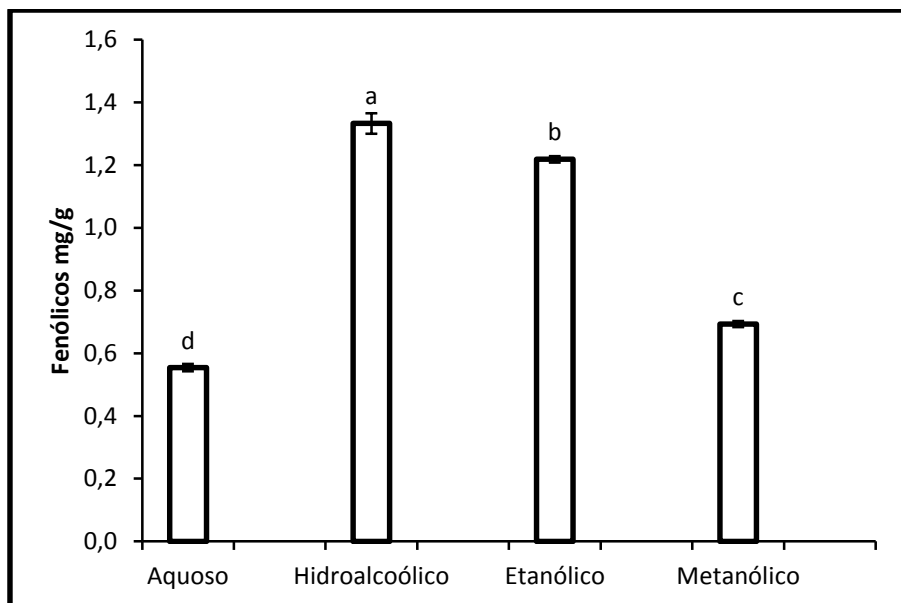


Figura 9. Teores de fenólicos totais (mg/g) quantificados no fruto inteiro do pilriteiro, obtidos por extração líquida recorrendo a diferentes solventes.

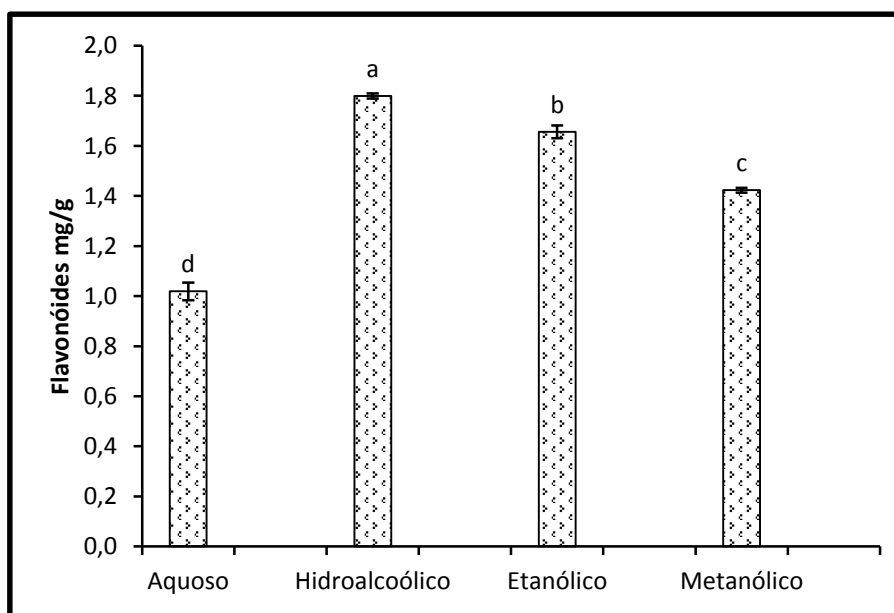


Figura 10. Quantificação do teor de flavonoides totais obtidos a partir dos diferentes extratos do fruto do pilriteiro.

Pelos resultados obtidos, verifica-se que o teor de compostos bioativos é superior no extrato hidroalcoólico, seguido do etanólico, metanólico e, por último, o aquoso. O teor de flavonóides foi significativamente superior do que o teor dos fenólicos, independentemente do solvente extrator analisado. No entanto, o extrato hidroalcoólico apresentou valores significativamente superiores para os fenólicos e flavonóides (1,33 mg/g e 1,80 mg/g, respectivamente).

O extrato etanólico, embora com valores inferiores aos do extrato hidroalcoólico, foi o segundo solvente com maior capacidade extratora com 1,22 mg/g de fenólicos totais e 1,66 mg/g de flavonóides. Ainda dentro dos solventes sem toxicidade, o extrato aquoso foi o solvente que apresentou os piores valores (0,55 mg/g e 1,02 mg/g, referentes aos fenólicos e flavonóides, respetivamente. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas para todos eles ($p < 0,05$).

As bagas do *Crataegus monogyna* apresentam pigmentação vermelha quando atingem a sua maturação. O amadurecimento de qualquer fruto promove um aumento da concentração de compostos antioxidantes, cujas propriedades benéficas já foram descritas previamente e, de entre os diferentes metabolitos secundários com essas propriedades, os mais importantes parecem ser os fenólicos, os flavonóides e os carotenóides, sendo que estes dois últimos são pigmentos naturais e responsáveis pela coloração dos frutos.

Arancibia-Avila et al. (2008) observaram teores de polifenóis totais, flavonóides e antocianinas significativamente superiores em diferentes frutos amadurecidos quando comparados com os verdes ou em fase de senescência. No entanto, a utilização dos flavonóides como fármaco ou suplemento alimentar no mercado deve direcionar os estudos para que seja comprovada uma utilização segura e eficiente dos mesmos, requerendo para isso de novas informações sobre os seus efeitos secundários, a biodisponibilidade em diferentes formas de administração e as doses necessárias, já que estes dados são imprescindíveis para a formulação de novos produtos. É primordial, realizarem-se estudos que englobem isolamentos, identificações, caracterização dos flavonóides e dos fitofármacos, os quais propiciem condições de tratamento que venham contribuir para a saúde pública (Buriol *et al.*, 2009).

É do conhecimento geral que os compostos bioativos não possuem a mesma actividade antioxidante, pelo que um aumento da concentração de um determinado composto não significa um aumento proporcional da actividade antioxidante (Sanjust *et al.*, 2008). Quando se procede a uma avaliação de um extrato complexo, independentemente da natureza do solvente extrator, é necessário considerarem-se os efeitos sinérgicos ou antagónicos entre os diversos compostos presentes, o que torna não só, a actividade antioxidante dependente da concentração de cada composto, mas também da interação entre os diferentes compostos. Não se deve excluir, a possibilidade de existência de outras moléculas presentes nos extratos e possam afetar a actividade antioxidante, como por exemplo os compostos terpénicos, alcalóides, cumarinas, entre outros.

Para comparar o potencial antioxidante dos diferentes constituintes antioxidantes (fenólicos e flavonóides) com solventes de baixa toxicidade foram realizados dois tipos de métodos: DPPH• (decréscimo na absorção do radical livre DPPH•) e o poder de redução FRAP. A determinação da actividade antioxidante de uma determinada amostra, *in vitro*, é realizada através de uma variedade de técnicas, sendo que as mais comuns são a DPPH• e a redução do ferro (FRAP) (Bernatoniene *et al.*, 2008).

Um dos papéis mais importantes dos compostos de natureza antioxidante é a sua actividade antioxidante, utilizando-se frequentemente esta propriedade para avaliar o seu potencial. O DPPH• é um radical livre estável capaz de aceitar um eletrão ou átomo de hidrogénio, tornando-se num não radical que dificilmente oxida. Devido a este eletrão desemparelhado e através da alteração da cor do radical livre, a mesma (violeta) vai descolorando à medida que o eletrão se emparelha. O aumento da actividade antioxidante é diretamente proporcional ao consumo e descoloração do DPPH•, uma vez que este reage com os compostos fenólicos e flavonóides, sequestradores de radicais livres (Magalhães *et al.*, 2008; Subtil *et al.*, 2009).

Por outro lado, o ensaio FRAP é caracterizado pela redução do complexo férrico ao estado ferroso, através de um oxidante, geralmente em pH ácido, havendo maior absorvência quanto maior a redução do ferro. Esta redução férrica é comum, por exemplo, na peroxidação lipídica (Magalhães *et al.*, 2008; Subtil *et al.*, 2009). Embora seja uma metodologia rápida e simples, apresenta algumas limitações, tais como

interferência com compostos redox, e, por outro lado, nem todos os antioxidantes possuem esta capacidade de redução, causando medições incorretas quanto às capacidades antioxidantes (Magalhães *et al.*, 2008; Subtil *et al.*, 2009).

A título de exemplo cita-se o estudo de Peschel *et al.* (2008), que recorreu ao método FRAP para avaliar a atividade antioxidante de alguns frutos portugueses. No estudo os autores evocaram, como desvantagem do método utilizado, o facto de não reagir rapidamente com alguns antioxidantes como a enzima glutathione (antioxidante endógeno). No entanto, os autores pensam que continua a ser um exame viável uma vez que apenas uma pequena quantidade de glutathione é absorvida, através das plantas, pelos humanos. Além disto, como Halvorsen *et al.* (*cit in* Peschel *et al.*, 2008) verificaram, podem ocorrer discrepâncias nos resultados quando este exame é utilizado, devendo-se a variáveis como a origem geográfica da planta ou o tempo de armazenamento das amostras. Estas alterações dependentes do armazenamento são confirmadas pelo estudo de Ljubincic *et al.* (2005) que demonstra uma alteração da capacidade antioxidante consoante esta variável.

No entanto, na discussão dos resultados é necessária ainda a avaliação da habilidade extratora dos meios solventes redutores (Augusti *et al.*, 2012). Assim, procedeu-se à avaliação dos métodos DPPH• e FRAP consoante o meio extrator estudado (tabela 2).

Tabela 2. Quantificação dos compostos antioxidantes existentes nas quatro amostras segundos o método DPPH• e FRAP.

Extratos	DPPH• (%)*	FRAP (mg/g)*
Aquoso	71.18±0.96 ^b	54.98±7.01 ^b
Hidroalcoólico	72.30±0.94 ^b	97.63±3.71 ^a
Etanólico	74.50±0.10 ^a	85.30±1.64 ^a
Metanólico	70.57±00.3 ^b	87.33±0.27 ^a

*Valores expressos em média ± desvio padrão, para n=3.

Uma vez mais, os resultados estão repetidos, em forma de figuras (11 e 12) para que sejam mais visíveis as diferenças encontradas entre as actividades antioxidantes obtidas para cada extrato analisado.

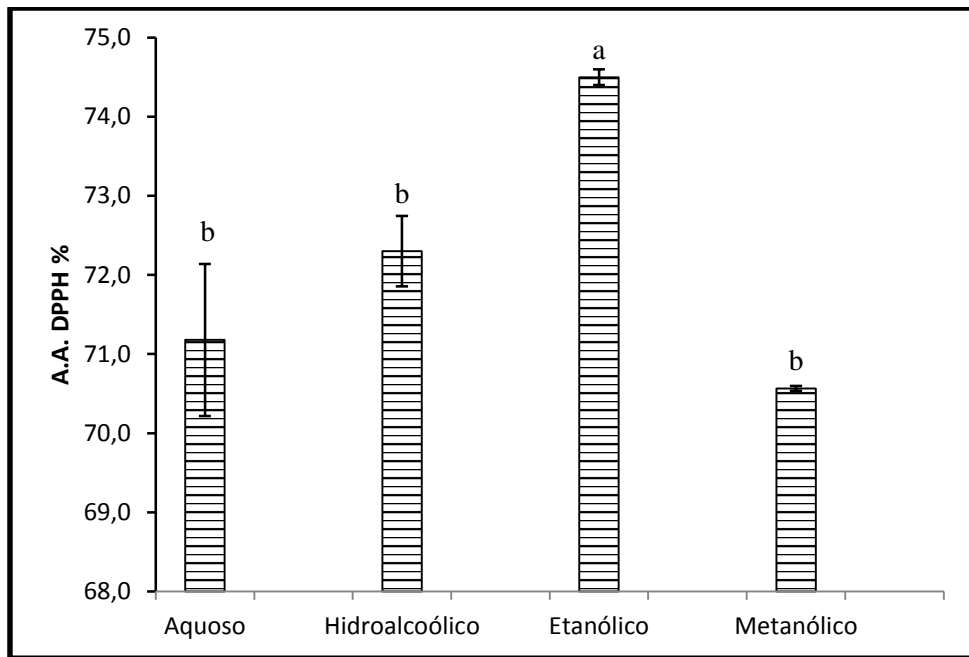


Figura 11. Resultados do método DPPH•, em percentagens, nos quatro meios extratores.

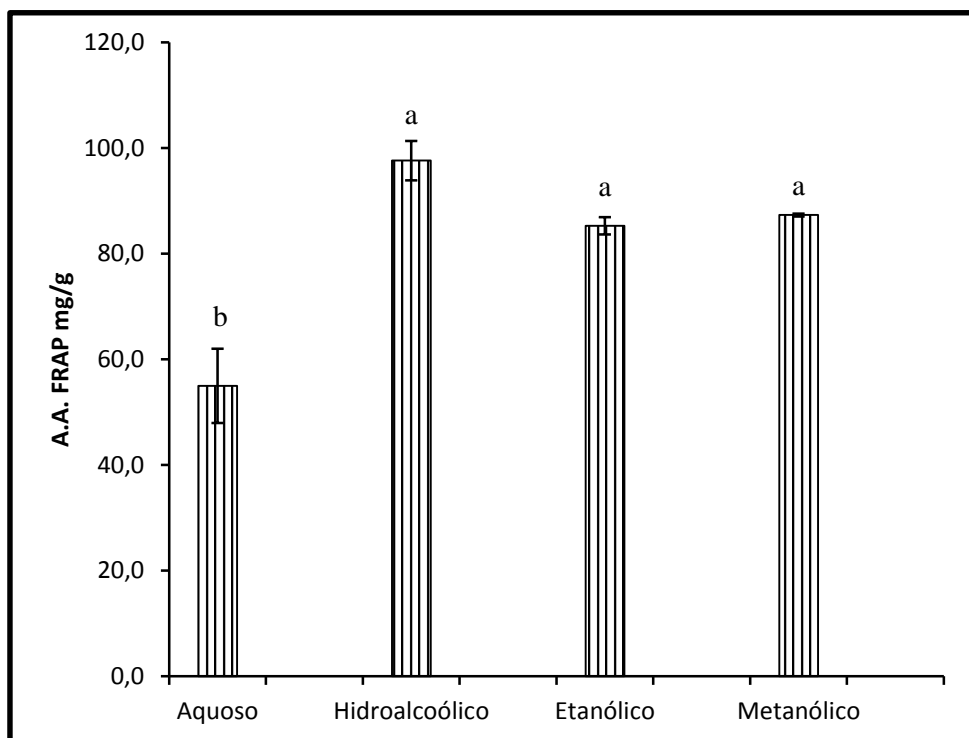


Figura 12. Resultados do método FRAP, em mg/g, nos quatro meios extratores.

A análise do gráfico da figura 12 demonstra que houve uma correlação positiva do método DPPH• entre os compostos fenólicos e a atividade anti-radical das amostras nos diferentes meios solventes. O solvente etanólico foi mais eficiente na eliminação de radicais livres e consequente identificação de antioxidantes (com uma média de 74,50%), logo seguido pelo meio hidroalcoólico (com uma média de 72,30%) e por fim o meio metanólico (com uma média de 70,57%).

Os dados obtidos encontram-se de acordo com o estudo de Belkhir et al. (2013), onde o método alcançou valores médios de 93% e o estudo de Bernatoniene et al. (2009), onde a capacidade “scavenger” alcançou os $82,04 \pm 0,72\%$ após a estabilização da reação. Segundo ainda o estudo de Barros et al. (2011), a média obtida no meio etanólico foi de $89,8 \pm 0,6\%$ e de $75,1 \pm 1,3\%$ no meio aquoso. Já no estudo Bahorun et al. (2008) os resultados foram um pouco inferiores, com os dados a variarem entre os $50 \pm 0,5\%$ e $20 \pm 0,3\%$ no meio etanólico e aquoso, respectivamente. No estudo de Dornas et al. (2007) foram obtidos resultados similares, com o método DPPH• a identificar mais compostos antioxidantes nos extratos etanólicos, embora o meio aquosos tenha também obtido resultados satisfatórios.

Já no método FRAP, o solvente que mostrou maior capacidade de redução férrica foi o hidroalcoólico, com uma média de $97,63 \pm 3,71$ mg/g, seguido pelo extrato metanólico com $87,33 \pm 0,27$ mg/g e por último o meio aquoso, com um valor bastante inferior ao metanólico, $54,98 \pm 7,01$ mg/g.

Segundo o estudo de Belkhir et al. (2013), o método FRAP é rápido e vulgarmente utilizado como análise de rotina, com a observação de várias amostras em pouco tempo e os compostos fenólicos, neste estudo, num meio solvente aquosos, rondaram os 92 mg/g, mostrando a sua capacidade de identificação de radicais livres. O estudo de Peschel et al. (2008) recorreu ao método FRAP para a avaliação da atividade antioxidante de alguns frutos portugueses e apontou como desvantagem deste método as discrepâncias nos resultados de amostras com tempos de armazenamento diferentes, facto confirmado pelo estudo de Ljubincic et al. (2005).

A capacidade antioxidante das frutas e flores da *C. monogyna* é atribuída, principalmente, aos compostos bioativos encontrados na sua constituição, nomeadamente dos flavonoides e fenólicos. A sua ação passa pela inibição e eliminação de radicais livres como o peróxido de hidrogénio, os hidroxilos ou o peróxido lipídico, e inibem mecanismos oxidativos responsáveis pelo aparecimento de diversas patologias (Bernatoniene *et al.*, 2009). Os efeitos positivos do espinheiro na saúde humana estão principalmente relacionados com a quantidade de compostos antioxidantes, especialmente flavonoides e fenólicos, compostos sempre presentes na baga e flores (Samec e Zegarac, 2011).

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo humano. As frutas, principalmente as que apresentam a coloração vermelha/azul, como é o caso do fruto do *Crataegus monogyna*, são as fontes exógenas mais importantes de compostos fenólicos, mais concretamente, derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico dentre estes citam-se: as antocianinas, os flavonóis, as catequinas e os taninos (hidrolisados ou condensados).

Em estatística descritiva, o coeficiente de correlação de *Pearson* mede o grau de correlação (e a direção deste, se positivo ou negativo) entre duas variáveis da escala métrica em que o coeficiente assume valores entre -1 e 1 (-1 significa uma correlação negativa perfeita entre as duas variáveis, ou seja, se uma aumenta a outra diminui enquanto o 1 uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis).

Dos compostos polares analisados observou-se uma forte correlação entre os teores de fenólicos totais e de flavonóides dos diferentes extratos e a atividade antioxidante avaliada pelos dois métodos supracitados.

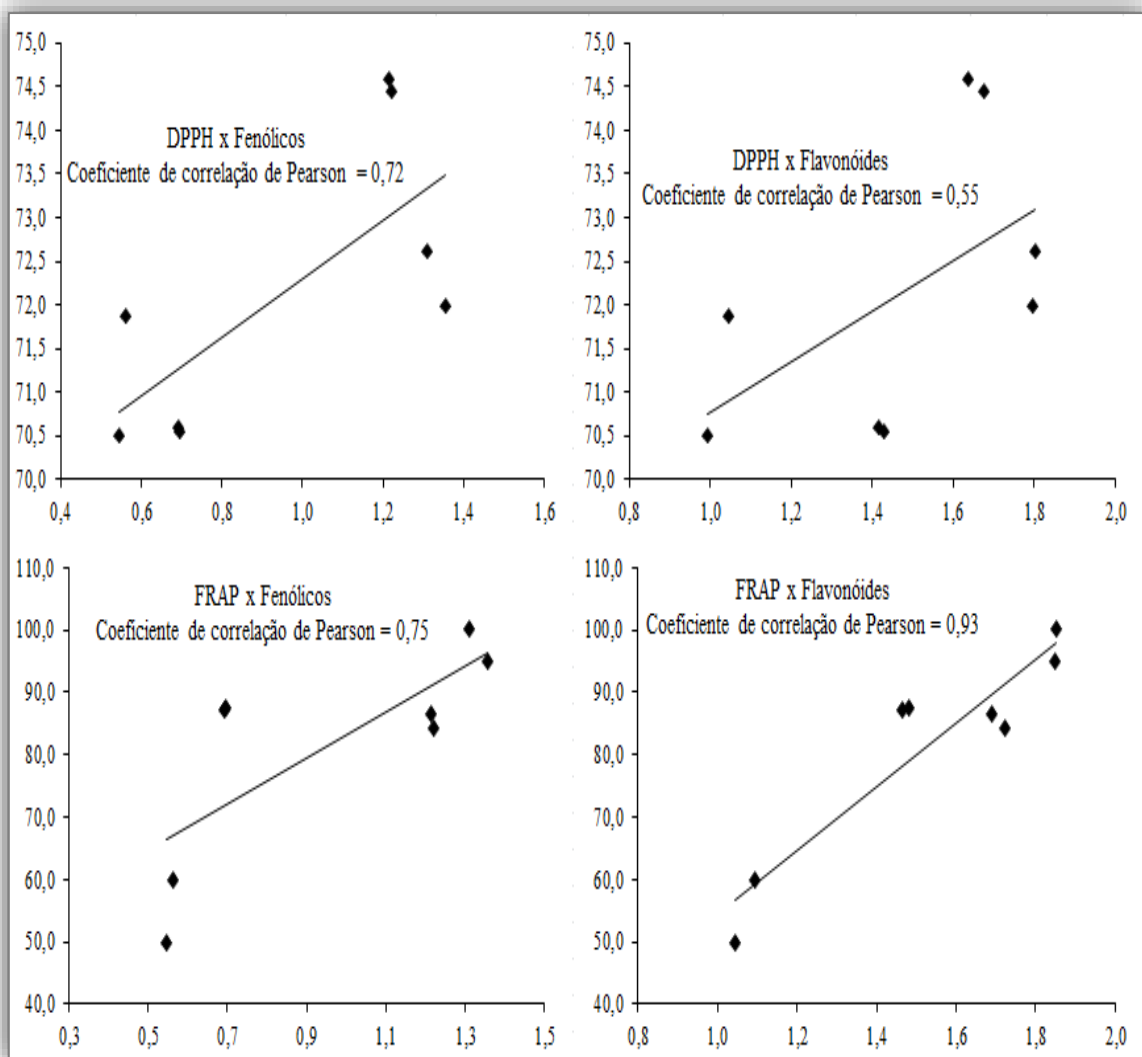


Figura 13. Correlação de Pearson obtidas para avaliar os métodos antioxidantes (DPPH• e FRAP) com os teores de compostos bioativos.

Pela figura 13 consegue-se observar uma correlação positiva entre as duas variáveis estudadas, ou seja, entre os compostos bioativos e os métodos antioxidantes. Atendendo às estruturas químicas destes compostos, verifica-se, uma vez mais, que é de elevada importância analítica recorrer-se a mais do que um método antioxidante para comprovar a eficácia dos compostos bioativos. Exemplo disso é o caso dos flavonoides que apresentam maior correlação com o método FRAP (0,93) enquanto os fenólicos exercem maior atividade antioxidante pelo método do DPPH• (0,72).

O método FRAP pareceu ser mais eficaz na identificação de antioxidantes quando comparado com o de DPPH•, principalmente na identificação de flavonóides, com um coeficiente superior ($p = 0,93$), logo seguido pelo método FRAP nos fenólicos ($p = 0,75$). O método DPPH• obteve um resultado similar ao FRAP na identificação de fenólicos ($p = 0,72$) e o pior resultado na determinação de flavonóides ($p = 0,55$).

Segundo um estudo realizado por Ozcan *et al.* (2005), o método FRAP apresentou maior correlação com os fenólicos ($p = 0,96$) e significativamente inferior para os flavonóides ($p = 0,73$), dados contraditórios com este trabalho, no entanto, o mesmo autor realça que o efeito antioxidante de uma planta pode derivar dos efeitos sinérgicos existentes entre os diferentes compostos fenólicos.

Tendo em atenção dos compostos antioxidantes nos diferentes meios de extração, foi observado que tanto os compostos fenólicos como os flavonóides são identificadas com maior precisão nos meios de extração hidroalcoólico, logo seguido pelo etanólico e estando o meio aquoso em desvantagem em qualquer um dos exames usados, embora seja efetivo. No estudo de Barros *et al.* (2011), por exemplo, os meios solventes etanólicos tinham uma efetividade superior aos aquosos (Barros *et al.*, 2011).

No entanto, na discussão dos resultados é necessária ainda a avaliação da habilidade extratora dos meios solventes redutores (Augusti *et al.*, 2012). Os compostos ativos existentes nas plantas são extraídos, quase sempre, utilizando os métodos de extração por solvente. O solvente utilizado é, normalmente, uma mistura de álcool e água, no rácio necessário que se pense ser ótimo para a extração de um determinado composto, num determinado estudo. No entanto, tal acaba por dificultar a seletividade durante o processo de extração, uma vez que há muito poucos parâmetros ajustáveis (Shortle *et al.*, 2013). Um dos principais problemas na indústria química e farmacêutica é a utilização sistemática de solventes orgânicos, muitos dispendiosos e com elevada toxicidade para a saúde pública. Atualmente, a substituição destes solventes por outros meios aquosos permite minimizar o impacto ambiental, o custo e a toxicidade (Cerqueira *et al.*, 2007).

Cai et al. (*cit in Bernatoniene et al., 2008*) estudou 112 plantas medicinais tradicionais chinesas utilizando o metanol e a água como solventes extratores e o estudo de (*Bernatoniene et al., 2008*) utilizou o etanol e a água como extratores uma vez que são frequentemente usados na produção das preparações líquidas das frutas do espinheiro, infusões ou extratos, por exemplo (*Bernatoniene et al., 2008*). Em adição a estes aspetos económicos, a água apresenta propriedades químicas ideais, tais como: alta polaridade; a capacidade de formação de ligações de hidrogénio. Além disso, os avanços nos estudos mostram que diversos tipos de reação se comportam de maneira diferente quando em solução aquosa, podendo ter rendimentos e velocidades de reação superiores ou seletividades maiores explicados pelos efeitos da polaridade hidrofóbica. Estes, além dos aspetos económicos (custo reduzido) e ambientais (ausência de toxicidade), são um dos principais motivos para a utilização dos meios aquosos (*Cerqueira et al., 2007*).

Dornas et al. (2007) avaliou o potencial antioxidante em diferentes partes do espinheiro recorrendo a diferentes solventes com baixa toxicidade (água e etanol) e concluiu que estes solventes apresentam uma rentabilidade similar aos tradicionais solventes orgânicos usados (metanol, clorofórmio, acetonitrilo). Ambos os meios solventes, etanólico e aquoso, apresenta capacidade extratora de compostos antioxidantes, embora o primeiro pareça alcançar melhores resultados (*Bernatoniene et al., 2008*).

As diferenças obtidas na identificação dos antioxidantes nos diferentes meios solventes dependem, muitas vezes, das diferentes polaridades do meio ou da mistura destas duas variáveis (*Kóstic et al., 2012*). Os flavonóides, por exemplo, são mais facilmente extraídos em meios polares como o etanol enquanto os ácidos e os açúcares pelos extratos aquosos (*Edwards et al., 2012*).

Embora tenham sido encontradas diferenças na atividade antioxidante nos diferentes meios solventes e consoante o exame utilizado, os resultados refletem uma correlação profunda e positiva entre os testes utilizados e os conteúdos antioxidantes, embora os solventes etanólicos pareçam obter melhores resultados do que os aquosos (*Barros et al., 2011*).

Este trabalho visou enfatizar uma espécie autóctone Portuguesa, de fácil reprodução, importância para a fauna selvagem, distribuição no país, representatividade do ecossistema que ocupam, interesse para espaços urbanos, entre muitos outros. *C. monogyna* Jacq. é uma planta bravia de pouco uso. O fruto (pilrito), pela sua natureza em compostos fitoquímicos e atividade antioxidante, provou ser um produto subvalorizado que pode e deve ser utilizado nas indústrias alimentar e farmacêutica.

O processo extrativo dos compostos fitoquímicos é uma das condicionantes do subaproveitamento dos recursos naturais. A constante procura de solventes de elevada eficácia e baixa toxicidade, torna-se um desafio. Por outro lado, a necessidade de minimizar impactos negativos no ambiente e promover maior poupança de gastos nas indústrias crescem ao rol de razões supracitadas. Este trabalho tentou validar o melhor solvente extrator de fitoquímicos tendo em atenção esses fatores. A água, o etanol e o metanol foram os solventes puros utilizados. Os resultados obtidos nesta investigação indicam-nos que a planta *C. monogyna* deverá ser aproveitada quer para a indústria alimentar, quer para a indústria farmacêutica devido à sua elevada composição em antioxidantes, obtendo-se assim vantagens de ordem terapêutica e económica.

Embora o interesse nas propriedades desta planta, os estudos *in vitro* são ainda escassos, principalmente os que tentam identificar o melhor meio solvente para a extração da mesma. Neste estudo podemos concluir que o meio hidroalcoólico é a melhor escolha como solvente de extração como se pode comprovar pelo método FRAP. Esta escolha também se deve ao facto de este solvente apresentar uma baixa toxicidade e ter um custo mais baixo em comparação ao meio etanólico, que apresentou o melhor resultado no método DPPH*.

Espera-se num futuro próximo, um maior esforço nesta área de pesquisa para que se possa confirmar o meio hidroalcoólico como o mais adequado, uma vez que houve incongruência nos resultados. Sendo necessárias mais investigações clínicas expressivas da utilização do meio hidroalcoólico como meio extrator, assim como a elaboração de guias e compreensão total da sua ação.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed DM, Yousef ARM, Hassan HSA. (2010). Relationship between electrical conductivity, softening and color of Fuerte avocado fruits during ripening. *Agriculture and Biology Journal North America*, 1(5): 878-885.
- Ájila, C. *et al.* (2007). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, 105, pp. 982-988.
- Arancibia-Avila et al (2008). Antioxisant properties of durian fruit as influenced by ripening. *LWT-Food Science and Technology*, 41: 2118-2125.
- Arya, V., Thakur, N. (2012). Standardization of haw fruits. *American-Asian Journal of Scientific Research*, 7 (1), pp. 16-22.
- Augusti, K. *et al.* (2012). A rethinking on the benefits and drawbacks of common antioxidants and a proposal to look for the antioxidants in allium products as ideal agents: a review. *Indian Journal of Clinical and Biochemistry*, 27 (1), pp. 6-20.
- Bahorun, T. *et al.* (1994). Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Planta Med.*, 60(4), pp. 323-328;
- Bahorun, T. *et al.* (2008). Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. *Food*, 3, 191-198;
- Bandaranayake, W. (2006). *Quality Control, Screening, Toxicity, and Regulation of Herbal Drugs*. In: *Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drug*. Edited by I. Ahmad, F. Aqil, and M. Owais. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp. 25-57.
- Barros, L., Carvalho, A., Ferreira, I. (2011). Comparing the composition and bioactivity of *Crataegus Monogyna* flowers and fruits used in folk medicine. *Phytochemical Analysis*, 22, pp.181-188.
- Barroso, M. *et al.* (2011). Flavored waters: influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HS-SPME/GC-MS. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 59, pp. 5062-5072.

- Belkhir, M. *et al.* (2013). Comparative analysis of Tunisian wild *Crataegus azarolus* (Yellow Azarole) and *Crataegus monogyna* (Red Azarole) leaf, fruit and traditionally derived syrup: phenolic profiles and antioxidant and antimicrobial activities of the aqueous-acetone extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, pp. 9594-9601.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”. The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, pp. 70-76.
- Bernatoniene, J. *et al.* (2008). Free radical-scavenging activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Medicina*, 44 (9), pp. 706-711.
- Bernatoniene, J. *et al.* (2009). The comparison of anti-oxidative kinetics in vitro of the fluid extract from maidenhair tree, motherwort and hawthorn. *Acta Poloniae Pharmaceutica and Drug Research*, 66 (4), pp. 415-421.
- Blatt, Y. *et al.* (2002). Microencapsulated and controlled release herbal formulations. US 6340478 B1.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C. (1997). Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Food Science Technology*, 30(6), pp. 609-615.
- Borges, L. *et al.* (2011). Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera*, 7 (12), pp.1-21.
- Buriol, L. *et al.* (2009). Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Química Nova*, 32 (2), pp. 296-302.
- Cerqueira, F., Medeiros, M., Augusto, O. (2007). Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, 30 (2), pp. 441-449.
- Dauqan, E., Abdullah, A., Sani, H. (2011). Natural antioxidants, lipid profile, lipid peroxidation, antioxidant enzymes of different vegetable oils. *Advance Journal Food Science Technology*, 3(4), pp. 308-316.

- Dornas, W. *et al.* (2007), Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28 (3), pp. 241-249;
- Edwards, J. *et al.* (2012). A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Photochemistry*, 79, pp.5-26.
- Egea, I. *et al.* (2010). Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. *Plant Foods Hum Nutr.*, 65(2), pp.121-129.
- El-Diwani, G., El-Rafie, S., Hawash, S. (2009). Protection of biodiesel and oil from degradation by natural antioxidants of *Egyptian Jatropha*. *International Journal Environmental Science Technology*. 6(3): 369-378.
- Ferreira, I., Abreu, R. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise - Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde*, 2, pp. 32-39.
- Guo, C. *et al.* (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23, pp. 1719-1726.
- Hamid, A. *et al.* (2010) Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal Pure Applied Chemistry*. 4(8), pp. 142-151.
- Jalili, A., Hasanzadeh, S. (2013). *Crataegus monogyna* fruit aqueous extract as a protective agent against doxorubicin-induced reproductive toxicity in male rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 3(2), pp. 159-170.
- Kaur, C., Kapoor, H. (2002). Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal Food Science Technology*, 37, pp. 153-161.
- Keser, S. *et al.* (2013). Hydrogen peroxide radical *scavenging* and total antioxidant activity of hawthorn. *Chemistry Journal*, 2 (1), pp. 9-12.
- Kóatic, D. *et al.* (2012). Phenolic content, and antioxidant and antimicrobial activities of *Crataegus Oxyacantha* L (*Rosaceae*) fruit extract from southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(1), pp.117-124.
- Kumar, D. *et al.* (2012). The fenus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspective. *Revista Brasileira de Farmacologia*, 22 (5), pp. 1187-1200.

- Leja, M. *et al.* (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, 100, pp. 237-240.
- Liu, T., Cao, Y., Zhao, M. (2010). Extraction, optimization, purification, and antioxidant activity of procyanidins from hawthorn (*C. pinnatifida* Bge. Var. major) fruits. *Food Chemistry*, 119, pp. 1656-1662.
- Ljubincic, P. *et al.* (2005). Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, pp. 153-161.
- Magalhães, M. *et al.* (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytical Chemical Acta*, 613, pp. 1-19.
- Messias, K. (2009). Os antioxidantes. *Food Ingredient Brasil*, 6, pp. 16-31.
- Nascimento, D. *et al.* (2009). Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico contendo *Passiflora incarnata* L., *Crataegus oxyacantha* L., *Saliz alba* L. em voluntários saudáveis. *Revista Brasileira de Farmacologia*, 19 (1), pp. 261-268.
- Oliveira, O.W., Petrovick, P.R. (2010). Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(4), pp. 641-650.
- OMS (2005). Estratégia de la OMS sobre medicina tradicional. [Em linha]. Disponível em <<http://www.amhb.org.br/media/estrategia.pdf>>. [Consultado a 10 de fevereiro 2013];
- Özcan, M. *et al.* (2005). Hawthorn (*Crataegus spp.*) fruit: some physical and chemical properties. *Journal of Food Engineering*, 69, pp. 409-413.
- Özyürek, M. *et al.* (2012). Evaluation of antioxidant activity of *Crataegus Species* collected from different regions of Turkey. *Records of Natural Products*, 6 (3), pp. 263-277.
- Palanisamy, U. *et al.* (2011). Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. *Food Chemistry*, 127(1), pp. 21-27.

Peschel, W., Bohr, C., Plescher, A. (2008). Variability of total flavonoids in *Crataegus* factor evaluation for the monitored production of industrial starting material. *Fitoterapia*, 79, pp. 6-20.

Pickering, J. (2004). Discover life. [Em linha]. Disponível em <<http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Crataegus>>. [Consultado em 16.08.2013];

Reffat, A. *et al.* (2010). Phytochemical and biological activities of *Crataegus sinaica* growing in Egypt. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, pp.257-261.

Rodrigues, S. *et al.* (2012). Flores e frutos imaturos de *Crataegus monogyna* revelam elevado potencial antioxidante. [Em linha]. <<https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/7962/4/Poster%20Nac.%2086.pdf>>. [Consultado a 1-10-2013].

Samec, D., Zegarac, J. (2011). Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures – comparison with blackberries, white and red grapes. *Scientia Horticulturae*, 131, pp. 15-21.

Saway, Y. *et al.* (2005). Effects of structure on radical-scavenging abilities and antioxidative activities of tea polyphenols: NMR analytical approach using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(9), pp. 3598-3604.

Shortle, E. *et al.* (2013). Optimization of process variables for antioxidant components from *Crataegus monogyna* by supercritical fluid extraction (CO₂) using Box-Behnken experimental design. *The Journal of Supercritical Fluids*, 81, pp.112-118.

Sousa, C. *et al.* (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30, pp. 351-355.

Souza, C.R.F. Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e económica do processo em leite de Jorro. Tese de Doutorado, 2007, Ribeirão Preto, Brasil.

Subtil, E., Mierzwa, J., Hespanhol, I. (2009). Avaliação do desempenho do sistema UV/H₂O₂ no tratamento de efluentes provenientes do processo de tratamento térmico de emulsões de água e óleo. *Revista Ambiente e Água*, 4 (3), pp. 169-180.

Tadic, V. *et al.* (2008). Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of Hawthorn berries ethanol extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 7700-7709.

Vinha, AF. *el al.* (2012a). Chemical composition and antioxidante activity of Portuguese diospyrus kaki fruit by geographical origins. *Journal of Agricultural Science*, 4(2), pp. 281-289.

Vinha, AF. *el al.* (2012b). Phytochemical characterization and radical scavenging activity of aqueous extracts of medicinal plants from Portugal. *European Journal of Medicine Plants*, 2(4), pp. 335-347.

Vinha, AF. *el al.* (2013). Influence of the storage conditions on the physicochemical properties, antioxidant activity and microbial flora of different tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cultivars. *Journal of Agricultural Science*, 5 (2), pp. 118-128.